รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การผลิตโพลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติจากจุลินทรีย์

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.สังศรี กุลปรีชา

จฬ
วท 15
008031
2538

การผลิตโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติจากจุลินทรีย์

Production of Biodegradable Polymers from Microorganism

โดย

รศ.ดร.ส่งศรี กุลปรีชา

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการนี้ ได้รับการอุดหนุนทุนวิจัยจาก

เงินทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2538

I16707684

บทคัดย่อ

ปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ Alcaligenes sp. A-04 เพื่อผลิตโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ (Poly-β-hydroxybutyrate หรือ PHB) ได้แก่ สภาวะความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 7.0 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายเท่ากับ 100% อุณหภูมิเท่ากับ 30°ซ ภายใต้สภาวะที่จำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร ปริมาณฟรุคโตสเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณ 47% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อปรับปรุงการเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อ Alcaligenes sp. A-04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้ผลว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร ฟรุคโตสเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณเพิ่มขึ้นถึง 82.12% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (7.21 กรัมต่อลิตรของน้ำหมัก) เมื่อเปรียบเทียบสมบัติของไบโอโพลีเมอร์ (ได้แก่ PHB และโคโพลีเมอร์) กับสมบัติของปิโตรโพลีเมอร์ พบว่า สมบัติเชิงกลของไบโอโพลีเมอร์ เช่น ค่าความเหนียว และ ค่าการต้านแรงดึง ต่ำกว่าของปิโตรโพลีเมอร์ สมบัติของไบโอโพลีเมอร์ชนิดต่าง ๆ จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด และ ปริมาณของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ..... ก

สารบัญ..... ข

สารบัญรูป..... ค-จ

สารบัญตาราง..... ฉ-ช

คำย่อ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 วิธีดำเนินการวิจัย..... 6

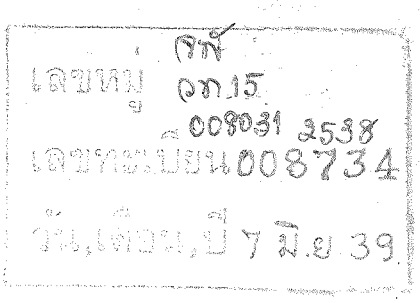
3 ผลการวิจัย..... 18

4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 61

รายการอ้างอิง..... 66

ภาคผนวก..... 70

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้าง PHA	2
2	ภาพตัดของเซลล์ *Alcaligenes eutrophus* จากกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน แสดง PHB แกรนูลภายในเซลล์.....	4
3	สูตรโครงสร้างของ PHB	5
4	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อต่างชนิดกัน.....	19
5	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ แล้วใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับการผลิต PHB ในขวดเขย่า.....	24
6	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ แล้วใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับการผลิต PHB ในถังหมัก.....	27
7	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ และใช้อาหาร MSM เป็นอาหารสำหรับการผลิต PHB ในขวดเขย่าและในถังหมัก.....	29
8	ค่า pH ของน้ำหมักที่เวลาต่าง ๆ กัน เมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ต่างกัน.....	31

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

9 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 5.0 1.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร 37

10 ปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักเมื่อมีปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร แปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร..... 39

11 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 0.3 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร..... 43

12 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 20.0 กรัม/ลิตร แปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 1.0 และ 1.5 กรัม/ลิตร..... 47

13 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 30.0 กรัม/ลิตร เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร..... 51

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

14 เปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิตขึ้น โดยแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต และเพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตสให้เพียงพอสำหรับการเติบโต และการผลิต PHB ดังนี้
แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 และ 0.3 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร
แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 20.0 กรัม/ลิตร
แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 30.0 กรัม/ลิตร.... 53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างจีนัสของจุลินทรีย์ ที่สร้างและสะสม PHB.....	4
2	น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของ *Alcaligenes* sp. A-04 ใสอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2.....	21
3	น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ แล้วใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับผลิต PHB ในขวดเขย่า.....	23
4	น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ แล้วใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับผลิต PHB ในถังหมัก.....	26
5	ค่า pH ของน้ำหมักที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของ แอมโมเนียมซัลเฟต ต่างกัน.....	32
6	ปริมาณออกซิเจนในน้ำหมัก เมื่อแปรผันอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ เมื่อควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30°ซ.....	33
7	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB และปริมาณฟรุคโตส เมื่อแปรผันปริมาณฟรุคโตส 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร.....	38

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8	เปรียบเทียบปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะของ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักเมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร แปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร.....	40
9	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB และปริมาณฟรุคโตส เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.1 0.3 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร โดยให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร.....	44
10	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB และปริมาณฟรุคโตส เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.5 1.0 และ 1.5 กรัม/ลิตร โดยให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร.....	48
11	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB และปริมาณฟรุคโตส เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร โดยให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 30.0 กรัม/ลิตร.....	52
12	เปรียบเทียบปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะ เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1-2.0 กรัม/ลิตร และเพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตสเป็น 10.0-30.0 กรัม/ลิตร เพื่อให้เพียงพอสำหรับการเติบโต และการผลิต PHB	54

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

13 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย และค่า [n] ของสาร PHB ที่ผลิตจาก Alcaligenes sp. A-04 และสารมาตรฐาน P(3HB-14%3HV)..... 56

14 อุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) และ glass transition temperature (Tg) ของสารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก Alcaligenes sp. A-04 ได้แก่ PHB P(3HB-97%3HV) และ สารมาตรฐาน P(3HB-14%3HV)..... 57

15 เปรียบเทียบสมบัติเชิงกลของไบโอโพลีเมอร์ P(3HB-97%3HV) และ PHB ที่ผลิตจาก Alcaligenes sp. A-04 และ สารมาตรฐาน P(3HB-14%3HV) กับโพลีเมอร์จากปิโตรเคมี PP และ PE 60

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

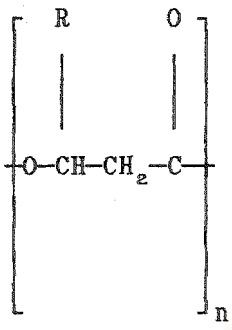
ชม	=	ชั่วโมง
°ซ	=	องศาเซลเซียส
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
%	=	ร้อยละ
M	=	โมลาร์
mM	=	มิลลิโมลาร์
pH	=	ค่าความเป็นกรดด่าง
PHB	=	โพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท (poly-β-hydroxybutyrate)
ppm	=	part per million
vvm	=	ปริมาตรอากาศ ต่อ ปริมาตรน้ำหมัก ต่อ นาที
v/v	=	หน่วยปริมาตร ต่อ หน่วยปริมาตร
w/v	=	หน่วยน้ำหนัก ต่อ หน่วยปริมาตร
μ	=	อัตราการเจริญจำเพาะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันการรักษาสภาวะแวดล้อมมีความสำคัญ และมีการให้ความสนใจกันเป็นอย่างมาก พลาสติกเป็นปัญหากับสิ่งแวดล้อมมาช้านาน เพราะมีการนำมาใช้ทำสิ่งของเครื่องใช้ รวมทั้งภาชนะบรรจุที่ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน แต่การนำกลับมาใช้ใหม่ หรือการทำลายอย่างถูกวิธีมีขั้นตอนและปัญหาในทางปฏิบัติ พลาสติกที่กล่าวถึงนี้ส่วนใหญ่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก และมีราคาถูก เช่น โพลีโพรไพลีน (polypropylene PP) โพลีเอทธิลีน (polyethylene PE) หรือ โพลีไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride PVC) พลาสติกดังกล่าวล้วนก่อให้เกิดปัญหาด้านการตกค้าง และการกำจัดซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่ปัญหาสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันนี้แม้ว่าจะมีการผลิตถุงพลาสติกที่สามารถสลายได้โดยแสงอาทิตย์ หรือรังสีอุลตราไวโอเลต (ultraviolet UV) ก็มิได้ลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้มากนัก เพราะยังมีส่วนของพลาสติกที่ไม่สามารถสลายได้กระจัดกระจาย และตกค้างอยู่ ดังนั้นถ้ามีการทดแทนพลาสติกดังกล่าวด้วยพลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ (biodegradable plastic)ก็จะทำให้ลดปัญหาในด้านดังกล่าวนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Evan และ Sikdar,1990) สารโพลีเอสเทอร์บางชนิดที่ผลิตได้และสะสมไว้ในเซลล์จุลินทรีย์ มีสมบัติใกล้เคียงกับสมบัติของพลาสติกในกลุ่ม PP PE และ PVC สารดังกล่าวคือ สารในกลุ่มโพลีเบต้าไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (poly-β-hydroxyalkanoates หรือ PHAs) ดังรูปที่1 ตัวอย่างเช่น โพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท (poly-β-hydroxybutyrate หรือ PHB) และโพลีเบต้าไฮดรอกซีวาลีเรท (poly-β-hydroxyvalerate หรือ PHV) สารโพลีเมอร์ดังกล่าวมีสมบัติเป็นวัสดุพลาสติกที่ขึ้นรูป และย่อยสลายได้ในธรรมชาติ (biodegradable thermoplastic material) โดยเอนไซม์ดีโพลีเมอเรสที่มีอยู่ในจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ และให้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสภาวะแวดล้อม เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก (Evan และ Sikdar,1990 ; Howells,1982)



รูปที่ 1. สูตรโครงสร้าง PHA (monomer)

จากรูปที่ 1.

เมื่อ R คือหมู่เมทธิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท (β-hydroxybutyrate)

เมื่อ R คือหมู่เมทธิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีวารีเรท (β-hydroxybutyrate)

เมื่อ R คือหมู่โพรพิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีคาโพรเอท (β-hydroxycaproate)

เมื่อ R คือหมู่บิวธิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีเฮปตาโนเอท (β-hydroxyheptanoate)

เมื่อ R คือหมู่เพนธิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีออกตาโนเอท (β-hydroxyoctanoate)

เมื่อ R คือหมู่เฮกซิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีโนนาโนเอต (β-hydroxynonanoate)

เมื่อ R คือหมู่เฮปทิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีเดกคาโนเอท (β-hydroxydecanoate)

เมื่อ R คือหมู่ออกทิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีอันเดกคาโนเอท (β-hydroxyundecanoate)

เมื่อ R คือหมู่โนนิล สารนี้คือ เบต้าไฮดรอกซีโดเดกคาโนเอท (β-hydroxydodecanoate)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PHA

PHA เป็นโพลีเมอร์ที่มีหน่วยย่อย (monomer) ในสายโพลีเมอร์เป็นสารจำพวกอัลเคน โดยทั่วไปแบ่ง PHA ได้เป็นสองชนิดคือ ชนิดแรกได้แก่ โฮโมโพลีเมอร์ (homopolymer) หมายถึง โพลีเมอร์ที่มีหน่วยย่อยในสายโพลีเมอร์เพียงชนิดเดียว ตัวอย่างเช่น PHB เป็นต้น ชนิดที่สองได้แก่ เฮทเทอโรโพลีเมอร์ (heteropolymer) คือโพลีเมอร์ที่มีหน่วยย่อยในสายโพลีเมอร์มากกว่าหนึ่งชนิด ตัวอย่างเช่น โคโพลีเมอร์ของ 3HB และ 3HV (P(3HB-co-3HV)) เป็นต้น PHA ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหาร ในสภาวะที่อาหารคาร์บอนของเซลล์มีปริมาณมากเกินพอ

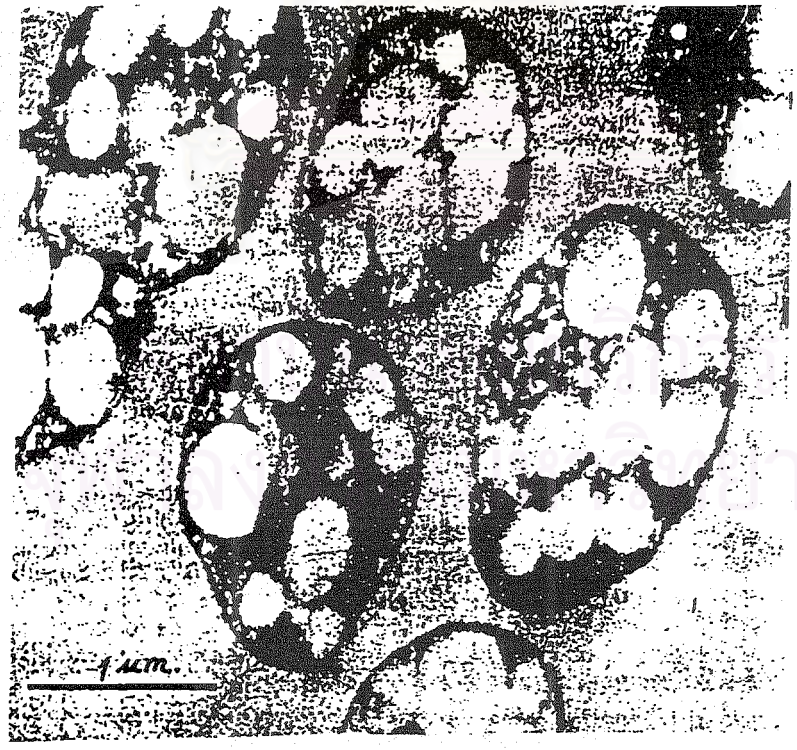
และเกิดการขาดแคลนอาหารสำคัญอย่างใดอย่างหนึ่งพร้อม ๆ กัน (Anderson และ Dawes, 1990)

ลักษณะของ PHB

PHB เป็นโพลีเมอร์ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แบคทีเรียชนิดแกรมบวก แกรมลบ และในไซยาโนแบคทีเรียบางชนิด (ตารางที่ 1) (Byrom,1987) จากการศึกษาพบว่า PHB ทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และพลังงานให้แก่เซลล์เปรียบได้กับไกลโคเจน และแป้ง ที่สะสมในสัตว์ชั้นสูง และพืชตามลำดับ (Bloembergen และคณะ, 1986) PHB จะสะสมอยู่ภายในแกรนูล (granule) ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.5 ไมครอน และมีเมมเบรนซึ่งประกอบด้วยไลปิด และโปรตีนหนา 2 นาโนเมตร(รูปที่ 2) ที่ประกอบด้วยไลปิด และโปรตีนซึ่งมีน้ำหนัก 0.5 และ 2.0% ของน้ำหนักแกรนูล จากการศึกษาของ Ballard และคณะ (1987) ซึ่งศึกษาจำนวนและขนาดแกรนูลใน *Alcaligenes eutrophus* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนพบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เอื้ออำนวยต่อการสะสม PHB จำนวนแกรนูลต่อเซลล์จะอยู่ในช่วง 8 ถึง 12 แกรนูล และทำให้เซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มขึ้นจาก 0.24 เป็น 0.50 ไมครอน มีผลให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนจากยาวรี เป็นค่อนข้างกลม น้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยของแกรนูล (วัดโดยวิธี Light-scattering) เท่ากับ $5x10^{8}$ (Ellar และคณะ, 1968) โดยน้ำหนักโมเลกุลของโพลีเมอร์จะอยู่ในช่วง 10^{3} ถึง 10^{6} ขึ้นกับเชื้อแต่ละชนิด แต่ละแกรนูลประกอบด้วยโพลีเมอร์อย่างน้อย 1,000 สาย Mas และคณะ (1985) พบว่าจากปริมาณและความหนาแน่นที่วัดได้ ทำให้ทราบว่า PHB แกรนูลจาก *A. eutrophus* มีน้ำประมาณ 40% และการผลิต PHB ใน *A. eutrophus* จะหยุดเมื่อปริมาณ PHB ในเซลล์มีประมาณ 80% แม้ว่าเอนไซม์และซับสเตรท ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHB จะยังคงมีอยู่ ทั้งนี้เนื่องจากเนื้อที่ภายในเซลล์มีอยู่จำกัด (Ballard และคณะ ,1987)

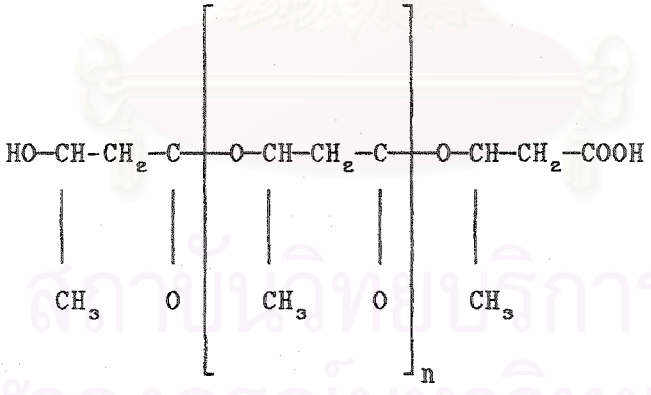
Alcaligenes	*Azotobacter*	*Azospirillum*	*Bacillus*
Bergerinckia	*Chlorogloea*	*Chromatium*	*Chromobacterium*
Derxia	*Hemophilus*	*Hyphomycrobium*	*Lampropaedia*
Methylobacterium	*Micrococcus*	*Nocardia*	*Pseudomonas*
Rhizobium	*Rhodobacter*	*Rhodospirillum*	*Sphaerotilus*
Spirillum	*Actinomyces*	*Vibrio*	*Zoogloea*

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจีนัสของจุลินทรีย์ที่สร้างและสะสม PHB (Byrom, 1987)



รูปที่ 2 ภาพตัดของเซลล์ *Alcaligenes eutrophus* จากกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน แสดง PHB แกรนูลภายในเซลล์ (Byrom, 1987)

PHB จัดเป็นโฮโมโพลีเมอร์ ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ 3-hydroxybutyric acid จำนวน 23,000-25,000 โมเลกุลมาต่อกัน มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 3. (Evan และ Sikdar,1990) จุดหลอมเหลวประมาณ 180 องศาเซลเซียส น้ำหนักโมเลกุลของ PHB ในจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่น *Azotobacter* sp. จะอยู่ในช่วง $8x10^5$ ถึง $2x10^8$ *Alcaligenes eutrophus* จะอยู่ในช่วง $6x10^5$ ถึง $1.2x10^6$ *Pseudomonas* sp. AMI อยู่ในช่วง $5x10^5$ ถึง $6x10^5$ และ *Methylobacterium* sp. B3-Bp อยู่ในช่วง $2.5x10^5$ ถึง $3x10^5$ (Ballard และคณะ,1987) นอกจากชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำให้ PHB มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันแล้ว พบว่าวิธีการสกัด ช่วงการเจริญของเซลล์ที่นำมาสกัด สภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ และปริมาณสารอาหารที่จำเป็นก็มีผลเช่นกัน (Dawes และ Senior, 1973 ; Ballard และคณะ ,1987 ; Berger และคณะ, 1989)



เมื่อ n = 23,000-25,000

รูปที่ 3. สูตรโครงสร้างของ PHB

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 จุลินทรีย์

ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถสร้างและสะสมโพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท (PHB) ซึ่งได้คัดเลือกโดย อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) คือ *Alcaligenes* sp. A-04

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

2.2.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium)

สูตรที่ 1 (nutrient broth ของ Difco) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

สูตรที่ 2 (Doi และคณะ,1986) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์	10	กรัม
โพลีเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
ฟรุคโตส	10	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน (แยกสารละลายฟรุคโตสนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110°ซ เป็นเวลา 10 นาที)

สูตรที่ 3 (Doi และคณะ,1988) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์	10	กรัม
โพลีเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	5	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

2.2.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อการผลิต PHB

MSM (Mineral salt medium) สูตรปรับปรุง (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2536) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต	0.1	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.3	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.05	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	20.0	มก.
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.3	มก.
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	มก.

แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต	0.6	มก.
กรดบอริก	0.6	มก.
ผงสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
ฟรุคโตส	10.0	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3โมลาร์ แยกละลาย เกลือ,แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต และ trace element เมื่อละลายแล้วนำมารวมกัน ส่วนสารละลายฟรุคโตสนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110°ซ เป็นเวลา 15 นาที

2.3 <u>วิธีการเก็บรักษา การเตรียมหัวเชื้อ สำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ และการคัดเลือกอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ</u>

2.3.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์มาปลูกลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) โดยใช้เข็มเขี่ย (needle) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ และทำการปลูกเชื้อลงบนอาหารใหม่ (subculture) ทุก ๆ 1เดือน

2.3.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับกล้าเชื้อ

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2.3.1 ลงในสารละลายเกลือแกงเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์(physiological saline) นำเชื้อที่กระจาย(resuspend) ในสารละลายเกลือ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.35

2.3.3 การเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้นปริมาณมาก

นำหัวเชื้อจากข้อ 2.3.2 จำนวน 0.5 มล. ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ สูตรที่ 1 2 และ3 ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มล. คิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 30 ชม. โดยเก็บตัวอย่างจากชั่วโมงที่ 18,24 และ 30 ชม. มาหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้น นำอาหารสูตรที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด มาทำการเลี้ยงอีกครั้งหนึ่งที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 48 ชม. เก็บตัวอย่างทุก 6 ชม. นำตัวอย่างมาหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง นำผลที่ได้มาเขียนกราฟแสดงการเติบโต เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่จะใช้สำหรับการเตรียมกล้าเชื้อต่อไป

2.4 <u>การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการผลิต PHB หรือ การเตรียมกล้าเชื้อ</u>

นำหัวเชื้อจากข้อ 2.3.2 ปริมาตร 0.5 มล. ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมะสม ซึ่งคัดได้จากข้อ 2.3.3 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°ซ โดยใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 2.3.3 นำกล้าเชื้อที่ได้มาปั่นแยกเอาส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วกระจายเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHB จากข้อ 2.2.3 แล้วถ่ายเชื้อลงในถังหมัก

2.5 <u>การเปรียบเทียบการเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่เลือกไว้จากข้อ 2.3.3 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ</u>

2.5.1 เปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อต่างกัน เลี้ยงในขวดเขย่า

นำหัวเชื้อจากข้อ 2.3.2 ปริมาณ 0.5 มล.ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ได้เลือกไว้จากข้อ 2.3.3 และอาหาร MSM ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มล.เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ ใช้เวลาที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.3 จากนั้นถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อทั้งสองชนิดลงในขวดทดลองขนาด 250 มล. ที่มีอาหาร MSM อยู่ 50 มล.เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30°ซ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 60 นำแต่ละตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB

2.5.2 เปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อต่างกัน เลี้ยงในถังหมัก

นำหัวเชื้อจากข้อ 2.3.2 ปริมาณ 0.5 มล. ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ได้เลือกไว้จากข้อ 2.3.3 และอาหาร MSM ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มล. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ โดยใช้เวลาที่เหมาะสมจากข้อ2.3.3จากนั้นถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อแต่ละชนิดลงในถังหมักที่มีอาหารMSM อยู่ 2.5 ลิตร เลี้ยงเชื้อโดยปรับอัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.8 vvm (Mulchandani และคณะ,1989) โดยปรับ pH (ค่าความเป็นกรดด่าง) เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำแต่ละตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB

จากนั้นนำผลที่ได้จากข้อ 2.5.1 และ 2.5.2 มาเปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB เมื่อใช้อาหารสูตรที่เลือกจากข้อ 2.3.3 และอาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ โดยเปรียบเทียบทั้งในขวดเขย่าและถังหมัก

2.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยการเลี้ยงแบบ Batch cultivation

เตรียมกล้าเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมและเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.3.3 เก็บเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง แล้วกระจายเซลล์ในอาหาร MSM สูตรปรับปรุง แล้วถ่ายลงสู่ถังหมัก ควบคุมอุณหภูมิที่ 30°ซ อัตราการกวน 600 รอบ/นาที และอัตราการให้อากาศ 1.8 vvm จากนั้นจึงศึกษาผลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์และปริมาณ PHB

2.6.1 การศึกษาผลของ pH ระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เปรียบเทียบระหว่างสภาวะควบคุม pH ที่ 7.0 ตลอดการทดลอง โดยเติม 3M NaOH และ 1.5M H_2SO_4 (Mulchandani และคณะ ,1989) และสภาวะที่ไม่ควบคุม pH ตลอดการทดลอง โดยปรับค่า pH เริ่มต้นที่ 7.0 เมื่อใช้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 10.0 กรัม/ลิตร และแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.1 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 60 นำตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร หาน้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณฟรุคโตส (Bernfeld,1955) ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (Kempers, 1974) ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ,1951; Mulchandani และคณะ,1989) และปริมาณ PHB (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ ,2536 ;Brivonese และ Sutherland,1989)

2.6.2 การควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30°ซ และใช้ค่า pH ที่เหมาะสม ที่ได้จากข้อ 2.6.1 แปรค่าอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ เพื่อให้ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักแตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ตลอดการทดลอง กับค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก

เท่ากับ 80 50 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร น้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณฟรุคโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนและปริมาณ PHB

2.6.3 การหาปริมาณของฟรุคโตส (อาหารแหล่งคาร์บอน) ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิต PHB

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30°ซ และใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.6.1 และ 2.6.2 แปรผันปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นคือ 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60ชั่วโมง แล้วนำแต่ละตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600นาโนเมตร น้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณฟรุคโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนและปริมาณ PHB

2.6.4 การหาปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟต (อาหารแหล่งไนโตรเจน) ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิต PHB

เลี้ยงเชื้อ*Alcaligenes*sp.A-04 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.6.1 2.6.2 และ 2.6.3 แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นคือ 0.1 0.3 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร โดยให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ10.0กรัม/ลิตร จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณฟรุคโตสเป็น 20.0 และ 30.0กรัม/ลิตร เพื่อให้เพียงพอสำหรับ *Alcaligenes* sp. A-04 ที่จะใช้เมื่อเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเก็บตัวอย่างทุก12ชั่วโมงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำแต่ละตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร น้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณฟรุคโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณโปรตีนและปริมาณ PHB

2.7 วิธีหาค่าความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร วิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และกราฟมาตราฐานระหว่าง น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของเซลล์

วิธีหาค่าความเข้มข้นของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

นำน้ำหมักที่เก็บจากถังหมักในแต่ละช่วงเวลามาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่า OD_{600} (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.5 แล้วบันทึกค่าไว้ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐานระหว่าง น้ำหนักเซลล์แห้งและ OD_{600} (ภาคผนวกที่ 1ก. และ 1ข.) จากนั้นนำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้สูตรดังนี้

น้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.) = (1/ความชัน) x OD_{600} x ค่าการเจือจาง (dilution)

2.8 วิธีหาปริมาณฟรุคโตสในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Bernfeld(1955) โดยนำน้ำหมักที่ทำการปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาณ 1 มล. เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid : DNSA reagent) (ภาคผนวกที่ 2) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มล.ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่าง ฟรุคโตสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวกที่ 5) จากนั้นนำมาหาปริมาณฟรุคโตสโดยใช้สูตรดังนี้

ปริมาณฟรุคโตส (มก./มล.) = (1/ความชัน) x OD_{540} x ค่าการเจือจาง

2.9 วิธีหาปริมาณ residual biomass (ชีวมวลส่วนที่เหลือ)

หาได้จาก นำปริมาณ PHB ลบออกจาก น้ำหนักเซลล์แห้ง มีหน่วยเป็น กรัม/ลิตร

2.10 วิธีหาปริมาณโปรตีนของเซลล์ (cellular protein)

ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) และ Mulchandani และคณะ (1989) โดยนำน้ำหมักปริมาณ 5 มล. มาปั่นแยกส่วนน้ำใสออก แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 N จำนวน 5 มล. นำไปอุ่นที่ 90°ซ เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมนำสารละลายโปรตีนที่เจือจางแล้วปริมาณ 1 มล. เติมสารละลาย Lowry C (ภาคผนวกที่ 3) 5 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวกที่ 3) 0.5 มล.ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่าง ปริมาณโปรตีน (BSA, bovine serum albumin) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (ภาคผนวกที่ 6) จากนั้นนำมาหาปริมาณโปรตีนโดยใช้สูตรดังนี้

ปริมาณโปรตีน (มก./มล.) = (1/ความชัน) x (1/1000) x OD_{660} x ค่าการเจือจาง

2.11 วิธีหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก

ใช้วิธีของ Kempers (1974) โดยนำน้ำหมักที่ทำการปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำน้ำหมักที่เจือจางแล้วปริมาณ 5 มล. เติมโปแตสเซียมคลอไรด์ (ภาคผนวกที่ 4) เข้มข้น 2 โมลาร์ 5 มล.เติมสารละลาย EDTA (ภาคผนวกที่ 4) 1 มล. ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพัสซายด์รีเอเจนท์ (ภาคผนวกที่ 4) 2 มล. เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์รีเอเจนท์ (ภาคผนวกที่ 4) 4 มล. และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน (NH_4^+-N) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ภาคผนวกที่ 7) จากนั้นนำมาหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้สูตรดังนี้

ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (มก./มล.) = OD_{636} x (1/ความชัน) x (1/1000)

x (ค่าการเจือจาง/5) x (132/28)

28 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจน ในแอมโมเนียมซัลเฟต

132 คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอมโมเนียมซัลเฟต

2.12 วิธีการสกัดแยก PHB จากเซลล์ และการทำให้บริสุทธิ์

การสกัดแยก PHB (เป็นวิธีการที่ปรับปรุงจากวิธีของ Brivoneseและ Sutherland, 1989 โดย อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ ,2536) โดยนำน้ำหมักปริมาตร 5 มล. ใส่ในหลอดแก้วมีฝาเกลียวปิดขนาด 10 มล. นำไปปั่นแยกที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 25 นาที เก็บส่วนของเซลล์ไว้ แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือ คลอรอกซ์ (clorox) 1 มล. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 มล. ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอะซีโตน 5 มล. แล้วปั่นล้างเอาอะซีโตนออก จากนั้นเอาส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยเอทธานอลบริสุทธิ์ 99.80% 5 มล. แล้วปั่นล้างด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เอาเอทธานอลออกเก็บส่วนของตะกอนไว้ เติมคลอโรฟอร์ม 5 มล. ต้มในน้ำเดือด 30 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ นำส่วนที่เป็นตะกอนไปสกัด PHB อีกครั้ง รวมส่วนใสที่ได้กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรของส่วนใสที่กรองได้ให้ครบ 10 มล. PHB จะละลายอยู่ในคลอโรฟอร์มเก็บส่วนนี้ (stock ของ PHB) นำส่วนนี้ไปวิเคราะห์ปริมาณ PHB ต่อไป ในการทำให้สารบริสุทธิ์ เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติทำโดยรวมส่วนคลอโรฟอร์มแล้ว นำไประเหยคลอโรฟอร์มออกที่อุณหภูมิ 80°ซ เพื่อทำให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นมากขึ้น จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยเมธานอล (ใช้ปริมาตร 10 เท่า ของสารละลายในคลอโรฟอร์ม) ปั่นแยกตะกอนสารผลิตภัณฑ์ที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำตะกอนมาละลายด้วยคลอโรฟอร์มและตกตะกอนซ้ำอีก 2 ครั้ง ด้วยเมธานอลและไดเมธิลอีเทอร์ นำส่วนตะกอนมาอบแห้งที่ 80°ซ นาน 12 ชม. นำตะกอนของสารผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาละลายด้วยคลอโรฟอร์ม

และเทใส่แบบที่ได้เตรียมไว้

2.13 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์

2.13.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Gel permeation chromatography (GPC)

PHB จากข้อ 2.12 และ P(3HB-14%3HV) หนักเท่ากับ 0.0200 กรัม นำมาละลายด้วยเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) ในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มล. กรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บใน vial ปริมาณที่ฉีดเข้าเครื่องเท่ากับ 0.1 มล. โดยใช้ THF เป็น mpbile phase

2.13.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี viscometry

นำ PHB จากข้อ 2.12 และ P(3HB-14%3HV) มาตรฐานมาละลายด้วยคลอโรฟอร์มให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.2 ถึง 0.8 กรัมต่อ 100 มล. นำมา 25 มล. ใส่ลงในคอลัมน์ของเครื่อง viscometer แบบ Ubbelohde tube ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.05 ซม. (ASTM D.445 No 1828) ใช้นาฬิกาจับเวลาที่สารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และตัวทำละลายเคลื่อนที่ผ่านเส้นกำหนดตำแหน่ง (marker) บนคอลัมน์ ซึ่งควบคุมอุณหภูมิโดย อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30°ซ นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า intrinsic viscosity [n]

2.14 การวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) และ glass transition temperature (Tg)

นำสาร PHB จากข้อ 2.12 และสารมาตราฐาน P(3HB-14% 3HV) วิเคราะห์ Tm และ Tg โดยวิธี Differential scanning calorimetry โดย calibrate ที่ scan rate เท่ากับ 10° ซ/นาที ภายใต้สภาวะของก๊าซซีเลียม และใช้ Indium กับ cyclohexane เป็นสารมาตรฐานในการ calibrate วิเคราะห์หา Tm และ Tg ของสารผลิตภัณฑ์ โดยเริ่มจากอุณหภูมิ -80 °ซ และเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 10 °ซ/นาที ถึง 200 °ซ

2.15 การวิเคราะห์สมบัติเชิงกลของแผ่นฟิลม์โดยเครื่อง Universal testing machine

นำแผ่นฟิลม์จากข้อ 2.12 มาเตรียม specimens ตามวิธีมาตรฐานของ ASTM (D 882-91) specimens มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ายาว 150 มม. กว้าง 5 มม. ช่วงทดสอบยาว 100 มม. และที่เหลือเป็นช่วงยึด ด้านละ 25 มม. ดึง specimen ด้วยอัตรา 10 มม./นาที จนกระทั่ง specimen ขาด แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ สมบัติเชิงกลที่วิเคราะห์คือ Load at Max. Load Tensile Strength หรือ Stress at Max. Load Displacement at Max. Load (ระยะที่พลาสติกยืด) Young's Modulus Toughness % Elongation นำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับ specimen ของ PP และ PE ที่ทดสอบโดยวิธีเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

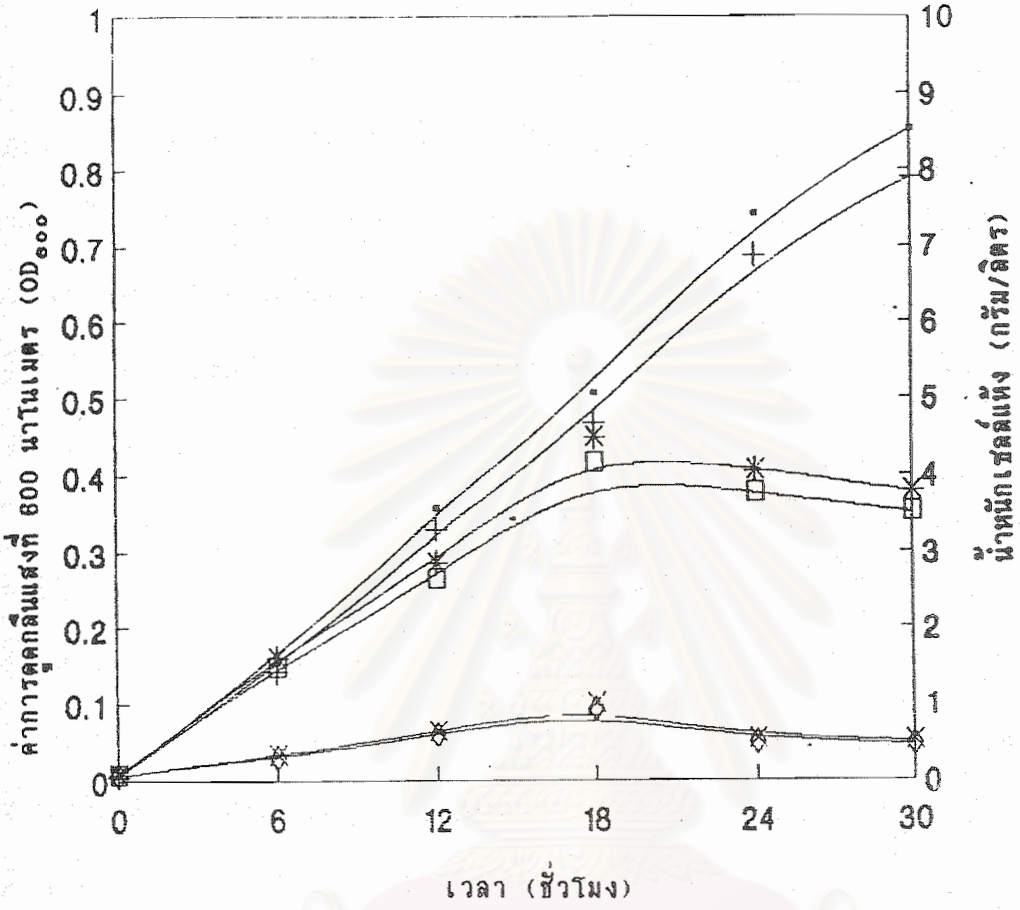
ผลการวิจัย

3.1 การเลือกชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อและหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ

3.1.1 การเลือกชนิดของอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

เตรียมเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ตามวิธีในข้อ 2.3.2 ใส่ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ 1 2 และ 3 (จากข้อ 2.2.2) เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำแต่ละตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากผลการวิจัยพบว่า อาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ 2 (ข้อ 2.2.2) นั้นให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 18 24 และ 30 ส่วนอาหารสูตรที่ 3 และสูตรที่ 1 นั้นให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 และลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 4



OD_{600} (อาหารสูตรที่ 1) น้ำหนักเซลล์แห้ง (อาหารสูตรที่ 1)

OD_{600} (อาหารสูตรที่ 2) น้ำหนักเซลล์แห้ง (อาหารสูตรที่ 2)

OD_{600} (อาหารสูตรที่ 3) น้ำหนักเซลล์แห้ง (อาหารสูตรที่ 3)

รูปที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อต่างชนิดกัน

3.1.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

จากผลการวิจัยข้อ 3.1.1 ทราบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 เป็นอาหารสูตรที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ จึงเลี้ยงกล้าเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ 2 นานเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำมาหาความเข้มข้นของเซลล์โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง แล้วนำค่าความเข้มข้นของเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง มาเขียนกราฟการเติบโตได้ผลดังแสดงในรูปที่ 5

เนื่องจากเซลล์ที่จะนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเพื่อผลิตสารผลิตภัณฑ์นั้น ควรเป็นเซลล์ที่กำลังมีการเติบโต และในการวิจัยนี้ต้องการใช้เซลล์ปริมาณมากเพื่อใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นในการผลิต PHB ดังนั้นจึงได้พิจารณาว่า กล้าเชื้อที่มีอายุ 30 ชั่วโมง เป็นกล้าเชื้อที่ยังอยู่ในระยะที่มีการแบ่งตัว และให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูง (ตารางที่ 2) คือ 8.79 กรัม/ลิตร ถึงแม้ว่าไม่ใช่เวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เพราะที่เวลา 36 ชั่วโมง เซลล์จะอยู่ในช่วงการเติบโตคงที่แล้ว ส่วนที่เวลา 24 ชั่วโมง แม้ว่าจะเป็นช่วงที่เซลล์กำลังมีการเติบโต แต่ก็ได้ปริมาณเซลล์น้อยกว่าที่เวลา 30 ชั่วโมง ประมาณ 2 เท่า ในทำนองเดียวกัน จากตารางที่ 4 ที่เวลา 30 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 เติบโตได้ความเข้มข้นของเซลล์สูง (OD_{800} เท่ากับ 23.65) และเซลล์ยังอยู่ในระยะที่มีการเติบโต ส่วนที่เวลา 24 ชั่วโมง หรือน้อยกว่า 24 ชั่วโมงนั้น ความเข้มข้นของเซลล์ต่ำกว่ามาก (ประมาณ 2 เท่า) ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อคือเวลา 30 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร
0	0.03	0.09
6	0.04	0.11
12	1.64	4.40
18	3.59	9.65
24	5.42	14.58
30	8.79	23.65
36	9.95	26.78
42	7.80	21.06
48	5.00	13.50

ตารางที่ 2 น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การเปรียบเทียบการเติบโตและการสร้าง PHB เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบ 2 ขั้นตอน

จากผลการวิจัยของคณะผู้ร่วมวิจัย (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2536) ซึ่งได้ปรับปรุงอาหารสูตร MSM สำหรับการผลิต PHB จึงมีแนวความคิดที่จะนำอาหารสูตรดังกล่าวมาลองใช้เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

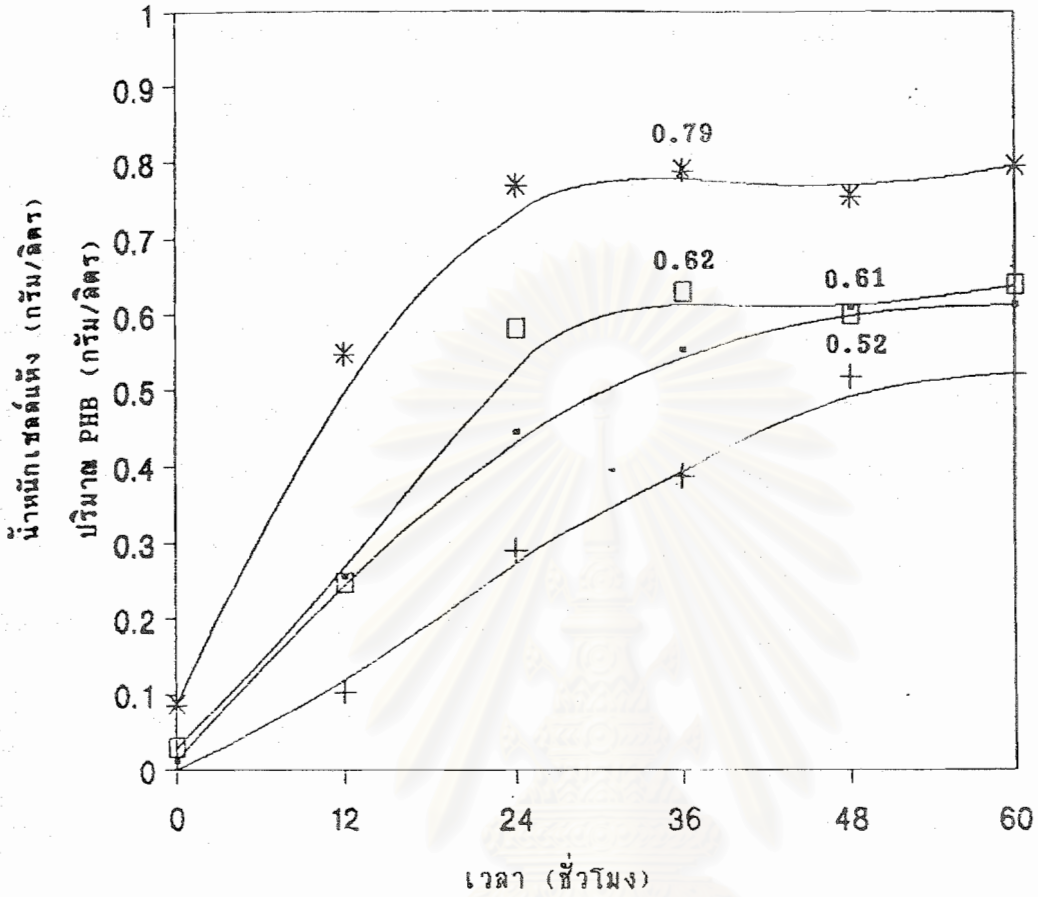
ศึกษาเปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB ของเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 (ได้จากข้อ 3.1.1) และอาหาร MSM สูตรที่ปรับปรุงโดย อรุณ ชาญชัย-เชาว์วิวัฒน์ (2536) เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อแล้วเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต PHB ในอาหาร MSM สูตรเดียวกัน

3.2.1 การเปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB โดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อในขวดเขย่า

ผลการวิจัยในระดับขวดเขย่านั้น เมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและการผลิต PHB เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมง ปริมาณ PHB สูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง โดยปริมาณ PHB ที่ผลิตได้เท่ากับ 0.62 กรัม/ลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.79 กรัม/ลิตร แต่เมื่อใช้อาหาร MSM เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นช้ากว่าเมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 โดยปริมาณ PHB สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยปริมาณ PHB ที่ผลิตได้เท่ากับ 0.52 กรัม/ลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.61 กรัม/ลิตร สรุปได้ว่าเมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาณ PHB ที่ได้สูงกว่าเมื่อใช้ MSM ประมาณ 1.2 เท่า โดยใช้เวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สั้นกว่าเมื่อใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 5

เวลา (ชั่วโมง)	อาหาร MSM		อาหารสูตรที่ 2	
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)
0	0.01	0.00	0.09	0.03
12	0.26	0.10	0.55	0.25
24	0.45	0.29	0.77	0.58
36	0.55	0.39	0.79	0.62
48	0.61	0.52	0.75	0.60
60	0.61	0.52	0.79	0.64

ตารางที่ 3 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ แล้วใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับผลิต PHB ในขวดเขย่า



น้ำหนักเซลล์แห้ง (ในอาหาร MSM)

ปริมาณ PHB (ในอาหาร MSM)

น้ำหนักเซลล์แห้ง (ในอาหารสูตรที่ 2)

ปริมาณ PHB (ในอาหารสูตรที่ 2)

รูปที่ 5 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อแล้วใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับการผลิต PHB ในขวดเขย่า

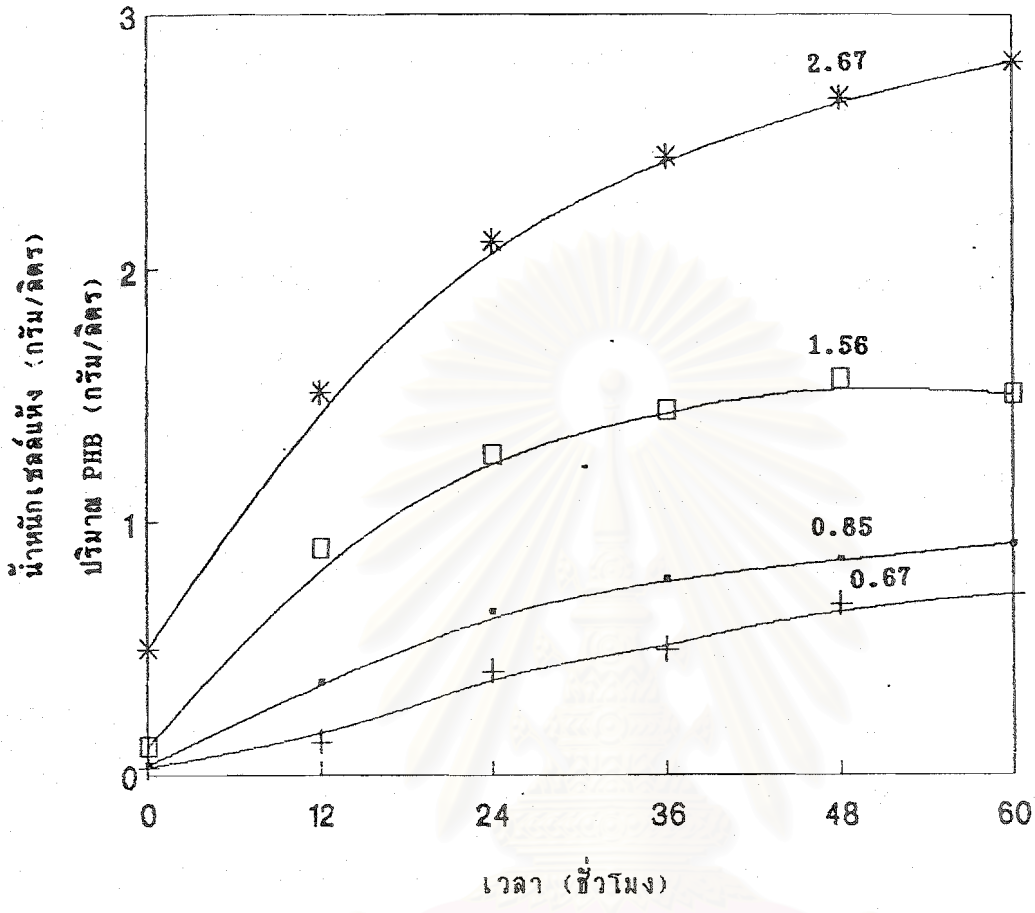
3.2.2 การเปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อในถังหมัก

ผลการวิจัยในระดับถังหมักนั้นพบว่า เมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาณ PHB ที่ผลิตขึ้นได้สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณเท่ากับ 1.56 กรัม/ลิตร และเมื่อใช้ MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้เท่ากับ 0.67 กรัม/ลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง และค่อนข้างคงที่โดยมีปริมาณเท่ากับ 0.71 กรัม/ลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง สรุปได้ว่าเมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาณ PHB ที่ได้สูงกว่าเมื่อใช้ MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อประมาณ 2.3 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 6 ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งได้พบว่าในทำนองเดียวกัน เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อในอาหารสูตรที่ 2 *Alcaligenes* sp. A-04 มีการเติบโตได้ดีกว่า เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อในอาหาร MSM กล่าวคือที่เวลา 48 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.67 กรัม/ลิตร และ 0.85 กรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่ 2 และในอาหาร MSM ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวลา (ชั่วโมง)	อาหาร MSM		อาหารสูตรที่ 2	
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)
0	0.04	0.03	0.50	0.11
12	0.37	0.13	1.51	0.89
24	0.64	0.41	2.11	1.26
36	0.77	0.49	2.43	1.44
48	0.85	0.67	2.67	1.56
60	0.91	0.71	2.81	1.50

ตารางที่ 4 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ แล้วใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับผลิต PHB ในถังหมัก



น้ำหนักเซลล์แห้ง (ในอาหาร MSM)

ปริมาณ PHB (ในอาหาร MSM)

น้ำหนักเซลล์แห้ง (ในอาหารสูตรที่ 2)

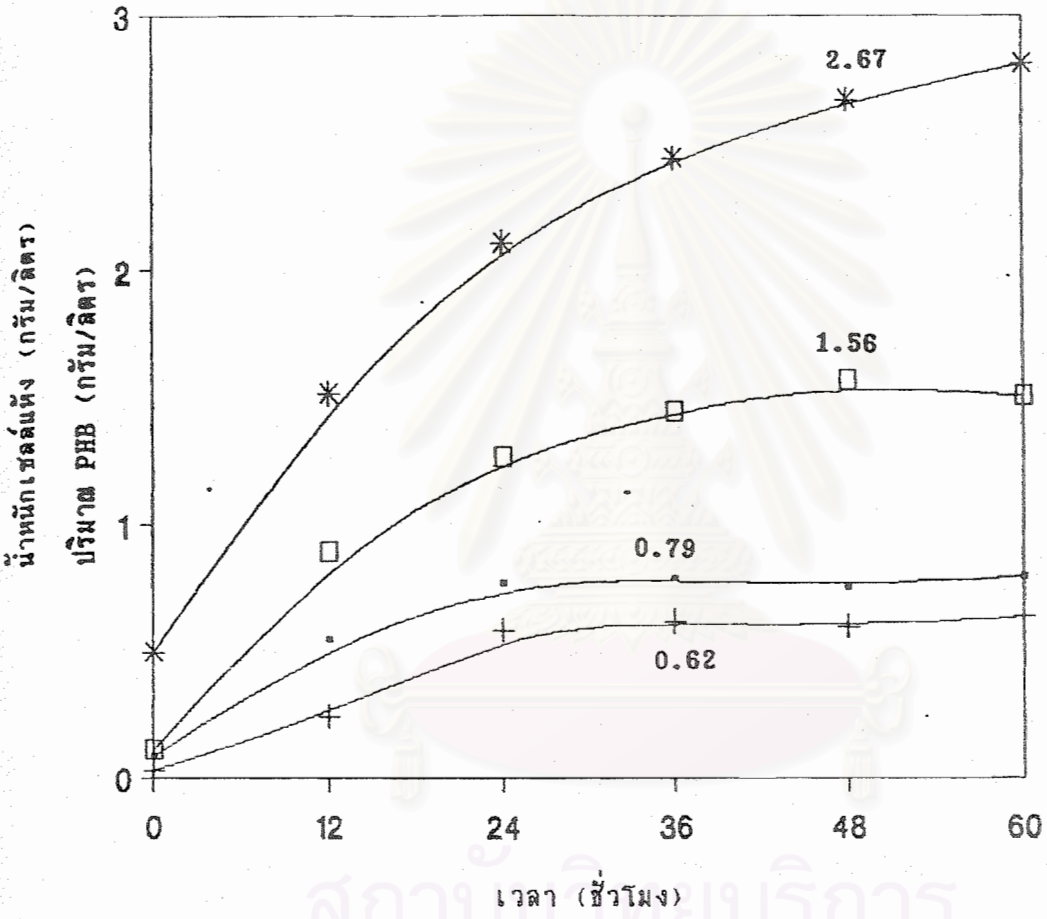
ปริมาณ PHB (ในอาหารสูตรที่ 2)

รูปที่ 6 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อใช้อาหาร MSM และอาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อและใช้ MSM เป็นอาหารสำหรับการผลิต PHB ในถังหมัก

จากการเปรียบเทียบการเติบโตและการสร้าง PHB โดย *Alcaligenes* sp.A-04 เมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 และอาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ทั้งในขวดเขย่าและในถังหมัก (จากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2) พบว่าเมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ แล้วย้ายลงสู่อาหารสำหรับการผลิต PHB เชื้อสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณมากกว่าเมื่อใช้อาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ และเมื่อเปรียบเทียบการเติบโตและการผลิต PHB เมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อในขวดเขย่าและในถังหมัก พบว่าในถังหมัก *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ปริมาณมากกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า ดังแสดงในรูปที่ 7 กล่าวคือ ที่เวลา 36 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในขวดเขย่าเท่ากับ 0.79 และ 0.62 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และเพิ่มขึ้นเป็น 2.67 และ 1.56 กรัม/ลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในถังหมัก

เนื่องจากในการเลี้ยงกล้าเชื้อ มีจุดประสงค์ที่จะเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนที่จะนำลงเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิต PHB (อาหารMSM) จากที่กล่าวมาทั้งจากข้อ 3.1 และ 3.2 เห็นได้ว่าอาหารสูตรที่ 2 มีความเหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเซลล์ในขั้นตอนการเลี้ยงกล้าเชื้อ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



น้ำหนักเซลล์แห้ง (ระดับขวดเขย่า)

น้ำหนักเซลล์แห้ง (ระดับถังหมัก)

ปริมาณ PHB (ระดับขวดเขย่า)

ปริมาณ PHB (ระดับถังหมัก)

รูปที่ 7 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่าและในถังหมัก

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

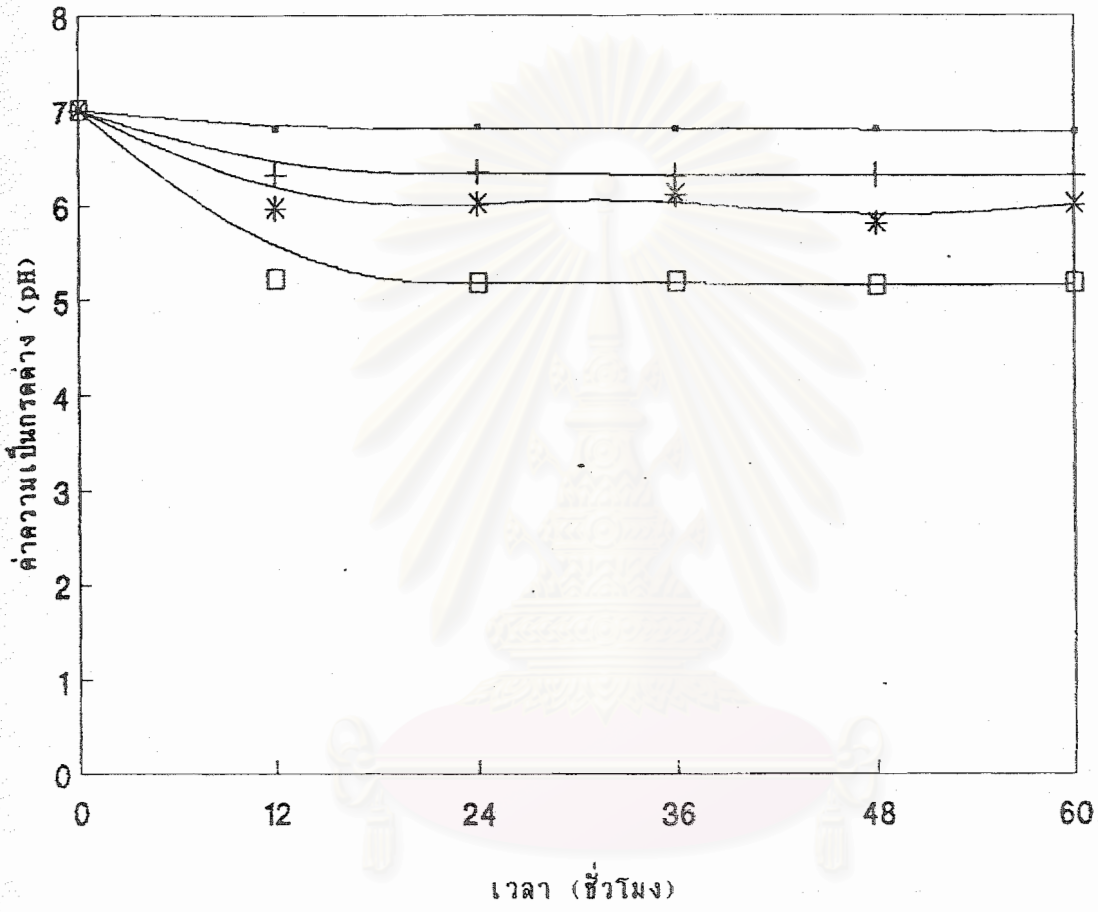
การหาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณ PHB ที่ผลิตขึ้นโดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักนั้นใช้อาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHB และใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ผลการวิจัยจากข้อ 3.1 และ 3.2) เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง โดยควบคุมสภาวะในถังหมักดังนี้ ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2.5 ลิตร อุณหภูมิ30°ซ (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2536) อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.8 vvm ตลอดทุกการทดลอง นอกจากจะระบุเป็นอย่างอื่น

3.3.1 pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงถังหมักซึ่งมี MSM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1.1 ผลของปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อค่า pH ของน้ำหมัก เมื่อความเข้มข้นของฟรุคโตสเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร

เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 0.1 ถึง 1.0 กรัม/ลิตร โดยปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 พบว่าค่า pH ของน้ำหมักจะเริ่มลดลงเมื่อมีการเติบโตของเชื้อ จนถึงประมาณชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้น ค่า pH จะค่อนข้างคงที่และสังเกตได้ว่าเมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณสูง ค่า pH ซึ่งวัดที่เวลา 12 ชั่วโมง มีค่าต่ำลง ดังแสดงในรูปที่ 8 และตารางที่ 5



แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.3 กรัม/ลิตร

แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัม/ลิตร

รูปที่ 8 ค่า pH ของน้ำหมักที่เวลาต่าง ๆ กัน เมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ต่างกัน

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	ค่า pH ที่เวลาเริ่มต้น	ค่า pH ที่เวลา 12 ชั่วโมง
0.1	7.0	6.78
0.3	7.0	6.30
0.5	7.0	5.95
1.0	7.0	5.20

ตารางที่ 5 ค่า pH ของน้ำหมักที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสทุกสภาวะเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร

3.3.2 ผลของการควบคุมปริมาณออกซิเจนในน้ำหมัก ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

จากที่ได้มีผู้รายงานไว้ (Groom และคณะ,1988; Mulchandani และคณะ, 1989) ว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีผลต่อการผลิต PHB โดยที่แต่ละเชื้อที่ใช้จะมีระดับค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB แตกต่างกัน ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงได้แปรผันปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ให้มีค่าสูงต่ำแตกต่างกัน

เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ 30°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อใส่ลงในถังหมักที่มีอาหาร MSM โดยควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30°ซ ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ แล้วแปรผันอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ ซึ่งมีผลต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ผลของการแปรผันอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่ทำให้ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีค่าต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 6

อัตราการกวน (รอบ/นาที)	อัตราการให้อากาศ (vvm)	ปริมาณออกซิเจนในน้ำหมัก (ppm) (ที่อุณหภูมิ 30°ซ)	%อิ่มตัวของออกซิเจน (ที่อุณหภูมิ 30°ซ)
600	1.8	7.6	100.00
300	0.6	6.1	80.26
200	1.6	5.3	69.74
200	0.2	3.8	50.00

ตารางที่ 6 ปริมาณของออกซิเจนในน้ำหมัก เมื่อแปรผันอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ เมื่อควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30°ซ

จากผลการวิจัยที่กล่าวมา เมื่อควบคุมให้ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีค่าเท่ากับ 100% ของค่าการละลายอิ่มตัว *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุด (1.56 กรัม/ลิตร หรือ 58.54% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ ที่ทำให้ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% ของค่าการละลายอิ่มตัว (คืออัตราการกวน 600 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ 1.8 vvm) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3 การหาปริมาณฟรุคโตสที่เหมาะสำหรับการเติบโต และการผลิต PHB

เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ 30°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงถังหมักที่มีอาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งอาหารไนโตรเจน ควบคุม pH ของน้ำหมักเท่ากับ 7.0 ตลอดการทดลอง (ตามผลการวิจัยข้อ 3.3.1) และควบคุมให้ปริมาณของออกซิเจนในน้ำหมักเท่ากับ 100% อิ่มตัวตลอดการทดลอง (ตามผลการวิจัยข้อ 3.3.2) แปรผันปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร

เมื่อใช้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 กรัม/ลิตร พบว่าที่เวลา 36 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุด 0.99 กรัม/ลิตร คิดเป็น 39.84% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตและฟรุคโตสหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และ 36 ตามลำดับ ปริมาณของ PHB เริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 ปริมาณของ PHB/โปรตีน เท่ากับ 1.81 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0937 ดังแสดงในรูปที่ 9ก. และตารางที่ 7

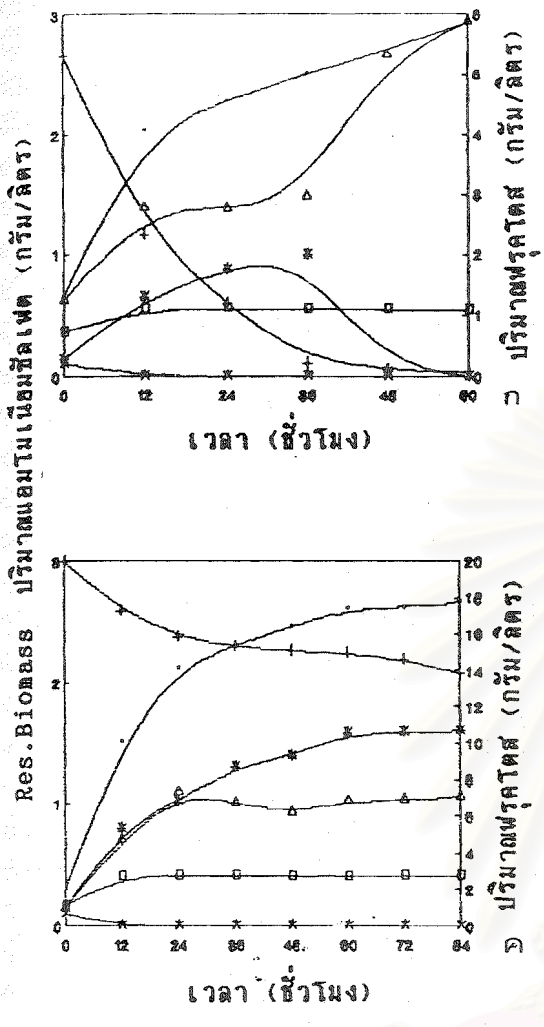
เมื่อใช้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร พบว่าเวลา 84 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ 1.58 กรัม/ลิตร คิดเป็น 56.23% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณของ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.69 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0930 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่12 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีฟรุคโตสเหลือในน้ำหมักเท่ากับ 6.45 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 9ข. และตารางที่ 7

เมื่อใช้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร พบว่าที่เวลา 84 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ 1.60 กรัม/ลิตร คิดเป็น 60.15%ของน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB เริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 60 ปริมาณของ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.74 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.1324 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีฟรุคโตสเหลือในน้ำหมักเท่ากับ 14 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 9ค. และตารางที่ 7

I16707084

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร เปรียบเทียบระหว่างเมื่อมีฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร และ 20.0 กรัม/ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า ได้ปริมาณ PHB ใกล้เคียงกันคือ 1.58 และ 1.60 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และยังพบอีกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงขึ้นเมื่อปริมาณฟรุคโตสเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร (เท่ากับ 0.1324) ขณะที่เมื่อปริมาณฟรุคโตสเท่ากับ 5.0 และ 10.0 กรัม/ลิตร อัตราการเจริญจำเพาะใกล้เคียงกัน (เท่ากับ 0.0937 และ 0.0930 ตามลำดับ) ดังแสดงในรูปที่ 10 และ ตารางที่ 8 แต่เมื่อพิจารณาปริมาณฟรุคโตสที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อพบว่า เมื่อใช้ฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร มีฟรุคโตสเหลือประมาณ 6.0 กรัม/ลิตร ในขณะที่เมื่อใช้ฟรุคโตส 20.0 กรัม/ลิตร มีฟรุคโตสเหลือมากถึง 14.0 กรัม/ลิตร ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ปริมาณฟรุคโตสที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB คือ 10.0 กรัม/ลิตร ส่วนปริมาณโปรตีนและ residual biomass นั้นพบว่ามีปริมาณสูงสุดที่ระยะเวลาเดียวกับระยะเวลาที่แอมโมเนียมซัลเฟตหมดลง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



น้ำหนักเซลล์แห้ง — ปริมาณ PHB

ปริมาณโปรตีน — Residual Biomass

ปริมาณฟรุคโตส — ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

รูปที่ 9 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร

(ก.) ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 5.0 กรัม/ลิตร

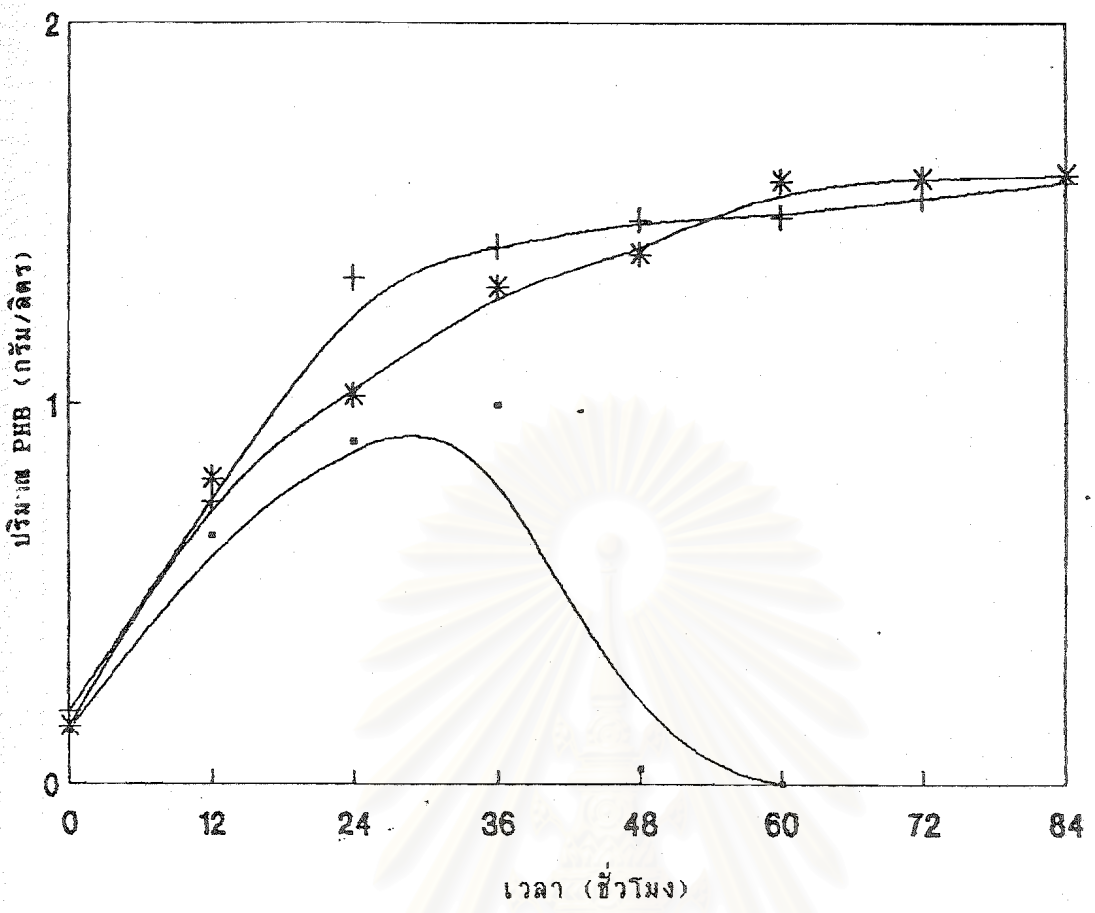
(ข.) ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร

(ค.) ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณฟรุคโตส (กรัม/ลิตร)								
	5.0			10.0			20.0		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส
0	0.66	0.03	5.01	0.45	0.19	9.86	0.31	0.15	19.98
12	2.03	0.65	2.02	1.36	0.74	8.12	1.51	0.80	17.30
24	2.27	0.89	0.89	2.06	1.33	7.43	2.12	1.02	15.85
36	2.48	0.99	0.00	2.39	1.41	7.25	2.31	1.31	15.30
48	2.69	0.04	0.00	2.62	1.48	7.00	2.46	1.39	15.05
60	2.93	0.00	0.00	2.76	1.49	6.80	2.61	1.59	14.96
72	*	*	*	2.77	1.54	6.50	2.62	1.59	14.60
84	*	*	*	2.77	1.58	6.45	2.66	1.60	13.91

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB และปริมาณฟรุคโตส เมื่อแปรผันปริมาณฟรุคโตส 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณฟรุคโตส เป็น กรัม/ลิตร)

* ไม่ได้วิเคราะห์ตัวอย่างในช่วงเวลาดังกล่าว เนื่องจากฟรุคโตสหมด



ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 5.0 กรัม/ลิตร

ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร

ความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 ปริมาณ PHB ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมัก เมื่อมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร แปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร

ความเข้มข้นของฟรุคโตส (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	% PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB/โปรตีน	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)
5.0	0.99	39.84	1.81	0.0937
10.0	1.58	56.23	3.69	0.0930
20.0	1.60	60.15	3.74	0.1324

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบ ปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะของ *Alcaligenes* sp. A-04 ในถังหมักเมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร แปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของฟรุคโตสเท่ากับ 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.4 การหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม สำหรับการเติบโตและการผลิต PHB

เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสูตรที่ 2 ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงถังหมักที่มีอาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ควบคุม pH ของน้ำหมักที่ 7.0 ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ (ตามผลการวิจัยข้อ3.3.1) และควบคุมให้ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% ของค่าการละลายอิ่มตัวตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ (ตามผลการวิจัยข้อ 3.3.2) ใช้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น10.0กรัม/ลิตร (ตามผลการวิจัยข้อ 3.3.3) แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 0.3 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร

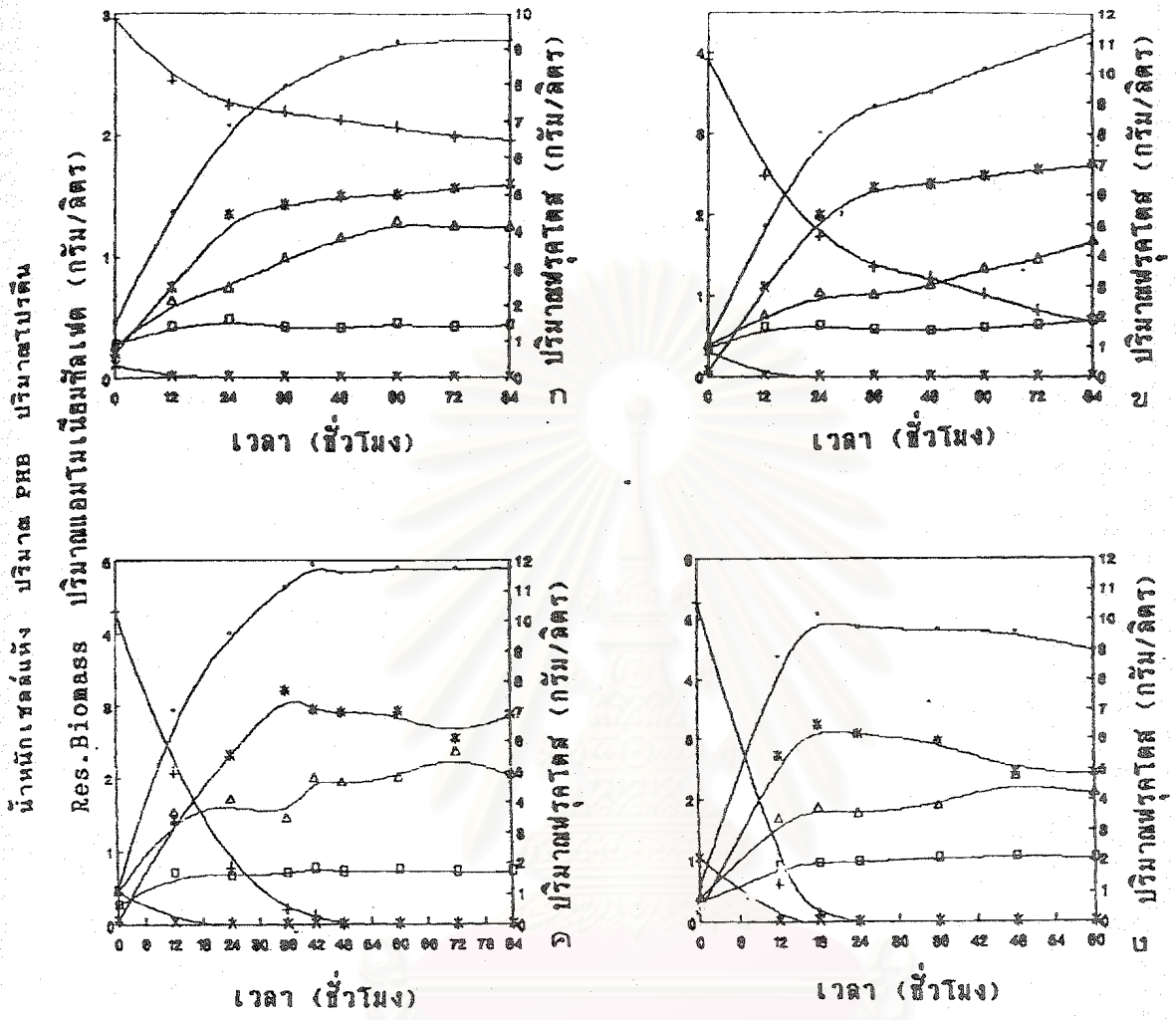
เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.1 กรัม/ลิตร พบว่าที่ 48 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ 1.48 กรัม/ลิตร คิดเป็น 56.57% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB เริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 โดยที่ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.65 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0930 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีฟรุคโตสเหลือในน้ำหมักเท่ากับ 6.45 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 11ก. และตารางที่ 9

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.3 กรัม/ลิตร พบว่าที่ 48 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ 2.37 กรัม/ลิตร คิดเป็น 67.71% ของน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าปริมาณ PHB เริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.87 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.1175 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีฟรุคโตสเหลืออยู่ในน้ำหมักประมาณ 2 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 11ข. และตารางที่ 9

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร ได้ปริมาณ PHB สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 3.19 กรัม/ลิตร คิดเป็น 68.94% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ PHB ก็ได้ลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 42 เป็นต้นไป พบว่าฟรุคโตสเหลืออยู่เพียง 1.27 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 42 และหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 4.38 ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งนั้นค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.1497 พบว่าแอมโมเนียมหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ดังแสดงในรูปที่ 11ค. และตารางที่ 9

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร ปริมาณ PHB สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 18 เท่ากับ 3.22 กรัม/ลิตร คิดเป็น 65.71% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง PHB ลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป พบว่าฟรุคโตสเหลืออยู่น้อยมากที่ชั่วโมงที่ 18 และหมดลงประมาณชั่วโมงที่ 24 ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.37 รวมทั้งน้ำหนักเซลล์แห้งก็ลดลงด้วย อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.170 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 11ง. และตารางที่ 9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB

ปริมาณโปรตีน Residual Biomass

ปริมาณฟรุคโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

รูปที่ 11 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 10.0 กรัม/ลิตร แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น (ก.) 0.1 กรัม/ลิตร (ข.) 0.3 กรัม/ลิตร (ค.) 0.5 กรัม/ลิตร (ง.) 1.0 กรัม/ลิตร

เวลา ชม.	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)											
	0.1			0.3			0.5			1.0		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส
0	0.45	0.19	9.86	0.45	0.06	10.43	0.48	0.04	10.33	0.56	0.19	10.54
12	1.36	0.74	8.12	1.85	1.10	6.58	2.93	1.42	4.99	4.37	2.70	1.23
18	*	*	*	*	*	*	*	*	*	5.06	3.22	0.22
24	2.06	1.33	7.43	3.01	1.99	4.63	3.98	2.29	1.87	4.83	3.07	0.00
36	2.39	1.41	7.25	3.33	2.33	3.60	4.63	3.19	0.50	4.82	2.95	0.00
42	*	*	*	*	*	*	4.93	2.94	0.27	*	*	*
48	2.62	1.48	7.00	3.50	2.37	3.27	4.81	2.89	0.01	4.78	2.44	0.00
60	2.76	1.49	6.80	3.80	2.47	2.73	4.89	2.91	0.00	4.49	2.41	0.00
72	2.77	1.54	6.50	4.00	2.55	2.16	4.87	2.53	0.00	**	**	**
84	2.77	1.58	6.45	4.27	2.61	1.81	4.89	2.86	0.00	**	**	**

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB และปริมาณฟรุคโตส เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.1 0.3 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร โดยให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 10.0 กรัม/ลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณฟรุคโตส เป็น กรัม/ลิตร) * ไม่ได้เก็บตัวอย่างในช่วงเวลาดังกล่าว

** ไม่ได้ศึกษาในช่วงเวลาดังกล่าว เพราะจากฟรุคโตสหมด

จากผลการวิจัยที่กล่าวมาสรุปได้ว่าเมื่อใช้ฟรุคโตสปริมาณ 10.0 กรัม/ลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร ปริมาณฟรุคโตสไม่เพียงพอสำหรับใช้ในการเติบโตและการผลิต PHB PHB และน้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงเมื่อฟรุคโตสหมดลง แต่เมื่อใช้ฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร ควรใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัม/ลิตร เพราะได้ PHB สูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณน้อยกว่านี้ คือได้ PHB 3.22 กรัม/ลิตร ที่เวลาเพียง 18 ชั่วโมง ดังนั้นจึงคาดว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตส อาจทำให้มีการผลิตและสะสม PHB ได้มากขึ้น จึงได้เพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตสเริ่มต้นเป็น 20.0 กรัม/ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 1.0 และ 1.5 กรัม/ลิตร

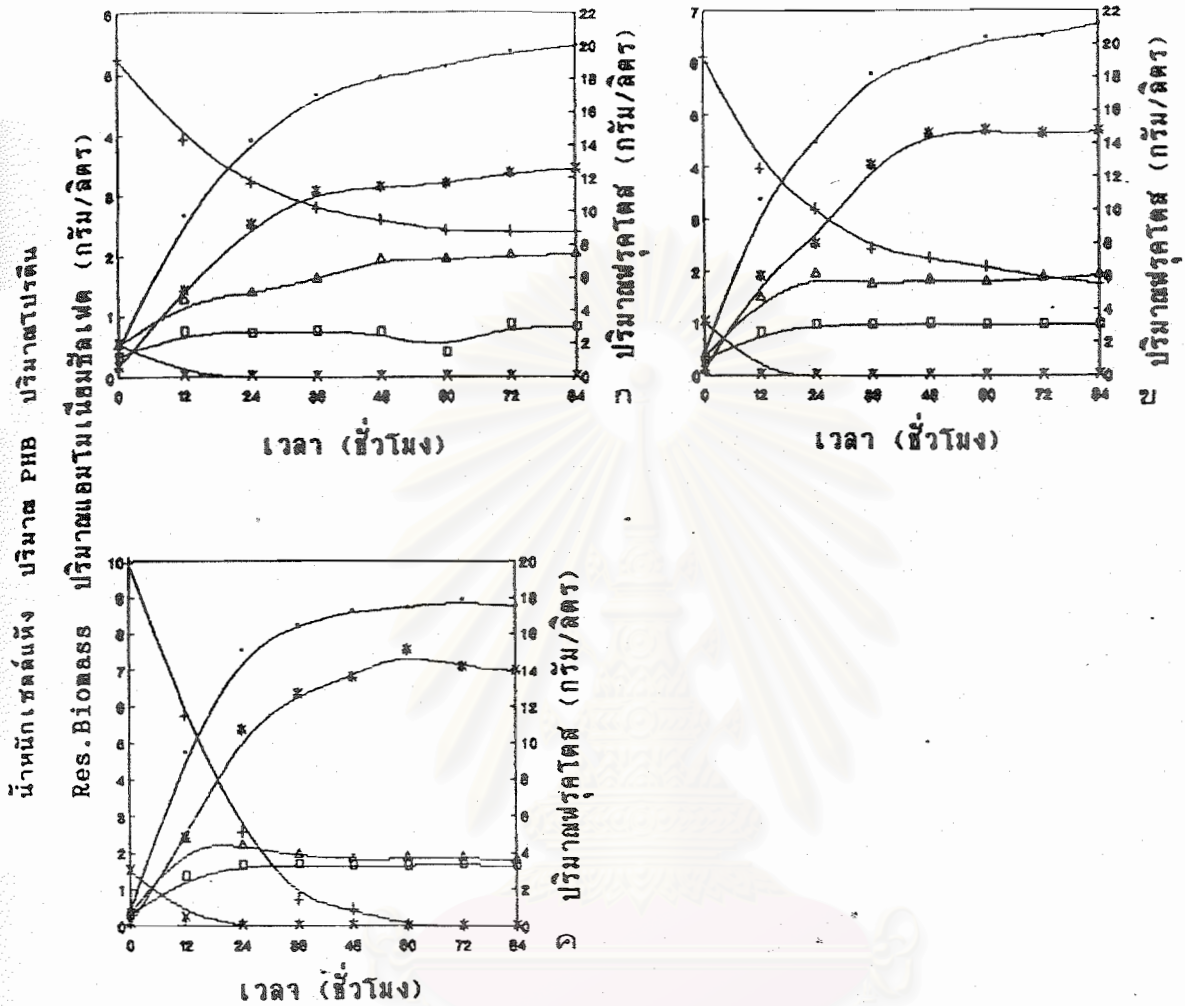
เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร และฟรุคโตสความเข้มข้นเริ่มต้น 20.0 กรัม/ลิตร พบว่าที่ 48 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุด 3.11 กรัม/ลิตร คิดเป็น 63.08% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 4.34 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.1474 และพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าฟรุคโตสเหลืออยู่ในน้ำหมักเท่ากับ 8.72 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 12ก. และ ตารางที่ 10

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร และฟรุคโตสความเข้มข้นเริ่มต้น 20.0 กรัม/ลิตร พบว่าปริมาณ PHB จะเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 และที่ 48 ชั่วโมงนี้ *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุด 4.63 กรัม/ลิตร คิดเป็น 76.53% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 4.82 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.1727 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าฟรุคโตสเหลืออยู่ในน้ำหมัก 8.72 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 12ข. และตารางที่ 10

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 1.5 กรัม/ลิตร และฟรุคโตสความเข้มข้นเริ่มต้น 20.0 กรัม/ลิตร พบว่าที่ 60 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุด 7.32 กรัม/ลิตร คิดเป็น 84.25% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 4.49 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.2017 ฟรุคโตสหมดที่ชั่วโมงที่ 60 หลังจากนั้น PHB และน้ำหนักเซลล์แห้งก็ลดลง แอมโมเนียมซัลเฟตหมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 12 ค. และตารางที่ 10

จากผลการวิจัยที่กล่าวมาแล้วสรุปได้ว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตสเป็น 20.0 กรัม/ลิตร จะทำให้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น กล่าวคือได้ PHB เท่ากับ 3.35 กรัม/ลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง 4.63 กรัม/ลิตร ที่ 48 ชั่วโมง และ 7.32 กรัม/ลิตร ที่ 60 ชั่วโมง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นปริมาณ 0.5 1.0 และ1.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัม/ลิตร พบว่าปริมาณฟรุคโตสในน้ำหมักหมดก่อนที่จะสิ้นสุดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อคือ ที่เวลาประมาณ 60 ชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตสเริ่มต้นเป็น 30.0กรัม/ลิตร เพื่อให้เพียงพอที่ *Alcaligenes* sp. A-04 จะนำไปใช้สำหรับ การเติบโต และการผลิต PHB ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเป็น 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 20.0 กรัม/ลิตร แปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (ก.) 0.5 กรัม/ลิตร (ข.) 1.0 กรัม/ลิตร และ (ค.) 1.5 กรัม/ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)								
	0.5			1.0			1.5		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส
0	0.45	0.16	19.22	0.43	0.09	19.20	0.42	0.06	19.91
12	2.65	1.41	15.57	3.37	1.90	12.45	4.72	2.39	11.48
24	3.88	2.51	12.66	4.47	2.53	10.01	7.52	5.36	5.09
36	4.64	3.04	10.98	5.76	4.02	7.67	8.24	6.33	1.42
48	4.93	3.11	9.40	6.05	4.63	7.05	8.62	6.82	0.88
60	5.10	3.17	8.79	6.47	4.70	6.54	8.69	7.32	0.00
72	5.34	3.35	8.77	6.50	4.64	5.95	8.92	7.07	0.00
84	5.44	3.42	8.72	6.70	4.82	5.51	8.76	6.97	0.00

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณฟรุคโตส เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.5 1.0 และ 1.5 กรัม/ลิตร โดยให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณฟรุคโตส เป็น กรัม/ลิตร)

เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 1.5 กรัม/ลิตรและฟรุคโตส ความเข้มข้นเริ่มต้น 30.0 กรัม/ลิตร พบว่าที่ 72 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุด 7.21 กรัม/ลิตรคิดเป็น82.12% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าปริมาณ PHB จะเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 4.45 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.199 และพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตใกล้หมดที่ชั่วโมงที่ 24 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าฟรุคโตสเหลืออยู่ 9.84 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 13ก. และตารางที่ 11

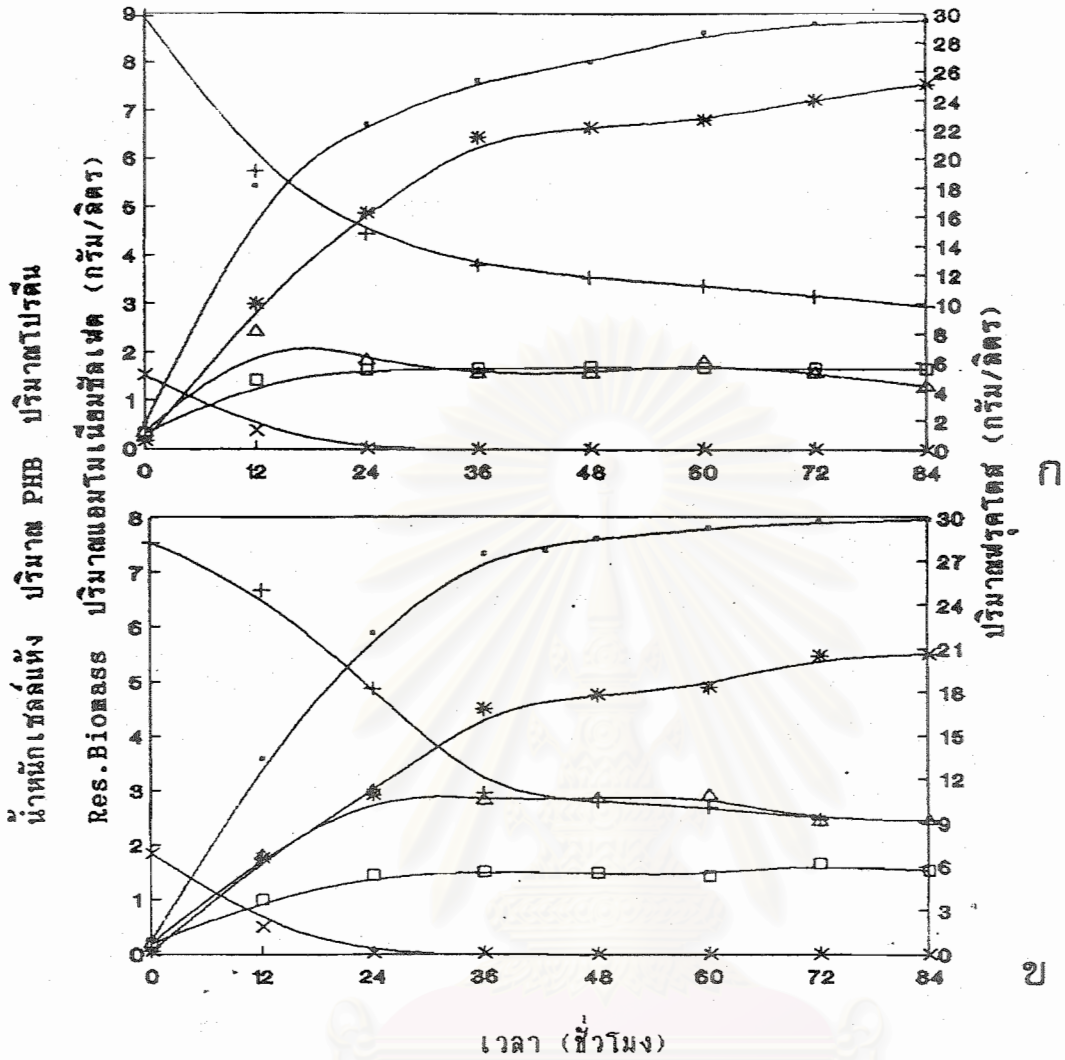
เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้น 2.0 กรัม/ลิตร พบว่าที่ 72 ชั่วโมง *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุด 5.47 กรัม/ลิตร คิดเป็น 69.92% ของน้ำหนักเซลล์แห้งและพบว่าปริมาณ PHB เริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ปริมาณ PHB/โปรตีน เท่ากับ 3.60 และอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.245 พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหมดที่ชั่วโมงที่ 36 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าฟรุคโตสเหลืออยู่ 9.20 กรัม/ลิตร ดังแสดงในรูปที่ 13ข. และตารางที่ 11

จากรูปที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิตขึ้นที่เวลาต่าง ๆ เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเพิ่มปริมาณฟรุคโตสให้มากเพียงพอสำหรับการเติบโต และการผลิต PHB ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อซึ่งได้ผลว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 7.54 กรัม/ลิตร หรือคิดเป็น 85.20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 84 ชั่วโมง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัม/ลิตร และฟรุคโตส 30.0 กรัม/ลิตร ผลการเปรียบเทียบปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะ ดังแสดงในตารางที่ 12

จากผลการวิจัยเมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจาก 0.1 จนถึง 2.0 กรัม/ลิตร ในสภาวะที่มีฟรุคโตสเพียงพอตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ พบว่า ปริมาณโปรตีน และ residual biomass มีความสัมพันธ์กับปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น โดยพบว่าปริมาณโปรตีนที่สูงสุดในแต่ละการทดลอง(การทดลองที่มีการแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต)เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นสูงขึ้น และช่วงเวลาที่โปรตีนมีปริมาณสูงสุด เป็นเวลาเดียวกันกับเวลาที่แอมโมเนียมซัลเฟตหมด เช่นเดียวกับโปรตีน ปริมาณของ residual biomass ที่สูงสุดในแต่ละการทดลอง มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นสูงขึ้น และช่วงเวลาที่ residual biomass มีปริมาณสูงสุดเป็นเวลาเดียวกับเวลาที่แอมโมเนียมซัลเฟตหมดลง

ดังนั้นเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีน และ residual biomass เป็นตัวแปรที่บอกถึงการเติบโตของเซลล์ โดยมีความสัมพันธ์กับการใช้อาหารไนโตรเจนของเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB

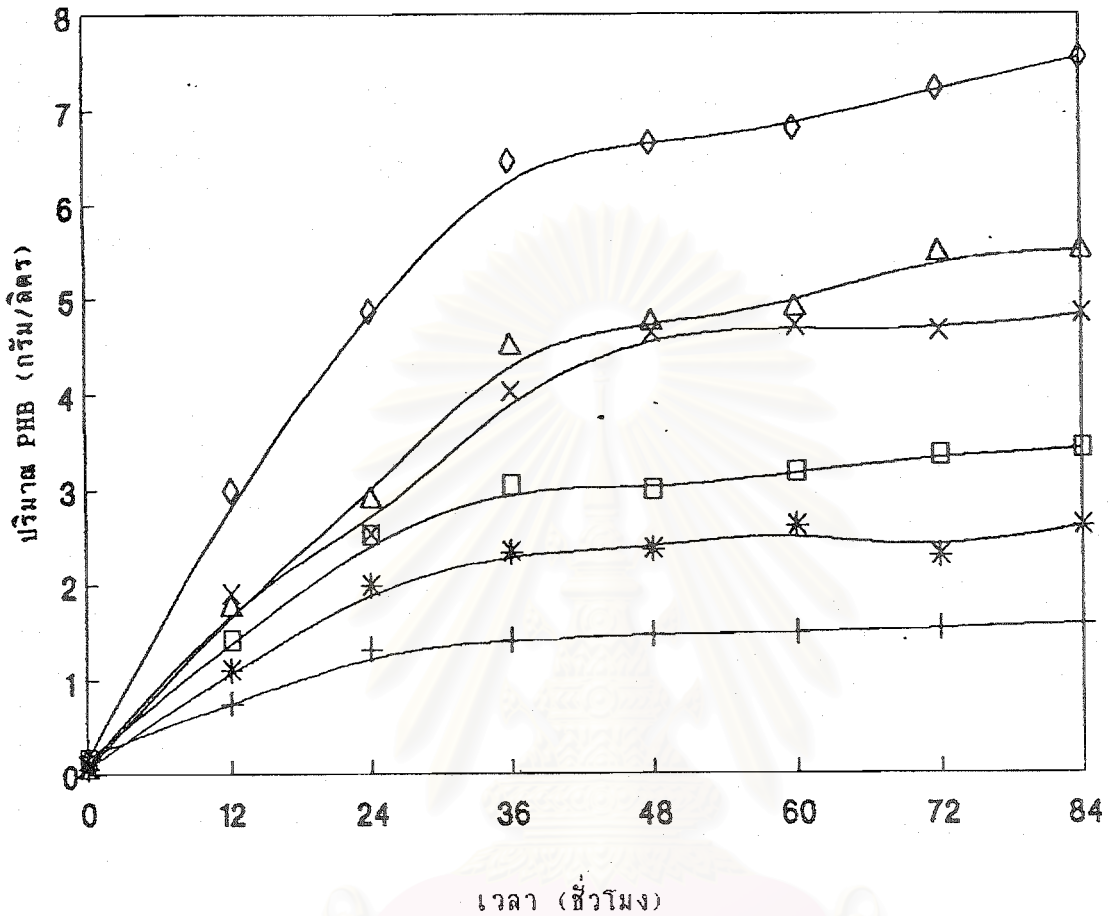
ปริมาณโปรตีน Residual biomass

ปริมาณฟรุคโตส ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

รูปที่ 13 การเติบโต การผลิต PHB และการใช้อาหารของ *Alcaligenes* sp. A-04 เมื่อให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้น 30.0 กรัม/ลิตร เมื่อแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (ก.) 1.5 กรัม/ลิตร และ (ข.) 2.0 กรัม/ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)					
	1.5			2.0		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส	น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB	ปริมาณฟรุคโตส
0	0.50	0.16	29.78	0.31	0.05	28.29
12	5.42	2.99	19.12	3.57	1.76	25.03
24	6.71	4.87	14.78	5.88	2.90	18.21
36	7.62	6.45	12.66	7.32	4.50	11.04
48	8.00	6.64	11.79	7.59	4.74	10.45
60	8.61	6.80	11.23	7.80	4.89	10.05
72	8.78	7.21	10.54	7.91	5.47	9.26
84	8.85	7.54	9.84	7.95	5.50	9.20

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณฟรุคโตส เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร โดยให้ปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นเท่ากับ 30.0 กรัม/ลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ปริมาณโปรตีน เป็น กรัม/ลิตร)



แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.3 กรัม/ลิตร

แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัม/ลิตร

แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 กรัม/ลิตร

รูปที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิตขึ้น โดยแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต และเพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตสให้เพียงพอสำหรับการเติบโต และการผลิต PHB ดังนี้

แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 และ 0.3 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 10.0 กรัม/ลิตร

แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 20.0 กรัม/ลิตร

แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 30.0 กรัม/ลิตร

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นของฟรุคโตส (กรัม/ลิตร)	ปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร)	%PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง	ปริมาณ PHB/โปรตีน	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)
0.1	10.0	1.48	56.57	3.65	0.0930
0.3	10.0	2.37	67.71	3.87	0.1175
0.5	20.0	3.11	63.08	4.34	0.1474
1.0	20.0	4.63	76.53	4.82	0.1727
1.5	30.0	7.21	82.12	4.45	0.1990
2.0	30.0	5.47	69.92	3.60	0.2448

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบ ปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB/โปรตีน และอัตราการเจริญจำเพาะ เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1-2.0 กรัม/ลิตร และเพิ่มความเข้มข้นของฟรุคโตสเป็น 10.0-30.0 กรัม/ลิตร เพื่อให้เพียงพอ สำหรับการเติบโต และการผลิต PHB

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ เมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 0.3 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร PHB มีปริมาณสูงสุด ที่เวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.5 และ 2.0 กรัม/ลิตร PHB มีปริมาณสูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง

ผลการวิจัยเมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจาก 0.1-2.0 กรัม/ลิตร โดยให้ฟรุคโตสปริมาณที่เพียงพอที่จะใช้สำหรับการเติบโตและการผลิต PHB ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ สรุปได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น จะทำให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงขึ้นตามไปด้วย รวมทั้งปริมาณ PHB ก็ได้สูงขึ้นเช่นกัน แต่เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเพิ่มมากขึ้นเป็น 2.0 กรัม/ลิตร ปริมาณ PHB ที่ได้มีค่าต่ำกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตร

ดังนั้นเห็นได้ว่าเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตร *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณ สูงที่สุดเท่ากับ 7.21 กรัม/ลิตร หรือ 82.12% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 72 ชั่วโมง แต่ปริมาณ PHB/โปรตีน ที่เวลาเดียวกัน(4.45) พบว่ามีปริมาณที่ต่ำกว่า สภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เริ่มต้น 1.0 กรัม/ลิตร(4.82) และใกล้เคียงกับสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เริ่มต้น 0.5 กรัม/ลิตร(4.34) ซึ่งเป็นสภาวะที่ให้ปริมาณ PHB ต่ำกว่าถึง 4 กรัม/ลิตร หรือ ต่ำกว่า 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี

3.4.1 การหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์

นำสาร PHB ที่ผลิตโดย Alcaligenes sp. A-04 จากการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ P(3HB-97% 3HV) และสารมาตรฐาน P(3HB-14% 3HV) มาทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยเครื่อง GPC และหาค่า intrinsic viscosity [n] หรือความหนืด โดยเครื่อง viscometer ตามวิธีข้อ 2.13.2 ผลการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและค่า [n] ของสาร PHB ที่ผลิตจาก Alcaligenes sp. A-04 และสารมาตราฐาน P(3HB-14% 3HV)

ตัวอย่าง	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย โดยเครื่อง GPC	[n] โดยเครื่อง viscometer
P(3HB-97% 3HV)	130,100	0.54
PHB	150,000	0.61
P(3HB-14% 3HV)	400,000	0.94

3.4.2 การหาค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) และ glass transition temperature (Tg)

นำสาร PHB และ P(3HB-97%3HV) ที่ผลิตจาก Alcaligenes sp. A-04 จากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และสารมาตราฐาน P(3HB-14% 3HV) มาวิเคราะห์หา Tm และ Tg โดยเครื่อง DSC ดังแสดงในตารางที่ 14 อุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) ของโฮโมโพลีเมอร์ PHB จะมีค่าสูงสุดคือ 183°ซ และอุณหภูมิหลอมเหลวจะมีค่าลดลงเมื่อมีโมโนเมอร์ของ 3HV เพิ่มขึ้น เช่น เมื่อ 3HV เท่ากับ 14 และ 97 โมลเปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิหลอมเหลวลดลงเหลือเท่ากับ 159 และ 106°ซ ตามลำดับ PHB มีค่า Tg เท่ากับ 8°ซ และ Tg ลดลงเหลือเท่ากับ 3°ซ เมื่ออยู่ในรูปของโคโพลีเมอร์ที่มีโมโนเมอร์ของ 3HV เท่ากับ 14 โมลเปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 14 อุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) และ glass transition temperature (Tg) ของสารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก Alcaligenes sp. A-04 ได้แก่ PHB P(3HB-97% 3HV) และสารมาตรฐาน P(3HB-14% 3HV)

ตัวอย่าง	Tg (°ซ)	Tm (°ซ)
PHB	8	183
P(3HB-14% 3HV)	3	159
P(3HB-97% 3HV)	-	106

หมายเหตุ - คือวิเคราะห์ไม่ได้

3.5 การตรวจสอบคุณสมบัติเชิงกลของไบโอโพลีเมอร์ เปรียบเทียบกับ PP และ PE

นำแผ่นฟิลม์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดย Alcaligenes sp. A-04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ได้แก่ PHB และ P(3HB-97% 3HV) และสารมาตรฐาน P(3HB-14% 3HV) เพื่อเปรียบเทียบกับคุณสมบัติเชิงกลของ PP (ถุงร้อน) และ PE (ถุงเย็น) ตรวจสอบคุณสมบัติเชิงกล ได้แก่ ค่าแรงสูงสุด (maximum load) ที่ใช้ในการดึง specimen ให้ขาด ค่าการต้านแรงดึง (stress at max load หรือ tensile strength) เป็นค่าของแรงต่อพื้นที่หน้าตัดของ specimen ค่า Young's Modulus เป็นดัชนีที่ใช้บอกถึงความแข็งและเปราะของพลาสติก (stiffness) ความเหนียว (toughness) เป็นค่าแสดงความสามารถในการรับพลังงานที่มากระทำต่อโพลีเมอร์ ก่อนที่จะหมดสภาพของโพลีเมอร์ ระยะที่ถูกยืด เป็นระยะที่ยืดออกมาจากความยาวเดิมของ specimen % Elongation คือการคำนวณในรูปเปอร์เซ็นต์ของระยะถูกยืดออกจากระยะเดิม เทียบกับระยะเดิม (100 มม.) (Billmeyer, 1984 และ Berins, 1991) จากผลการวิจัยในตารางที่ 15 พบว่า ค่าแรงสูงสุดที่ใช้ดึงตัวอย่างไบโอโพลีเมอร์จาก Alcaligenes sp. A-04 และ ปิโตรโพลีเมอร์ (PP และ PE) มีค่าใกล้เคียงกัน คือไบโอโพลีเมอร์มีค่าแรงดึงอยู่ในช่วง 1.8-4.4 นิวตัน ในกลุ่มของปิโตรโพลีเมอร์มีค่าแรงดึงอยู่ในช่วง 2.3-3.6 นิวตัน กลุ่มไบโอโพลีเมอร์เมื่ออยู่ในรูปโคโพลีเมอร์ ต้องใช้ค่าแรงดึงสูงสุดมากกว่าโฮโมโพลีเมอร์ ในการทำให้ specimen ขาด การต้านแรงดึงของปิโตรโพลีเมอร์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 13.608 ถึง 14.969 (MPa) สูงกว่าค่าต้านแรงดึงไบโอโพลีเมอร์ 6.989 ถึง 9.603 MPa PHB มีค่า Young's modulus สูงแสดงว่า PHB มีความแข็งแรงและเปราะสูงโดยมีค่าเท่ากับ 2693 MPa และจะมีค่าลดลงเมื่ออยู่ในรูปของโคโพลีเมอร์ และ PHB ยังมีความแข็งและเปราะสูงกว่าปิโตรโพลีเมอร์ด้วย ดังแสดงในตารางที่ 15 ในทางตรงกันข้ามไบโอโพลีเมอร์มีค่าความเหนียวต่ำกว่าปิโตรโพลีเมอร์ และในกลุ่มของไบโอโพลีเมอร์ PHB มีความเหนียวต่ำสุด (0.02 MPa) พบว่าเมื่ออยู่ในรูปโคโพลีเมอร์จะมีค่าความเหนียวเพิ่มขึ้น ระยะที่ถูกยืดมีความสัมพันธ์กับค่าความเหนียวคือ ถ้ามีความเหนียวสูงโพลีเมอร์นั้นจะถูกดึงได้ยาวกว่า ที่มีความเหนียวน้อย เช่น ปิโตรโพลีเมอร์มีค่าความเหนียวสูงกว่าไบโอโพลีเมอร์ ก็จะมีระยะถูกยืดมากกว่า ในกลุ่มของ

ไบโอโพลีเมอร์ โคโพลีเมอร์มีความเหนียวมากกว่าก็จะถูกยืดได้มากกว่าโฮโมโพลีเมอร์ การที่ปิโตรโพลีเมอร์มีทั้งความเหนียวและความแข็งที่สูงกว่าไบโอโพลีเมอร์นั้น เนื่องจากปิโตรโพลีเมอร์ที่พบตามท้องตลาดมีการใส่สารแต่งเติมเพื่อปรับปรุงสมบัติของพลาสติก ในกลุ่มของไบโอโพลีเมอร์เองก็สามารถปรับปรุงสมบัติได้ โดยทำให้อยู่ในรูปของโคโพลีเมอร์ หรือเทอร์โพลีเมอร์ ที่มี 3HB 4HB และ 3HV ในสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่าง	Load at Max. Load (N)	Stress at Max. Load (MPa)	Young,s Modulus (stiffness) (MPa)	Toughness (MPa)	Displacement at Max. Load (mm)	% Elongation
P(3HB-97% 3HV)	4.4	9.014	767	0.11	2.0	2
P(3HB-14% 3HV)	2.3	6.989	675	0.15	2.9	3
PHB	1.8	9.603	2693	0.02	.0.4	0.4
PP[a]	2.3	14.268	749	38.52	388.88	388
PP[b]	2.6	13.608	837	40.80	390.9	390
PE[c]	2.6	14.964	163	9.45	97.2	97
PE[d]	3.6	14.868	139	25.30	235.3	235

PP[a] และ PE[c] คือถุงพลาสติกที่ซื้อจากสามย่าน

PP[b] และ PE[d] คือถุงพลาสติกที่ซื้อจากลำเพ็ง

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบสมบัติเชิงกลของไบโอโพลีเมอร์ P(3HB-97% 3HV) และ PHB ที่ผลิตจาก *Alcaligenes sp.* A-04 และสารมาตรฐานP(3HB-14% 3HV) กับโพลีเมอร์จากปิโตรเคมี PP และ PE

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการผลิต และสะสม PHB ให้ได้ปริมาณมาก จะต้องจำกัดปริมาณอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน (Byrom, 1987) แต่ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยสารอาหารที่สมบูรณ์ เชื้อจุลินทรีย์จะเติบโตในภาวะสมดุลย์ โดยสารอาหารจะถูกนำไปใช้ในการเติบโต มากกว่า การผลิตและสะสม PHB ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณมากแล้วนำลงสู่อาหารสำหรับการผลิต และสะสม PHB งานวิจัยนี้ศึกษาหาอาหารสูตรที่เหมาะสม เพื่อที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อโดยเปรียบเทียบจากน้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของเซลล์ พบว่าอาหารสูตรที่ 2 จะให้ความเข้มข้นของเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารอาหารที่ประกอบในอาหารสูตรที่ 2 มีความเหมาะสมกว่าในสูตรอาหารที่ 1 และ 3 ในการทำให้ *Alcaligenes* sp. A-04 เติบโตได้ดี ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงกล้าเชื้อก่อนนำลงอาหาร MSM สำหรับการผลิต PHB ในถังหมัก คือ 30 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ได้จากการศึกษารูปแบบของการเจริญเติบโต เนื่องจากที่เวลานี้ได้ปริมาณเซลล์มาก และเซลล์เจริญอยู่ในช่วง log phase ซึ่งทำให้ได้กล้าเชื้อปริมาณมาก เพื่อที่จะใช้ในการผลิตและสะสม PHB ในขั้นต่อไป

เปรียบเทียบในระดับขวดเขย่าและในถังหมัก ระหว่างเมื่อใช้อาหารสูตรที่2 และอาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อแล้วใช้อาหาร MSM เป็นอาหารสำหรับการผลิต PHB พบว่าปริมาณ PHB ที่ผลิตขึ้นเมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อได้ปริมาณ PHB สูงกว่าในระยะเวลาที่สั้นกว่า เมื่อใช้อาหาร MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมื่อใช้อาหารสูตรที่ 2 ทำให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นสูงกว่า เมื่อใช้ MSM เป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ส่วนอาหาร MSM นั้นเหมาะที่จะเป็นอาหารที่กระตุ้นการสร้าง และสะสม PHB มากกว่าจะเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ

ในการเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ผลิตขึ้น เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM และใช้อาหาร MSM เป็นอาหารสำหรับการผลิต PHB พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้ในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าโดยปริมาณ PHB ที่ได้เมื่อเลี้ยงในถังหมัก สูงกว่าในขวดเขย่าถึง 2.4เท่า ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากสภาวะการผลิต PHB ในถังหมักเหมาะสมกว่าสภาวะในขวดเขย่า

ผลการศึกษาในระดับขวดเขย่า (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ ,2536) พบว่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB อยู่ในช่วง 6.0-7.0 ดังนั้นเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักจึงปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และศึกษาผลของการควบคุม และไม่ควบคุมค่า pH ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ พบว่าในสภาวะที่ไม่ควบคุม pH เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตค่าpHของน้ำหมักลดลงและการลดลงแปรผันตามความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เพิ่มขึ้น และค่าpH คงที่เมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตหมดลง ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการเจริญของเชื้อแล้วมีการนำแอมโมเนียมซัลเฟตไปใช้ (Steinbuchel และ Schlegel ,1989) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PHB %PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB/โปรตีน ระหว่างสภาวะที่ควบคุม และไม่ควบคุมpHตลอดการทดลอง โดยแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้น 0.1 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร พบว่าสภาวะที่ควบคุม pH ตลอดการทดลองให้ปริมาณ PHB สูงกว่า สภาวะที่ไม่ควบคุม pH ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะมีการผลิตสารที่มีความเป็นกรด จึงทำให้ pH ของน้ำหมักต่ำลง (Nakata ,1963) แม้ว่าโดยส่วนใหญ่แล้วการศึกษาเกี่ยวกับ pH ในการเลี้ยงเชื้อเป็นไปในด้านการหา pH ที่เหมาะสมซึ่งเป็นเพียง pH เริ่มต้น โดยศึกษาในระดับขวดเขย่า เช่นงานวิจัยที่เกี่ยวกับการหา สารอาหารและสภาวะที่เหมาะกับการเติบโตของ *Hydrogenomonas eutropha* โดย Repaske (1961) และการศึกษาผลของอาหารคาร์บอนที่มีต่อมวลโมเลกุลของ PHB ใน *Alcaligenes eutrophus* โดย Taidi และคณะ (1994) เป็นต้น โดยที่ในระดับถังหมักไม่พบว่ามีการศึกษาเปรียบเทียบ ผลของการควบคุม และไม่ควบคุม pH ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อแต่พบว่ามีงานวิจัยจำนวนมากที่เกี่ยวกับการผลิตPHBโดย *Alcaligenes* sp. ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Sonnleitner และคณะ (1979) Steinbuchel และ Schlegel (1989) ล้วนควบคุม pH ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อทั้งสิ้น

จากการศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ต่อการเติบโตและการผลิต PHB โดยให้ปริมาณการละลายอิ่มตัวของออกซิเจนที่ระดับต่าง ๆ พบว่าเมื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% 80% 70% และ 50% ของค่าการละลายอิ่มตัว จะได้ปริมาณ PHB % PHB/น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB/โปรตีน ลดลงตามลำดับ โดยพบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเท่ากับ 100% ของค่าการละลายอิ่มตัว ทำให้เซลล์ผลิต PHB ได้สูงสุด อัตราการเจริญจำเพาะเมื่อการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักมีค่าเท่ากับ 100% 80% และ 70% ของค่าการละลายอิ่มตัว จะใกล้เคียงกันคือ 0.0930 0.0924 และ 0.0941 แสดงให้เห็นว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ที่ระดับนี้ไม่มีผลต่อ อัตราการเจริญจำเพาะของ *Alcaligenes* sp.A-04 แต่จะมีผลต่อการผลิต PHB มีรายงานของผู้วิจัยบางกลุ่ม (Senior และคณะ, 1972 ; Jackson และ Dawes, 1976 ; Ward และคณะ, 1977) ได้รายงานไว้ว่าการจำกัดปริมาณออกซิเจนเป็นการกระตุ้นการสร้าง PHB เช่น *Azotobacter beijerinckii* สามารถผลิต PHB ได้ถึง 70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อจำกัดปริมาณออกซิเจนเท่ากับ 0.275 % (oxygen in inflowing gas) Mulchandani และคณะ (1989) และ Groom และคณะ (1988) รายงานไว้ว่าเพื่อให้การ ผลิต PHB ของ *Alcaligenes* sp. มีผลดี ควรรักษาระดับของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักให้มากกว่า 80% ของค่าการละลายอิ่มตัว จึงอาจสรุปได้ว่าปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการเติบโต และการผลิต PHB อาจแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์จุลินทรีย์ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเลี้ยงเชื้อ

เมื่อแปรผันปริมาณฟรุคโตสเท่ากับ 5.0 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร โดยความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร พบว่าฟรุคโตสปริมาณ 5.0 กรัม/ลิตร ไม่เพียงพอที่ *Alcaligenes* sp. A-04 ใช้ในการเติบโตและการผลิต PHB คาดว่าเมื่อฟรุคโตสในน้ำหมักเหลืออยู่ปริมาณน้อยมาก เซลล์จะนำ PHB มาใช้แต่เมื่อความเข้มข้นของฟรุคโตสเพิ่มเป็น 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร พบว่าเพียงพอสำหรับใช้ในการเติบโตและการผลิต PHB ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ฟรุคโตส5.0 และ 10.0 กรัม/ลิตรพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะใกล้เคียงกันคือ 0.0937 และ 0.0930 เมื่อปริมาณฟรุคโตสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร อัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 0.1324 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ โดยใช้ปริ

มาณฟรุคโตสเท่ากับ 10.0 และ 20.0 กรัม/ลิตร พบว่าใกล้เคียงกัน (1.58 และ 1.60 กรัม/ลิตร ตามลำดับ) แต่ปริมาณฟรุคโตสที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ฟรุคโตสปริมาณ 10.0 กรัม/ลิตร นั้นน้อยกว่าเมื่อใช้ฟรุคโตสเท่ากับ 20.0 กรัม/ลิตร (14.0 และ 6.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ) ดังนั้นจึงสรุปว่าปริมาณฟรุคโตสเริ่มต้นที่เหมาะสม เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร ควรเป็น 10.0 กรัม/ลิตร

เมื่อได้ปริมาณฟรุคโตสที่เหมาะสมแล้ว ได้แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ฟรุคโตสปริมาณ 10.0 กรัม/ลิตรนั้น เพียงพอที่จะใช้ในการเลี้ยงเชื้อเมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และ 0.3 กรัม/ลิตร เท่านั้น เพราะเมื่อเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร พบว่าฟรุคโตสหมดก่อนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำให้เซลล์มีการนำPHBไปใช้ ทำให้ปริมาณ PHB ลดลง ดังนั้นเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร จึงได้เพิ่มปริมาณฟรุคโตสเป็น 20.0 กรัม/ลิตร และเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1.5 กรัม/ลิตรด้วย พบว่าฟรุคโตสปริมาณ 20.0 กรัม/ลิตร ไม่เพียงพอสำหรับ *Alcaligenes* sp. A-04 ใช้ในการเติบโตและการผลิต PHB ตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตรจึงได้เพิ่มปริมาณฟรุคโตสเป็น 30.0 กรัม/ลิตร และได้เพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 2.0 กรัม/ลิตร ด้วย ผลการทดลองพบว่า สำหรับการเลี้ยงเชื้อแบบ batch cultivation นั้น การเลี้ยงเชื้อที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1.5 กรัม/ลิตร ใช้ฟรุคโตสเท่ากับ 30.0 กรัม/ลิตร *Alcaligenes* sp. A-04 ผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 7.21 กรัม/ลิตร คิดเป็นปริมาณ 82.12% ของน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณ PHB ที่ได้นี้สูงกว่าที่ Mulchandani และคณะ (1989) ได้ศึกษาไว้เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697 ในสภาวะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 กรัม/ลิตร ฟรุคโตส 40.0 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสภาวะที่ดีที่สุด โดยปริมาณ PHB ที่ได้สูงสุดเท่ากับ 3.78 กรัม/ลิตร คิดเป็น 59.10% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 47 ชั่วโมง และเมื่อดูที่เวลาใกล้เคียงกัน ที่ 48 ชั่วโมงเห็นได้ว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถผลิต PHB ได้ถึง 6.64 กรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาณที่ *A. eutrophus* ATCC 17697 ผลิตได้ถึง 2 เท่า

สรุปว่าสภาวะที่ทำให้เชื้อผลิต PHB ได้สูงสุดในการเลี้ยงแบบ batch คือสภาวะที่มีฟรุคโตสเท่ากับ 30 กรัม/ลิตร และ ที่ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1.5 กรัม/ลิตร (ได้ PHB ปริมาณ 7.21 กรัม/ลิตร คิดเป็น 82.12% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 72 ชั่วโมง)

จากงานวิจัยนี้เมื่อเปรียบเทียบสมบัติเชิงกลระหว่างปิโตรโพลิเมอร์กับไบโอโพลีเมอร์ พบว่าแรงสูงสุดที่ใช้ในการดึงให้ specimen ขาดมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ปิโตรโพลีเมอร์มีสมบัติเชิงกลอื่นที่ดีกว่าไบโอโพลีเมอร์ กล่าวคือปิโตรโพลีเมอร์มีค่าต้านแรงดึง ความเหนียว และระยะที่ถูกดึงมากกว่า และความแข็งที่น้อยกว่าไบโอโพลีเมอร์ เนื่องจากในกระบวนการผลิตโพลีเมอร์ทางอุตสาหกรรมจะเติมสารแต่งเติมหลายชนิดเพื่อเพิ่มสมบัติเชิงกลให้ดีขึ้น และเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้งาน (Berlins, 1991) จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าไบโอโพลีเมอร์ที่เป็นโคโพลีเมอร์ มีสมบัติเชิงกลที่ดีกว่าโฮโมโพลีเมอร์ PHB โดยเมื่ออยู่ในรูปโคโพลีเมอร์มีค่าความแข็งที่ลดลง และความเหนียวที่เพิ่มขึ้น ทำให้โคโพลีเมอร์สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้มากกว่า และสะดวกต่อการนำเข้ากระบวนการทางโพลีเมอร์ (Holmes, 1985) ซึ่งสารถทำได้โดยการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในแหล่งคาร์บอนผสมทั้งในด้านชนิดและสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนที่เลือกได้ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไป เมื่อเปรียบเทียบกับปิโตรโพลีเมอร์ (PP และ PE) พบว่าสมบัติเชิงกลของไบโอโพลีเมอร์ด้อยกว่าปิโตรโพลีเมอร์ ในด้านการต้านแรงดึง และความเหนียว ซึ่งถ้าจะมีการนำไปใช้ทดแทนปิโตรโพลีเมอร์บางชนิดก็อาจทำได้ โดยการเติมสารแต่งเติมบางชนิดบางชนิดให้เหมาะกับวัตถุประสงค์และการใช้งาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. ลักษณะและการสร้าง โพลี-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทีเรท โดย *Alcaligenes* sp. A-04. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2536.

ภาษาอังกฤษ

Anderson, A.J., and Dawes, A. Occurence, Metabolism, Metabolic role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Microbiological Rev. 54(1990) : 450-472.

Ballard, D.G.H., Holmes, P.A., and Senior, P.J. Formation of polymers of β-hydroxybutyric acid in bacterial cell and a comparison of the morphology of growth with the formation of polyethylene in the solid state. In M. Fontanille and A. Guyot (ed.) Recent advances in mechanistic and synthetic aspects of polymerization. 215 (1987) : 239-314.

Berger, E., Ramsay, B.A., Ramsay, J.A., and Chavarie, C. PHB recovery by hypochlorite digestion of non PHB biomass. Biotechnol.Tech. 3(1989) : 227-232.

Bernfeld, F. Method in Enzymology : Amylase α and β. Academic Press Inc (Colowich, P.S. and Kaplan, O.N.,eds) (1955) : 149.

Berrins, L.M. Injection Molding of Thermoplastics in Plastics Engineering Handbook of Society of the Plastics Industry, ed. Berrins, M.L. (New York : Van Nostrand Reinhol, 1991), P.153-154.

Bloembergen, S., Holden, D.A., Hamer, G.K., Bluhm, T.L., and Marchessault, R.H. Studies of composition and crystallinity of bacterial poly (β-hydroxybutyrate-co-β-hydroxyvalerate) Macromolecules 19 (1986) : 2865-2871.

Brivonese, C.A. and Sutterland, I.W. Polymer production by mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30 (1989) : 97-102.

Byrom, D. Polymer synthetsis by microorganisms:technology and economic Tibtech. 5(1987) : 246-250.

Dawes, E.A., and Senior, P.J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganism. Adv.Microb.Physiol. 10(1973):135-266

Ellar, D., Lundgren, D.G., Okamura, K., and Marchessault, R.H. Morphology of poly-β-hydroxybutyrate granules. J. Mol. Biol. 35(1968) : 489-502.

Evan,D.J. and Sikda, K.S. Biodegradable plastic . Chemtech. 5 (1990) : 38-42.

Groom,C.A., Luong, J.H.T., and Mulchandani, A. On-line culture fluorescence measurment during the batchcultivation of poly-β-hydroxybutyrate producing *Alcaligenes eutrophus*. J. Biotechnol. 8(1988) : 271-278.

Holmes, P.A. Application of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic . Phys. Technol. 16(1985): 32-36.

Howells, E.R. Single cell protein and related technology. J.Chem. Ind. (1982) : 508-511.

Jackson, E.A., and Dawes, E.A. Regulation of tricarboxylic acid cycle and poly-β-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen and oxygen limitation. J. Gen. Microbiol. 97(1976) : 303-312.

Kempers, A.J. Determination of sub-microquantities of ammonuim and nitrates in soils with phenol, sodium nitroprusside and hypochlorite. Geoderma 12(1974) : 201-206.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall,R.J. Protein measurment with Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193 (1951) : 265-275.

Mas, J., Pedros-Alio, C., and Guerrero, R. Mathametical model for determining the effects of intracytoplasmic inclusions on volumn and density of microorganisms. J. Bacteriol. 164(1985) : 749-756.

Mulchandani, A., Luong, J.H.T,and Groom. C. Substrate inhibition kinetic for microbialgrowth andsynthesis of poly-β-hydroxybutyricacid by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30 (1989): 11-17.

Nakata, H.M. Effect of pH on intermediates produced during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. (1963) : 577-581.

Repaske, R. Nutritional requiment for *Hydrogenomonas eutropha* J. bacteriol. 83(1962) : 418-422.

Senior, P.J., Beech, G.A., Richie, G.A.F., and Dawes, E.A. The role of oxygen limitationinthe formation of poly-β-hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. J. Biochem. 128 (1972) : 1193-1201.

Sonnleitner, B., Heinzle, E., Braunegg, G., and Lafferty R.M. Formal kinetics of poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) production in *Alcaligenes eutrophus* H16 and *Mycoplana rubra* R14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium-limited batch cultures. Eur. J. Appl. Microbiol. 7(1979) : 1-10.

Steinbuchel, A. and Schlegel, H.G. Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus*, which are impared in the accumulation of poly(β-hydroxybutyric acid) (PHB) under conditions permitting synthesis of PHB. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31 (1989) : 168-175.

Taidi, B., Anderson, A.J., Dawes, E.A., and Byrom, D. Effect of carbon source and concentration on the molecular mass of poly(β-hydro xybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40(1994) : 786-790.

Ward, A.C., Rowley, B.I. and Dawes, E.A. Effect of oxygen and nitrogen limitation on poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis in ammonium grown *Azotobacter beijerinckii*. J. Gen. Microbiol. 102(1977) : 61-68.

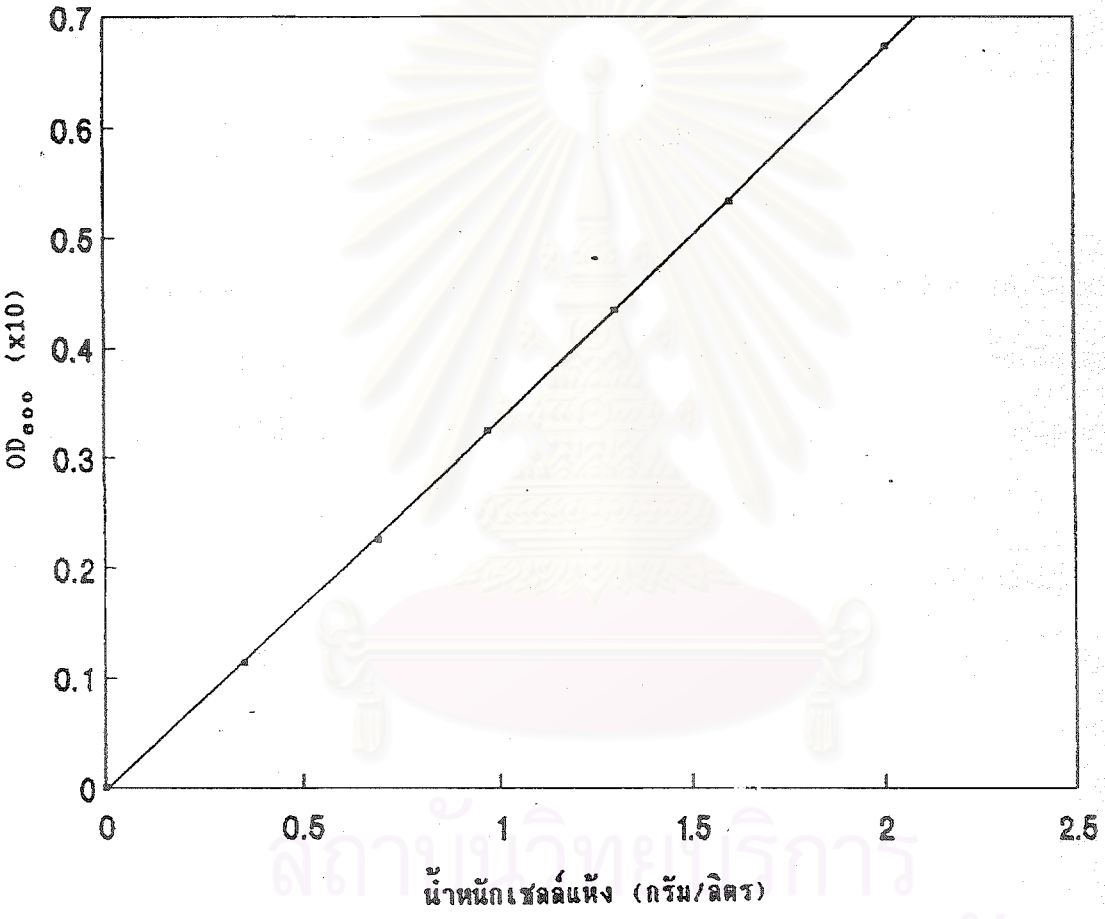
ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1ก. วิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และกราฟมาตราฐานระหว่าง น้ำหนักเซลล์แห้งและ OD_{600} และวิธีหาอัตราการเจริญจำเพาะ

เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ใช้สำหรับกระตุ้นการสร้าง PHB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตวงปริมาตรเรียงตามลำดับ 20 40 60 80 100 และ 120 มล. เติมน้ำกลั่นให้แต่ละตัวอย่างมีปริมาตรเป็น 120 มล. เมื่อผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำแต่ละตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่า OD_{600} กระจายอยู่ในช่วง 0.1-0.7 บันทึกค่าไว้ ปริมาณที่เหลือของแต่ละตัวอย่างนำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบ ต่อนาที นาน 15 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ทั้ง 6 ตัวอย่าง ไปอบที่ 80°ซ จนได้น้ำหนักคงที่ แล้วนำค่า OD_{600} และค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์และคำนวนหาค่าความชัน (slope)

การหาอัตราการเจริญจำเพาะหาได้โดยนำค่า ln ของน้ำหนักเซลล์แห้งหรือ ln ของค่า OD_{600} ของแต่ละช่วงเวลามา plot คู่กับเวลา (ชั่วโมง) จากนั้นหาค่าความชันในช่วงที่มีความชันมากที่สุด (ใน *Alcaligenes* sp. A-04 ระยะเวลาที่มีความชันมากที่สุดประมาณ 0-12 ชั่วโมง) ค่าความชันนี้คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 1ข. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Alcaligenes* sp. A-04 (ความชันเท่ากับ 3.33)

ภาคผนวกที่ 2 วิธีเตรียมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิกรีเอเจนต์

เตรียมโดยละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาณ 20 มล. เติมโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท 30 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ผสมให้เข้ากัน บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวกที่ 3 วิธีเตรียมสารละลาย LowryC และ LowryD

สารละลาย LowryC ได้จากการผสมสารละลาย LowryA และ LowryB ในอัตราส่วน 50 : 1 ซึ่งสารละลาย LowryA ประกอบด้วย โซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม โซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตท 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร สารละลาย LowryB ประกอบด้วย คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.

สารละลาย LowryD ประกอบด้วย ฟีนอลรีเอเจนท์ และ น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 โดยเตรียมทันทีที่จะใช้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 4 วิธีเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียม

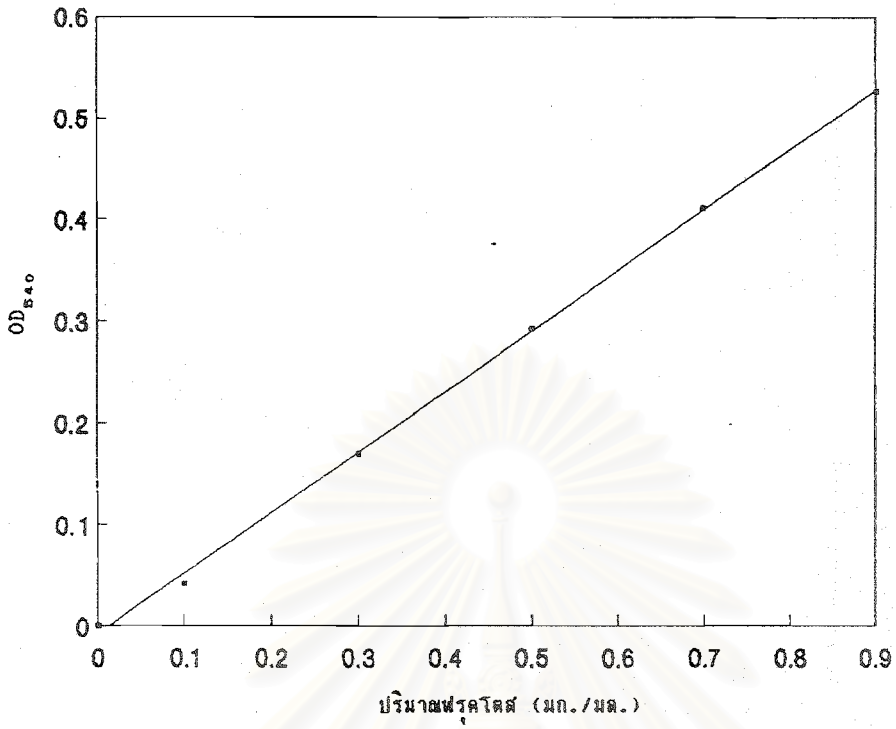
โปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ได้จากละลาย โปแตสเซียมคลอไรด์ 150 กรัมในน้ำปลอดประจุ 800 มล. แล้วเจือจางให้ได้ 1,000 มล.

ฟีนอลไนโตรพัสซายด์รีเอเจนต์ ได้จากละลาย ฟีนอล 7 กรัม และโซเดียมไนโตรพัสซายด์ 34 มก. ในน้ำปลอดประจุ 80 มล. เจือจางให้ได้ 100 มล. เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°ซ

บัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์รีเอเจนท์ ได้จากละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.480 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 70 มล. เติมไดโซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.98 กรัม และเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (5-5.25%) จำนวน 20 มล. ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 11.4-12.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเจือจางให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มล.

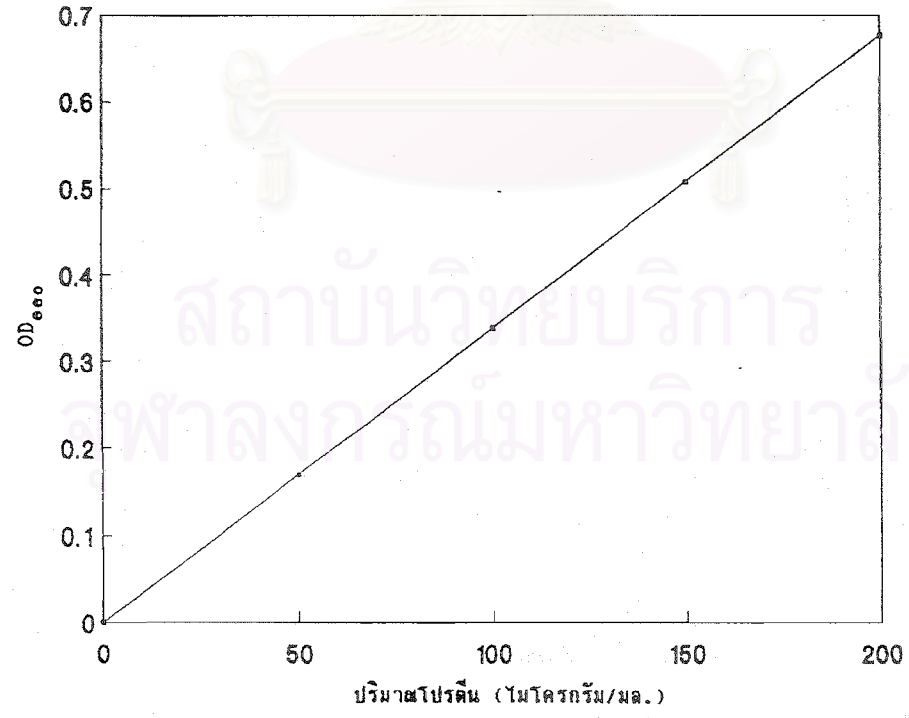
สารละลาย EDTA เตรียมได้จากละลาย EDTA ไดโซเดียมซอลท์ (EDTA disodium) จำนวน 6 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 80 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7.0 และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณฟรุคโตส

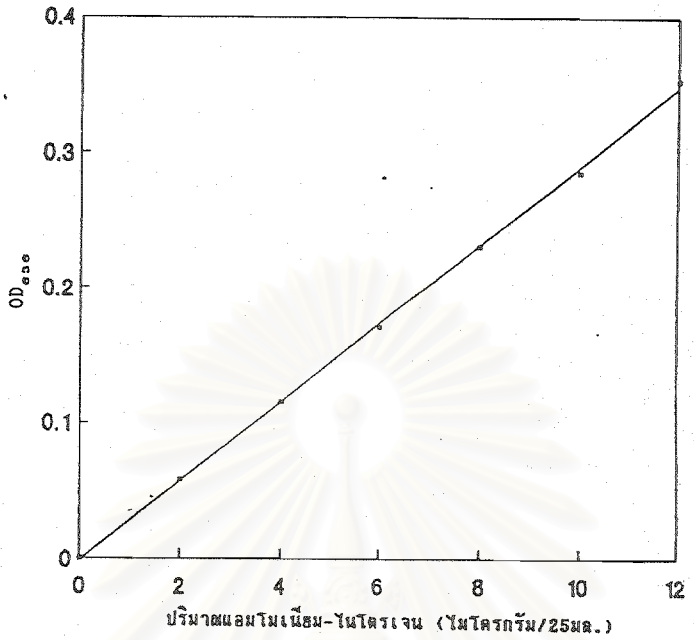
(ความชันเท่ากับ 0.575)



ภาคผนวกที่ 6 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีน

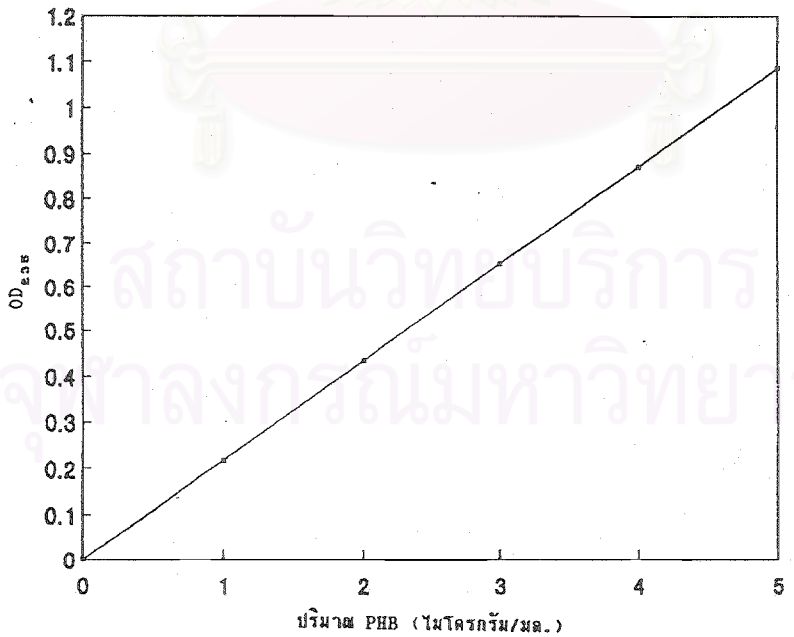
(ความชันเท่ากับ 3.385×10^{-3})

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวกที่ 7 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน

(ความชันเท่ากับ 0.028)



ภาคผนวกที่ 8 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ PHB

(ความชันเท่ากับ 0.217)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย