

การผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)  
ที่มีสัดส่วนโดยโมลของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตที่เหมาะสม จาก *Bacillus megaterium* P-12  
ด้วยการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์สองขั้นตอน



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2557  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF POLY (3-HYDROXYBUTYRATE-co-3-HYDROXYVALERATE),  
THE BIODEGRADABLE PLASTIC WITH SUITABLE 3HV MOLE FRACTION  
BY *Bacillus megaterium* P-12 IN TWO STAGE FED-BATCH CULTIVATION

Mr. Jakkapat Suwannakoot



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

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ที่มีสัดส่วนโดยโมลของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตที่เหมาะสม จาก *Bacillus megaterium* P-12 ด้วยการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์สองขั้นตอน

โดย

นายจักรพรรดิ สุวรรณภูมิ

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐฐา ทองจุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ ทารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐฐา ทองจุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

จักรพรรดิ สุวรรณภูมิ : การผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ที่มีสัดส่วนโดยโมลของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตที่เหมาะสม จาก *Bacillus megaterium* P-12 ด้วยการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์สองขั้นตอน (PRODUCTION OF POLY (3-HYDROXYBUTYRATE-co-3-HYDROXYVALERATE), THE BIODEGRADABLE PLASTIC WITH SUITABLE 3HV MOLE FRACTION BY *Bacillus megaterium* P-12 IN TWO STAGE FED-BATCH CULTIVATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร.สงศรี กุลปรีชา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.ณัฐภา ทองจุล, 117 หน้า.

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือ PHBV เป็นโคพอลิเมอร์ที่มีการสังเคราะห์และสะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์หลายชนิดเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานจัดเป็นพอลิเมอร์ที่มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เนื่องด้วยสมบัติที่สามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยการเลี้ยง *Bacillus megaterium* P-12 แบบเฟด-แบตช์สองขั้นตอนในถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB) ได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 27.52 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 5.04 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 23.71% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ มีสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไปสูงสุดเท่ากับ 0.69 ในการเลี้ยงเชื้อแบบเฟด-แบตช์ขั้นตอนแรก การเติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 6 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 28.02 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 7.30 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 26.27% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ในการเลี้ยงเชื้อแบบเฟด-แบตช์ขั้นตอนที่สอง การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ถูกกระตุ้นด้วยการเติมแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกากน้ำตาลและโซเดียมโพรพิโอเนตในอัตราส่วน 60 กรัมต่อลิตร ต่อ 10 กรัม ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงขึ้นเป็น 30.88 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ PHBV สูงขึ้นเป็น 9.44 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นปริมาณ PHBV เท่ากับ 30.56% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง มีสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV เท่ากับ 21.67 โมลเปอร์เซ็นต์

|            |                          |                                  |
|------------|--------------------------|----------------------------------|
| ภาควิชา    | จุลชีววิทยา              | ลายมือชื่อนิสิต .....            |
| สาขาวิชา   | จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม | ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ..... |
| ปีการศึกษา | 2557                     | ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม ..... |

# # 5571934723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: BACILLUS MEGATERIUM P-12 / TWO STAGE FED-BATCH / PHBV

JAKKAPAT SUWANNAKOOT: PRODUCTION OF POLY (3-HYDROXYBUTYRATE-co-3-HYDROXYVALERATE),THE BIODEGRADABLE PLASTIC WITH SUITABLE 3HV MOLE FRACTION BY *Bacillus megaterium* P-12 IN TWO STAGE FED-BATCH CULTIVATION. ADVISOR: PROF. SONGSRI KULPREECHA, D.Eng., CO-ADVISOR: ASST. PROF. NUTTHA THONGCHUL, Ph.D., 117 pp.

Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) or P(3HB-co-3HV) or PHBV is an intracellular storage material which is accumulated in many microorganisms as carbon and energy storage. It is considered as an environment-friendly material because of its biodegradable properties. This work aimed to study the production of PHBV by two step fed-batch cultivation. The effect of initial total sugar concentration in sugarcane molasses (40, 50, 60 and 70 g/l) on cell growth and P(3HB) production by *Bacillus megaterium* P-12 were investigated in a 5 liter fermenter. The result revealed that the initial total sugar concentration of 60 g/l was best suited for growth and P(3HB) production resulting in high cell concentration of 27.52 g/l and 5.04 g/l of P(3HB) (equivalent to 23.71% of P(3HB) content) at 9 h cultivation. At this initial sugar concentration, the highest biomass yield of 0.69 was obtained. This inferred to the high efficiency of substrate consumption. The first step of fed-batch cultivation, feeding of molasses (60 g/l) and urea (6 g/l) at 6 h of cultivation was suitable for growth and P(3HB) production which 28.02 g/l of DCW and 7.30 g/l of P(3HB) (26.27% content) were investigated. PHBV production was induced by the second step of fed-batch cultivation, sugarcane molasses (60 g/l) and sodium propionate (10 g) were fed at 9 h of cultivation. The result show that 30.88 g/l of DCW and 9.44 g/l of PHBV were obtained (equivalent to 30.56% of PHBV content) with 21.69 % of 3HV mole fraction.

Department: Microbiology

Student's Signature .....

Field of Study: Industrial Microbiology

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2014

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณีฎฐา ทองจุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำแก่ข้าพเจ้า ทำให้สามารถทำงานวิจัยได้สำเร็จ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้า ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิธ ลือพร้อมชัย ที่กรุณารับเป็นประธาน กรรมการสอบ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน กรรมการภายใน และรองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช กรรมการภายนอกจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่กรุณารับเป็นกรรมการ สอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บริษัทมิตรผลวิจัยและพัฒนา ที่ให้ความอนุเคราะห์กากน้ำตาลเพื่อใช้ใน งานวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณพี่ๆน้องๆเพื่อนๆในห้องวิจัย 1804/13 ทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือและคอยให้กำลังใจในการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับความความช่วยเหลือ และ อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวสำหรับความรักความห่วงใย คอยเป็นกำลังใจตลอดช่วงระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จการศึกษา

## สารบัญ

หน้า

|   |    |
|---|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....  | ง  |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....                                     | จ  |
| กิตติกรรมประกาศ.....  | ฉ  |
| สารบัญ.....   | ช  |
| สารบัญรูปภาพ.....   | ญ  |
| สารบัญตาราง.....  | ต  |
| บทที่ 1.....  | 1  |
| บทนำ.....   | 1  |
| มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย.....                               | 3  |
| วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....                                | 4  |
| ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....                               | 4  |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....                              | 4  |
| บทที่ 2.....  | 5  |
| ปรีทรรศน์วรรณกรรม.....                                      | 5  |
| 2.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....                     | 5  |
| 2.1.1 ความหมายของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....        | 5  |
| 2.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการย่อยสลาย.....                | 5  |
| 2.1.3 กลไกการย่อยสลายของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ..... | 6  |
| 2.1.4 ชนิดของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....            | 7  |
| 2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต.....                             | 8  |
| 2.3 โครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต.....          | 10 |
| 2.4 การจัดจำแนกชนิดของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต.....           | 11 |

|  |    |
|--|----|
| 2.5 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต.....   | 12 |
| 2.6 วิธีชีวสังเคราะห์ของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต.....  | 15 |
| 2.7 เทคนิคในการตรวจสอบการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต.....   | 20 |
| 2.8 การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต.....   | 21 |
| 2.9 พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต).....  | 24 |
| 2.10 โครงสร้างทางเคมีของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต).....  | 25 |
| 2.11 สมบัติของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต).....  | 25 |
| 2.12 พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3ไฮดรอกซีวาเลอเรต).....  | 27 |
| 2.13 สมบัติของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3ไฮดรอกซีวาเลอเรต).....   | 28 |
| 2.14 วิธีชีวสังเคราะห์(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3ไฮดรอกซีวาเลอเรต).....   | 30 |
| 2.15 การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยการควบคุมสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV.....  | 32 |
| 2.16 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเพด-แบดซ์.....  | 33 |
| บทที่ 3.....   | 37 |
| อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....  | 37 |
| 3.1 วัสดุอุปกรณ์.....  | 37 |
| 3.2 เคมีภัณฑ์.....   | 38 |
| 3.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....  | 40 |
| 3.4 วิธีวิเคราะห์.....   | 45 |
| บทที่ 4.....   | 49 |
| ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....  | 49 |
| 4.1 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) โดย <i>B. megaterium</i> P-12.....             | 49 |
| 4.2 การศึกษาช่วงเวลาในการเติมแหล่งคาร์บอนในขั้นตอนแรกเพื่อเพิ่มการเจริญและการผลิตไฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) โดย <i>B. megaterium</i> P-12..... | 64 |



|   |     |
|---|-----|
| 4.3 การศึกษาอัตราส่วนความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนผสมที่เดิมในชั้นที่สอง ที่เหมาะสมต่อ<br>การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดย <i>B. megaterium</i> P-12..... | 75  |
| บทที่ 5 .....   | 93  |
| สรุปผลการทดลอง.....   | 93  |
| รายการอ้างอิง.....  | 99  |
| ภาคผนวก .....   | 109 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....  | 117 |



## สารบัญรูปภาพ

|   |    |
|---|----|
| รูปที่ 1 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการย่อยสลายพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ .....  | 6  |
| รูปที่ 2 กลไกการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์.....  | 7  |
| รูปที่ 3 แกรนูล PHAs ที่สะสมภายในเซลล์ <i>Pseudomonas putida</i> CA-3.....  | 9  |
| รูปที่ 4 องค์ประกอบของแกรนูล PHAs .....   | 9  |
| รูปที่ 5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHAs.....  | 10 |
| รูปที่ 6 วิธีชีวสังเคราะห์ PHAs .....   | 17 |
| รูปที่ 7 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเครื่องหมายการค้า Nodax™ .  | 23 |
| รูปที่ 8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงแกรนูลของ P(3HB).....  | 24 |
| รูปที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) .....  | 25 |
| รูปที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) .....   | 27 |
| รูปที่ 11 การเรียงตัวแบบส้อมของมอนอเมอร์ 3HB และ 3HV ในสายโคพอลิเมอร์ PHBV .....  | 27 |
| รูปที่ 12 แผ่นฟิล์มโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายในธรรมชาติ.....   | 28 |
| รูปที่ 13 วิธีชีวสังเคราะห์ PHBV จากกลูโคส กรดโพธิ์โอนิกและกรดวาเลอริก .....  | 31 |
| รูปที่ 14 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมใน กากน้ำตาลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร..... | 52 |
| รูปที่ 15 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมใน กากน้ำตาลเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร..... | 54 |
| รูปที่ 16 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมใน กากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร..... | 56 |

รูปที่ 17 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมใน กากน้ำตาลเท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร..... 58

รูปที่ 18 เปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) ค่าที่ สูงที่สุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวม ในกากน้ำตาล ต่างๆกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 59

รูปที่ 19 เปรียบเทียบค่าอัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไปค่าที่สูงที่สุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลต่างๆกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 61

รูปที่ 20 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมใน กากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ 67

รูปที่ 21 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมใน กากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 7.5 ของการเลี้ยง เชื้อ..... 69

รูปที่ 22 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมใน กากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ 71

รูปที่ 23 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) ค่าที่สูง ที่สุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวม ในกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตรและเติมสารอาหารใหม่ ณ เวลาที่ต่างกัน..... 72

รูปที่ 24 เปรียบเทียบอัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ปริมาณ เซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไปค่าที่สูงที่สุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มี ปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตรและเติมสารอาหารใหม่ ณ เวลาที่ต่างกัน..... 73

- รูปที่ 25 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรีย ที่ ชั่วโมงที่ 9 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนต เท่ากับ 60 : 5 ที่ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ..... 78
- รูปที่ 26 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติม แหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 5 ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ..... 82
- รูปที่ 27 สัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรีย ที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 5 ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ..... 83
- รูปที่ 28 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติม แหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 10 ที่ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ..... 86
- รูปที่ 29 สัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรีย ที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 10 ที่ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ..... 87
- รูปที่ 30 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติม แหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 15 ที่ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ..... 90

รูปที่ 31 สัดส่วนมอดอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง B. megaterium P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 15 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ..... 91



## สารบัญตาราง

|  |    |
|--|----|
| ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณผลผลิตของตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ .....  | 13 |
| ตารางที่ 2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ PHAs.....   | 18 |
| ตารางที่ 3 บริษัทที่มีการผลิต PHAs ในระดับอุตสาหกรรม .....   | 23 |
| ตารางที่ 4 สมบัติทางกายภาพและเชิงกลของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) และพอลิพรอพิลีน ....  | 26 |
| ตารางที่ 5 สมบัติของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของมอนอเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตต่างกัน .....   | 29 |
| ตารางที่ 6 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร.....                                       | 51 |
| ตารางที่ 7 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร.....                                       | 53 |
| ตารางที่ 8 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร.....                                       | 55 |
| ตารางที่ 9 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร.....                                       | 57 |
| ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) ที่สูงสุด เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลต่างๆกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง .....  | 59 |
| ตารางที่ 11 เปรียบเทียบค่าอัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไปค่าที่สูงที่สุด เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลต่างๆกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ..... | 61 |

ตารางที่ 12 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ 66

ตารางที่ 13 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 7.5 ของการเลี้ยงเชื้อ..... 68

ตารางที่ 14 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ 70

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) ค่าที่สูงที่สุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตรและเติมสารอาหารใหม่ ณ เวลาที่ต่างกัน..... 72

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบอัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไปค่าที่สูงที่สุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตรและเติมสารอาหารใหม่ ณ เวลาที่ต่างกัน ..... 73

ตารางที่ 17 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 9 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 5 ที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ..... 77

ตารางที่ 18 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 5 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ..... 81

ตารางที่ 19 สัดส่วนมोनอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 5 ที่ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ.....83

ตารางที่ 20 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติม แหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 10 ที่ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ.....85

ตารางที่ 21 สัดส่วนมोनอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 10 ที่ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ .....87

ตารางที่ 22 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติม แหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 15 ที่ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ.....89

ตารางที่ 23 สัดส่วนมोनอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 15 ที่ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ..... 91

ตารางที่ 24 เปรียบเทียบการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV สัดส่วนของมोनอเมอร์ 3HV โดยใช้ จุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอน และวิธีการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน..... 97



# บทที่ 1

## บทนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมพลาสติกมีการเติบโตเป็นอย่างมาก เนื่องจากความต้องการใช้ที่เพิ่มสูงขึ้น เพราะพลาสติกเกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวันของมนุษย์ในหลายๆด้าน เช่น บรรจุภัณฑ์ ยานยนต์ เครื่องใช้ไฟฟ้า เกษตรกรรม และอื่นๆ โดยพลาสติกดังกล่าวมีสมบัติที่ดีกว่าวัสดุอื่น คือ แข็งแรง มีน้ำหนักเบา สีสวยงาม และสามารถขึ้นรูปให้มีลักษณะตามที่ต้องการได้ แต่พลาสติกเหล่านี้ได้มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ ทำให้เกิดการสะสมและเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ถึงแม้จะมีการจัดการพลาสติกเหล่านี้โดยหลายวิธี เช่น เผา หรือฝังกลบ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวก็ยังคงเกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม หรือแม้กระทั่งแนวทางการบริหารจัดการมลพิษรูปแบบใหม่ที่เน้นการส่งเสริมและอนุรักษ์ไว้ซึ่งทรัพยากรธรรมชาติโดยมีการประยุกต์หลักการด้าน 3Rs (Reduce Reuse Recycle) ที่เป็นการลด คัดแยก และนำขยะพลาสติกกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งถึงแม้จะเป็นนโยบายที่ได้รับการตอบรับดี แต่ขยะพลาสติกดังกล่าวก็ยังคงสะสมและหมุนเวียนในระบบ วิธีการดังกล่าวจึงยังเป็นวิธีที่ไม่แก้ปัญหาที่จุดเริ่มต้น ดังนั้น แนวทางหนึ่งในการจัดการกับปัญหามลพิษจากพลาสติกสังเคราะห์ คือ การใช้พลาสติกหรือพอลิเมอร์ชีวภาพที่สามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติ เช่น พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates) หรือ PHAs โพลีแลคไทด์ (polylactides) โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) เป็นต้น (Patwardhan และ Srivastava, 2004) ซึ่งมีความสำคัญและมีความน่าสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อเป็นแนวทางในการนำมาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีและลดผลกระทบที่เกิดขึ้นกับสิ่งแวดล้อมได้

PHAs เป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกรด 3-ไฮดรอกซี (3-hydroxy acid) สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน อยู่ในรูปแกรนูล (granule) ที่ไม่ละลายน้ำภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์จุลินทรีย์ (Phillip, 2007) โดยมีบทบาทเช่นเดียวกับไขมันที่สะสมในมนุษย์และแป้งที่สะสมในพืช (Patwardhan และ Srivastava, 2004) ซึ่งภาวะที่มีการสังเคราะห์ คือ มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป (excess carbon) และมีการจำกัดสารอาหารบางชนิดหรือภาวะขาดสมดุลของสารอาหาร (unbalanced growth condition) เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และออกซิเจน เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์บางสายพันธุ์สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้มากถึง 90% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Madison และ Huisman, 1999; zarei และคณะ, 2013) โดยความแตกต่างขององค์ประกอบและโครงสร้างของ PHAs ขึ้นอยู่กับชนิดของ

จุลินทรีย์ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะการเพาะเลี้ยง (Cuellar และคณะ, 2011) PHAs มีสมบัติที่สำคัญ คือ สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติ ได้เป็น น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดคาร์บอกซิลิก (Lee, 1996) ซึ่งไม่เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ด้วยสมบัติสำคัญที่สามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradability) และสมบัติที่เข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ทำให้สามารถนำ PHAs ไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น ทาง การเกษตร ทางอุตสาหกรรม และทางการแพทย์ เป็นต้น (Bonartsev และคณะ, 2007) นอกจากนี้ สมบัติอื่นๆบางประการของ PHAs ที่มีความใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมีซึ่งเป็นเทอร์ โมพลาสติกที่สามารถขึ้นรูปใหม่ได้ เช่น พอลิพรอพิลีน (polypropylene หรือ PP) พอลิเอทิลีน (polyethylene หรือ PE) (Ashby และคณะ, 2012) จึงทำให้ PHAs มีความน่าสนใจในการนำมาใช้ งาน และมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง PHAs ชนิดแรกที่มีการศึกษา คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ poly(3-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB) เป็นโฮโมพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) ถูกค้นพบโดย Lemoigne ในปี ค.ศ. 1927 (Philip และคณะ, 2007) ซึ่งต่อมาเป็นที่รู้จักและมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรม แต่อย่างไรก็ตาม P(3HB) ยังมีข้อด้อย เนื่อง ด้วยสมบัติทางกายภาพและเชิงกลหลายประการ โดยมีอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (glass transition temperature หรือ Tg) เท่ากับ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature หรือ Tm) เท่ากับ 180 องศาเซลเซียส ค่ายังส์โมดูลัส (Young's Modulus) เท่ากับ 3.5 GPa ค่า ต้านแรงดึง (tensile strength) เท่ากับ 43 MPa เปอร์เซ็นต์การยืด (% elongation to break) เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ และระดับความเป็นผลึก (degree of crystallinity) สูง ประมาณ 55-80 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ P(3HB) มีลักษณะแข็ง (stiffness) และเปราะ (brittleness) (Sudesh และคณะ, 2000) จึงมีข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์บางชนิดที่ต้องมีความยืดหยุ่น ดังนั้น จึงมีการ พัฒนาและปรับปรุงสมบัติของพอลิเมอร์ให้ดีขึ้น เช่น การพัฒนากระบวนการผลิตโดยเพิ่ม กระบวนการหลอมละลาย (annealing) ซึ่งทำให้มีค่าการทนต่อแรงดึง (tensile strength) เพิ่มมาก ขึ้น (Tanaka และคณะ, 2006) และอีกวิธีที่มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาในปัจจุบัน คือ การสังเคราะห์ โคพอลิเมอร์ โดยเป็นการสังเคราะห์มอนอเมอร์ของ 3HB ร่วมกับมอนอเมอร์ชนิดอื่น ซึ่งสมบัติของ โคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้นั้นจะขึ้นกับสัดส่วนของมอนอเมอร์ชนิดที่เป็นองค์ประกอบ (Rai และคณะ, 2011)

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือ P(3HB-co-3HV) หรือ PHBV เป็นโคพอลิเมอร์ชนิดที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซี บิวทิเรต (3HB) เชื่อมต่อกับมอนอเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV) จุลินทรีย์จะสังเคราะห์ PHBV ขึ้นเมื่อมีการเติมโคสับสเตรต (co-substrate) หรือแหล่งคาร์บอนที่ให้มอนอเมอร์ 3HV (carbon generating 3HV monomer) ที่เหมาะสม เช่น กรดวาเลอริก 3-ไฮดรอกซีวาเลอโร

ไนไตรล์ กรดลิวูลินิก โซเดียมโพรพิโอเนต โซเดียมวาเลอเรต เป็นต้น (Tseng และคณะ, 2010) PHBV มีสมบัติทางกายภาพและเชิงกลที่ดีกว่าโพลิเมอร์ P(3HB) โดยมอนอเมอร์ 3HV ที่เป็นองค์ประกอบใน PHBV ทำให้ระดับความเป็นผลึกของโพลิเมอร์ลดลง ส่งผลให้อุณหภูมิในการหลอมเหลวลดลง และเพิ่มสมบัติความเหนียวและความยืดหยุ่น (Yang และคณะ, 2012) โดย PHBV มีอุณหภูมิหลอมเหลวเท่ากับ 65-170 องศาเซลเซียส ขึ้นกับสัดส่วนของ 3HV (Inoue, 1998) ซึ่งอุณหภูมิหลอมเหลวที่ต่ำส่งผลดีต่อการขึ้นรูปโพลิเมอร์และลดการเสื่อมสภาพทางความร้อนระหว่างกระบวนการ นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การยืดจะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ 3HV โดยสูงถึง 700% เมื่อมีสัดส่วน 3HV เท่ากับ 28 โมลเปอร์เซ็นต์ (Matsumoto และคณะ, 2011) โดยโคโพลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV ในช่วง 20 - 30 โมลเปอร์เซ็นต์ จะมีสมบัติด้านต่างๆที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ (Chen และ Wang, 2002) ดังนั้น สมบัติที่ดีกว่าของโคโพลิเมอร์ PHBV จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาวิจัยการผลิตโคโพลิเมอร์ชนิดดังกล่าว เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้หลากหลายตามวัตถุประสงค์

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเฟด-แบตช์เป็นวิธีที่ทำให้สามารถผลิตเซลล์และผลิตภัณฑ์ให้ได้ปริมาณสูง เพราะสารอาหาร (โดยเฉพาะแหล่งคาร์บอน) สามารถถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม ลดความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นต่อเซลล์ ทำให้ได้ผลผลิตสูงและความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ต่อเวลาสูง (Kanjanachumpol และคณะ, 2013) นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน เป็นวิธีที่สามารถผลิต PHAs ให้ได้ความเข้มข้นสูงขึ้นเช่นกัน โดยในขั้นตอนแรกเป็นการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ และขั้นตอนที่สองเป็นการสังเคราะห์และสะสมโพลิเมอร์ ซึ่งหากมีการควบคุมการเลี้ยงเชื้อทั้งสองขั้นตอนให้มีประสิทธิภาพจะทำให้ได้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สูง (Kim และคณะ, 1997)

### มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

ในปัจจุบันการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพกำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากพลาสติกดังกล่าวสามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดมลพิษสะสมในสิ่งแวดล้อม ซึ่งตอบสนองต่อวิถีชีวิตของมนุษย์ในยุคปัจจุบันที่หันมาให้ความสนใจสิ่งแวดล้อมมากขึ้น โดย P(3HB) จัดเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายทางชีวภาพชนิดที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี แต่อย่างไรก็ตาม P(3HB) ยังมีข้อจำกัดด้านสมบัติของความยืดหยุ่น และอื่นๆ เช่น มีความแข็ง และเปราะ ฯลฯ จึงทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ไม่หลากหลาย ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยการผลิตโคโพลิเมอร์ เช่น PHBV ซึ่งเป็นพลาสติกชีวภาพชนิดที่มีสมบัติดีกว่าหลายประการ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ศันสนีย์ สันตือรณพันธ์ (2550) ได้คัดแยกแบคทีเรีย

ไอโซเลต P-12 ซึ่งสามารถสังเคราะห์ P(3HB) ได้ในปริมาณสูง และต่อมาวันกุลล ชนะสิทธิ์ (2553) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมีและลำดับเบส 16S rDNA ของไอโซเลตดังกล่าว และจัดจำแนกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ชนิด *Bacillus megaterium* รวมถึงได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHBV ของเชื้อดังกล่าว ซึ่งพบว่าสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้จากแหล่งคาร์บอนผสม คือ น้ำอ้อยและโซเดียมโพธิโอเนต แต่ความเข้มข้นของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่สังเคราะห์ได้ยังคงค่อนข้างต่ำ ยังไม่เหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 แบบเฟด-แบตช์สองขั้นตอน ร่วมกับการควบคุมสัดส่วนของโคสับสเตรต เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของโคพอลิเมอร์สูง และมีสัดส่วน 3HV ที่เหมาะสม อีกทั้งเลือกใช้กากน้ำตาลที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกและสามารถหาทดแทนใหม่ได้มาเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตและนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่เหมาะสมต่อไป

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) โดยการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 แบบเฟด-แบตช์สองขั้นตอน

### ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต โโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) โดย *B. megaterium* P-12
2. ศึกษาช่วงเวลาในการเติมแหล่งคาร์บอนในขั้นตอนที่หนึ่งที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์โโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) โดย *B. megaterium* P-12
3. ศึกษาสัดส่วนความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนผสมที่เติมในขั้นตอนที่สองที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV โดย *B. megaterium* P-12

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบสภาวะการเจริญที่เหมาะสมในการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดยการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 แบบเฟด-แบตช์สองขั้นตอน

## บทที่ 2

### ปริทรรศน์วรรณกรรม

#### 2.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

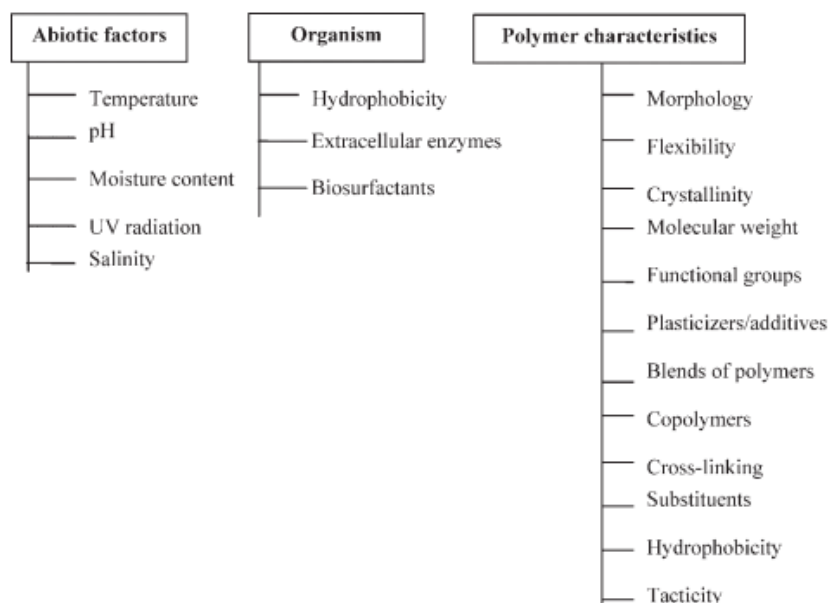
##### 2.1.1 ความหมายของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic) หมายถึง พลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายโดยกระบวนการของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น แบคทีเรีย และรา โดยผ่านปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์บางชนิดผลิตขึ้น ได้เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ มีเทน ชีวมวล เป็นต้น (Shah, 2008) สามารถเกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ในดิน บ่อบำบัดน้ำเสีย แหล่งน้ำจืด หรือน้ำทะเล เป็นต้น

##### 2.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการย่อยสลาย

กระบวนการย่อยสลายพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพสามารถเกิดขึ้นได้ภายใต้สภาวะต่างๆ ซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยสลายนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 ปัจจัย (Artham และ Doble, 2008) ดังนี้

1. ปัจจัยทางกายภาพ (abiotic factors) เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง เปอร์เซ็นต์ความชื้น รังสียูวี ความเค็ม เป็นต้น
2. จุลินทรีย์ (organisms) เช่น จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์
3. คุณลักษณะของพอลิเมอร์ (polymer characteristics) เช่น ลักษณะพื้นฐาน ความยืดหยุ่น ความเป็นผลึก น้ำหนักโมเลกุล หมู่ฟังก์ชัน พลาสติกไฮเซออร์ สารเติมแต่ง ความไม่ชอบน้ำ เป็นต้น

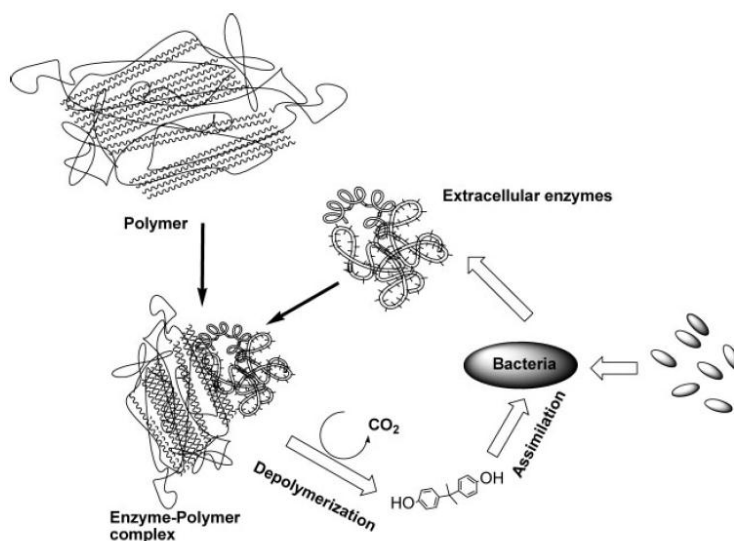


รูปที่ 1 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการย่อยสลายพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

(Artham และ Doble, 2008)

### 2.1.3 กลไกการย่อยสลายของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

หลักการของการย่อยสลาย คือ การทำให้พันธะเคมีของพอลิเมอร์อ่อนแอหรือแตกหักลง ซึ่งจะทำงานโดยเอนไซม์ที่หลังจากเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยมีทั้งเอนไซม์ที่ทำงานภายในเซลล์ (endoenzymes) และเอนไซม์ที่ทำงานภายนอกเซลล์ (exoenzymes) ซึ่งเอนไซม์ที่หลั่งออกมาเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันต่างๆ เช่น หมู่คาร์บอกซิล (-COOH) หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และหมู่อะมิโน (-NH<sub>2</sub>) ที่มีความสามารถในการเข้ายึดเกาะและทำลายโครงสร้างต่างๆ ได้ โดยเมื่อโมเลกุลของพอลิเมอร์มีขนาดเล็กลงจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ จนเกิดเป็นโอลิโกเมอร์หรือมอนอเมอร์ที่มีขนาดเล็กและมีสมบัติที่ละลายน้ำ ทำให้สามารถถูกขนส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์และถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งพลังงาน ผ่านวิถีเมตาบอลิซึมที่เหมาะสมได้ โดยความสามารถในการย่อยสลายของพอลิเมอร์จะขึ้นอยู่กับระดับการเป็นผลึกและชนิดของพอลิเมอร์ ซึ่งโคพอลิเมอร์มีความสามารถในการถูกย่อยสลายได้ดีกว่าโฮโมพอลิเมอร์ (Artham และ Doble, 2008; Reddy และคณะ, 2013; Mohan และ Srivastava, 2010)



รูปที่ 2 กลไกการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์

(Artham และ Doble, 2008)

#### 2.1.4 ชนิดของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่เป็นที่รู้จักกันในปัจจุบันมีอยู่หลายชนิด ซึ่งจะมีความแตกต่างกันตามโครงสร้าง กระบวนการผลิต และคุณสมบัติของวัสดุนั้น โดยตัวอย่างของพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีดังนี้

##### 2.1.4.1 พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid; PLA)

พอลิแลคติกแอซิดเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิเอสเทอร์ที่มีสายโซ่ตรง (aliphatic polyester) จัดเป็นเทอร์โมพลาสติก (thermoplastic) ผลิตได้จากวัสดุที่หาทดแทนใหม่ได้ (renewable resources) เช่น ข้าวโพด แป้ง มันสำปะหลัง และอ้อย ผ่านกระบวนการหมักน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกโดยการทำงานของจุลินทรีย์ในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จากนั้นกรดแลคติกที่ผลิตได้จะถูกทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ได้เป็นพอลิแลคติกแอซิด มีลักษณะใส ถ่ายเทความร้อนและความชื้นได้ดี สามารถทนความร้อนได้ตั้งแต่ 60-120 องศาเซลเซียส มีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิสไตรีน (polystyrene หรือ PS) และพอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต (polyethylene terephthalate หรือ PET) สามารถขึ้นรูปได้ด้วยความร้อน การอัดขึ้นรูป การอัดรีด และการฉีดยื่นรูป เป็นต้น (อมรรัตน์ เลิศวรสิริกุล, 2554)

#### 2.1.4.2 พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (polybutylene succinate; PBS)

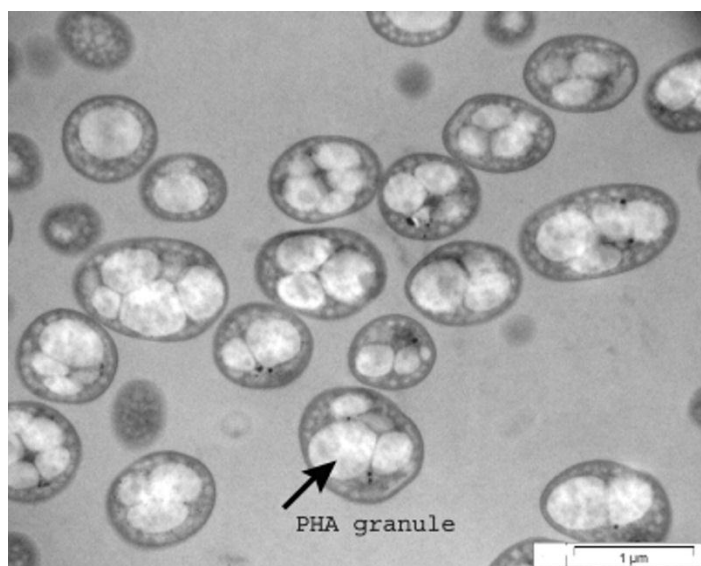
พอลิบิวทิลีนซัคซิเนตเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิเอสเตอร์ (polyester) อีกชนิดหนึ่ง โดยผลิตจากมอนอเมอร์หลัก 2 ชนิด คือ กรดซัคซินิก (succinic acid) ที่ผลิตจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Actinobacillus succinogenes* *Anaerobiospirillum succiniciproducens* เป็นต้น (Xu และ Guo, 2010) และ 1,4-Butanediol ที่ผลิตจากปิโตรเลียม PBS มีลักษณะขุ่นและมีคุณสมบัติคล้ายพอลิเอทิลีน (polyethylene) และพอลิโพรพิลีน (polypropylene) สามารถนำมาขึ้นรูปได้ด้วยกระบวนการฉีดขึ้นรูปและการเป่าขึ้นรูปฟิล์ม โดย PBS มีความยืดหยุ่นที่ดีและสามารถทนความร้อนได้ตั้งแต่ 80-95 องศาเซลเซียส

#### 2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

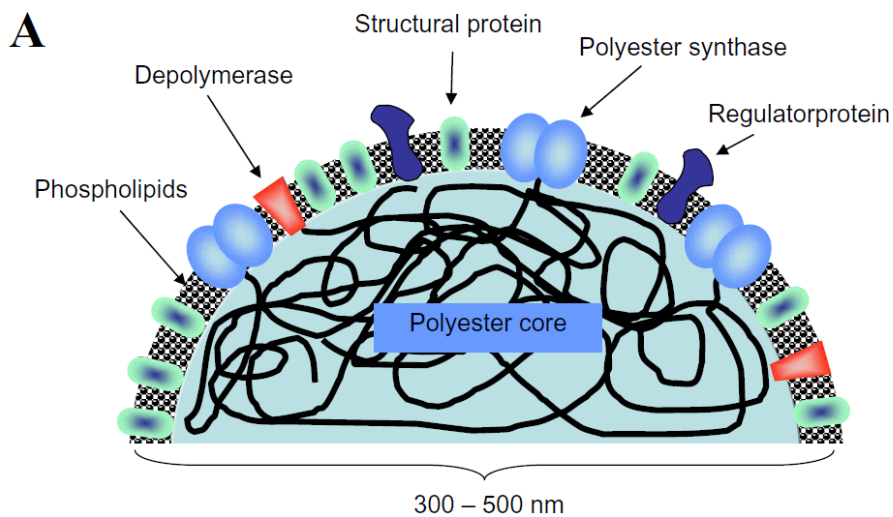
พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates; PHAs) จัดเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิเอสเตอร์ สังเคราะห์และสะสมในรูปของแกรนูล (granule) ในไซโทพลาสซึมของจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์ ซึ่งจุลินทรีย์จะสะสมมากถึง 90% ของน้ำหนักเซลล์แห้งและสามารถถูกย่อยโดยเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เอส (depolymerase) เพื่อนำมาใช้ในสภาวะขาดแคลนสารอาหาร จุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์และสะสม PHAs ได้ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน แมกนีเซียม เป็นต้น แต่มีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป โดยแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถใช้เพื่อสังเคราะห์ PHAs มีหลากหลายชนิด เช่น คาร์โบไฮเดรต (กลูโคส ซูโครส ฟรักโตส) ทรัพยากรที่สามารถหาทดแทนใหม่ได้ (renewable resources) (แป้ง เซลลูโลส) แอลกอฮอล์ (เมทานอล กลีเซอรอล) อัลเคน (เฮกเซน โดเดคเคน) ผลพลอยได้จากกระบวนการอุตสาหกรรม (กากน้ำตาล หางนม กลีเซอรอล) และกรดอินทรีย์ (กรดบิวทิริก กรดโพรพิโอนิก) เป็นต้น (Rudnik, 2008)

ขนาดและจำนวนของแกรนูลขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง  $0.2 \pm 0.5$  ไมโครเมตร และพบได้ 8-12 แกรนูลต่อเซลล์ ซึ่งมอนอเมอร์ประกอบด้วยหน่วยย่อยเชื่อมต่อกัน  $10^3$ - $10^4$  มอนอเมอร์ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง  $2 \times 10^5$ - $3 \times 10^6$  ดาลตัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่เป็นพอลิเอสเตอร์ 97.7% ที่เหลือเป็นโปรตีน 1.87% (PHA synthase depolymerase structural protein และ regulator protein) และลิปิดหรือฟอสโฟลิปิด 0.46% ดังแสดงในรูปที่ 4 โดยในปัจจุบันมีการศึกษาและจำแนก PHAs มากถึง 150 ชนิด ซึ่งรวมทั้งชนิดโฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์ (Reddy และคณะ, 2003; Ojumu และคณะ, 2004; Khana และ Srivastava, 2005) (Loo และ Suddesh<sup>3</sup>, 2007; Suriyamongkol และคณะ, 2007; Bernerd และคณะ, 2014)





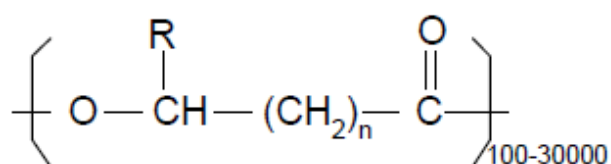
รูปที่ 3 แกรนูล PHAs ที่สะสมภายในเซลล์ *Pseudomonas putida* CA-3  
(Ward และคณะ, 2005)



รูปที่ 4 องค์ประกอบของแกรนูล PHAs (Rehm, 2003)

## 2.3 โครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

PHAs เป็นพอลิเอสเทอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ 3-hydroxy fatty acid ที่มีหน่วยซ้ำตั้งแต่ 100-3000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของมอนอเมอร์ตัวที่หนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของมอนอเมอร์ตัวที่สอง ตรงตำแหน่งปีศาจคาร์บอน ซึ่งเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) โดยมอนอเมอร์มีการเรียงตัวต่อกันเป็นสายตรงแบบหัวต่อหาง (head to tail) (Brandl และคณะ, 1990; Shrivastav และคณะ, 2013) โครงสร้างทางเคมีของ PHAs ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHAs (Ojumu และคณะ, 2004)

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

## 2.4 การจัดจำแนกชนิดของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

2.4.1 การจัดจำแนกตามจำนวนอะตอมของคาร์บอน สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท (Suriyamongkol และคณะ, 2007) คือ

2.4.1.1 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายสั้น (short chain length PHAs; scl-PHAs) ประกอบด้วยคาร์บอน 3-5 อะตอมในหน่วยมोनอเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) เป็นต้น ซึ่งพบว่า scl-PHAs มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี

2.4.1.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายปานกลาง (medium chain length; mcl-PHAs) ประกอบด้วยคาร์บอน 6-14 อะตอมในหน่วยมोनอเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) โดยพอลิเมอร์ในกลุ่มนี้จะมีสมบัติยืดหยุ่นใกล้เคียงกับวัสดุจำพวกยาง

2.4.1.3 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายยาว (long chain length; lcl-PHAs) ประกอบด้วยคาร์บอนมากกว่า 14 อะตอมในหน่วยมोनอเมอร์

2.4.2 การจัดจำแนกตามองค์ประกอบของพอลิเมอร์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.4.2.1 โฮโมพอลิเมอร์ (Homopolymer) ในหน่วยซ้ำของสายพอลิเมอร์ ประกอบด้วยมोनอเมอร์เพียงชนิดเดียวต่อกัน เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) หรือ P(3HB)

2.4.2.2 เฮเทอโรพอลิเมอร์ (Heteropolymer) ในหน่วยซ้ำของสายพอลิเมอร์ ประกอบด้วยมोनอเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนมोनอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ คือ

-โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยมोनอเมอร์จำนวน 2 ชนิดต่อกันเป็นหน่วยซ้ำในสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือ P(3HB-co-3HV) พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) หรือ P(3HB-co-3HHx) เป็นต้น

-เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยมोनอเมอร์จำนวน 3 ชนิดต่อกันเป็นหน่วยซ้ำในสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) P(3HB-co-3HV-co-4HB)

## 2.5 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

PHAs สามารถสังเคราะห์และสะสมภายในเซลล์ของแบคทีเรียหลายชนิด โดยพบทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมากกว่า 300 สปีชีส์ เช่น *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. และ *Methylobacterium* sp. หรือแม้แต่ในแบคทีเรียกลุ่ม archaea ในสปีชีส์ haloarchaeal เช่น *Haloferax*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcularia*, *Halobacterium* เป็นต้น ในปัจจุบันแบคทีเรียแกรมลบเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์ PHAs มากที่สุด เพราะสามารถสังเคราะห์และสะสม PHAs ได้สูงถึง 50-88% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกสามารถสังเคราะห์ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าเพียงไม่เกิน 50% โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ PHAs ที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียแกรมลบมีข้อจำกัดคือ จะพบการปนเปื้อนของลิโปโพลีแซคคาไรด์เอนโดท็อกซิน [lipopolysaccharide (LPS) endotoxin] ซึ่งทำให้เกิดอาการอักเสบ จึงอาจไม่เหมาะกับการประยุกต์ใช้ PHAs ในทางการแพทย์ แต่ก็สามารถกำจัดได้โดยการทำปฏิกิริยากับตัวออกกซิไดซ์ (oxidizing agents) บางชนิด เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามก็เป็นการทำให้ต้นทุนของการผลิต PHAs จากแบคทีเรียแกรมลบเพิ่มสูงขึ้นและอาจส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติของพอลิเมอร์ด้วย (Keshavarz และ Roy, 2010; Tan และคณะ, 2014) ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้ ดังแสดงในตาราง ที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณผลผลิตของตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (Tan และคณะ, 2014)

| จุลินทรีย์                         | จุลินทรีย์  | แหล่งคาร์บอน  | ชนิดของ PHAs | ร้อยละของ PHAs โดย น้ำหนัก (%) | อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง) |
|------------------------------------|-------------|---|--------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| <b>แบคทีเรียแกรมลบ</b>             |             |   |              |                                |                                       |
| <i>Azohydromonas australica</i>    | ATCC 29713, | Malt waste  | P3HB         | 70.1                           | 0.445                                 |
| <i>(Alcaligenes latus)</i>         | DSM 1124,   |   |              |                                |                                       |
| <i>Azotobacter beijerinckii</i>    | DSM 1041,   | Glucose   | P3HB         | 24.8                           | 0.090                                 |
|                                    | NCIB 11292  |   |              |                                |                                       |
| <i>Burkholderia cepacia</i>        | ATCC 17759, | Xylose  |              | 58.4                           | NG                                    |
| <i>(Pseudomonas multivorans,</i>   | DSM 50181,  | Glycerol  | P3HB         | 31.3                           | 0.103                                 |
| <i>Pseudomonas cepacia)</i>        | NCIB 9085   | Fructose, glucose, sucrose                          |              | 50.4–59.0                      | NG                                    |
| <i>Cupriavidus necator</i> H16     | ATCC 17699, | Fructose, glucose                                   | P3HB         | 67.0–70.5                      | 0.052–0.067                           |
| <i>(Alcaligenes eutrophus</i> H16, | DSM 428,    | Com oil, oleic acid, olive oil, palm oil            | P3HB         | 79.0–82.0                      | 0.041–0.047                           |
| <i>Ralstonia eutropha</i> H16,     | KCTC 22496, | Acetate, butyrate, lactic acid,                     | 3HB, 3HV     | 3.9–40.7                       | 0.001–0.037                           |
| <i>Wautersia eutropha</i> H16)     | NCIB 10442  | propionic acid, CO2                                 | P3HB         | 88.9                           | 0.230                                 |
| <i>Methylobacterium extorquens</i> | ATCC 55366  | Methanol  | P3HB         | 40.0–46.0                      | 0.250–0.600                           |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      | NCIM 2948   | Cane molasses, fructose, glucose, glycerol, sucrose | P3HB         | 12.4–62.0                      | 0.012–0.110                           |
| <i>Pseudomonas oleovorans</i>      | ATCC 8062,  | 4-Hydroxyhexanoic acid                              | scl-mcl-PHA  | 18.6                           | NG                                    |
|                                    | DSM 1045    |   |              |                                |                                       |

ตารางที่ 1 (ต่อ) ชนิดและปริมาณผลผลิตของตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (Tan และคณะ, 2014)

| จุลินทรีย์                        | จุลินทรีย์                        | แหล่งคาร์บอน   | ชนิดของ PHAs  | ร้อยละของ PHAs โดยน้ำหนัก (%) | อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) |
|-----------------------------------|-----------------------------------|--|---------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| <b>แบคทีเรียแกรมบวก</b>           |                                   |  |               |                               |                                      |
| <i>Bacillus megaterium</i>        | DSM 90                            | citric acid, glucose, glycerol, succinic acid  | P3HB          | 9.0–50.0                      | NG                                   |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> | ATCC 15990, DSM 20137, NCIB 10337 | acetic acid, citric acid, glucose, glycerol, succinic acid                                       | P3HB, mcl-PHA | 4.0–32.0                      | NG                                   |
| <i>Nocardia lucida</i>            | NCIMB 10980                       | acetate, succinate   | 3HB, 3HV      | 7.0–20.0                      | NG                                   |
| <i>Rhodococcus</i> sp             | NCIMB 40126                       | acetate, fructose, glucose, hexanoate, 4-hydroxybutyrate, lactate, molasses, succinate, valerate | P3HB3HV       | 4.0–53.0                      | NG                                   |
| <b>แบคทีเรียโพรคาริโอต</b>        |                                   |  |               |                               |                                      |
| <i>Haloflex mediterranei</i>      | ATCC 33500, CCM 3361, DSM 1411    | hydrolyzed whey glycerol and crude glycerol  | P3HB3HV       | 72.8<br>75.0–76.0             | 0.090<br>0.120                       |
| Various archaeal strains          | -                                 | fructose, glucose, glycerol  | P3HB, P3HB3HV | 0.8–22.9                      | <0.001–0.021                         |

## 2.6 วิธีชีวสังเคราะห์ของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

PHAs มีบทบาทสำคัญต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในสภาวะที่สารอาหารไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต โดยจุลินทรีย์จะสังเคราะห์และสะสมไว้ใช้เป็นแหล่งของสารอาหารและพลังงานในสภาวะดังกล่าว ซึ่งวิถีในการสังเคราะห์ PHAs ของจุลินทรีย์นั้นจะสัมพันธ์กับวิถีเมตาบอลิกลกลางของจุลินทรีย์ เช่น ไกลโคไลซิส วัฏจักรเครปส์ ปีตา-ออกซิเดชัน การสังเคราะห์กรดไขมัน การสังเคราะห์กรดอะมิโน วัฏจักรคัลวิน และวิถีเซอริน เป็นต้น ซึ่งตัวกลาง (intermediates) หลายตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง acetyl-CoA ในวิถีการสังเคราะห์ PHAs จะเชื่อมโยงกับวิถีต่างๆ ที่กล่าวในข้างต้น โดยในสภาวะที่สารอาหารมีปริมาณมาก โคเอนไซม์ เอ (coenzyme A) จากวัฏจักรเครปส์จะถูกสร้างในปริมาณมากซึ่งจะไปขัดขวางการสังเคราะห์ PHAs โดยการยับยั้งเอนไซม์ 3-ketothiolase (PhaA) ซึ่งจะทำให้ acetyl-CoA ผ่านเข้าสู่วัฏจักรเครปส์เพื่อนำไปสร้างเป็นพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ในทางกลับกันในสภาวะที่สารอาหารไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต หรือมีการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แต่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป ปริมาณของโคเอนไซม์ เอ จะไม่ยับยั้งการสังเคราะห์ PHAs ซึ่งจะทำให้ acetyl-CoA ผ่านเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์และเกิดการสะสม PHAs ขึ้น โดยตัวอย่างวิธีชีวสังเคราะห์ของ PHAs (Tan และคณะ, 2014) ดังแสดงในตัวอย่าง คือ

วิถีการสังเคราะห์แบบที่ 1 (วิถี B) ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์ 3 ชนิดร่วมกัน คือ  $\beta$ -ketothiolase (PhaA), Acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) และ PHA synthase (PhaC) โดยขั้นแรกเอนไซม์  $\beta$ -ketothiolase จะควบรวม acetyl-CoA ที่ได้จาก วิถี tricarboxylic acid (TCA) จำนวน 2 โมเลกุลรวมเป็น acetoacetyl-CoA จากนั้นเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase จะรีดิวซ์ acetoacetyl-CoA ไปเป็น 3-hydroxybutyryl-CoA และขั้นตอนสุดท้าย เกิดปฏิกิริยา polymerization ของ 3-hydroxybutyryl-CoA โดยการทำงานของเอนไซม์ PHA synthase ได้เป็น PHAs วิถีการสังเคราะห์แบบที่ 1 นี้ พบได้ใน *R. eutrophus*, *P. oleovorans* และ *Aeromonas hydrophila* เป็นต้น

วิถีการสังเคราะห์แบบที่ 2 (วิถี J) เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน (fatty acid) โดยผ่านวิถีปีตา-ออกซิเดชัน ( $\beta$ -oxidation) เช่น ใน *A. caviae* เอนไซม์ (R)-specific enoyl-CoA hydratase จะเปลี่ยน enoyl-CoA ไปเป็น (R)-3-hydroxyacyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นเพื่อเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHAs ต่อไป โดยวิถีการสังเคราะห์แบบที่ 2 นี้ พบได้ใน *P. aeruginosa* และ *P. putida* เป็นต้น

วิถีการสังเคราะห์แบบที่ 3 (วิถี K) เกิดขึ้นร่วมกันระหว่างการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกับวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน โดย acyl carrier protein (ACP) จะถูกเปลี่ยนเป็น 3-hydroxyacyl-ACP แล้วเป็น (R)-3-hydroxyacyl-CoA โดยเอนไซม์ PhaG (acyl-ACP-CoA transacylase)

รูปที่ 6 แสดงวิถีในการสังเคราะห์ PHAs (วิถี A-J สำหรับ PHAs ชนิด scl และวิถี J-M สำหรับ PHAs ชนิด mcl) และตารางที่ 2 แสดงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ PHAs







ตารางที่ 2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ PHAs (Tan และคณะ, 2014)

| หมายเลข | เอนไซม์                                   | ตัวย่อ | สปีชีส์   |
|---------|---|--------|---|
| 1       | Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase   | -      | <i>C. necator</i>                                   |
| 2       | Pyruvate dehydrogenase complex            | -      | <i>C. necator</i> และ<br><i>B. cepacia</i>          |
| 3       | 3-Ketothiolase                            | PhaA   | <i>C. necator</i>                                   |
| 4       | NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase | PhaB   | <i>C. necator</i>                                   |
| 5       | PHA synthase                              | PhaC   | <i>C. necator</i> และอื่นๆ                          |
| 6       | Acetyl-CoA carboxylase                    | ACC    | <i>E. coli</i> K-12 MG1655                          |
| 7       | Malonyl-CoA:ACPtransacylase               | FabD   | <i>E. coli</i> K-12 MG1655                          |
| 8       | 3-Ketoacyl carrier protein synthase       | FabH   | <i>E. coli</i> K-12 MG1655                          |
| 9       | NADPH-dependent 3-Ketoacylreductase       | FabG   | <i>P. aeruginosa</i>                                |
| 10      | Succinic semialdehydedehydrogenase        | SucD   | <i>Clostridium kluyveri</i>                         |
| 11      | 4-Hydroxybutyrate dehydrogenase           | 4HbD   | <i>Clostridium kluyveri</i>                         |
| 12      | 4-Hydroxybutyrate-CoA:CoAtransferase      | OrfZ   | <i>Clostridium kluyveri</i>                         |
| 13      | Alcohol dehydrogenase                     | -      | <i>Aeromonas hydrophila</i><br>4AK4                 |
| 14      | Hydroxyacyl-CoA synthase,                 | -      | Mutants และ<br>recombinants of<br><i>C. necator</i> |
| 15      | Methylmalonyl-CoA mutase                  | Sbm    | <i>E. coli</i> W3110                                |
| 16      | Methylmalonyl-CoA racemase                | -      | <i>N. corallina</i>                                 |
| 17      | Methylmalonyl-CoA decarboxylase           | YgfG   | <i>E. coli</i> W3110                                |
| 18      | Ketothiolase                              | -      | -   |
| 19      | 3-Ketothiolase                            | BktB   | <i>C. necator</i>                                   |
| 20      | Ketothiolase                              | -      | -   |

ตารางที่ 2 (ต่อ) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ PHAs (Tan และคณะ, 2014)

| หมายเลข | เอนไซม์                                   | ตัวย่อ | สปีชีส์   |
|---------|---|--------|---|
| 21      | NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase | -      | <i>Rhizobium (Cicer) sp.</i> CC 1192                                    |
| 22      | Acyl-CoA synthetase                       | FadD   | <i>P. putida</i> CA-3 และ <i>E. coli</i> MG1655                         |
| 23      | Acyl-CoA oxidase                          | -      | -   |
| 24      | Enoyl-CoA hydratase I                     | -      | -   |
| 25      | (R)-Enoyl-CoA hydratase                   | PhaJ   | <i>P. putida</i> KT2440   |
| 26      | Epidermase                                | -      | -   |
| 27      | 3-Ketoacyl-CoA thiolase                   | FadA   | <i>P. putida</i> KT2442   |
| 28      | 3-Hydroxyacyl-ACP:CoAtransacylase         | PhaG   | <i>P. mendocina</i>   |
| 29      | Cyclohexanol dehydrogenase                | ChnA   | <i>Acinetobacter sp.</i> SE19 และ <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU |
| 30      | Cyclohexanonemonooxygenases               | ChnB   | <i>Acinetobacter sp.</i> SE19 และ <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU |
| 31      | Caprolactone hydrolase                    | ChnC   | <i>Acinetobacter sp.</i> SE19 และ <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU |
| 32      | 6-Hydroxyhexanoate dehydrogenase          | ChnD   | <i>Acinetobactersp.</i> SE19 และ <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU  |
| 33      | 6-Oxohexanoate dehydrogenase              | ChnE   | <i>Acinetobactersp.</i> SE19 และ <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU  |
| 34      | Semialdehyde dehydrogenase                | -      | -   |
| 35      | 6-hydroxyhexanoate dehydrogenase          | -      | -   |
| 36      | Hydroxyacyl-CoA synthase                  | -      | -   |
| 37      | Lactonase                                 | -      | Mutants และ recombinants of <i>C. necator</i>                           |

## 2.7 เทคนิคในการตรวจสอบการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

การตรวจสอบ PHAs ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์สามารถทำได้หลากหลายวิธี ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ (Tan และคณะ, 2014)

### 2.7.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (polymerase chain reaction; PCR)

วิธีการนี้ใช้หลักการตรวจสอบยีน *phaC* ซึ่งถูกเข้ารหัสเป็นเอนไซม์ PHA synthase ที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ PHAs ข้อดี คือ ใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย มีความไว ความจำเพาะและอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูง แต่มีข้อจำกัด คือ โพรเมอร์ที่ใช้มีไม่เพียงพอสำหรับการตรวจสอบยีน *phaC* ทุกยีน และมีแนวโน้มที่จะมีข้อผิดพลาดในการตรวจสอบ

### 2.7.2 การย้อมด้วยสี Nile red และ Nile blue A (Nile red and Nile blue A staining)

วิธีการนี้ใช้หลักการตรวจสอบแกรนูลของ PHAs ภายในเซลล์ โดยการย้อมสีแบคทีเรียด้วยสี Nile blue A แล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ข้อดี คือ สามารถตรวจสอบได้โดยตรงด้วยจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต ใช้ตัวอย่างปริมาณน้อย ใช้เวลาสั้น แต่มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างไขมันและ PHAs ได้

### 2.7.3 การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy; TEM)

วิธีการนี้ใช้ตรวจสอบแกรนูลของ PHAs ภายในเซลล์เช่นเดียวกัน โดยมีข้อดี คือ สามารถส่องภาพให้เห็นแกรนูลขนาดใหญ่และสามารถวัดขนาดของแกรนูลได้ แต่มีข้อเสียคือ มีขั้นตอนที่ซับซ้อนในการเตรียมตัวอย่าง และอาจเกิดอันตรายจากสารเคมีและสารกัมมันตรังสี

### 2.7.4 การตรวจสอบด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

ใช้หลักการตรวจสอบความหนาแน่นของ PHAs ภายในเซลล์ โดยการวัดผ่านสเปกตรัม มีข้อดี คือ ใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย ใช้เวลาสั้น รายงานผลในเชิงปริมาณได้ แต่มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถจำแนกชนิดมอนอเมอร์ของ PHAs ได้ มีความไวต่ำ สามารถรายงานผลเชิงปริมาณได้เฉพาะ PHAs ชนิด scl

### 2.7.5 การตรวจสอบด้วยเทคนิค liquid chromatography (LC)

ใช้หลักการตรวจสอบความหนาแน่นของ PHAs ภายในเซลล์โดยการสกัดตัวอย่างด้วยสารเคมี แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography; HPLC) มีข้อดี คือ ไม่จำเป็นต้องใช้เซลล์ที่ผ่านการทำให้แห้ง ใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย ใช้เวลาเตรียมตัวอย่างสั้น สามารถตรวจสอบ PHAs ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ ข้อจำกัด คือ สามารถวิเคราะห์ได้เฉพาะ PHAs ชนิด scl และไม่สามารถจำแนกโฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์ได้

### 2.7.6 การตรวจสอบด้วยเทคนิค gas chromatography (GC)

ใช้ตรวจสอบความหนาแน่นของ PHAs ภายในเซลล์เช่นเดียวกัน โดยทำการสกัดเซลล์ที่ผ่านการทำให้แห้งแล้ว โดยใช้เมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟูริกในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง 80-100 องศาเซลเซียส เรียกขั้นตอนนี้ว่า methanolysis ซึ่งจะได้อนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของมอนอเมอร์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) โดยมี flamed ionization detector (FID) เป็นตัวตรวจสอบ ข้อดีของวิธีนี้ คือ มีความจำเพาะสูง สามารถจำแนกได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ ข้อเสีย คือ ต้องใช้เซลล์ที่ผ่านการทำให้แห้ง และใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างนาน ใช้สารเคมีที่มีความอันตรายและระเหยง่าย

## 2.8 การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

PHAs สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ดังนี้ (Phillip และคณะ, 2007) (Chen, 2010)

**1. ด้านการแพทย์** พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีสมบัติในการเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิด (3HB) P(3HB-3HV) P(4HB) P(3HO) และ P(3HB-3HHx) ถูกนำมาใช้ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยเป็นกระบวนการสร้างเนื้อเยื่อเพื่อทดแทน ซ่อมแซม หรือปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่สูญเสียหรือบาดเจ็บ เช่น ใช้เป็นกระดูกเทียม วัสดุเชื่อมกระดูก และวัสดุในการผ่าตัด นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มยาหรือฮอร์โมนที่มีสมบัติชะลอการปลดปล่อยด้วยยา

**2. ด้านการเกษตร** ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ของ PHAs ในด้านการเกษตร คือ การผลิตวัสดุคลุมดินอ่อนพืช (mulch film) โดยในปัจจุบันมีการผลิตในชื่อการค้า Nodax<sup>TM</sup> ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ที่มี 3(HB) เป็นองค์ประกอบหลักเชื่อมด้วยมอนอเมอร์ของ PHAs สายปานกลางชนิดอื่นๆในปริมาณเล็กน้อย นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มปุ๋ย ยากำจัดวัชพืช ยากำจัดศัตรูพืชเพื่อชะลอการปลดปล่อยตัวยาออกสู่สิ่งแวดล้อม

**3. ด้านวัสดุบรรจุภัณฑ์** บรรจุภัณฑ์หลายชนิดถูกผลิตจากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เพื่อลดปัญหาการสะสมของพลาสติกในสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างของบรรจุภัณฑ์ที่นำ PHAs มาประยุกต์ใช้ คือ ขวดแชมพู ถังสินค้า ภาชนะบรรจุกระดาษ มีดโกน ผ้าอ้อม ผลิตภัณฑ์สุขอนามัยสำหรับสตรี เครื่องสำอาง ถ้วยจาน เป็นต้น

ในปัจจุบัน PHAs สามารถผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม โดยมีตัวอย่างของเครื่องหมายการค้าหลายชนิด ยกตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 3 (Philip และคณะ, 2007)

**BIOPOL®** เริ่มมีการผลิตโดย Imperial Chemical Industries (ICI) ตั้งแต่ปี 1980 และในปัจจุบันผลิตโดยบริษัท Metabolix (Cambridge, MA, USA). โดยผลิตเป็นโคพอลิเมอร์ชนิด PHBV ที่มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 140-180 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อปริมาณมอนอเมอร์ของ 3HV เพิ่มขึ้นจะทำให้ระดับความเป็นผลึกลดลงและพอลิเมอร์มีความยืดหยุ่นมากขึ้น BIOPOL® ถูกนำมาใช้เป็นวัสดุเคลือบกระดาษและทำกระดาษแข็ง มีความเหมาะสมในการเป่าขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทฟิล์ม มีสมบัติป้องกันไฟฟ้าสถิต สามารถใช้ประโยชน์กับผลิตภัณฑ์ด้านไฟฟ้าและบรรจุภัณฑ์อิเล็กทรอนิกส์ นอกจากนี้บริษัท Fluka และ Toray ได้ทำการพัฒนา BIOPOL® เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ และถูกนำมาผลิตเป็นเส้นเอ็น เส้นเชือก หรือตาข่ายดักปลา ซึ่งมีความแข็งแรงและมีสมบัติที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพในแหล่งน้ำ อีกทั้งยังผลิตเป็นขวดแชมพู ขวดบรรจุน้ำมันเครื่อง และมีดโกนแบบใช้แล้วทิ้ง เป็นต้น

**Nodax™** จัดเป็นโคพอลิเมอร์ชนิดที่มีการผลิตไม่นานมานี้ โดยโครงสร้างประกอบด้วย P(3HB) เชื่อมต่อกับ PHAs สายปานกลาง เช่น 3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต 3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต และ 3-ไฮดรอกซีเดคะโนเอตในปริมาณเล็กน้อย การจำแนกประเภทของ Nodax™ ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ ความยาวของสายโซ่ข้างของมอนอเมอร์ ข้อดีของการมี PHAs สายปานกลางเชื่อมต่อกับโครงสร้างของ P(3HB) คือ ทำให้พอลิเมอร์มีระดับความเป็นผลึกและจุดหลอมเหลวลดต่ำลง ซึ่งทำให้มีความเหนียวและความนุ่ม ซึ่งทำให้ประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย โดยมีรายงานว่าความยืดหยุ่นของพอลิเมอร์จะขึ้นอยู่กับความยาวของสายโซ่ข้างของ PHAs สายปานกลาง มีการพัฒนาโดยบริษัท Procter และ Gamble เกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลายทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และสมบัติทางกลอื่นๆเพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน ปัจจุบัน Nodax™ ถูกผลิตเป็นเม็ดโฟม เส้นใย เสื้อผ้า พรม ผ้าใยสังเคราะห์ แผ่นฟิล์ม และผลิตภัณฑ์ในกลุ่มน้ำยา ผลิตภัณฑ์เช็ดทำความสะอาด สาลี และอุปกรณ์ทางสุขอนามัยที่สามารถย่อยสลายได้



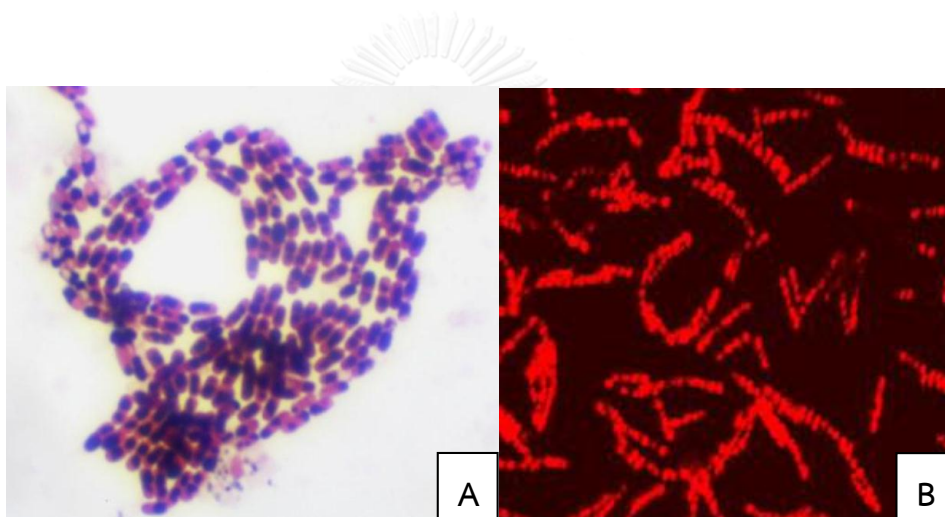
รูปที่ 7 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเครื่องหมายการค้า Nodax™  
(Poliakoff และ Noda, 2004)

ตารางที่ 3 บริษัทที่มีการผลิต PHAs ในระดับอุตสาหกรรม

| บริษัท                        | ประเทศ       | ชื่อทางการค้า | ชนิดของ PHAs | ระดับการผลิต         |
|-------------------------------|--------------|---------------|--------------|----------------------|
| Biomatera                     | แคนาดา       | Biomatera     | PHBV         | นำร่อง<br>อุตสาหกรรม |
| Biomer                        | เยอรมัน      | Biomer        | PHB, PHBV    | นำร่อง<br>อุตสาหกรรม |
| Bio-On                        | อิตาลี       | Minerv PHA    | PHB, PHBV    | นำร่อง<br>อุตสาหกรรม |
| Kaneka                        | ญี่ปุ่น      | Kaneka        | PHBHx        | นำร่อง<br>อุตสาหกรรม |
| Meridian                      | สหรัฐอเมริกา |               | โคพอลิเมอร์  | อุตสาหกรรม           |
| Metabolix                     | สหรัฐอเมริกา | Mirel         | โคพอลิเมอร์  | อุตสาหกรรม           |
| PHB Industrial/<br>Copersucar | บราซิล       | Biocycle      | PHB, PHBV    | นำร่อง<br>อุตสาหกรรม |
| PolyFerm Canada               | แคนาดา       | VersaMer PHA  | PHBV         | นำร่อง<br>อุตสาหกรรม |
| Tianan                        | จีน          | Enmat         | PHBV         | อุตสาหกรรม           |
| Tianjin & DSM                 | จีน          | GreenBio      | โคพอลิเมอร์  | นำร่อง<br>อุตสาหกรรม |
| Tianzhu                       | จีน          | Tianzhu       | PHBHx        | นำร่อง<br>อุตสาหกรรม |

## 2.9 พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ poly(3-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB) เป็น PHAs ชนิดที่มีการศึกษาและจัดจำแนกมากที่สุดในแบคทีเรีย (Karbasi และคณะ, 2011) โดยในปี 1926 Lemoigne นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศส ได้ค้นพบครั้งแรกภายในเซลล์ของ *Bacillus megaterium* ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมสารอาหารและพลังงานในสภาวะการเจริญที่ไม่สมดุล สามารถตรวจสอบการสังเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมด้วยสีชูดาน แบล็คบี (Sudan Black B) และสีไนล์บลู เอ (Nile Blue A) ซึ่งสีไนล์บลู เอ จะมีความจำเพาะกว่าสี ชูดาน แบล็คบีซึ่งย้อมไกลโคเจน และพอลิฟอสเฟตด้วย แต่สีทั้งสองชนิดก็สามารถย้อมติดสีแกรนูลของ PHAs ที่เป็นสารจำพวกไขมันได้ (Loo และ Suddesh<sup>a</sup>, 2007)



รูปที่ 8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดงแกรนูลของ P(3HB)

(A) การย้อม *B. megaterium* MSBN04 ด้วยสีชูดาน แบล็คบี

(Sathiyarayanan และคณะ, 2013)

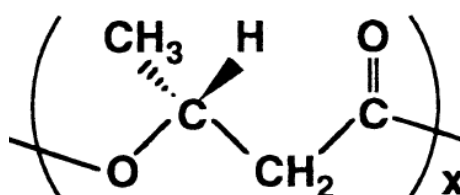
(B) การย้อมแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* ด้วยสีไนล์บลู เอ

โดยตรวจสอบภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ (Maaloul และคณะ, 2013)



## 2.10 โครงสร้างทางเคมีของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)

โครงสร้างของ P(3HB) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3-hydroxybutyrate) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ โดยหมู่เมทิล (methyl group) จะเชื่อมกับสายพอลิเมอร์หลักในตำแหน่งคาร์บอน ได้เป็นสารประกอบพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ซึ่งจากการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของ P(3HB) ด้วยเทคนิค X-ray พบว่ามีลักษณะอัดตัวแน่นและเป็นเกลียวเวียนขวา (right-handed helix) มีความยาวหนึ่งรอบเกลียว (fiber repeat) เท่ากับ 0.6 นาโนเมตร น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง  $10^3$ - $10^6$  ดาลตัน (Waser และคณะ, 2001)



รูปที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) (Sudesh และ Doi, 2000)

## 2.11 สมบัติของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)

P(3HB) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีระดับความเป็นผลึก (degree of crystallinity) สูง ทำให้มีความแข็งแรงและความต้านทานต่อตัวทำละลายต่างๆ ทนต่อรังสียูวี มีสมบัติไม่ละลายน้ำ ทนต่อความชื้น ความสามารถในการซึมผ่านของออกซิเจน น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ โดยสมบัติของ P(3HB) มีความใกล้เคียงกับพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ชนิดพอลิพรอพิลีน (polypropylene หรือ PP) (Ashby และคณะ, 2012) โดยมีอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (glass transition temperature หรือ Tg) เท่ากับ 15 องศาเซลเซียส อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature หรือ Tm) เท่ากับ 175 องศาเซลเซียส ค่ายังส์โมดูลัส (Young's Modulus) เท่ากับ 3.5 GPa ค่าต้านแรงดึง (tensile strength) เท่ากับ 40 MPa เปอร์เซ็นต์การยืด (% elongation to break) เท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์ และระดับความเป็นผลึก (degree of crystallinity) สูง ประมาณ 55-80% (Sudesh และคณะ, 2000) แต่อย่างไรก็ตามด้วยสมบัติทางกายภาพและเคมีดังกล่าวทำให้ P(3HB) มีลักษณะแข็ง (stiffness) และเปราะ (brittleness) จึงมีข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ได้ไม่หลากหลาย (Ray และ Bousmina, 2005)

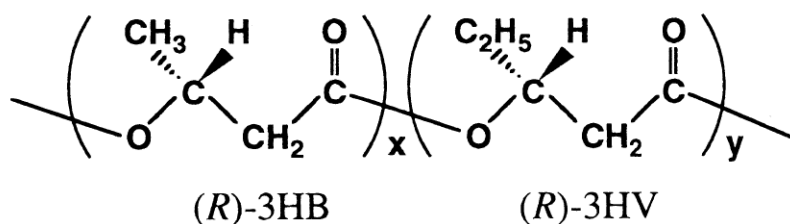
ตารางที่ 4 สมบัติทางกายภาพและเชิงกลของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) และพอลิพรอพิลีน (Ojumu และคณะ, 2004)

| สมบัติ  | P(3HB) | (PP) |
|---|--------|------|
| ความหนาแน่น (density; g/cm <sup>3</sup> )           | 0.95   | 1.25 |
| จุดหลอมเหลว (melting point; °C)                     | 175    | 176  |
| อุณหภูมิ T <sub>g</sub> (glass-transition temp; °C) | 15     | -10  |
| ระดับความเป็นผลึก (crystalline; %)                  | 80     | 70   |
| มอดูลัสของยัง (Young's modulus; Pa)                 | 3.5    | 1.7  |
| ความสามารถในการต้านแรงดึง (tensile strength; MPa)   | 40     | 34.5 |
| ความสามารถในการขยายตัว (elongation to Break; %)     | 6      | 400  |
| ความต้านทานแรงกระแทก (impact strength (v/m)         | 50     | 45   |



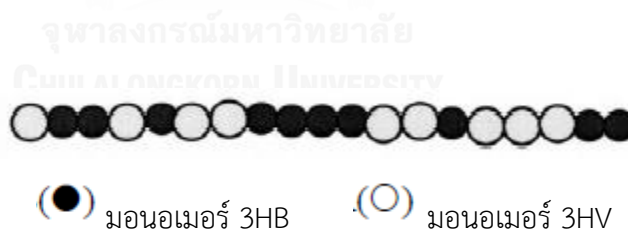
## 2.12 พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)] หรือ P(3HB-co-3HV) หรือ PHBV เป็นโคพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) และ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ โดยมีการเรียงตัวของมอนอเมอร์เป็นแบบสุ่ม (Inoue, 1998) PHBV จัดเป็นโคพอลิเมอร์ชนิดที่มีสมบัติที่ดีกว่าโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) เนื่องจากมีสมบัติทางกายภาพและเชิงกลที่ดีกว่า มีจุดเด่นในด้านสมบัติความแข็งแรง ความเหนียว และความยืดหยุ่น ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย (Lee และคณะ, 2008) โดยมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจาก *R. eutropha* ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 โดย Imperial Chemical Industries (ICI) (Ariffin และคณะ, 2011) โครงสร้างทางเคมีของ PHBV แสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

(Sudesh และ Doi, 2000)

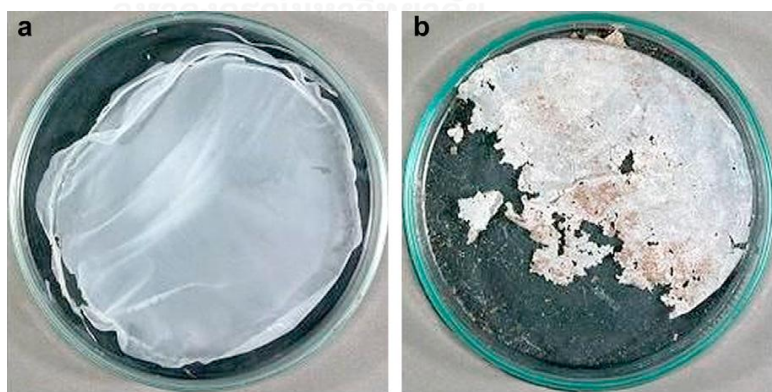


รูปที่ 11 การเรียงตัวแบบสุ่มของมอนอเมอร์ 3HB และ 3HV ในสายโคพอลิเมอร์ PHBV

(Kumar และคณะ, 2001)

### 2.13 สมบัติของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

สมบัติทางกายภาพและเชิงกลของไฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) ได้มีการพัฒนาและปรับปรุงให้มีสมบัติที่ดีขึ้นโดยการสังเคราะห์มอนอเมอร์ของ 3HV ร่วมเป็นโคพอลิเมอร์ PHBV โดยสัดส่วนของมอนอเมอร์ของ 3HV จะมีผลต่อสมบัติของโคพอลิเมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยเมื่อสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV มีค่าประมาณ 20 โมลเปอร์เซ็นต์ จะทำให้โคพอลิเมอร์ PHBV มีความแข็งแรงและความยืดหยุ่นที่ดีที่สุด และง่ายต่อการขึ้นรูปในกระบวนการผลิตวัสดุระดับนาโนและการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ (Zhang และคณะ, 2015) ซึ่งโคพอลิเมอร์ PHBV จะมีสมบัติที่แข็งแรงขึ้น (มีการเพิ่มขึ้นของค่าต้านทานแรงกระแทก) และมีความยืดหยุ่นเพิ่มมากขึ้น (มีค่ามอดูลัสของยังลดลง) เมื่อมีสัดส่วนของมอนอเมอร์ของ 3HV เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวก่อนขาด (elongation at break) ก็เพิ่มมากขึ้นตามสัดส่วนของมอนอเมอร์ของ 3HV ด้วย โดยมีค่าสูงถึง 700 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV เท่ากับ 28 โมลเปอร์เซ็นต์ (Inoue และ Yoshie, 1992) อีกทั้งอุณหภูมิในการหลอมเหลวก็จะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของมอนอเมอร์ของ 3HV โดยอุณหภูมิหลอมเหลวของ PHBV จะมีค่าระหว่าง 65-170 องศาเซลเซียสขึ้นอยู่กับสัดส่วนของ 3HV มอนอเมอร์ ซึ่งอุณหภูมิหลอมเหลวที่ต่ำมีข้อดีในกระบวนการขึ้นรูปของพอลิเมอร์และลดการย่อยสลายโดยความร้อนในระหว่างกระบวนการ (Inoue, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าสมบัติการย่อยสลายได้ในธรรมชาติของ PHBV ขึ้นกับสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV โดยความสามารถในการย่อยสลายจะลดลงเมื่อมีสัดส่วนของ 3HV ที่เพิ่มมากขึ้น และจะสามารถย่อยสลายได้ดีเมื่อมีระดับความเป็นผลึกต่ำ (Mitomo และคณะ, 1999) ภาพแสดงการย่อยสลายของโคพอลิเมอร์ PHBV ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 แผ่นฟิล์มโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายในธรรมชาติ  
a ก่อนการฝังดิน และ b หลังการฝังดิน เป็นเวลา 120 วัน (Shah และคณะ, 2010)

Savenkova และคณะ (2000) ศึกษาสมบัติของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตจาก *Azotobacter chroococcum* ซึ่งมีสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV ตั้งแต่ 0-20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าระดับความเป็นผลึกของโคพอลิเมอร์ PHBV มีค่าต่ำกว่าโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) และมีค่าลดลงจาก 63-31 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV เพิ่มขึ้นจาก 0-20 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (glass-transition temperature) ก็มีค่าลดลงจาก 4 ถึง -6 องศาเซลเซียส ในขณะที่ อุณหภูมิหลอมเหลวก็ลดลงจาก 180-123 องศาเซลเซียส เมื่อสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV เพิ่มขึ้น ในส่วนการศึกษาสมบัติเชิงกลของโคพอลิเมอร์ PHBV ได้มีการบ่มพอลิเมอร์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10, 28 และ 224 วัน ซึ่งพบว่าทำให้พอลิเมอร์มีความเปราะมากขึ้น นอกจากนี้สมบัติด้านความยืดหยุ่นของโคพอลิเมอร์มีค่ามากกว่าโฮโมพอลิเมอร์ โดยมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV มีค่าสูงขึ้น ในขณะที่เดียวกันก็มีระดับความเป็นผลึกลดลงด้วย

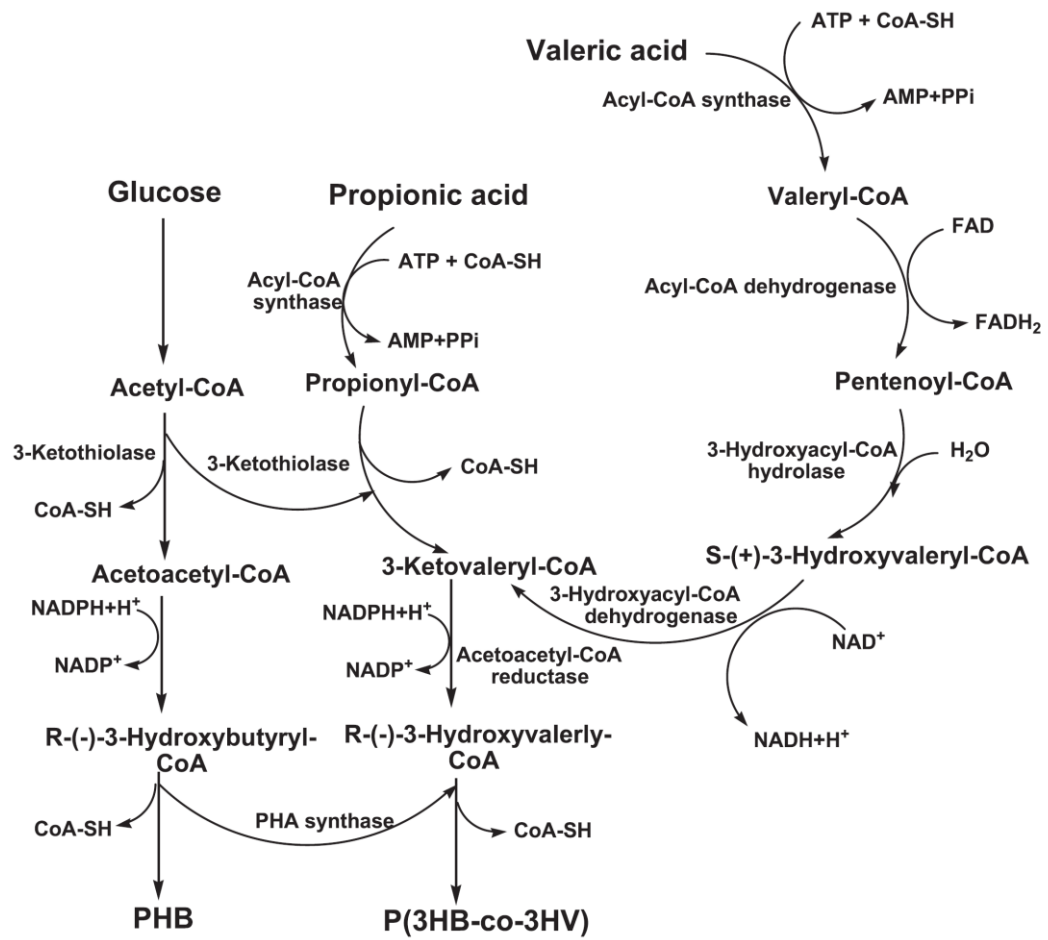
**ตารางที่ 5 สมบัติของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนของมอนอเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตต่างกัน (Loo และ Sudesh<sup>a</sup>, 2007)**

| สมบัติ  | สัดส่วนของมอนอเมอร์ของ 3HV (โมล%) |     |     |     |     |     |
|---|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|   | 0                                 | 3   | 9   | 14  | 20  | 25  |
| อุณหภูมิหลอมเหลว<br>(melting temperature; °C)                 | 170                               | 170 | 162 | 150 | 145 | 137 |
| อุณหภูมิ T <sub>G</sub><br>(glass-transition temperature; °C) | 10                                | 8   | 6   | 4   | -1  | -6  |
| มอดูลัสของยังส์<br>(Young's modulus; GPa)                     | 3.5                               | 2.9 | 1.9 | 1.5 | 1.2 | 0.7 |
| ความสามารถในการต้านแรงดึง<br>(tensile strength; MPa)          | 40                                | 38  | 37  | 35  | 32  | 30  |

## 2.14 วิธีชีวสังเคราะห์(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

กระบวนการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ประกอบด้วยสารตั้งต้น 2 ชนิด คือ 3-hydroxy butyryl CoA (3HB-CoA) และ 3-hydroxy valeryl CoA (3HV-CoA) ซึ่งโดยทั่วไป 3HV-CoA ได้มาจากการใช้แหล่งคาร์บอนสำหรับสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HV เช่น กรดโพรพิโอนิก และกรด วาเลอริก โดยเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HV จะเกิดปฏิกิริยาควบรวมระหว่าง propionyl-CoA และ acetyl-CoA โดยเอนไซม์ 3-ketothiolase ได้ เป็น 3-ketovaleryl-CoA ในขณะที่เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HV กรดวาเลอริกถูกเปลี่ยนเป็น valeryl-CoA โดยเอนไซม์ Acyl-CoA synthase จากนั้น เอนไซม์ Acyl-CoA dehydrogenase ทำการเปลี่ยน valeryl-CoA เป็น pentenoyl-CoA แล้ว เอนไซม์ 3-hydroxyacyl-CoA hydrolase เปลี่ยน pentenoyl-CoA เป็น 3-hydroxy valeryl และ เปลี่ยนเป็น 3-ketovaleryl-CoA โดยเอนไซม์ 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase จากนั้น เอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase จะเปลี่ยน 3-ketovaleryl-CoA ที่ได้มาจากกรดโพรพิ โอนิกหรือกรดวาเลอริก เป็น 3HV-CoA จากนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรซ์ระหว่าง 3HB-CoA และ 3HV-CoA ได้เป็นโคพอลิเมอร์ PHBV โดยวิธีชีวสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV จากกลูโคสและกรดโพร พิโอนิกหรือกรดวาเลอริก แสดงในรูปที่ 13

โดยทั่วไปในกระบวนการสังเคราะห์ PHBV จะต้องใช้แหล่งคาร์บอนผสม เช่น กลูโคสกับ โซเดียมโพรพิโอเนต กลูโคสกับโซเดียมวาเลอเรต เมทานอลกับเอมิล-แอลกอฮอล์ ซูโครสกับโซเดียม วาเลอเรต โซเดียมบิวทิเรตกับโซเดียมวาเลอเรต เป็นต้น (Shang และคณะ, 2004) โดยโซเดียม โพรพิโอเนตมีความเหมาะสมในการใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์เป็นโคพอลิเมอร์ PHBV มากกว่าสารตั้งต้นชนิดอื่น เช่น โซเดียมวาเลอเรต (Lee และคณะ, 2008) เนื่องจากให้ความเข้มข้น ของพอลิเมอร์ PHBV ในปริมาณที่สูงกว่า แต่หากต้องการมอนอเมอร์ของ 3-HV ในปริมาณสูง สามารถใช้โซเดียมวาเลอเรตเป็นสารตั้งต้นได้ (Shang และคณะ, 2004) โดยกรดโพรพิโอนิกหรือ เกลือโซเดียมโพรพิโอเนตที่ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ไม่ได้ถูกนำไป สังเคราะห์เป็นมอนอเมอร์ของ 3HV โดยตรง แต่ส่วนหนึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA และสามารถ เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HB ด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามอนอเมอร์ของทั้ง 3HB และ 3HV สามารถถูกสังเคราะห์ขึ้นเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นสารตั้งต้น และ การใช้กรดโพรพิโอนิก ในปริมาณสูงจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และทำให้เซลล์ตาย ดังนั้น จึงต้องมีการควบคุมการ เติมกรดโพรพิโอนิกให้มีความเข้มข้นต่ำและไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Loo และ sudesh<sup>3</sup>, 2007)



รูปที่ 13 วิธีชีวสังเคราะห์ PHBV จากกลูโคส กรดโพรพิโอนิกและกรดวาเลอริก  
(Bhati และ Mallick, 2015)

## 2.15 การผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยการควบคุมสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV

PHBV มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมภายใต้ชื่อทางการค้า BIOPOL® และมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิต PHBV ที่มีสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV สูง ในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Burkholderia sp.*, *Chromobacterium violaceum* และ *Azotobacter salinestrus* (Loo และ Sudesh, 2007) ซึ่งสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV มีความสำคัญต่อสมบัติของโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ โดยสมบัติต่างๆของโคพอลิเมอร์สามารถควบคุมโดยการปรับสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV ในระหว่างกระบวนการหมัก เลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่สังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HV ให้เหมาะสม พร้อมทั้งควบคุมสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนผสมที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่สังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HB และมอนอเมอร์ 3HV (Ojumu และคณะ, 2004)

ดังมีรายงานของ Mitomo และคณะ (1999) ที่ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดย *Burkholderia cepacia* D1 พบว่า โคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้มีค่าสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV ในช่วง 49-90% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดวาเลอริกในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 4-20 กรัมต่อลิตร

กิติพงษ์ ปวรังกูร (2545) เปรียบเทียบการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยใช้ไซเตียมโพรฟิไอเนตและไซเตียมวาเลอเรตเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HV โดย *Bacillus sp.* BA-019 รายงานว่าการใช้ไซเตียมโพรฟิไอเนตความเข้มข้น 2.5 5 7.5 และ 10 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ได้สัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV ในช่วง 14-24 โมลเปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อใช้ไซเตียมวาเลอเรตที่ความเข้มข้นเดียวกัน ส่งผลให้ได้สัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV ในช่วง 34-40 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าการใช้ไซเตียมวาเลอเรตส่งผลให้ได้สัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV สูงกว่าการใช้ไซเตียมโพรฟิไอเนต แต่ทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นโคพอลิเมอร์ต่ำกว่า

Loo และ Sudesh<sup>b</sup> (2007) ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดย *Delftia acidovorans* โดยใช้กลูโคสและไซเตียมวาเลอเรตเป็นแหล่งคาร์บอนผสมสำหรับสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HV พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของไซเตียมวาเลอเรตจาก 2-10 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ได้สัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV ในช่วง 18-90 โมลเปอร์เซ็นต์



Yu และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดย *R. eutropha* ในถังหมักที่มีการกวนแบบต่อเนื่อง (continuous stirred tank reactor) โดยแปรความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนผสม คือ กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และโซเดียมโพรพิโอเนต 3 5 7 และ 15 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อใช้กลูโคส 10 กรัมต่อลิตรและโซเดียมโพรพิโอเนต 3 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีการสังเคราะห์ P(3HB) เป็นส่วนใหญ่ พบการสังเคราะห์ PHBV ในปริมาณเล็กน้อย ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนตเป็น 5 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ได้สัดส่วนมอนอเมอร์ 3HB ต่อ 3HV เท่ากับ 70 ต่อ 30 โมลเปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนตเป็น 7 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ได้สัดส่วนมอนอเมอร์ 3HB ต่อ 3HV เท่ากับ 60 ต่อ 40 โมลเปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนตถูกเพิ่มขึ้นเป็น 15 กรัมต่อลิตร พบว่าได้สัดส่วน 3HB ต่อ 3HV เท่ากับ 40 ต่อ 60 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากผลการทดลองสรุปได้ว่าความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนตที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้ได้สัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV ที่สูงขึ้นด้วย แต่ในขณะเดียวกันความเข้มข้นของโพรพิโอเนตที่สูงเกินไปก็จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ PHBV ต่ำ

## 2.16 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเฟด-แบตช์

การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ (fed-batch cultivation) เป็นการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสารอาหารใหม่เพื่อให้จุลินทรีย์มีการเจริญอย่างต่อเนื่อง มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์โดยการควบคุมการเติมสารอาหาร เพื่อลดความเป็นพิษของสารอาหารที่มีต่อเซลล์ สารอาหารที่เติมลงไปควรมีความเข้มข้นที่สูงเพื่อลดการเจือจางของสารอาหารในระบบและลดข้อจำกัดเรื่องขนาดของถังหมัก โดยรูปแบบการเติมสารอาหารมีทั้งวิธี exponential feeding pH stat feeding และ pulse feeding เป็นต้น (Gerdhar และคณะ, 2013) กระบวนการเริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ที่มีสารอาหารและชีวมวลในปริมาณเล็กน้อย จากนั้นสารอาหารใหม่จะถูกเติมเข้าสู่ระบบเมื่อสารอาหารเดิมที่มีอยู่ถูกใช้ไป ซึ่งทำให้สามารถควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารให้อยู่ในระดับที่ต้องการ ทำให้สามารถเลี้ยงเชื้อได้ความเข้มข้นของเซลล์และผลผลิตในปริมาณสูง ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตสามารถควบคุมโดยความเข้มข้นของสารอาหารเพื่อป้องกันการยับยั้งการเจริญจากความเข้มข้นของสารอาหาร (catabolite repression)

Du และคณะ (2001) ศึกษาการผลิต PHBV โดยการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* แบบเฟด-แบตช์ ควบคุมการเติมสารอาหารด้วยวิธี exponential feeding ซึ่งมีกลูโคสและกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ พบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์ ความเข้มข้นของ PHBV ปริมาณของ PHBV และโมลเปอร์เซ็นต์ของ 3HV เท่ากับ 52.1 กรัมต่อลิตร 40.8 กรัมต่อลิตร 78.3 เปอร์เซ็นต์ และ 16.2 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีอัตราการผลิตสูงถึง 0.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าอัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกลูโคสที่มีค่าต่ำ ส่งผลให้มีความเข้มข้นของเซลล์ ปริมาณของ PHBV และอัตราการผลิตสูง แต่มีสัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของ 3HV ต่ำ ในขณะที่เมื่ออัตราส่วนของกรดโพรพิโอนิกต่อกลูโคสที่มีค่าสูง ส่งผลให้มีสัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของ 3HV สูงแต่มีปริมาณของ PHBV และอัตราการผลิตต่ำ

Marangoni และคณะ (2002) ศึกษาการผลิต PHBV ด้วยหางนม น้ำตาลอินเวิร์ท (inverted sugar) และกรดโพรพิโอนิกด้วย *R. eutropha* โดยศึกษารูปแบบการเติมสารอาหาร 2 วิธี คือ การเติมอาหารตามการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง (pH regulation) และการเติมแบบเป็นจังหวะ (pulse) ทุก 1.5 ชั่วโมง พบว่า การเติมด้วยวิธีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ไม่เหมาะสมกับงานวิจัยนี้ เนื่องจากสัปดาห์มีสมบัติควบคุมค่าความเป็นกรดต่างให้คงที่ (buffering activity) ดังนั้น การเติมสารอาหารแบบกะจึงให้ผลที่ดีกว่า คือ ได้ความเข้มข้นของ 3-ไฮดรอกซีวาลูเอเรต 1.46 กรัมต่อพอลิเมอร์ 3.93 กรัม ซึ่งคิดเป็น 37 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณพอลิเมอร์

Shang และคณะ (2004) ศึกษาการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* แบบเฟด-แบตช์ เพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จากกลูโคสและโซเดียมวาลูเอเรตโดยให้มีสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV สูง โดยศึกษาวิธีการเติมสารอาหารทั้งแบบการเติมเป็นลำดับ (sequential feeding) และแบบการเติมในครั้งเดียว (simultaneous feeding) พบว่าการเติมสารอาหารแบบต่อเนื่องได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงถึง 110 กรัมต่อลิตร มีมอนอเมอร์ของ 3HV 62.7 โมลเปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการผลิต 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ปจฺฉิม กัญจนชุมพล (2010) ศึกษาการขยายส่วนการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 แบบเฟด-แบตช์ โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรียเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ การทดลองได้ศึกษาวิธีการป้อนสารอาหารแบบ exponential feeding และการป้อนแบบครั้งคราว (rectangular pulse feeding) ที่แบ่งอาหารเติมลงในถังหมักทุก 0.5 ชั่วโมง โดยเริ่มเติมอาหารที่ชั่วโมงที่ 9 และหยุดเติมเมื่อปริมาตรในถังหมักเท่ากับ 6 ลิตร พบว่าการป้อนอาหารแบบครั้งคราวที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 ต่อ 1 ได้ผลผลิตของเซลล์และ P(3HB) เท่ากับ 90.71 กรัมต่อลิตรและ 41.58 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการป้อนแบบ exponential feeding ที่ได้ผลผลิตเซลล์เพียง 72.97 กรัมต่อลิตรและ P(3HB) เท่ากับ 38.56 กรัมต่อลิตร จึงได้เลือกการเติมอาหารแบบครั้งคราวในการศึกษาการผลิตในถังหมักขนาด 90 ลิตร

การเลี้ยงเชื้อแบบสองระยะเป็นรูปแบบการเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารอาหารใหม่เข้าสู่ระบบ 2 ครั้ง ซึ่งมีความแตกต่างกันขององค์ประกอบในสารอาหารที่เติม ในระยะแรกจุลินทรีย์เจริญจากแหล่งคาร์บอนที่ไม่ซับซ้อน เช่น กลูโคส ฟรักโทส และอื่นๆ เพื่อให้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงและได้ชีวมวลสูง ส่วนในระยะที่สองจึงเติมสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์และสะสมผลิตภัณฑ์

Ramsay และคณะ (1990) ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ด้วยการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* และ *A. latus* แบบเฟด-แบตช์ 2 ระยะ โดยเริ่มต้นอาหารเลี้ยงเชื้อมีส่วนประกอบของกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 9 กรัมต่อลิตร เมื่อจุลินทรีย์มีการใช้อาหารใกล้หมดจึงมีการเติมอาหารในระยะที่หนึ่งซึ่งเป็นสารละลายกลูโคส 500 กรัมต่อลิตร เพื่อคงความเข้มข้นของกลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ 30 กรัมต่อลิตรและ 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะที่สองอาหารเติมอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 132 กรัมต่อลิตร และกรดโพรพิอิก 18 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตรา 35 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์และสะสม PHBV โดยผลการทดลองพบว่า *A. eutrophus* สังเคราะห์ PHBV ได้เท่ากับ 17 กรัมต่อลิตร มีสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV เท่ากับ 5 โมลเปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *A. latus* สังเคราะห์ PHBV ได้ 58 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV เท่ากับ 11 โมลเปอร์เซ็นต์

Kim และคณะ (1997) ศึกษาการเพิ่มปริมาณผลผลิต PHAs ชนิด mcl โดยการเพาะเลี้ยง *P. putida* แบบเฟด-แบตช์สองระยะ โดยมีกลูโคสและโซเดียมออกเตโนเอตเป็นแหล่งคาร์บอนผสม ซึ่งในระยะแรกของการเจริญ กลูโคสถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญของเซลล์ และในระยะที่สองใช้โซเดียมออกเตโนเอตเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก พร้อมการจำกัดปริมาณไนโตรเจนและออกซิเจน เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์พอลิเมอร์ ผลการทดลองพบว่าได้ความเข้มข้นและปริมาณ PHAs เท่ากับ 35.9 กรัมต่อลิตรและ 65.6% โดยน้ำหนัก เมื่อเวลาผ่านไป 39 ชั่วโมง

Sun และคณะ (2007) ศึกษาการผลิต PHAs ชนิด mcl โดยการเพาะเลี้ยง *P. putida* KT 2440 แบบเฟด-แบตช์สองระยะ โดยมีกลูโคสและกรดโนนาโนอิกเป็นแหล่งคาร์บอนผสม ในระยะแรกใช้กลูโคสเพื่อการเจริญของเซลล์ จากนั้นในระยะที่สอง มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนโดยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์จะถูกเติมแทนที่ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อลดปริมาณไนโตรเจน พร้อมทั้งการเติมกรดโนนาโนอิก 3 กรัมต่อลิตรเพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์พอลิเมอร์ พบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์ 70 กรัมต่อลิตร ปริมาณพอลิเมอร์ 75 เปอร์เซ็นต์

วิษณันท์ เมืองเก่า (2554) ศึกษาการผลิต PHBV โดยการเลี้ยง *B. megaterium* P12 แบบสองระยะในถังหมัก โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยและโซเดียมโพรพิโอเนต พบว่าการเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยน้ำตาล 9 กรัมต่อลิตร และโซเดียมโพรพิโอเนต 4.5 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อได้ความเข้มข้นของ PHBV สูงสุดเท่ากับ 4.67 กรัมต่อลิตร มีสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV เท่ากับ 17 โมลเปอร์เซ็นต์

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงมีแนวคิดในการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์สองขั้นตอน โดยแบ่งการเติมอาหารใหม่เป็น 2 ขั้นตอน คือ ในขั้นตอนแรกเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ และในขั้นที่สองเพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ซึ่งใช้รูปแบบการเติมอาหารแบบครั้งคราว โดยใช้กากน้ำตาลและโซเดียมโพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนผสมร่วมกับการควบคุมอัตราส่วนของโซเดียมโพรพิโอเนต ซึ่งคาดว่าจะสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ได้ในปริมาณสูงและมีสัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV ในช่วงที่เหมาะสม



## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์

- 3.1.1 ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร ของบริษัท B.E. Marubishi ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.2 เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (gas chromatography) รุ่น 3400CX ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.3 เครื่องสำหรับฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (auto sampler) รุ่น 8200CX ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.4 แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด CP-WAX 52 CB เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม. ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.5 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychroterm incubator shaker) รุ่น G27 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.6 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S ของบริษัท Satorious ประเทศเยอรมนี
- 3.1.7 เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P ของบริษัท Satorious ประเทศเยอรมนี
- 3.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P ของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K ของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.10 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (VIS spectrophotometer) รุ่น Novaspec II ของบริษัท Pharmacia Biotech ประเทศอังกฤษ
- 3.1.11 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 2000 ของบริษัท Cyberscan ประเทศสิงคโปร์
- 3.1.12 ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124 ของบริษัท ISSCO ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.13 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น INE 500 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.14 ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL-60 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี

- 3.1.15 ตู้อบแห้ง (dryer oven) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.16 หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tommy ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.18 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.19 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของบริษัท Forma Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.20 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.21 ไมโครปิเปต ขนาด 100 200 1,000 5,000 และ 10,000 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส
- 3.1.22 กระดาษกรอง Whatmanเบอร์ 1 และ 2 ของบริษัท Whatman ประเทศอังกฤษ
- 3.1.23 หลอดทดลองฝาเกลียว (screw-cap tube) ของบริษัท PYREX ประเทศเยอรมนี
- 3.1.24 เครื่องกลั่นสำหรับวิเคราะห์ไนโตรเจน รุ่น K-350 ของบริษัท BUCHI

### 3.2 เคมีภัณฑ์

- 3.2.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ( $H_2SO_4$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.2 กรดซิตริก ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.3 กรดบอริก ( $H_3BO_3$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.4 กรดเบนโซอิก ( $C_7H_6O_2$ ) ของบริษัท Nacalaitesque ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.5 กรดอะซิติก ( $C_2H_4O_2$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.6 กรดไฮโดรคลอริก ( $HCl$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.7 กลีเซอรอล ( $C_3H_8O_3$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.8 ซูโครส ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.9 คลอโรฟอร์ม ( $CHCl_3$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.10 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) ของบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.11 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

- 3.2.12 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศ  
อิตาลี
- 3.2.13 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.14 โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.15 โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.16 โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ( $\text{NaOCl}$ ) ของบริษัท Clorox ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.17 ไดคลอโรมีเทน ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.18 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 3.2.19 นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.20 โซเดียมโพธิเนต ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2\text{Na}$ ) ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 3.2.21 โซเดียมอะซิเตต ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 3.2.22 สารมาตรฐานพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [P(3HB)] ของบริษัท Sigma ประเทศ  
สหรัฐอเมริกา
- 3.2.23 สารมาตรฐานพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-12% 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [P(3HB-  
co-12% 3HV)] ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.24 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.25 แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $\text{MgCl}_2$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.26 แบคโททริปโทส (Bactotryptose) ของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.27 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.28 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Unilab ประเทศ  
สหรัฐอเมริกา
- 3.2.29 เมทานอล ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.30 เอทานอล ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.31 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศ  
อิตาลี
- 3.2.32 แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศ  
อิตาลี
- 3.2.33 ยูเรีย ( $\text{N}_2\text{H}_6\text{CO}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.24 สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Labscan Asia ประเทศไอร์แลนด์
- 3.2.25 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Springer ประเทศฝรั่งเศส
- 3.2.26 เปปโทน (peptone) ของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

- 3.2.27 แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{H}_2\text{O}]$  ของบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.28 กากน้ำตาล ของบริษัทมิตรผลวิจัย จำกัด ประเทศไทย
- 3.2.29 วุ้นผง (agar) ของบริษัท บิกเบนโปรดักตอรา เดออะการ์เอส. เอ ประเทศชิลี
- 3.2.30 ก๊าซไฮโดรเจน ( $\text{H}_2$ ) ของบริษัท PRAXAIR ประเทศไทย
- 3.2.31 ก๊าซออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) ของบริษัท TIG (Thai Industrial Gas) ประเทศไทย
- 3.2.32 ก๊าซไนโตรเจน ( $\text{N}_2$ ) ของบริษัท PRAXAIR ประเทศไทย

### 3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ *B. megaterium* P-12 เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการโดย ศันสนีย์ สันติอรรถพันธุ์ (2550) คัดแยกได้จากดินบริเวณใกล้บ่อน้ำพุร้อนหนองหญ้าปล้อง อำเภอหนองหญ้าปล้อง จังหวัดเพชรบุรี สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณสูง

#### 3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

##### 3.3.2.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

|                 |      |      |
|-----------------|------|------|
| สารสกัดจากยีสต์ | 3.0  | กรัม |
| แบคโทริปโทส     | 5.0  | กรัม |
| วุ้นผง          | 15.0 | กรัม |

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 ฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)



**3.2.2.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) ใช้สูตรของ Doi และคณะ (1986) ซึ่งศึกษาปรับปรุงโดย สุดา สุภาวีนสวัสดิ์ (2542) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย**

|                 |      |      |
|-----------------|------|------|
| สารสกัดจากยีสต์ | 10.0 | กรัม |
| แบคโทริปโทส     | 10.0 | กรัม |
| สารสกัดจากเนื้อ | 5.0  | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์  | 5.0  | กรัม |
| น้ำตาลทราย      | 10.0 | กรัม |

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 หนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายน้ำตาลหนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

**3.2.2.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการสังเคราะห์และสะสมไฮโมพอลิเมอร์ PHB และโคพอลิเมอร์ PHBV คือ อาหาร Mineral Salt Medium (MSM) (อติพล บัญเรืองถาวร, 2543) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย**

|                             |      |           |
|-----------------------------|------|-----------|
| แหล่งคาร์บอน (กากน้ำตาล)    | 60.0 | กรัม      |
| ยูเรีย                      | 6.0  | กรัม      |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต  | 2.0  | กรัม      |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต     | 0.6  | กรัม      |
| แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต | 0.2  | กรัม      |
| กรดซิตริก                   | 0.75 | กรัม      |
| สารสกัดจากยีสต์             | 0.1  | กรัม      |
| สารละลาย trace element      | 1.0  | มิลลิลิตร |

แยกละลายเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต และสารละลาย trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 และหนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย trace element ใน 1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

|                               |      |      |
|-------------------------------|------|------|
| แคลเซียมคลอไรด์               | 20.0 | กรัม |
| ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต        | 1.30 | กรัม |
| เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต     | 0.20 | กรัม |
| แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต | 0.60 | กรัม |
| กรดบอริก                      | 0.60 | กรัม |
| แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์   | 0.08 | กรัม |
| โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต     | 0.50 | กรัม |
| คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต     | 0.05 | กรัม |
| นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต     | 0.02 | กรัม |

#### 3.3.2.4 การเตรียมกากน้ำตาลสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

1. นำกากน้ำตาลเข้มข้นจากโรงงานมาเจือจางด้วยน้ำต้มสุกในอัตราส่วน 1 ต่อ 1
2. นำกากน้ำตาลที่ผ่านการเจือจางแล้ว มาปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 20,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง Tubular bowl centrifuge
3. นำกากน้ำตาลที่ผ่านการปั่นแยกตะกอนออกแล้วมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม

#### 3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

##### 3.3.3.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

เชี่ยจุลินทรีย์โดยใช้รูปเชี่ยเชื้อ ลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเชี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ทุกๆ 1 เดือน

### 3.3.3.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.2.2 ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลว ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ จากนั้นปั่นแยกเซลล์และทำซ้ำอีกรอบ กระจายเซลล์ใน 10% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปรับให้อยู่ในช่วง 0.8-1.0 (จำนวน  $10^9$  CFU/ml) บรรจุลงในหลอดเยือกแข็ง (cryotube) ที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน หรือเก็บที่ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

### 3.3.4 การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะ *B. megaterium* P-12 บนอาหารแข็งเอียง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) เพื่อเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย โดยปรับความขุ่นของเซลล์แขวนลอยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสม (วันกุลชนะสิทธิ์, 2553)

### 3.3.5 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) โดย *B. megaterium* P-12

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.4 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) เเพาะลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MSM ปริมาตร 3 ลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลเท่ากับ 40 50 60 และ 70 กรัมต่อลิตร และใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที

เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูล์ซ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (ในรูปของน้ำตาลและยูเรียที่เหลือ) ปริมาณ P(3HB) ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้น

### 3.3.6 การศึกษาช่วงเวลาในการเติมแหล่งคาร์บอนในขั้นตอนที่หนึ่งที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) โดย *B. megaterium* P-12

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.4 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (10% โดยปริมาตร) เเพาะลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MSM ปริมาตร 3 ลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาในข้อ 3.3.5 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที จากนั้นทำการเติมสารอาหารใหม่ในขั้นที่หนึ่ง โดยแปรช่วงเวลาในการเติมสารอาหารใหม่ คือ ชั่วโมงที่ 6 7.5 และ 9 ซึ่งอยู่ในช่วงกลางของระยะการเจริญแบบคงที่ (เติมสารอาหารใหม่แบบครั้งเดียว ณ ชั่วโมงใดๆ โดยสารอาหารใหม่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและยูเรียที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.5 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับปริมาณน้ำหมักที่ถูกเก็บตัวอย่างออกจากถังหมัก ณ ชั่วโมงที่ 6 ทำให้หลังการเติมอาหารใหม่ ในถังหมักมีน้ำหมักปริมาตรรวมเท่ากับ 3 ลิตร)

เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูล์ซ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (ในรูปของน้ำตาลและยูเรียที่เหลือ) ปริมาณ P(3HB) ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้น

### 3.3.7 การศึกษาสัดส่วนความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนผสมที่เติมในชั้นที่สองที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดย *B. megaterium* P-12

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.4 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (10% โดยปริมาตร) เพาะลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MSM ปริมาตร 3 ลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกาน้ำตาลที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาในข้อ 3.3.5 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที จากนั้นทำการเติมสารอาหารใหม่ในชั้นที่หนึ่ง ในช่วงเวลาที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาในข้อ 3.3.6 (สารอาหารใหม่ที่เติมประกอบด้วยกาน้ำตาลและยูเรียที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.5 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร)

จากนั้นทำการเติมสารอาหารใหม่ในชั้นที่สอง โดยแปรสัดส่วนแหล่งคาร์บอนผสม (กาน้ำตาลและโซเดียมโพรพิโอเนต) ที่มีความเข้มข้นของกาน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) และโซเดียมโพรพิโอเนต (กรัม) เท่ากับ 60 ต่อ 5 60 ต่อ 10 และ 60 ต่อ 15 ตามลำดับ ร่วมกับยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10) เติมสารอาหารใหม่แบบครั้งเดียว ณ ชั่วโมงใดๆ โดยสารอาหารใหม่มีปริมาตรเท่ากับ 150 มิลลิลิตร

เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (ในรูปของน้ำตาลและยูเรียที่เหลือ) ปริมาณ PHBV ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้น

## 3.4 วิธีวิเคราะห์

### 3.4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แห้ง

นำสารตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมงจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งหน่วยเป็นกรัมต่อลิตรจากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมที่มีเซลล์} - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า}}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง}} \times 1,000$$

### 3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก โดยเจือจางสารตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมสารละลายฟินอล 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 97 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำตาลซูโครส แล้วคำนวณความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในหน่วยกรัมต่อลิตร

### 3.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณยูเรียในน้ำหมัก

โดยวิธีของ Kjeldahl (A.O.A.C., 1975) นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยโพแทสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟตอัตราส่วน 95:5 ลงไป 7 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนสารละลายใสเป็นเวลา 45 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจนและเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 32 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50-60 มิลลิลิตรหรือจนสารละลายเป็นสีดำ แล้วกลั่นจับก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่เติมอินดิเคเตอร์เป็นเมทิลเรดเมทิลีนบลู (methyl red methylene blue) ปริมาณ 2 หยด กลั่นจนสารละลายบอริกมีปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่กลั่นได้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรต แล้วคำนวณหาปริมาณยูเรีย

### 3.4.4 การวิเคราะห์หาสัดส่วนของมอนอเมอร์และปริมาณของพอลิเมอร์โดยวิธี ก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography : GC)

โดยวิธีของ Comeau และคณะ (1988) โดยการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ไปอบแห้งประมาณ 10-12 ชั่วโมง แล้วชั่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัมใส่หลอดฝาเกลียว แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายในความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสนาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของมอนอเมอร์ใส่ในหลอดฝาเกลียวแล้วนำไปวิเคราะห์หาสัดส่วนของมอนอเมอร์และปริมาณพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟีภายใต้ภาวะ ดังนี้

|                         |   |
|-------------------------|---|
| ชนิดคอลัมน์             | แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด CP wax-52 CB เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร   |
| อุณหภูมิของ injector    | 250 องศาเซลเซียส (isothermal)   |
| อุณหภูมิของคอลัมน์      | 130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส |
| Split ratio             | 50 ต่อ 1  |
| ก๊าซตัวพา (carrier gas) | ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที  |
| ปริมาตรที่ฉีด           | 1 ไมโครลิตร   |

การวิเคราะห์ชนิดมอโนเมอร์โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายมาตรฐาน P(3HB) และ P(3HB-co-12% 3HV) แล้วคำนวณปริมาณพอลิเมอร์แสดงเป็นปริมาณต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ (กรัมต่อลิตร) และแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน แสดงกราฟมาตรฐานของสารต่างๆและโครมาโทแกรม ในภาคผนวก

การคำนวณปริมาณมอโนเมอร์ของ 3HB และ 3HV (กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม) จะใช้โปรแกรม Star chromatogram : version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณมอโนเมอร์โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

### 3.4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณของโซเดียมโพรพิโอเนตโดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี

โดยวิธีของ Ramsay และคณะ (1990) โดยนำน้ำหนักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว 1 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียว เติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 2 มิลลิกรัม ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายในความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อน 60 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นและไดคลอโรมีเทนอย่างละ 1 มิลลิกรัม เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นไดคลอโรมีเทน (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของมอโนเมอร์ใส่ในหลอดฝาเกลียว แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟีภายใต้ภาวะเดียวกับการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณพอลิเมอร์

การคำนวณปริมาณเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตโดยใช้โปรแกรม Star chromatogram : version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตโดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน แสดงกราฟมาตรฐานของสารต่างๆและโครมาโทแกรม ในภาคผนวก



## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) โดย *B. megaterium* P-12

โคพอลิเมอร์ PHBV ประกอบด้วยมอนอเมอร์หลัก 2 ชนิด คือ 3HB มอนอเมอร์ และ 3HV มอนอเมอร์ โดย 3HB มอนอเมอร์ สามารถสังเคราะห์ได้จากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทั่วไปและ 3HV มอนอเมอร์ สามารถสังเคราะห์ได้จากกรดและเกลือของกรดอินทรีย์บางชนิด ซึ่งในขั้นนี้เป็นการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ในขั้นต่อไป

การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ส่งเสริมการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ เนื่องจากแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบสำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่จุลินทรีย์จะนำไปสร้างเป็นพลังงานและเซลล์เพื่อการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ โดยคาร์บอนเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบอื่นๆในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

มีการศึกษาการผลิต PHAs จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกที่มีองค์ประกอบหลักเป็นซูโครส เช่น น้ำอ้อยและกากน้ำตาลเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลบริสุทธิ์ ซึ่งพบว่าสามารถผลิต PHAs ได้ ความเข้มข้นที่สูงและเป็นส่วนหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิตได้ Suwannasing และคณะ (2015) ศึกษาการผลิต PHA จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำอ้อย ทำการแปรองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 11 สูตร เมื่อเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนระหว่างน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำอ้อย พบว่าการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิต PHAs ได้สูงสุดเท่ากับ 1.525 กรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.40 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 44.85 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมาคือการใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคสที่ได้ความเข้มข้นของ PHAs เท่ากับ 0.115 และ 0.111 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากในน้ำอ้อยมีธาตุอาหารอื่นๆที่ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งไม่พบในน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสที่เป็นน้ำตาลบริสุทธิ์

เช่นเดียวกับ ศรีัญญา แก้วประดับ (2000) ศึกษาการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 โดยใช้ น้ำอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 9.21 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.62 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 50.12 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็น น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร และใช้ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งถึงแม้ น้ำอ้อยสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิต PHAs ได้ดี แต่อย่างไรก็ตามอาจมีข้อจำกัดในด้านของการแข่งขันกับอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจาก น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตน้ำตาลและอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ โดยที่ในปัจจุบันวัตถุดิบอีกชนิดหนึ่งได้รับความนิยมในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยงจุลินทรีย์ คือ กากน้ำตาล เนื่องจากมีราคาถูกและมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์

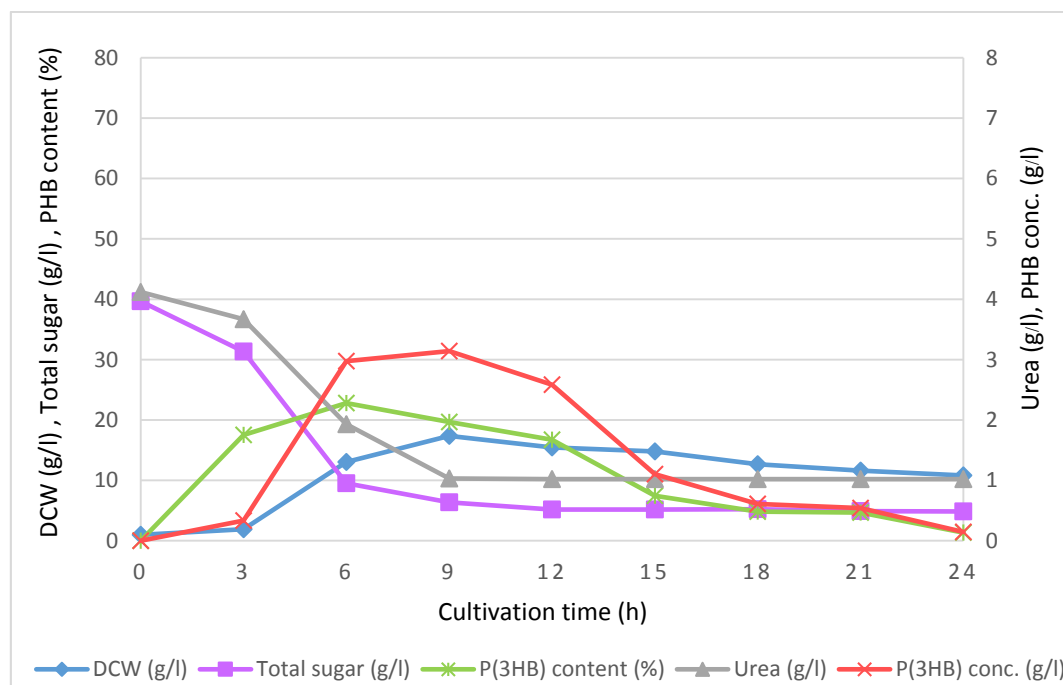
วันกุล ชนะสิทธิ์ (2553) ศึกษาผลของชนิดแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาล ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และฟรักโตส ได้พบว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต P(3HB) มากกว่าน้ำตาลชนิดอื่น งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้กากน้ำตาลซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นซูโครส และองค์ประกอบอื่นๆ คือ ฟรักโตส และกลูโคส รวมทั้งวิตามินและธาตุอาหารอื่นๆ โดยกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายในประเทศไทย

เติมกล้าเชื้อ *B. megaterium* P-12 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 3 ลิตร โดยแปรความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 40 50 60 และ 70 กรัมต่อลิตร ซึ่งมียูเรียที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวนเท่ากับ 600 rpm อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเพื่อนำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของ P(3HB) ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้น

ตารางที่ 6 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมใน กากน้ำตาลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร

| Time (h) | DCW (g/l)  | Total sugar (g/l) | Urea (g/l) | P(3HB) conc. (g/l) | P(3HB) content (% by weight) |
|----------|------------|-------------------|------------|--------------------|------------------------------|
| 0        | 0.99±0.00  | 39.65±0.00        | 4.12±0.01  | 0.00               | 0.00                         |
| 3        | 1.91±0.00  | 31.34±0.00        | 3.67±0.00  | 0.33               | 17.51                        |
| 6        | 13.05±0.01 | 9.52±0.00         | 1.93±0.01  | 2.97               | 22.79                        |
| 9        | 17.37±0.01 | 6.36±0.00         | 1.03±0.00  | 3.14               | 19.67                        |
| 12       | 15.45±0.00 | 5.15±0.01         | 1.02±0.00  | 2.58               | 16.73                        |
| 15       | 14.79±0.04 | 5.15±0.00         | 1.02±0.00  | 1.10               | 7.45                         |
| 18       | 12.67±0.01 | 5.21±0.00         | 1.02±0.00  | 0.61               | 4.81                         |
| 21       | 11.61±0.03 | 4.89±0.00         | 1.02±0.00  | 0.54               | 4.66                         |
| 24       | 10.82±0.04 | 4.84±0.00         | 1.02±0.00  | 0.15               | 1.35                         |

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลรวมในการกาน้ำตาลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 14 ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ณ ชั่วโมงที่ 3-9 สัมพันธ์กับความเข้มข้นของ P(3HB) โดยความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) มีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 17.37 กรัมต่อลิตร และ 3.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 22.79 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มลดลงอย่างช้าๆ และปริมาณ P(3HB) ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังชั่วโมงที่ 9 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลและยูเรียลดลงสัมพันธ์กับการเจริญและการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าคงที่หลังชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

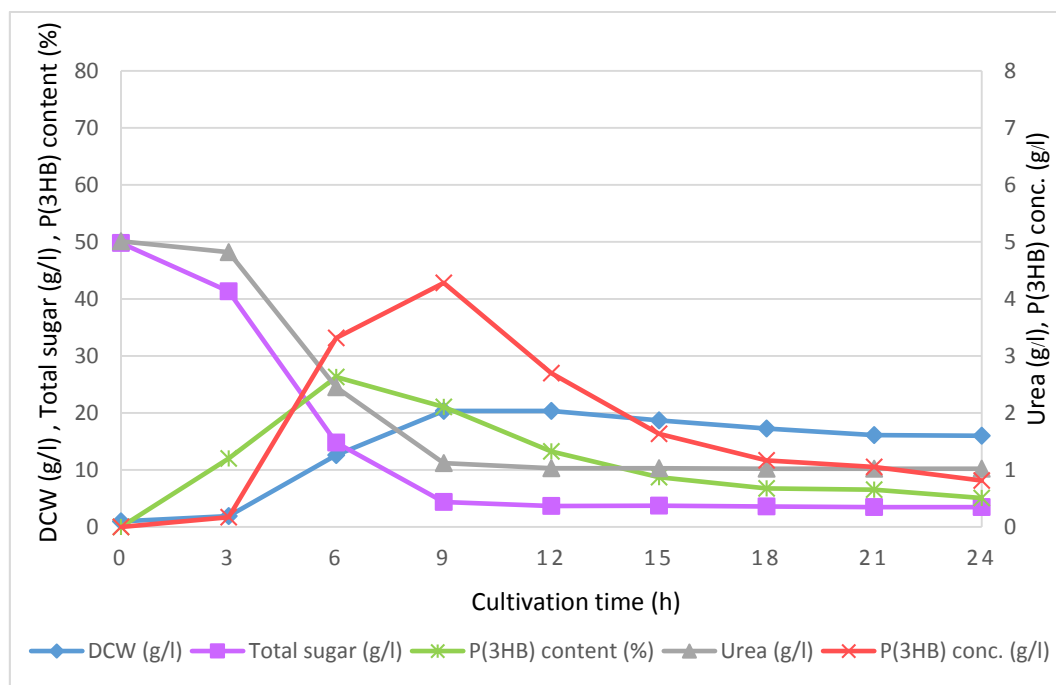


รูปที่ 14 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในการกาน้ำตาลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 7 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมใน กากน้ำตาลเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร

| Time (h) | DCW (g/l)  | Total sugar (g/l) | Urea (g/l) | P(3HB) conc. (g/l) | P(3HB) content (% by weight) |
|----------|------------|-------------------|------------|--------------------|------------------------------|
| 0        | 0.97±0.00  | 49.80±0.02        | 5.01±0.01  | 0.00               | 0.00                         |
| 3        | 1.91±0.00  | 41.33±0.01        | 4.82±0.04  | 0.17               | 12.01                        |
| 6        | 12.60±0.06 | 14.78±0.00        | 2.45±0.00  | 3.32               | 26.31                        |
| 9        | 20.35±0.02 | 4.36±0.00         | 1.12±0.01  | 4.28               | 21.05                        |
| 12       | 20.35±0.01 | 3.68±0.00         | 1.03±0.00  | 2.70               | 13.25                        |
| 15       | 18.70±0.00 | 3.73±0.00         | 1.03±0.00  | 1.63               | 8.73                         |
| 18       | 17.26±0.00 | 3.58±0.00         | 1.02±0.00  | 1.17               | 6.76                         |
| 21       | 16.10±0.00 | 3.47±0.00         | 1.02±0.00  | 1.05               | 6.53                         |
| 24       | 15.99±0.01 | 3.47±0.00         | 1.02±0.00  | 0.81               | 5.08                         |

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลรวมในการกาน้ำตาลเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 15 ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ณ ชั่วโมงที่ 3-9 สัมพันธ์กับความเข้มข้นของ P(3HB) โดยความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) มีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 20.35 กรัมต่อลิตร และ 4.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 26.31 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มลดลงอย่างช้าๆ และปริมาณ P(3HB) ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังชั่วโมงที่ 9 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลและยูเรียลดลงสัมพันธ์กับการเจริญและการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าคงที่หลังชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

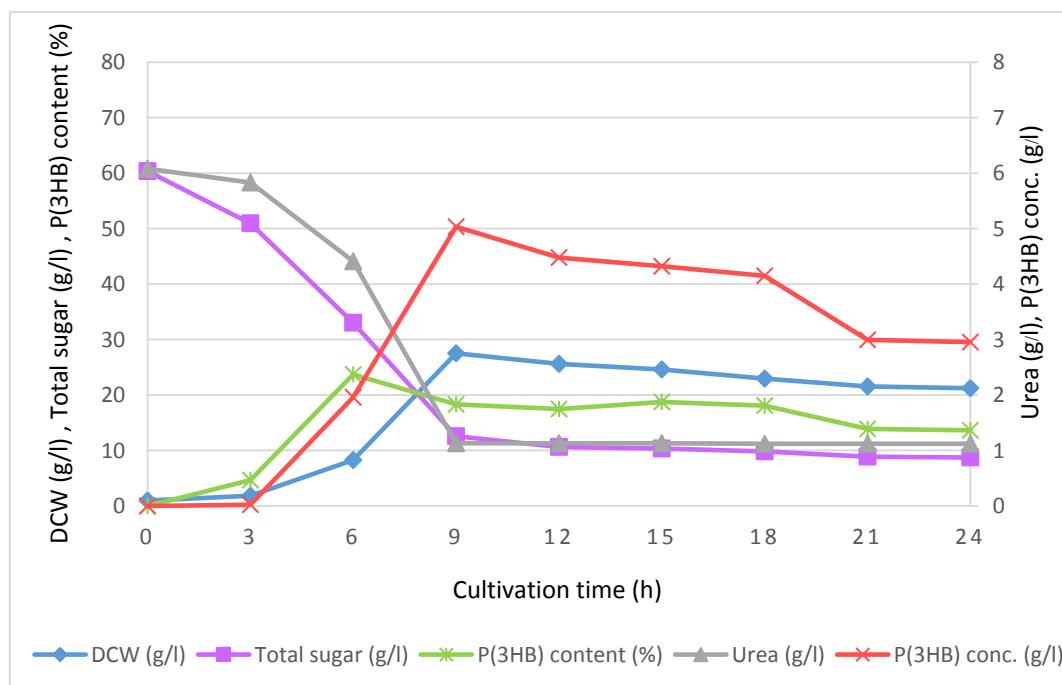


รูปที่ 15 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกาน้ำตาลเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 8 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมใน กากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร

| Time (h) | DCW (g/l)  | Total sugar (g/l) | Urea (g/l) | P(3HB) conc. (g/l) | P(3HB) content (% by weight) |
|----------|------------|-------------------|------------|--------------------|------------------------------|
| 0        | 0.98±0.00  | 60.37±0.01        | 6.08±0.03  | 0.00               | 0.00                         |
| 3        | 1.84±0.01  | 50.95±0.00        | 5.83±0.05  | 0.02               | 4.65                         |
| 6        | 8.26±0.00  | 33.02±0.01        | 4.41±0.04  | 1.96               | 23.71                        |
| 9        | 27.52±0.07 | 12.57±0.01        | 1.13±0.00  | 5.04               | 18.30                        |
| 12       | 25.61±0.02 | 10.62±0.00        | 1.13±0.00  | 4.48               | 17.48                        |
| 15       | 24.60±0.04 | 10.36±0.00        | 1.13±0.00  | 4.32               | 18.74                        |
| 18       | 22.95±0.03 | 9.83±0.00         | 1.12±0.00  | 4.15               | 18.08                        |
| 21       | 21.55±0.02 | 8.89±0.01         | 1.12±0.00  | 2.99               | 13.89                        |
| 24       | 21.22±0.00 | 8.73±0.00         | 1.12±0.00  | 2.95               | 13.63                        |

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลรวมในการกาน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 16 ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ณ ชั่วโมงที่ 3-9 สัมพันธ์กับความเข้มข้นของ P(3HB) โดยความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) มีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 27.52 กรัมต่อลิตร และ 5.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 23.71 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มลดลงอย่างช้าๆ และปริมาณ P(3HB) ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังชั่วโมงที่ 9 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลและยูเรียลดลงสัมพันธ์กับการเจริญและการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าคงที่หลังชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ



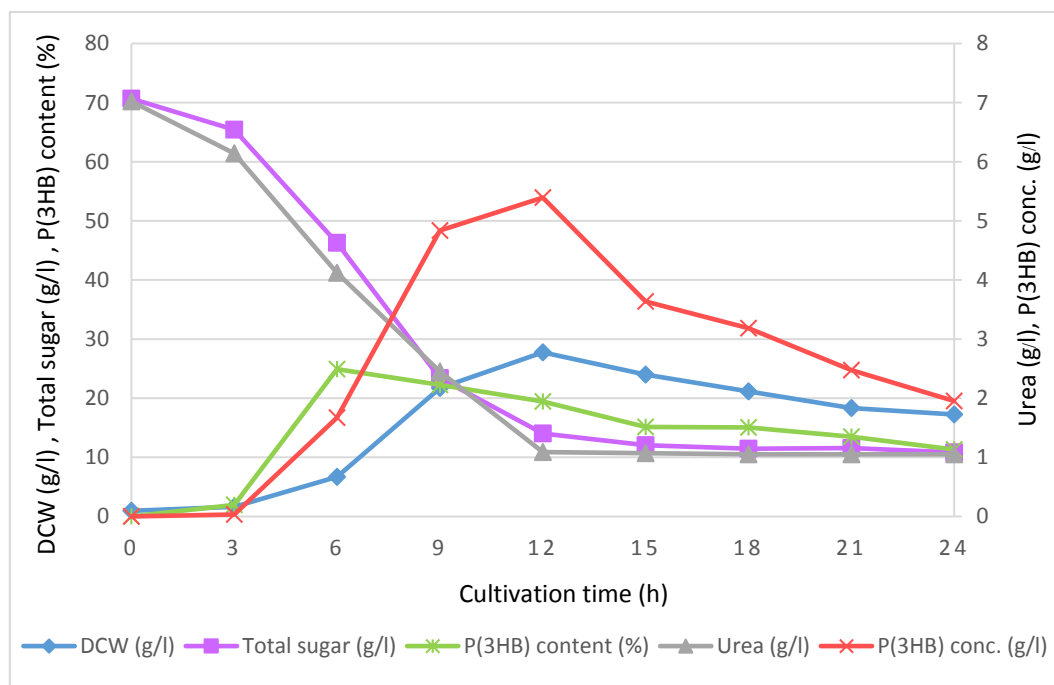
รูปที่ 16 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในการกาน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร



ตารางที่ 9 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมใน กากน้ำตาลเท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร

| Time (h) | DCW (g/l)  | Total sugar (g/l) | Urea (g/l) | P(3HB) conc. (g/l) | P(3HB) content (% by weight) |
|----------|------------|-------------------|------------|--------------------|------------------------------|
| 0        | 0.96±0.01  | 70.67±0.01        | 7.02±0.04  | 0.00               | 0.00                         |
| 3        | 1.64±0.01  | 65.41±0.01        | 6.14±0.03  | 0.03               | 1.95                         |
| 6        | 6.70±0.01  | 46.27±0.00        | 4.12±0.04  | 1.67               | 24.92                        |
| 9        | 21.72±0.01 | 23.40±0.00        | 2.45±0.01  | 4.84               | 22.26                        |
| 12       | 27.75±0.01 | 14.04±0.00        | 1.09±0.03  | 5.39               | 19.43                        |
| 15       | 24.00±0.00 | 12.04±0.00        | 1.07±0.00  | 3.64               | 15.15                        |
| 18       | 21.15±0.09 | 11.46±0.00        | 1.05±0.00  | 3.18               | 15.06                        |
| 21       | 18.34±0.01 | 11.57±0.00        | 1.05±0.00  | 2.47               | 13.49                        |
| 24       | 17.25±0.03 | 10.83±0.00        | 1.05±0.00  | 1.95               | 11.32                        |

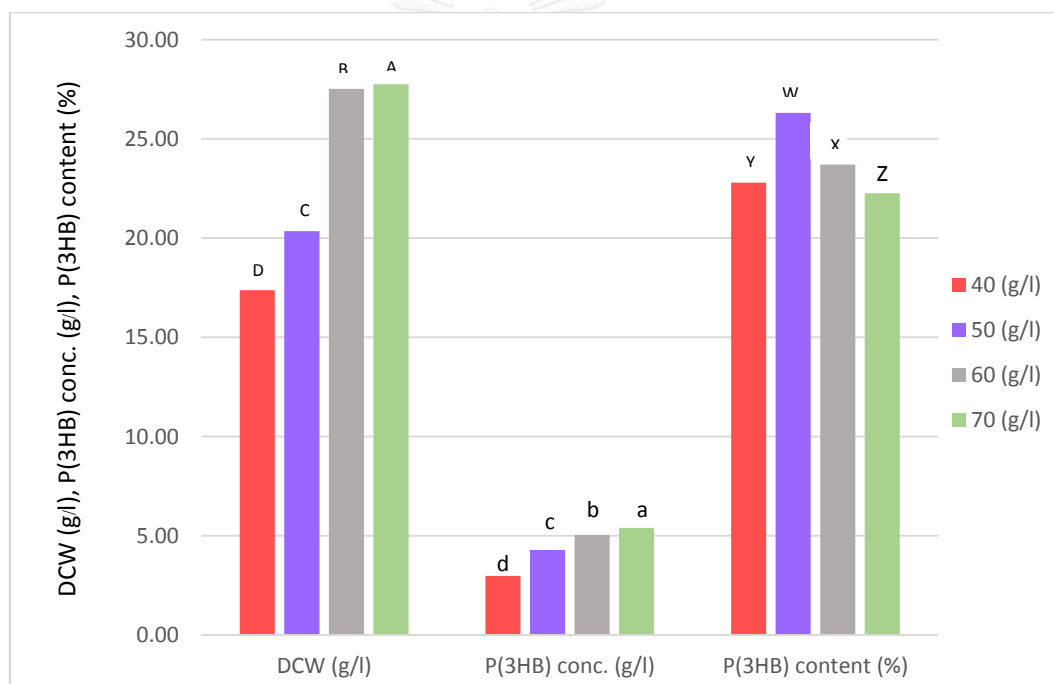
เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลรวมในการกาน้ำตาลเท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 17 ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ณ ชั่วโมงที่ 3-12 สัมพันธ์กับความเข้มข้นของ P(3HB) โดยความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) มีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 27.75 กรัมต่อลิตร และ 5.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 24.92 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มลดลงอย่างช้าๆ และปริมาณ P(3HB) ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลและยูเรียลดลงสัมพันธ์กับการเจริญและการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าคงที่หลังชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 17 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกาน้ำตาลเท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) ที่สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล ต่างๆกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

|                    | Initial total sugar (g/l) |       |       |       |
|--------------------|---------------------------|-------|-------|-------|
|                    | 40                        | 50    | 60    | 70    |
| DCW (g/l)          | 17.37                     | 20.35 | 27.52 | 27.75 |
| P(3HB) conc. (g/l) | 2.97                      | 4.28  | 5.04  | 5.39  |
| P(3HB) content (%) | 22.79                     | 26.31 | 23.71 | 22.26 |



รูปที่ 18 เปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) ค่าที่สูงที่สุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลต่างๆกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

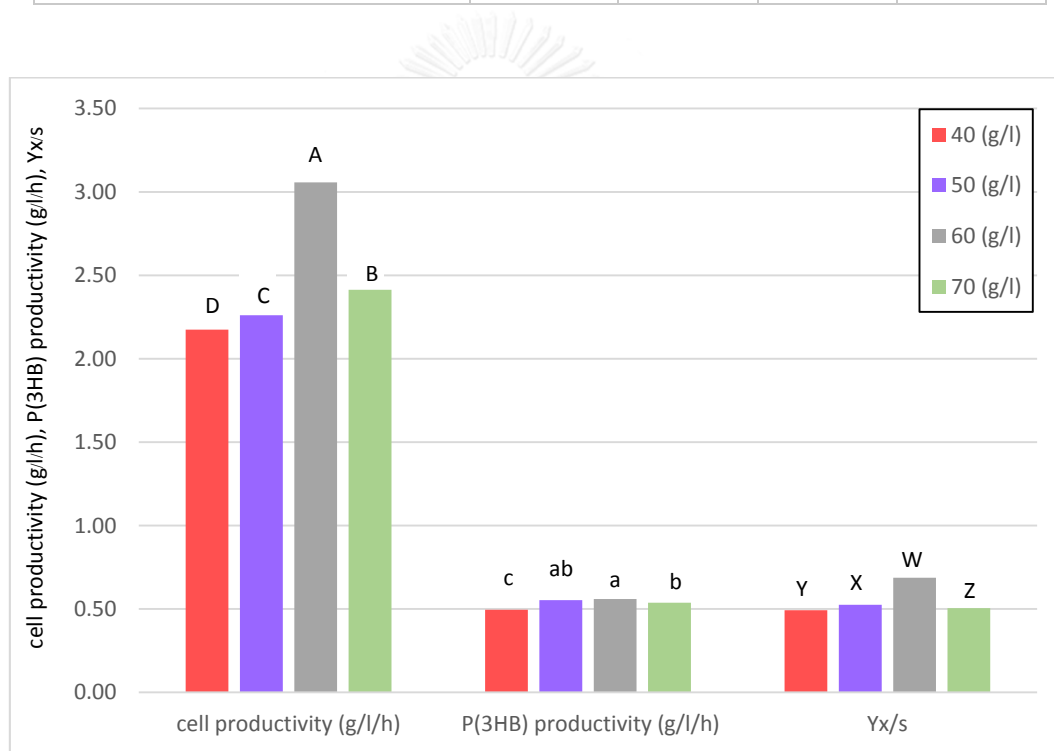
หมายเหตุ: สัญลักษณ์ตัวอักษร A-D หมายถึง ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้ง สัญลักษณ์ตัวอักษร a-d หมายถึง ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ P(3HB) และสัญลักษณ์ตัวอักษร W-Z หมายถึง ค่าเฉลี่ยปริมาณ P(3HB) ของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ ) ( $n=3$ ) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan test โดยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงค่าเฉลี่ยของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

จากผลการทดลองการเปรียบเทียบการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลรวมในการกักน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆกัน ดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 18 พบว่าความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมในกักน้ำตาลเท่ากับ 70 กรัมต่อลิตรมีผลให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 27.75 กรัมต่อลิตรและ 5.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใกล้เคียงกับความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกักน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ที่ได้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 27.52 กรัมต่อลิตร และ 5.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ P(3HB) ของแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลรวมมีค่าอยู่ในช่วง 22.26-26.31 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลและยูเรียที่เหลือสอดคล้องกับการเจริญของเซลล์ในทุกความเข้มข้นของน้ำตาลรวมที่ใช้



ตารางที่ 11 เปรียบเทียบค่าอัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไปค่าที่สูงที่สุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลต่างๆกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

|                             | Initial total sugar (g/l) |      |      |      |
|-----------------------------|---------------------------|------|------|------|
|                             | 40                        | 50   | 60   | 70   |
| cell productivity (g/l/h)   | 2.17                      | 2.26 | 3.06 | 2.41 |
| P(3HB) productivity (g/l/h) | 0.50                      | 0.55 | 0.56 | 0.54 |
| Yx/s                        | 0.49                      | 0.52 | 0.69 | 0.50 |



รูปที่ 19 เปรียบเทียบค่าอัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไปค่าที่สูงที่สุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลต่างๆกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ตัวอักษร A-D หมายถึง ค่าเฉลี่ยอัตราผลผลิตของเซลล์ สัญลักษณ์ตัวอักษร a-d หมายถึง ค่าเฉลี่ยอัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัญลักษณ์ตัวอักษร W-Z หมายถึง ค่าเฉลี่ยสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ ของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ ) ( $n=3$ ) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan test โดยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงค่าเฉลี่ยของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

เมื่อพิจารณาอัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไปของแต่ละความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล ดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 19 พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราผลผลิตของเซลล์ ค่าอัตราผลผลิตของ P(3HB) และค่าสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้สูงสุดเท่ากับ 3.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.69 ตามลำดับ ซึ่งค่าอัตราผลผลิตของเซลล์และอัตราผลผลิตของ P(3HB) บ่งบอกถึงความสามารถในการเจริญของเซลล์และการผลิต P(3HB) เทียบกับเวลา โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรมีค่าอัตราผลผลิตของเซลล์และอัตราผลผลิตของ P(3HB) สูงที่สุด แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลดังกล่าว สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) ได้สูงกว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมอื่นๆ อีกทั้งมีค่าสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่สูงที่สุด แสดงถึงที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมดังกล่าว เซลล์สามารถนำน้ำตาลไปใช้เพื่อการเจริญและสร้างเซลล์ได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ จึงสามารถสรุปได้ว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ เนื่องจากสารตั้งต้นถูกนำไปใช้สร้างเซลล์และสังเคราะห์ P(3HB) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในศึกษาขั้นต่อไป สอดคล้องกับปวุฒิ กาญจนชุมพล (2553) ที่ศึกษาการขยายส่วนการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิด P(3HB) โดย *B. megaterium* BA-019 ซึ่งงานวิจัยในขั้นต้นพบว่า การใช้น้ำตาลเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 32.48 กรัมต่อลิตร และ 8.75 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) ที่ผลิตได้มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Contrerus และคณะ (2013) ซึ่งศึกษาการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* พบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 28.59 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 8.50 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* uyuni S29 ในอาหาร mineral medium ที่มีกลูโคสเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกันกับ Nair และคณะ (2014) ที่ศึกษาการใช้กากน้ำตาลเพื่อลดต้นทุนการผลิต PHA โดย *Bacillus subtilis* โดยแปรความเข้มข้นของน้ำตาลในกากน้ำตาลเท่ากับ 10-100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การใช้น้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHA ที่สุด ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 20.9 กรัมต่อลิตรและมีความเข้มข้นของ PHA เท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 75.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง

การใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB) ในงานวิจัยนี้ พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญและการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ได้ในปริมาณสูง เช่นเดียวกับ Kulpreecha และคณะ (2003) ที่ได้ศึกษาการผลิต P(3HB) โดย *B. megaterium* BA-019 โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรียซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีราคาถูก พบว่า การเลี้ยงเชื้อแบบเพดแบตซ์ที่มีการเติมกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) สูงถึง 72.6 กรัมต่อลิตรและ 30.5 กรัมต่อลิตรตามลำดับ คิดเป็น 42.10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เช่นเดียวกับกับ Naheed และJamil (2014) ซึ่งได้ศึกษาการผลิต P(3HB) โดย *Enterobacter* sp. SEL2 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ได้พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ ได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 47.36 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากการศึกษาที่มีรายงานไว้ดังที่กล่าวมา จึงเห็นได้ว่าสามารถใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการสังเคราะห์ P(3HB) ได้ในปริมาณสูง ซึ่งความเข้มข้นของเซลล์และปริมาณพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ใช้ ทั้งนี้การใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถส่งเสริมการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB) ได้ดีเพราะในกากน้ำตาลมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรักโทส อีกทั้งประกอบด้วยวิตามิน แร่ธาตุชนิดต่างๆ เช่น ไทอามีน ไรโบฟลาวิน ไบโอติน โพแทสเซียม ฟอสเฟต แคลเซียม แมกนีเซียม คอปเปอร์ และเหล็ก เป็นต้น ซึ่งสารดังกล่าวสามารถส่งเสริมการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของเซลล์ (Koller และคณะ, 2012)

ได้พบว่าปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ภายหลังช่วงเวลาที่ได้ค่าสูงที่สุดลดลงอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในกราฟผลการทดลอง เป็นผลมาจากเมื่อเซลล์มีการสังเคราะห์พอลิเมอร์จนถึงค่าหนึ่งที่มีความเข้มข้นสูงสุดแล้ว รวมทั้งสารอาหารในระบบถูกใช้จนลดน้อยลง ภายในเซลล์จะเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอร์ไรซ์ โดยเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เรส นำพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาใช้เพื่อการย่อยสลาย ซึ่งสอดคล้องกับ Kedia และคณะ (2014) ที่รายงานว่าปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตโดย *C. necator* ภายหลังช่วงเวลาที่ได้ค่าสูงสุดจะลดลงอย่างรวดเร็ว เป็นผลมาจากการย่อยสลาย P(3HB) ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์เพื่อนำมาใช้ในการเจริญและการย่อยสลายของเซลล์

#### 4.2 การศึกษาช่วงเวลาในการเติมแหล่งคาร์บอนในขั้นตอนแรกเพื่อเพิ่มการเจริญและการผลิตไฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) โดย *B. megaterium* P-12

การเติมสารอาหารใหม่ลงไปในถังหมักมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ปริมาณเซลล์และผลผลิตของผลิตภัณฑ์เพิ่มสูงขึ้น เพราะหากใช้ความเข้มข้นของสารอาหารที่สูง ณ เวลาเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นที่สูงของสารอาหารอาจเกิดการยับยั้งการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ได้

จากผลการศึกษาการเติมสารอาหารในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) ได้ โดยการเติมอาหารใหม่ ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) ได้สูงสุดเท่ากับ เท่ากับ 34.99 กรัมต่อลิตรและ 9.09 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เติมสารอาหารโดยได้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 27.52 กรัมต่อลิตรและ 5.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Wang และคณะ (2013) ได้ศึกษาการผลิต P(3HB) จาก *A. lotus* โดยใช้น้ำตาลจากหัวบีทเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการเติมสารอาหารใหม่ที่มีองค์ประกอบต่าง ๆ กันที่ชั่วโมงที่ 16 ได้รายงานว่าการเติมสารอาหารใหม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ได้เป็น 10.30 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.01 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 38.66 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงเชื้อโดยไม่เติมสารอาหารที่ได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 9.23 ณ ชั่วโมงที่ 28 ของการเลี้ยงเชื้อ Sayed และคณะ (2009) ได้รายงานการผลิต P(3HB) โดย *A. lotus* ซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติมอาหารใหม่ที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน พบว่าการเลี้ยง *A. lotus* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเซลล์และเติมอาหารใหม่ที่มีการจำกัดไนโตรเจน พบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) เท่ากับ 12.56 และ 7.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงเชื้อเพียงขั้นตอนเดียวที่ไม่มีการเติมสารอาหารซึ่งได้ความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) เท่ากับ 7.01 และ 0.66 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การศึกษาในขั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ให้สูงขึ้น โดยการเติมสารอาหารใหม่ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและยูเรีย เพื่อส่งเสริมการเจริญของเซลล์ให้มีความเข้มข้นที่สูงขึ้น ซึ่งหากได้ความเข้มข้นของเซลล์สูง ก็จะทำให้ได้ความเข้มข้นของ P(3HB) สูงขึ้นด้วย โดยแปรช่วงเวลาในการเติมสารอาหารใหม่ในขั้นตอนแรก ซึ่งจากผลการทดลองในข้อที่ 4.1 เซลล์มีช่วงระยะเวลาการเจริญแบบคงที่ (exponential growth phase) อยู่ในช่วงระหว่าง 6 – 9 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่เซลล์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ซึ่งหากมีการเติมสารอาหารใหม่เข้าสู่ระบบในช่วงเวลาดังกล่าว อาจสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ให้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องได้ เนื่องจากเซลล์สามารถนำสารอาหารใหม่ที่เติมลงไปใช้เพื่อการเจริญได้อย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพ เพราะหากเติมสารอาหารก่อนหรือหลังช่วงดังกล่าวอาจไม่ส่งเสริมการเจริญ โดยหากเติมสารอาหารในช่วงเวลาที่



เร็วเกินไป ในช่วงเวลาก่อนชั่วโมงที่ 6 สารอาหารเดิมในระบบยังมีความเข้มข้นที่สูงอยู่ อาจเกิดการยับยั้งการทำงานของเซลล์ทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ต่ำ และหากเดิมในช่วงเวลาที่ช้าเกินไป คือหลังจากชั่วโมงที่ 9 เซลล์เริ่มมีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย การเติมสารอาหารใหม่จึงอาจไม่ส่งเสริมการเจริญและไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ให้สูงขึ้นได้ ดังนั้น จึงแปรช่วงเวลาในการเติมสารอาหารใหม่ ณ ชั่วโมงที่ 6 7.5 และ 9 โดยสารอาหารที่เติมประกอบด้วยกากน้ำตาลและยูเรียที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 4.1 ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรและยูเรียที่มีความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 เติมกากน้ำตาลและยูเรีย ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับปริมาตรที่ถูกเก็บตัวอย่างออกไป ณ ชั่วโมงที่ 6 โดยจะทำให้ปริมาตรรวมภายในถังเท่ากับ 3 ลิตร

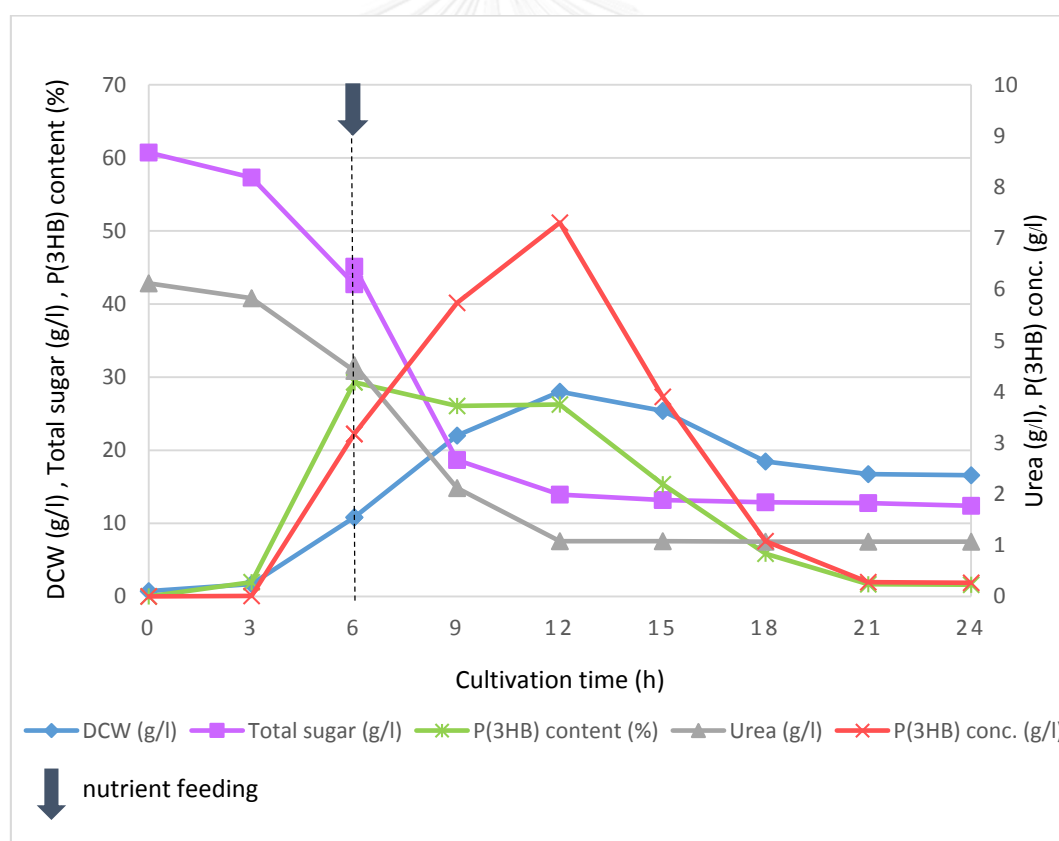
ปจฺติ กาญจนชุมพล (2010) ศึกษาการขยายส่วนการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 แบบเฟด-แบตช์ โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรียเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ การทดลองได้ศึกษาวิธีการป้อนสารอาหารแบบ exponential feeding และการป้อนแบบครั้งคราว (rectangular pulse feeding) พบว่าการป้อนอาหารแบบครั้งคราวได้ค่าความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) สูงกว่าการป้อนอาหารแบบ exponential feeding ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกการเติมอาหารแบบครั้งคราวเป็นรูปแบบในการเติมสารอาหารใหม่เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB)

เติมกล้าเชื้อปริมาตร 300 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 3 ลิตร ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 6 7.5 หรือ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ทำการเติมสารอาหารใหม่ในขั้นตอนแรกที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรและยูเรียที่มีความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงไปในถังหมัก เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเพื่อนำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของ P(3HB) ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้น

ตารางที่ 12 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในภาคน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมภาคน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ

| Time (h)          | DCW (g/l)  | Total sugar (g/l) | Urea (g/l) | P(3HB) conc. (g/l) | P(3HB) content (% by weight) |
|-------------------|------------|-------------------|------------|--------------------|------------------------------|
| 0                 | 0.73±0.00  | 60.73±0.01        | 6.12±0.03  | 0                  | 0                            |
| 3                 | 1.69±0.00  | 57.32±0.01        | 5.83±0.05  | 0.01               | 1.96                         |
| 6 <sup>ก่อน</sup> | 10.84±0.00 | 42.70±0.04        | 4.41±0.04  | 3.18               | 29.32                        |
| 6 <sup>หลัง</sup> | 10.84±0.01 | 45.12±0.00        | 4.52±0.02  | 3.18               | 29.32                        |
| 9                 | 22.02±0.01 | 18.67±0.00        | 2.12±0.01  | 5.74               | 26.07                        |
| 12                | 28.02±0.00 | 13.93±0.00        | 1.08±0.01  | 7.30               | 26.27                        |
| 15                | 25.40±0.01 | 13.20±0.00        | 1.08±0.00  | 3.90               | 15.37                        |
| 18                | 18.46±0.00 | 12.88±0.00        | 1.07±0.00  | 1.08               | 5.86                         |
| 21                | 16.73±0.01 | 12.78±0.00        | 1.07±0.00  | 0.28               | 1.67                         |
| 24                | 16.59±0.01 | 12.41±0.00        | 1.07±0.00  | 0.27               | 1.61                         |

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลรวมในการกักน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรและเติมอาหารใหม่ขั้นตอนแรกในชั่วโมงที่ 6 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 20 ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ณ ชั่วโมงที่ 3-12 สัมพันธ์กับความเข้มข้นของ P(3HB) โดยความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) มีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 28.02 กรัมต่อลิตร และ 7.30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงโดยไม่เติมสารอาหารใหม่ ที่ได้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 27.52 กรัมต่อลิตร และ 5.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 29.32 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มลดลงอย่างช้าๆ และปริมาณ P(3HB) ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลและยูเรียลดลงสัมพันธ์กับการเจริญและการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าคงที่หลังชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ

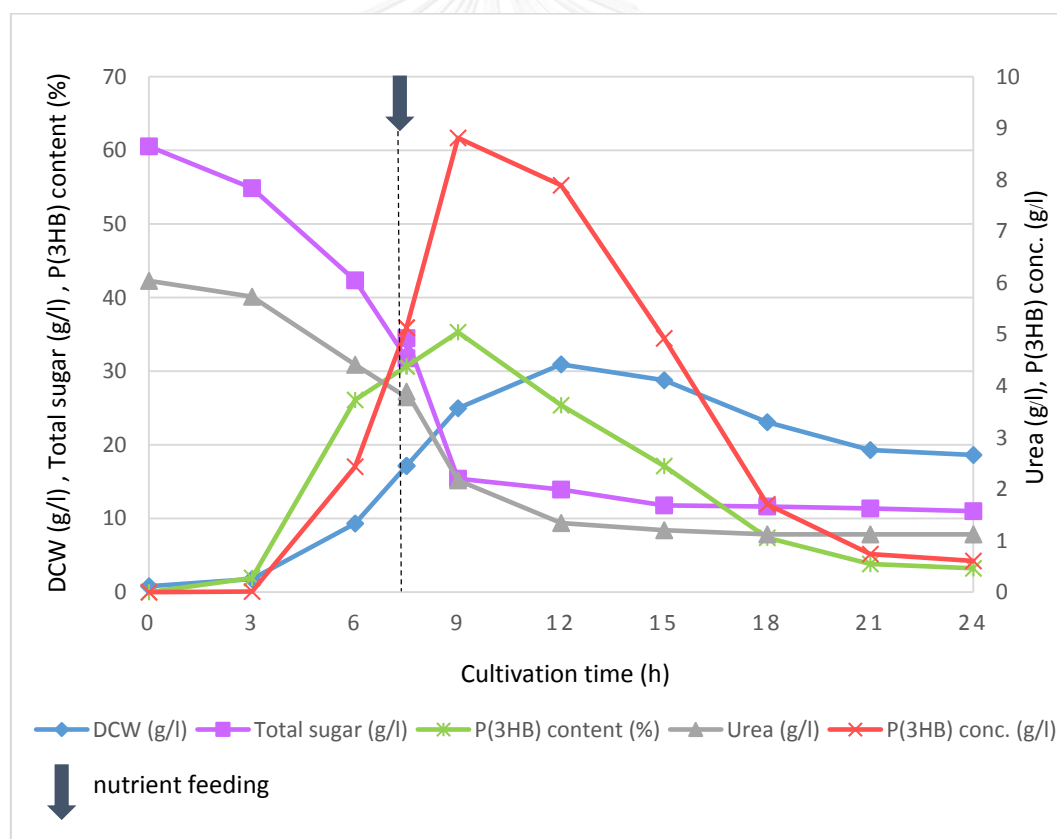


รูปที่ 20 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในการกักน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกักน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 13 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในภาคน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมภาคน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 7.5 ของการเลี้ยงเชื้อ

| Time (h)            | DCW (g/l)  | Total sugar (g/l) | Urea (g/l) | P(3HB) conc. (g/l) | P(3HB) content (% by weight) |
|---------------------|------------|-------------------|------------|--------------------|------------------------------|
| 0                   | 0.80±0.01  | 60.52±0.02        | 6.04±0.03  | 0                  | 0                            |
| 3                   | 1.78±0.00  | 54.84±0.01        | 5.73±0.00  | 0.01               | 1.94                         |
| 6                   | 9.33±0.05  | 42.33±0.01        | 4.41±0.00  | 2.43               | 26.10                        |
| 7.5 <sup>ก่อน</sup> | 17.14±0.00 | 31.76±0.00        | 3.78±0.04  | 5.13               | 30.67                        |
| 7.5 <sup>หลัง</sup> | 17.14±0.01 | 34.50±0.00        | 3.89±0.01  | 5.13               | 30.67                        |
| 9                   | 24.97±0.00 | 15.41±0.00        | 2.17±0.00  | 8.81               | 35.29                        |
| 12                  | 30.92±0.00 | 13.93±0.01        | 1.34±0.00  | 7.89               | 25.39                        |
| 15                  | 28.77±0.01 | 11.78±0.00        | 1.20±0.00  | 4.92               | 17.12                        |
| 18                  | 23.07±0.01 | 11.62±0.00        | 1.12±0.00  | 1.70               | 7.38                         |
| 21                  | 19.29±0.01 | 11.36±0.00        | 1.12±0.00  | 0.74               | 3.83                         |
| 24                  | 18.62±0.00 | 10.99±0.02        | 1.12±0.00  | 0.60               | 3.24                         |

เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลรวมในการกักน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรและเติมอาหารใหม่ขั้นตอนแรกในชั่วโมงที่ 7.5 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 13 และรูปที่ 21 ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ณ ชั่วโมงที่ 3-12 และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 30.92 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ และความเข้มข้นของ P(3HB) เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ณ ชั่วโมงที่ 3-9 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 8.81 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงโดยไม่เติมสารอาหารใหม่ ที่ได้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 27.52 กรัมต่อลิตรและ 5.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อโดยปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 35.29 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มลดลงอย่างช้าๆ และปริมาณ P(3HB) ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังชั่วโมงที่ 12 และ 9 ตามลำดับ จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลและยูเรียลดลงสัมพันธ์กับการเจริญและการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าคงที่หลังชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ

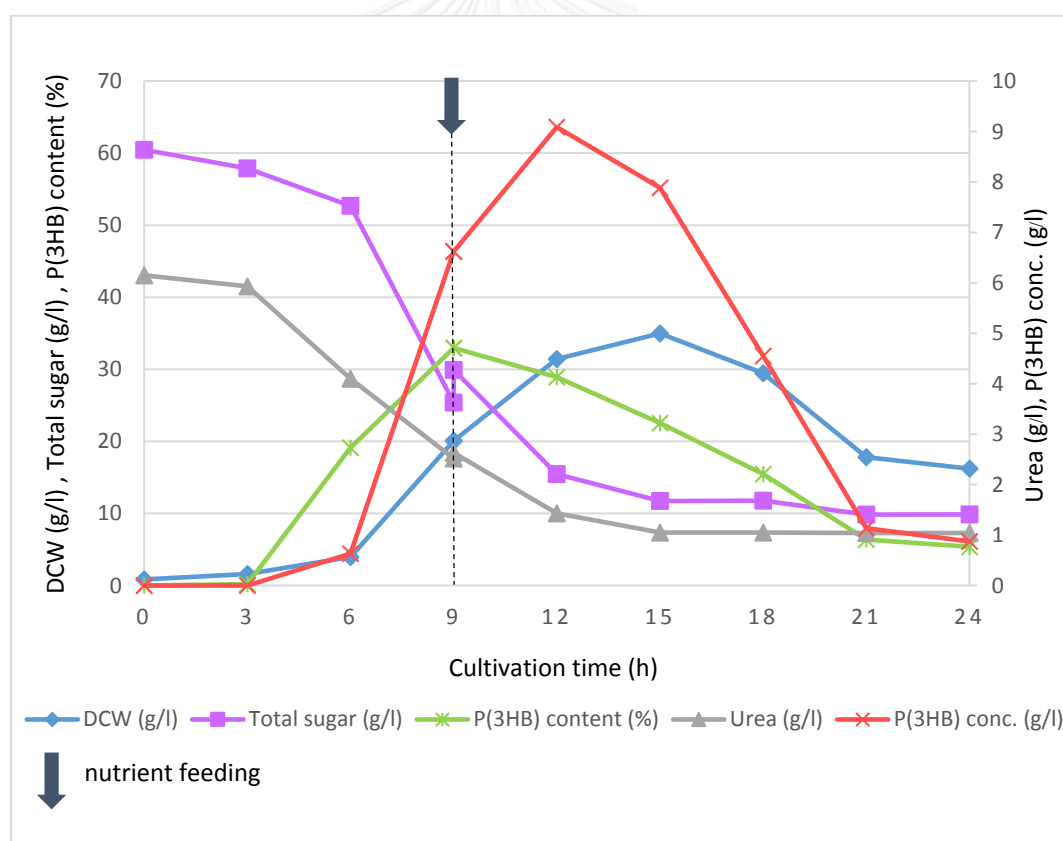


รูปที่ 21 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในการกักน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกักน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 7.5 ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 14 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในภาคน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมภาคน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

| Time (h) | DCW (g/l)  | Total sugar (g/l) | Urea (g/l) | P(3HB) conc. (g/l) | P(3HB) content (% by weight) |
|----------|------------|-------------------|------------|--------------------|------------------------------|
| 0        | 0.84±0.01  | 60.47±0.00        | 6.15±0.00  | 0.00               | 0.00                         |
| 3        | 1.60±0.00  | 57.89±0.00        | 5.93±0.02  | 0.00               | 0.19                         |
| 6        | 3.96±0.01  | 52.69±0.02        | 4.10±0.00  | 0.63               | 19.13                        |
| 9 ก่อน   | 20.09±0.01 | 25.40±0.01        | 2.52±0.01  | 6.62               | 32.97                        |
| 9 หลัง   | 20.09±0.01 | 29.92±0.00        | 2.63±0.04  | 6.62               | 32.97                        |
| 12       | 31.42±0.03 | 15.46±0.01        | 1.43±0.03  | 9.09               | 28.92                        |
| 15       | 34.99±0.05 | 11.73±0.00        | 1.05±0.00  | 7.88               | 22.54                        |
| 18       | 29.46±0.01 | 11.78±0.00        | 1.05±0.00  | 4.55               | 15.45                        |
| 21       | 17.81±0.00 | 9.83±0.00         | 1.04±0.00  | 1.14               | 6.37                         |
| 24       | 16.22±0.01 | 9.85±0.00         | 1.04±0.00  | 0.87               | 5.37                         |

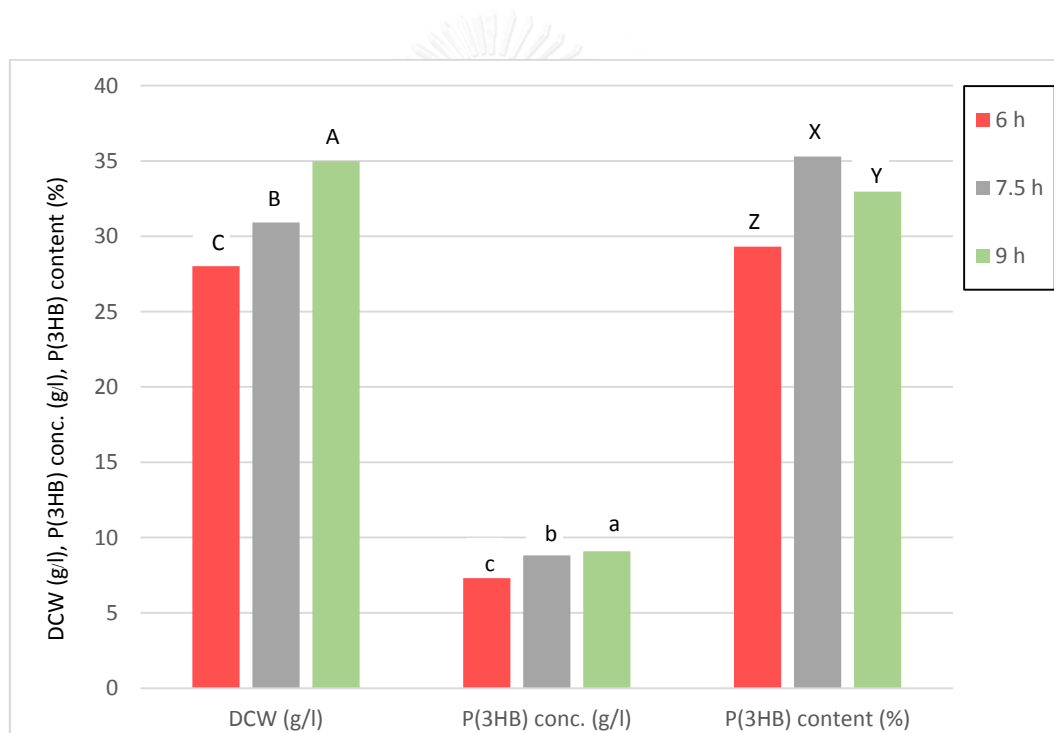
เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำตาลรวมในการกักน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรและเติมอาหารใหม่ขึ้นตอนแรกในชั่วโมงที่ 9 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 14 และรูปที่ 22 ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ณ ชั่วโมงที่ 6-15 และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 34.99 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ และความเข้มข้นของ P(3HB) เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ณ ชั่วโมงที่ 6-12 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 9.09 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงโดยไม่เติมสารอาหารใหม่ ที่ได้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 27.52 กรัมต่อลิตรและ 5.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อโดยปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 32.97 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มลดลงอย่างช้าๆ และปริมาณ P(3HB) ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังชั่วโมงที่ 15 และ 12 ตามลำดับ จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลและยูเรียลดลงสัมพันธ์กับการเจริญและการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าคงที่หลังชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 22 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และ ปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในการกักน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกักน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) ค่าที่สูงที่สุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตรและเติมสารอาหารใหม่ ณ เวลาที่ต่างกัน

|                    | feeding time (h) |       |       |
|--------------------|------------------|-------|-------|
|                    | 6 h              | 7.5 h | 9 h   |
| DCW (g/l)          | 28.02            | 30.92 | 34.99 |
| P(3HB) conc. (g/l) | 7.30             | 8.81  | 9.09  |
| P(3HB) content (%) | 29.32            | 35.29 | 32.97 |



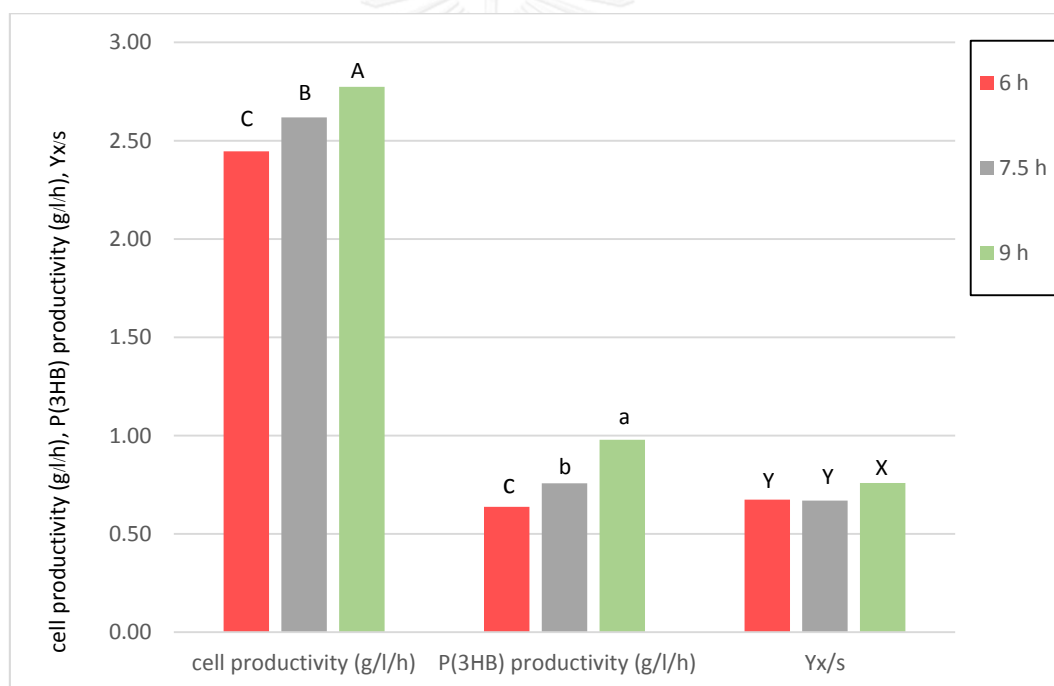
รูปที่ 23 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) ค่าที่สูงที่สุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตรและเติมสารอาหารใหม่ ณ เวลาที่ต่างกัน

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ตัวอักษร A-D หมายถึง ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้ง สัญลักษณ์ตัวอักษร a-d หมายถึง ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ P(3HB) และสัญลักษณ์ตัวอักษร W-Z หมายถึง ค่าเฉลี่ยปริมาณ P(3HB) ของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ ) ( $n = 3$ ) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan test โดยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงค่าเฉลี่ยของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ



ตารางที่ 16 เปรียบเทียบอัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไปค่าที่สูงที่สุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตรและเติมสารอาหารใหม่ ณ เวลาที่ต่างกัน

|                             | feeding time (h) |       |      |
|-----------------------------|------------------|-------|------|
|                             | 6 h              | 7.5 h | 9 h  |
| cell productivity (g/L/h)   | 2.45             | 2.62  | 2.77 |
| P(3HB) productivity (g/L/h) | 0.64             | 0.76  | 0.98 |
| Yx/s                        | 0.67             | 0.67  | 0.76 |



รูปที่ 24 เปรียบเทียบอัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไปค่าที่สูงที่สุด เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตรและเติมสารอาหารใหม่ ณ เวลาที่ต่างกัน

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ตัวอักษร A-D หมายถึง ค่าเฉลี่ยอัตราผลผลิตของเซลล์ สัญลักษณ์ตัวอักษร a-d หมายถึง ค่าเฉลี่ยอัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัญลักษณ์ตัวอักษร W-Z หมายถึง ค่าเฉลี่ยสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ ของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ ) ( $n=3$ ) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan test โดยตัวอย่างที่เหมือนกันแสดงค่าเฉลี่ยของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเซลล์ ความเข้มข้นของ P(3HB) ปริมาณ P(3HB) อัตราการผลิตของเซลล์ อัตราการผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไป ค่าที่สูงที่สุดของแต่ละช่วงเวลาที่ได้มีการอาหารใหม่ลงไปในถังหมัก ดังแสดงในตารางที่ 15-16 และรูปที่ 23-24 พบว่า ณ ชั่วโมงที่ 9 เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเติมสารอาหารใหม่มากที่สุด เนื่องจากมีค่าความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 34.99 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 9.09 กรัมต่อลิตร ปริมาณ P(3HB) 32.97 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการผลิตของเซลล์ เท่ากับ 2.77 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าอัตราการผลิตของ P(3HB) เท่ากับ 0.98 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และค่าสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไปสูงที่สุดเท่ากับ 0.76

ดังนั้น จึงเลือกช่วงเวลาในการเติมสารอาหารใหม่ในขั้นตอนแรก ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอยู่ในช่วงปลายของระยะการเจริญแบบคงที่ (late log phase) เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและสังเคราะห์ P(3HB) เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับ Nath และคณะ (2008) ศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิต P(3HB) ด้วยการเลี้ยง *Methylobacterium* sp. ZP24 แบบเฟด-แบตช์ โดยใช้หางนมจากการผลิตชีสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเริ่มการเติมสารอาหารใหม่ในช่วงปลายของระยะการเจริญแบบคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเติมหางนมและแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงเวลาดังกล่าวสามารถเพิ่มความเข้มข้นของ P(3HB) ได้สูงขึ้นจากการเลี้ยงโดยไม่เติมสารอาหารถึง 2.5 เท่า

#### 4.3 การศึกษาอัตราส่วนความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนผสมที่เติมในขั้นที่สอง ที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดย *B. megaterium* P-12

การทดลองนี้เป็นการเติมสารอาหารในขั้นที่สอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยการเติมสารอาหารใหม่ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนผสมเพื่อการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV ได้มีการรายงานถึงการใช้โซเดียมโพรพิโอเนตและโซเดียมวาเลอเรตเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ซึ่ง Lee และคณะ (2008) ศึกษาการผลิต PHBV โดย *C. necator* จากน้ำมันจากพืชชนิดต่างๆ เปรียบเทียบการเติมแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างโซเดียมโพรพิโอเนตและโซเดียมวาเลอเรต ซึ่งพบว่าการใช้น้ำมันจากพืชชนิดต่างๆ ร่วมกับโซเดียมโพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนผสมได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHBV สูงกว่าการใช้โซเดียมวาเลอเรต ในทางกลับกันหากต้องการได้สัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV สูง การใช้โซเดียมวาเลอเรตจะให้ผลที่ดีกว่าโดยได้สัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV เท่ากับ 14 โมลเปอร์เซ็นต์ซึ่งมากกว่าการใช้โซเดียมโพรพิโอเนตที่ได้สัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV เท่ากับ 8 โมลเปอร์เซ็นต์

กิติพงศ์ ปวรังกูร (2554) ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนโดยโมลของ 3HV สูง โดยการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 แบบเฟด-แบตช์ เปรียบเทียบการใช้โซเดียมวาเลอเรตและโซเดียมโพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HV พบว่าการใช้โซเดียมวาเลอเรตมีผลทำให้ได้สัดส่วนโดยโมลของ 3HV สูง ซึ่งมีค่ามากถึง 40 เปอร์เซ็นต์ แต่ทำให้การเจริญและปริมาณพอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีค่าต่ำกว่าการใช้โซเดียมโพรพิโอเนต ซึ่งให้ค่าสัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV ประมาณ 20 โมลเปอร์เซ็นต์ แต่เซลล์มีการเจริญมากกว่าการใช้โซเดียมวาเลอเรต ซึ่งอาจมาจากโซเดียมโพรพิโอเนตมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าโซเดียมวาเลอเรต

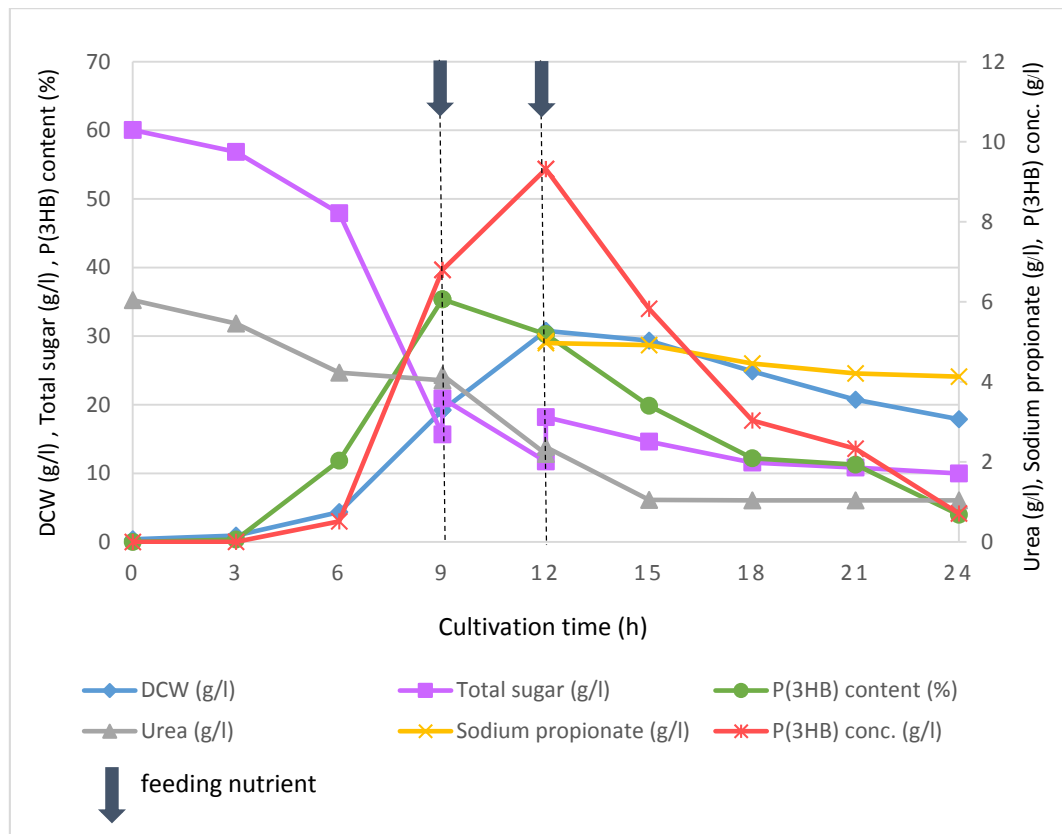
ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้โซเดียมโพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HV โดยใช้กากน้ำตาลและโซเดียมโพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนผสมในการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ในการเลี้ยงเชื้อแบบเฟด-แบตช์สองขั้นตอน จากการทดลองในข้อ 4.2 การเติมอาหารใหม่ในขั้นแรก ณ ชั่วโมงที่ 9 เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสะสม P(3HB) การเติมสารอาหารในขั้นตอนที่สอง จึงทำการเติม ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยแปรอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนผสม คือ ปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) และโซเดียมโพรพิโอเนต (กรัม) ในอัตราส่วน 60 ต่อ 5 60 ต่อ 10 และ 60 ต่อ 15

เติมกล้าเชื้อปริมาณ 300 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 3 ลิตร ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในกาน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ เติมสารอาหารใหม่ในขั้นตอนแรกที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรและยูเรียที่มีความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงไปในถังหมัก จากนั้น ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ เติมสารอาหารใหม่ในขั้นที่สองซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนผสม เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเพื่อนำมาวิเคราะห์น้ำตาลและและความเข้มข้นของ PHBV ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้น



ตารางที่ 17 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม-โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 9 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 5 ที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ

| Time (h)           | DCW (g/l)  | Total sugar (g/l) | Urea (g/l) | Sodium propionate (g/l) | P(3HB) conc. (g/l) | P(3HB) content (% by weight) |
|--------------------|------------|-------------------|------------|-------------------------|--------------------|------------------------------|
| 0                  | 0.40±0.00  | 60.05±0.04        | 6.04±0.00  | -                       | 0.00               | 0.00                         |
| 3                  | 0.93±0.03  | 56.84±0.04        | 5.46±0.01  | -                       | 0.00               | 0.13                         |
| 6                  | 4.36±0.00  | 47.90±0.00        | 4.23±0.00  | -                       | 0.52               | 16.48                        |
| 9 <sup>ก่อน</sup>  | 19.23±0.04 | 15.67±0.02        | 4.04±0.00  | -                       | 6.80               | 16.48                        |
| 9 <sup>หลัง</sup>  | 19.23±0.00 | 20.93±0.01        | 4.17±0.03  | -                       | 6.80               | 37.06                        |
| 12 <sup>ก่อน</sup> | 30.78±0.04 | 11.73±0.00        | 2.20±0.00  | 5.02±0.02               | 9.32               | 37.06                        |
| 12 <sup>หลัง</sup> | 30.78±0.01 | 18.19±0.00        | 2.37±0.02  | 4.97±0.04               | 9.32               | 38.17                        |
| 15                 | 29.35±0.07 | 14.62±0.00        | 1.05±0.00  | 4.92±0.02               | 5.83               | 25.42                        |
| 18                 | 24.87±0.00 | 11.57±0.01        | 1.04±0.00  | 4.46±0.00               | 3.04               | 13.30                        |
| 21                 | 20.73±0.02 | 10.83±0.00        | 1.04±0.00  | 4.21±0.00               | 2.33               | 8.38                         |
| 24                 | 17.88±0.00 | 9.99±0.00         | 1.04±0.00  | 4.13±0.00               | 0.71               | 3.66                         |



รูปที่ 25 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรีย ที่ชั่วโมงที่ 9 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนต เท่ากับ 60 : 5 ที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ

จากผลการศึกษาการเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 9 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 5 ที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 25 พบว่าความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ณ ชั่วโมงที่ 3-12 สัมพันธ์กับความเข้มข้นของ P(3HB) โดยความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) มีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 30.78 กรัมต่อลิตร และ 9.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 38.17 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มลดลงอย่างช้าๆ และปริมาณ P(3HB) ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลและยูเรียลดลงสัมพันธ์กับการเจริญและการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ โดยมีค่าคงที่หลังชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ

ซึ่งพบว่าพอลิเมอร์ที่ผลิตได้นั้นพบเฉพาะโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) โดยไม่พบการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV อีกทั้งปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนตยังถูกใช้ไปในปริมาณเล็กน้อย ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการเติมสารอาหารใหม่ในขั้นที่สองซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและโซเดียมโพรพิโอเนตใน ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงเป็นช่วงเวลาในการเติมที่เข้าไป เนื่องจากจุลินทรีย์อาจนำกากน้ำตาลเริ่มต้นที่มีอยู่ในถังหมักและจากการเติมในช่วงที่หนึ่งไปสร้างเป็นโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) โดยส่วนใหญ่หรือเกือบทั้งหมด จึงทำให้ไม่มีการสังเคราะห์หรือมีการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การเติมสารอาหารใหม่ในช่วงที่สอง ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงนั้น จึงยังไม่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV

Du และคณะ (2001) ได้ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จากกลูโคสและกรดโพรพิโอโนนิก โดย *R. eutropha* ได้แปรช่วงเวลาในการเติมอาหารใหม่ในช่วงเริ่มการเจริญ (early growth phase) ระยะกลางการเจริญ (mid-phase) และระยะปลายการเจริญ (late phase) พบว่าการเติมกรดโพรพิโอโนนิกในช่วงระยะกลางการเจริญ ให้ความเข้มข้นของ PHBV สูงกว่าการเติมในช่วงเวลาอื่นๆ เพราะการเติมกรดโพรพิโอโนนิกเร็วเกินไปในช่วงเริ่มการเจริญ อาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ หรือหากเติมช้าเกินไปในช่วงระยะปลายการเจริญ โดยเติมในชั่วโมงที่ 25 จากการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 55 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์มีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) อยู่แล้วในปริมาณมาก ซึ่งทำให้ความสามารถในการใช้กรดโพรพิโอโนนิกเพื่อสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HV ลดลง จึงทำให้ไม่พบการสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HV หรือพบได้ในปริมาณต่ำ เช่นเดียวกับวิยะนันท์ เมื่องเก่า (2553) ที่แปรช่วงเวลาในการเติมแหล่งคาร์บอนผสม ณ ชั่วโมงที่ 3 6 และ 9 ซึ่งพบว่าการเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยน้ำอ้อยและโซเดียมโพรพิโอเนตในอัตราส่วนน้ำตาล 9 กรัมต่อลิตร และโซเดียมโพรพิโอเนต 4.5 กรัม

ต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอยู่ในช่วงกลางของระยะการเจริญแบบคงที่ ได้รับความเข้มข้นของ PHBV เท่ากับ 4.67 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHBV เท่ากับ 23.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และสัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 17 โมลเปอร์เซ็นต์ ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

ดังนั้นจึงเลือกการเติมสารอาหารใหม่ในขั้นแรกเป็นชั่วโมงที่ 6 และเติมสารอาหารใหม่ในขั้นที่สองเป็นชั่วโมงที่ 9 ซึ่งเร็วขึ้นจากการเติมในรูปแบบเดิม ซึ่งคาดว่าจะอาจทำให้จุลินทรีย์มีการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ขึ้นได้

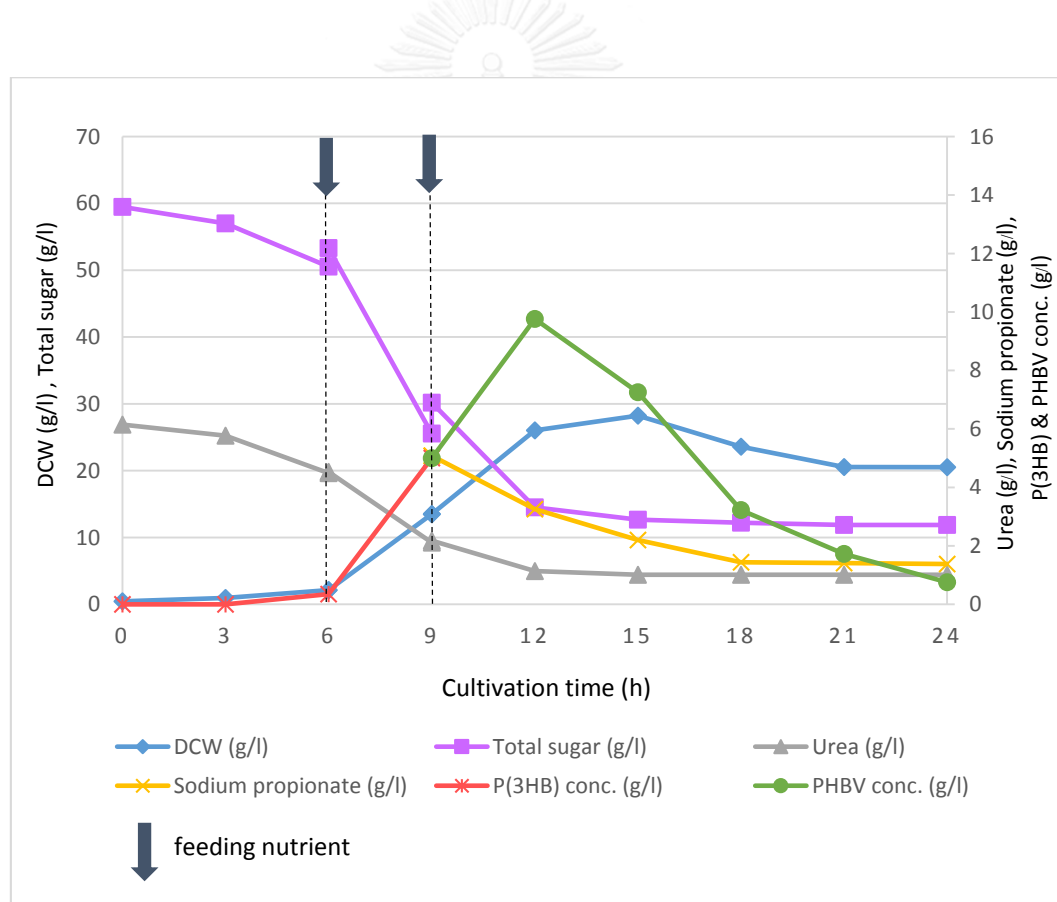




ตารางที่ 18 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม-โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 5 ที่ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

| Time (h)          | DCW (g/l)  | Total sugar (g/l) | Urea (g/l) | Sodium propionate (g/l) | PHA conc. (g/l) |      |
|-------------------|------------|-------------------|------------|-------------------------|-----------------|------|
|                   |            |                   |            |                         | P(3HB)          | PHBV |
| 0                 | 0.44±0.00  | 59.47±0.05        | 6.15±0.00  | -                       | 0.00            | -    |
| 3                 | 0.94±0.00  | 57.00±0.02        | 5.77±0.00  | -                       | 0.00            | -    |
| 6 <sup>ก่อน</sup> | 2.13±0.02  | 50.53±0.00        | 4.49±0.00  | -                       | 0.35            | -    |
| 6 <sup>หลัง</sup> | 2.13±0.02  | 53.32±0.01        | 4.53±0.02  | -                       | 0.35            | -    |
| 9 <sup>ก่อน</sup> | 13.50±0.06 | 25.56±0.00        | 2.11±0.02  | -                       | 5.00            | -    |
| 9 <sup>หลัง</sup> | 13.50±0.06 | 30.18±0.00        | 2.18±0.03  | 5.08±0.01               | 5.00            | -    |
| 12                | 26.02±0.01 | 14.51±0.00        | 1.14±0.01  | 5.08±0.03               | -               | 9.76 |
| 15                | 28.23±0.05 | 12.67±0.00        | 1.01±0.02  | 3.26±0.00               | -               | 7.25 |
| 18                | 23.58±0.04 | 12.20±0.00        | 1.01±0.03  | 2.20±0.00               | -               | 3.22 |
| 21                | 20.56±0.01 | 11.88±0.00        | 1.01±0.03  | 1.44±0.00               | -               | 1.72 |
| 24                | 20.52±0.00 | 11.88±0.00        | 1.01±0.00  | 1.41±0.00               | -               | 0.75 |

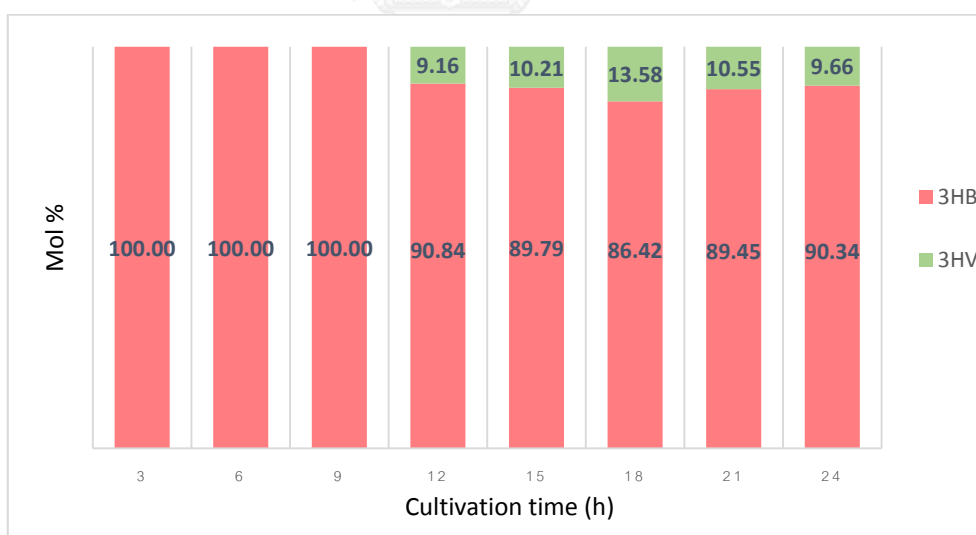
จากผลการศึกษาการเปลี่ยนช่วงเวลาในการเติมสารอาหารใหม่ โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรีย ที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 ต่อ 5 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 18 และรูปที่ 26 พบว่าความเข้มข้นของ เซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ณ ชั่วโมงที่ 6-15 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 28.23 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 15 ของ การเลี้ยงเชื้อ และในชั่วโมงที่ 3-9 พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้เป็นชนิด P(3HB) และหลังจากการเติม แหล่งคาร์บอนผสม ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ พบการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ซึ่งมี ค่าสูงสุดเท่ากับ 9.76 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์เริ่ม ลดลงอย่างช้าๆ และปริมาณ PHBV ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังชั่วโมงที่ 15 และ 12 ตามลำดับ จนถึง ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลและยูเรียลดลงสัมพันธ์กับการเจริญและปริมาณโพรพิ โอเนตลดลงจนมีค่าคงที่หลังชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 26 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 และเติม แหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 5 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 19 สัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 5 ที่ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

| Time (h) | Monomer fraction (mole %) |       |
|----------|---------------------------|-------|
|          | 3HB                       | 3HV   |
| 0        | -                         | -     |
| 3        | 100.00                    | 0.00  |
| 6        | 100.00                    | 0.00  |
| 9        | 100.00                    | 0.00  |
| 12       | 90.84                     | 9.16  |
| 15       | 89.79                     | 10.21 |
| 18       | 86.42                     | 13.58 |
| 21       | 89.45                     | 10.55 |
| 24       | 90.34                     | 9.66  |



รูปที่ 27 สัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 5 ที่ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

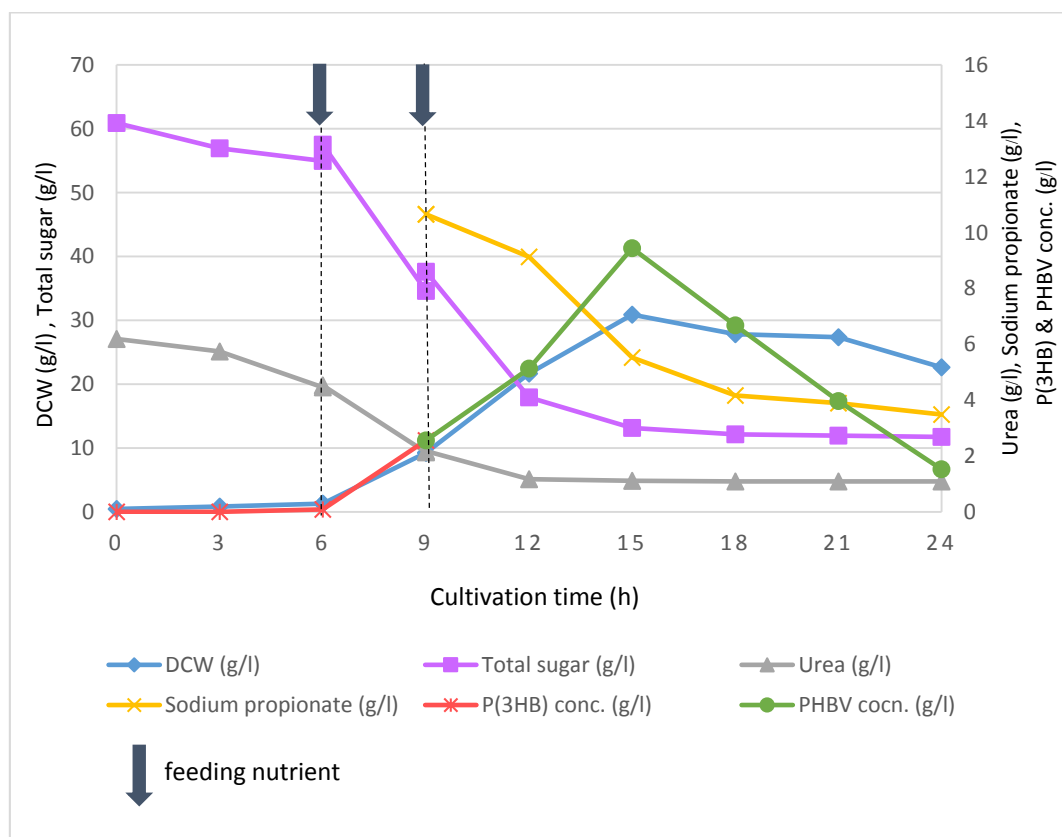
สัดส่วนมोनอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 ต่อ 5 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 19 และรูปที่ 27 พบว่าชั่วโมงที่ 3-9 พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ คือ P(3HB) และหลังจากการเติมแหล่งคาร์บอนผสมในชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ เซลล์เริ่มมีการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ในชั่วโมงที่ 12 โดยมีสัดส่วนมोनอเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้นจาก 9.16 โมลเปอร์เซ็นต์ เป็น 15.58 โมลเปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นค่าสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นสัดส่วนมोनอเมอร์ของ 3HV เริ่มลดลงอย่างช้าๆจนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ



ตารางที่ 20 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม-โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 10 ที่ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

| Time (h)          | DCW (g/l)  | Total sugar (g/l) | Urea (g/l) | Sodium propionate (g/l) | PHA conc. (g/l) |      |
|-------------------|------------|-------------------|------------|-------------------------|-----------------|------|
|                   |            |                   |            |                         | P(3HB)          | PHBV |
| 0                 | 0.46±0.01  | 60.89±0.00        | 6.19±0.00  | -                       | 0.00            | -    |
| 3                 | 0.83±0.01  | 56.95±0.01        | 5.74±0.01  | -                       | 0.00            | -    |
| 6 <sup>ก่อน</sup> | 1.28±0.00  | 54.95±0.01        | 4.46±0.04  | -                       | 0.08            | -    |
| 6 <sup>หลัง</sup> | 1.28±0.00  | 57.53±0.01        | 4.53±0.03  | -                       | 0.08            | -    |
| 9 <sup>ก่อน</sup> | 9.25±0.02  | 34.60±0.00        | 2.13±0.00  | -                       | 2.56            | -    |
| 9 <sup>หลัง</sup> | 9.25±0.02  | 37.60±0.00        | 2.18±0.00  | 10.65±0.04              | 2.56            | -    |
| 12                | 21.67±0.02 | 17.93±0.00        | 1.17±0.03  | 9.13±0.02               | -               | 5.13 |
| 15                | 30.88±0.09 | 13.15±0.00        | 1.11±0.04  | 5.52±0.00               | -               | 9.44 |
| 18                | 27.83±0.02 | 12.15±0.00        | 1.09±0.04  | 4.17±0.03               | -               | 6.68 |
| 21                | 27.37±0.03 | 11.94±0.00        | 1.09±0.00  | 3.89±0.02               | -               | 3.97 |
| 24                | 22.65±0.09 | 11.73±0.00        | 1.09±0.00  | 3.49±0.01               | -               | 1.52 |

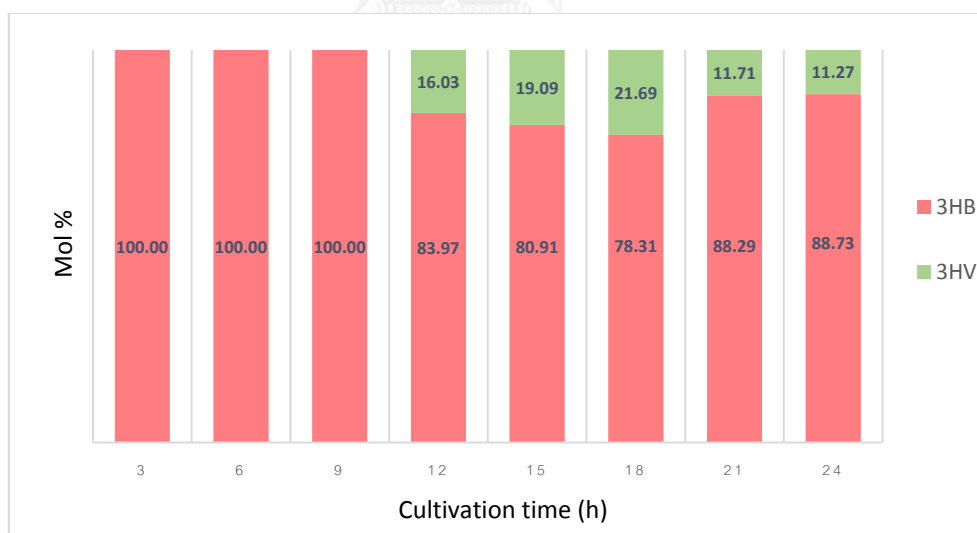
จากผลการศึกษาการเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 ต่อ 10 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 20 และรูปที่ 28 พบว่าความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ณ ชั่วโมงที่ 6-15 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 30.88 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ และในชั่วโมงที่ 3-9 พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้เป็นชนิด P(3HB) และหลังจากการเติมแหล่งคาร์บอนผสม ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ พบการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 9.44 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มลดลงอย่างช้าๆ และปริมาณ PHBV ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังชั่วโมงที่ 15 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลและยูเรียลดลงสัมพันธ์กับการเจริญและปริมาณโพรพิโอเนตลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 28 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 10 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 21 สัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 10 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

| Time<br>(h) | Monomer fraction (mole %) |       |
|-------------|---------------------------|-------|
|             | 3HB                       | 3HV   |
| 0           | -                         | -     |
| 3           | 100.00                    | 0.00  |
| 6           | 100.00                    | 0.00  |
| 9           | 100.00                    | 0.00  |
| 12          | 83.97                     | 16.03 |
| 15          | 80.91                     | 19.09 |
| 18          | 78.31                     | 21.69 |
| 21          | 88.29                     | 11.71 |
| 24          | 88.73                     | 11.27 |



รูปที่ 29 สัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 10 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

สัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 ต่อ 10 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 21 และรูปที่ 29 พบว่าชั่วโมงที่ 3-9 พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ คือ P(3HB) และหลังจากการเติมแหล่งคาร์บอนผสมในชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ เซลล์เริ่มมีการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ในชั่วโมงที่ 12 โดยมีสัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้นจาก 16.03 โมลเปอร์เซ็นต์ เป็น 21.69 โมลเปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นค่าสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV เริ่มลดลงอย่างช้าๆจนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ

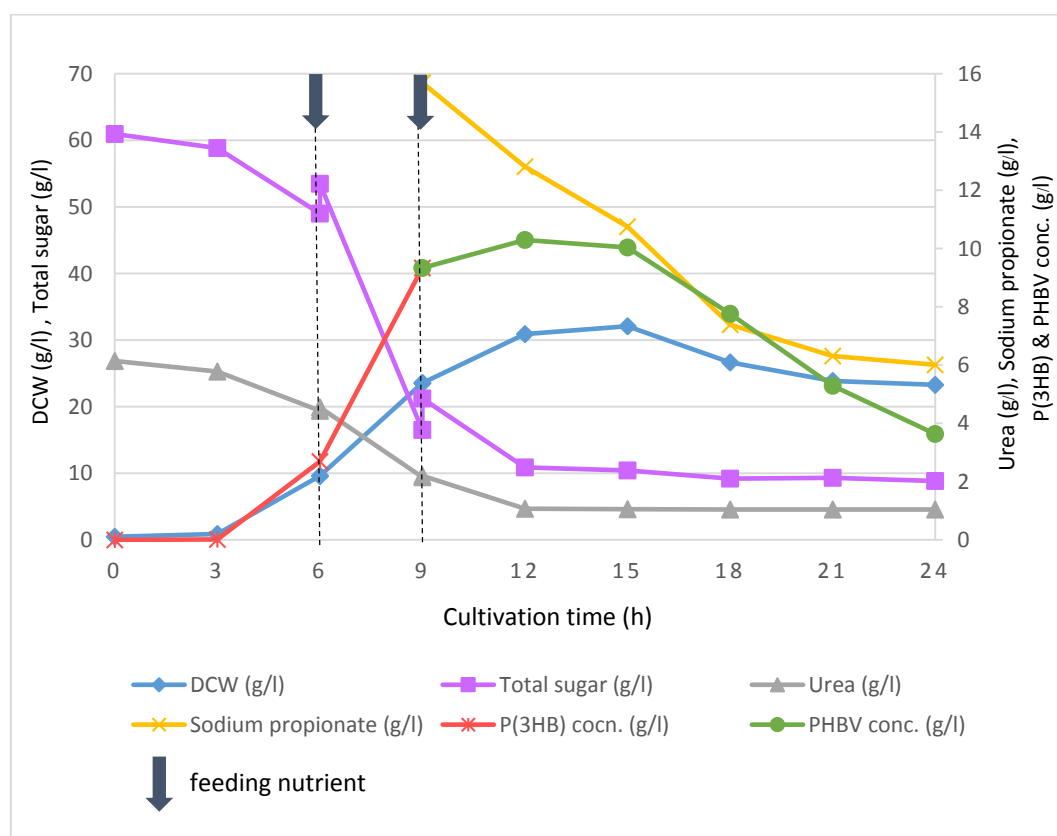




ตารางที่ 22 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม-โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 15 ที่ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

| Time (h)          | DCW (g/l)  | Total sugar (g/l) | Urea (g/l) | Sodium propionate (g/l) | PHA conc. (g/l) |       |
|-------------------|------------|-------------------|------------|-------------------------|-----------------|-------|
|                   |            |                   |            |                         | P(3HB)          | PHBV  |
| 0                 | 0.46±0.00  | 60.94±0.01        | 6.14±0.00  | -                       | 0.00            | -     |
| 3                 | 0.88±0.01  | 58.84±0.02        | 5.78±0.04  | -                       | 0.01            | -     |
| 6 <sup>ก่อน</sup> | 9.60±0.00  | 49.01±0.03        | 4.43±0.05  | -                       | 2.69            | -     |
| 6 <sup>หลัง</sup> | 9.60±0.00  | 53.48±0.01        | 4.55±0.06  | -                       | 2.69            | -     |
| 9 <sup>ก่อน</sup> | 23.56±0.01 | 16.51±0.01        | 2.15±0.04  | -                       | 9.33            | -     |
| 9 <sup>หลัง</sup> | 23.56±0.01 | 21.24±0.00        | 2.20±0.00  | 15.69±0.03              | 9.33            | -     |
| 12                | 30.90±0.01 | 10.88±0.00        | 1.07±0.02  | 12.81±0.03              | -               | 10.29 |
| 15                | 32.08±0.01 | 10.41±0.00        | 1.05±0.01  | 10.75±0.00              | -               | 10.04 |
| 18                | 26.65±0.00 | 9.20±0.00         | 1.04±0.01  | 7.39±0.00               | -               | 7.76  |
| 21                | 23.87±0.01 | 9.31±0.00         | 1.04±0.00  | 6.34±0.00               | -               | 5.29  |
| 24                | 23.30±0.00 | 8.83±0.00         | 1.04±0.00  | 6.01±0.00               | -               | 3.63  |

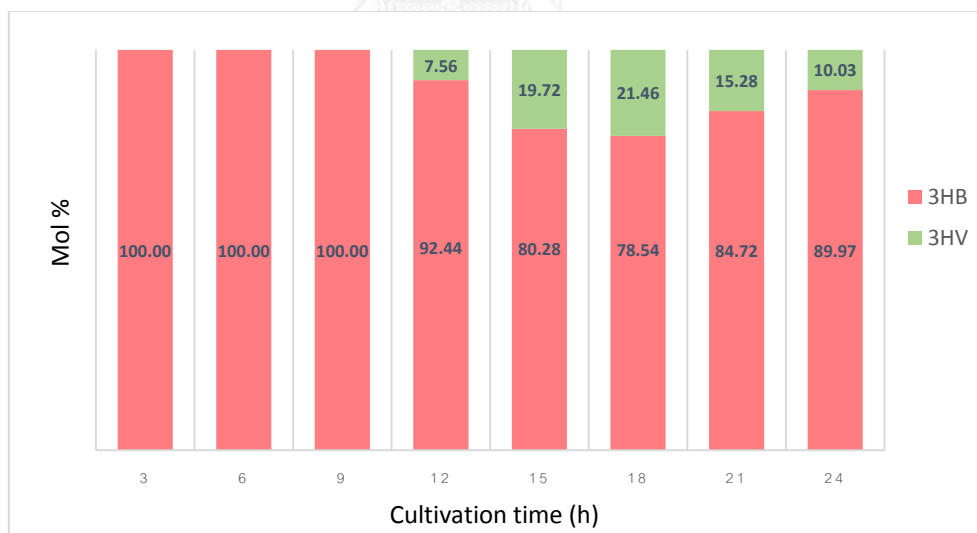
จากผลการศึกษาการเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 ต่อ 15 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 22 และรูปที่ 30 พบว่าความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ณ ชั่วโมงที่ 3-15 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 32.08 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ และในชั่วโมงที่ 3-9 พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้เป็นชนิด P(3HB) และหลังจากการเติมแหล่งคาร์บอนผสม ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ พบการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 10.29 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นความเข้มข้นของเซลล์เริ่มลดลงอย่างช้าๆ และปริมาณ PHBV ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังชั่วโมงที่ 15 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลและยูเรียลดลงสัมพันธ์กับการเจริญและปริมาณโพรพิโอเนตลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 30 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 15 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 23 สัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 15 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

| Time<br>(h) | Monomer fraction (mol%) |       |
|-------------|-------------------------|-------|
|             | 3HB                     | 3HV   |
| 0           | -                       | -     |
| 3           | 100.00                  | 0.00  |
| 6           | 100.00                  | 0.00  |
| 9           | 100.00                  | 0.00  |
| 12          | 92.44                   | 7.56  |
| 15          | 80.28                   | 19.72 |
| 18          | 78.54                   | 21.46 |
| 21          | 84.72                   | 15.28 |
| 24          | 89.97                   | 10.03 |



รูปที่ 31 สัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 : 15 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ

สัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหาร MSM ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติมกากน้ำตาลและยูเรียที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 ต่อ 15 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 23 และรูปที่ 31 พบว่าชั่วโมงที่ 3-9 พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ คือ P(3HB) และหลังจากการเติมแหล่งคาร์บอนผสมในชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ เซลล์เริ่มมีการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ในชั่วโมงที่ 12 โดยมีสัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้นจาก 7.56 โมลเปอร์เซ็นต์ เป็น 21.46 โมลเปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นค่าสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV เริ่มลดลงอย่างช้าๆจนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ

ซึ่งเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ PHBV และสัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV ของทั้งอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตทั้ง 3 อัตราส่วนที่ศึกษา พบว่าการใช้อัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 ต่อ 5 ส่งผลให้มีค่าความเข้มข้นของ PHBV และสัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV ต่ำกว่าที่อัตรา 60 ต่อ 10 และ 60 ต่อ 15 ซึ่งทั้งสองอัตราส่วนนี้มีค่าความเข้มข้นของ PHBV 3HV ที่ใกล้เคียงกัน คือ 9.44 กรัมต่อลิตร และ 10.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีสัดส่วนมอนอเมอร์ที่ใกล้เคียงกัน คือ 21.69 โมลเปอร์เซ็นต์และ 21.46 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มอัตราส่วนน้ำตาลรวมต่อโซเดียมโพรพิโอเนตจาก 60 ต่อ 10 เป็น 60 ต่อ 15 ทำให้ได้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในปริมาณเพียงเล็กน้อยและมีสัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV ที่ใกล้เคียงกัน อีกทั้งที่อัตราส่วน 60 ต่อ 15 ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนตที่เหลือ ณ ชั่วโมงที่ 24 ยังพบสูงกว่าที่อัตราส่วน 60 ต่อ 10 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วน 60 ต่อ 10 เซลล์สามารถนำโซเดียมโพรพิโอเนตไปใช้ได้มีประสิทธิภาพกว่า ดังนั้น ในการทดลองครั้งนี้ อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและโซเดียมโพรพิโอเนตในอัตราส่วน 60 ต่อ 10 จึงมีความเหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV โดยสัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนตที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu และคณะ (2009) ที่ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* โดยใช้โซเดียมโพรพิโอเนตได้พบว่ามอนอเมอร์ของ 3HV เพิ่มขึ้นจาก 5.6-14.3 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนตเพิ่มขึ้นจาก 0.5-1.5 กรัมต่อลิตร

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จาก *B. megaterium* P12 โดยการเลี้ยงเชื้อแบบเฟด-แบตช์สองขั้นตอน ใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเป็นหลัก รองลงมาคือ ฟรักโทส และกลูโคส และธาตุอาหารอื่นๆที่ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ โดยกากน้ำตาลจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย เนื่องจากน้ำตาลผลิตได้จากอ้อยซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สามารถเพาะปลูกได้ดีในประเทศไทย การเลี้ยงเชื้อแบบเฟด-แบตช์สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์และผลผลิตให้สูงขึ้นได้ เนื่องจากมีการเติมสารอาหารใหม่เข้าสู่ระบบ โดยในงานวิจัยนี้พัฒนาการเลี้ยง *B. megaterium* P12 แบบเฟด-แบตช์สองขั้นตอน ซึ่งในขั้นตอนแรกมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้น P(3HB) ให้สูงขึ้นโดยการเติมกากน้ำตาลและยูเรีย และในขั้นที่สองเป็นการเติมสารอาหารใหม่ที่เป็นแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HB (carbon generating 3HB monomer) และไซเตียมโพรพิโอเนตเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HV (carbon generating 3HV monomer) เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ขึ้น โดยมีการศึกษาช่วงเวลาในการเติม และอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PHBV และสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV เป็นสัดส่วนที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้งานตามความต้องการ

## 1. การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) โดย *B. megaterium* P-12

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์เนื่องจากความเข้มข้นที่สูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ได้ งานวิจัยในชั้นนี้ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB) พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB) เนื่องจากเซลล์สามารถนำน้ำตาลในกากน้ำตาลไปใช้ในการเจริญและสังเคราะห์ P(3HB) ได้ดีกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นอื่นๆ โดยได้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 27.52 และ 5.04 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยงานวิจัยนี้เลือกใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้าที่เลือกใช้ใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้น้ำอ้อยและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์และการสร้างผลิตภัณฑ์ได้ดีเนื่องจากในกากน้ำตาลและน้ำอ้อยมีองค์ประกอบของธาตุอาหารอื่นๆที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งไม่พบในน้ำตาลทรายบริสุทธิ์ จึงทำให้เซลล์สามารถเจริญในแหล่งคาร์บอนดังกล่าวได้ดี แต่อย่างไรก็ตามกากน้ำตาลจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกกว่าและเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล ซึ่งถือว่ามีความคุ้มค่ามากกว่าการใช้น้ำอ้อย เนื่องจากการใช้น้ำอ้อยอาจมีข้อจำกัดในด้านการแข่งขันกับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ

## 2. การศึกษาช่วงเวลาในการเติมแหล่งคาร์บอนในขั้นที่หนึ่ง ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) โดย *B. megaterium* P-12

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) โดยการเติมสารอาหารใหม่ลงไปจนถึงหมัก ณ ชั่วโมงต่างกัน ซึ่งการเติมสารอาหารใหม่สามารถลดข้อจำกัดเรื่องความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่มากเกินไปที่จะยับยั้งการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของเซลล์

จากการศึกษาการแปรช่วงเวลาในการเติมสารอาหารใหม่ในขั้นตอนแรกเป็น 6 7.5 และ 9 ชั่วโมง พบว่าค่าความเข้มข้นของเซลล์ ความเข้มข้นของ P(3HB) เพิ่มขึ้นตามชั่วโมงในการเติมอาหารใหม่ การเติมสารอาหารใหม่ ณ ชั่วโมงที่ 9 ส่งผลให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ ความเข้มข้นของ P(3HB) สูงที่สุด โดยได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 34.99 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 9.09 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเติมที่ชั่วโมงก่อนหน้า คือ ที่ชั่วโมงที่ 6 และชั่วโมงที่ 7.5 สารอาหารเติมในถังหมักยังคงมีปริมาณเพียงพอต่อการเจริญอยู่ อีกทั้งความเข้มข้นของเซลล์ ณ ชั่วโมงดังกล่าวยังคงมีน้อย การเติมสารอาหารใหม่ ณ ชั่วโมงดังกล่าวจึงส่งเสริมการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ไม่มากนัก แต่การเติมสารอาหารใหม่ ณ ชั่วโมงที่ 9 ซึ่งอยู่ในช่วงที่เซลล์กำลังเจริญ

สูงสุด ทำให้เซลล์สามารถนำอาหารไปใช้ได้อย่างทันทีและมีประสิทธิภาพ ทำให้ได้ค่าความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) สูงกว่าการเติมอาหารใหม่ ณ เวลาที่ 6 และ 7.5 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การเติมน้ำตาลที่มีน้ำตาลรวมความเข้มข้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ลงไปในถังหมัก ณ ชั่วโมงต่างๆกัน ส่งผลให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) เพิ่มขึ้นในปริมาณที่ยังไม่สูงมากนัก เนื่องจากความเข้มข้นน้ำตาลรวม 60 กรัมต่อลิตรที่เติมลงไปในน้ำหมักปริมาตร 3 ลิตร ทำให้เกิดการเจือจางและความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงส่งผลให้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) เพิ่มขึ้นในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งหากมีการศึกษาวิจัยต่อเนื่อง อาจมีการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลที่เติมให้สูงขึ้น เพื่อให้สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) ให้สูงขึ้นอีก อีกทั้งอาจมีการแบ่งการเติมสารอาหารใหม่ให้ถี่ขึ้น เพื่อศึกษาผลของรูปแบบการเติมสารอาหารต่อการเจริญของเซลล์และการสร้างผลิตภัณฑ์ด้วย

### 3. การศึกษาอัตราส่วนความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนผสมที่เติมในขั้นที่สองที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดย *B. megaterium* P-12

การเติมสารอาหารใหม่ในขั้นที่สอง มีวัตถุประสงค์เพื่อให้มีการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV โดยการเติมสารอาหารใหม่ที่เป็นแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและโซเดียมโพธิโอเนต Loo และ Sudesh (2007) ได้รายงานแหล่งคาร์บอนในรูปเกลือของกรดอินทรีย์ เช่น โซเดียมโพธิโอเนต มีความเป็นพิษน้อยกว่าแหล่งคาร์บอนที่อยู่ในรูปกรด เช่น กรดโพธิโอเนต เพราะสารประกอบในรูปเกลือจะช่วยลดการเกิดโปรตอนอิสระ (H<sup>+</sup>) ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ ทำให้ไม่มีการสะสมของกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วยรักษาระดับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้

ผลการทดลองการเติมสารอาหารใหม่ขั้นที่หนึ่ง ณ ชั่วโมงที่ 9 และการเติมสารอาหารใหม่ในขั้นที่สอง ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ไม่พบการสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ PHBV พบเพียงการสังเคราะห์โฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการเติมอาหารใหม่ในขั้นที่สอง ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อเป็นช่วงเวลาที่เข้าไปในการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV จึงทำให้เซลล์มีการสังเคราะห์โฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) เพียงอย่างเดียว และอาจเนื่องจากในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ เซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะอัตราการเจริญคงที่ (stationary phase) และระยะเซลล์ตาย (death phase) เซลล์จึงไม่สามารถนำโซเดียมโพธิโอเนตไปใช้เพื่อการสังเคราะห์หมอนอเมอร์ 3HV

ดังนั้น จึงเปลี่ยนเวลาการเติมสารอาหารใหม่ในขั้นตอนที่หนึ่ง จาก ณ ชั่วโมงที่ 9 เป็นชั่วโมงที่ 6 และเติมสารอาหารใหม่ในขั้นตอนที่สองเป็น ชั่วโมงที่ 9 จากเดิมเดิมที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งอยู่ในช่วงกลางของระยะการเจริญคงที่ จึงทำให้เซลล์สามารถสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV ได้ ซึ่งพบว่าที่อัตราส่วนกากน้ำตาลและโซเดียมโพรพิโอเนตเท่ากับ 60 ต่อ 10 ทำให้ได้ความเข้มข้นของ PHBV และสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV ในปริมาณที่เหมาะสมเท่ากับ 9.44 กรัมต่อลิตร และ 21.69 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งได้ความเข้มข้นของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้มีค่าสูงกว่า วิยะนันท์เมืองเก่า (2553) ที่ศึกษาการผลิต PHBV โดยการเลี้ยง *B. megaterium* P12 แบบสองระยะในถังหมัก โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำอ้อยและโซเดียมโพรพิโอเนต พบว่าได้ความเข้มข้นของ PHBV สูงสุดเท่ากับ 4.67 กรัมต่อลิตร มีสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV เท่ากับ 17 โมลเปอร์เซ็นต์

โดยโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้มีค่าสัดส่วนโมลเปอร์เซ็นต์ของมอนอเมอร์ 3HV อยู่ระหว่าง 13.58-21.69 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม สอดคล้องกับ Sudesh และคณะ (2000) ที่รายงานว่าโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีสัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV ในช่วง 20-30 โมลเปอร์เซ็นต์ มีสมบัติที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้มากที่สุด เนื่องจากสามารถนำไปขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มที่มีความยืดหยุ่นได้ Ariffin และคณะ (2011) รายงานว่า Imperial Chemical Industries (ICI) มีการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่สัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV มีค่าไม่เกิน 30 โมลเปอร์เซ็นต์เพื่อนำไปใช้งานในระดับอุตสาหกรรม การเปรียบเทียบการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ ได้แสดงในตารางที่ 24



ตารางที่ 24 เปรียบเทียบการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV สัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV โดยใช้จุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอน และวิธีการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน

| จุลินทรีย์                        | 3HB-3HV generating carbon source         | culture mode           | DCW (g/l) | PHBV conc. (g/l) | PHBV content (% DCW) | monomer 3HV (mole%) | references                   |
|-----------------------------------|--|------------------------|-----------|------------------|----------------------|---------------------|------------------------------|
| <i>B. megaterium</i> P-12         | sugarcane molasses/<br>sodium propionate | 2 step<br>fed-batch    | 30.88     | 9.44             | 30.56                | 21.67               | งานวิจัยนี้                  |
| <i>B. megaterium</i> P-12         | sugarcane liquor/<br>sodium propionate   | batch                  | 2.93      | 0.71             | 24.42                | 18                  | วันกุลต ชนะสิทธิ์,<br>2553   |
| <i>B. megaterium</i> P-12         | sugarcane liquor/<br>sodium propionate   | 2 phase<br>cultivation | 20.31     | 4.67             | 23.01                | 17                  | วิษณุภัท เมืองเก่า,<br>2554  |
| <i>R. eutropha</i><br>recombinant | glucose/ propionic acid                  | fed-batch              | 52.10     | 40.80            | 73.80                | 16.2                | Du และคณะ, 2001              |
| <i>C. glutamicum</i>              | glucose/ propionate                      | fed-batch              | 15.4      | 6.0              | 47.2                 | 28                  | Matsumoto และ<br>คณะ, 2001   |
| recombinant <i>E. coli</i>        | glucose/ propionic acid                  | fed-batch              | 141.90    | 88.10            | 62.10                | 15.3                | Choi และ Lee,<br>1999        |
| <i>B. megaterium</i> BA-019       | cane sugar/ sodium<br>valerate           | fed-batch              | 13.16     | 1.84             | 14.03                | 44                  | กิตติพงษ์ ปวงราษฎร์,<br>2545 |
| <i>Ralstonia</i> sp. Strain JC-64 | cottonseed oil/<br>valeric acid          | batch                  | 4.45      | 3.16             | 71                   | 62                  | Song และคณะ,<br>2001         |

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV จาก *B. megaterium* P-12 โดยใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกร่วมกับโซเดียมโพรพิโอเนต เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนผสมในการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV โดยการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ แบ่งการเติมอาหารใหม่เป็น 2 ขั้นตอน ในขั้นตอนแรกเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ และในขั้นที่สองเพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ PHBV โดยรูปแบบการเติมอาหารแบบ 2 ขั้นตอนนี้ทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของ PHBV ในปริมาณที่สูงขึ้น เนื่องจากได้เซลล์ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจากการเติมอาหารทั้งในขั้นตอนที่หนึ่งและขั้นตอนที่สอง ช่วงเวลาในการเติมแหล่งคาร์บอนผสมในงานวิจัยยังมีข้อจำกัดในเรื่องช่วงเวลาที่ได้จากการศึกษาอาจยังไม่เหมาะสมนัก ซึ่งหากมีการศึกษาวิจัยต่อเนื่องให้ช่วงเวลาในการเติมสารอาหารมีความเหมาะสมมากขึ้น อาจทำให้เพิ่มปริมาณความเข้มข้นของโคพอลิเมอร์ PHBV ให้สูงขึ้นได้อีก แต่อย่างไรก็ดีงานศึกษาวิจัยนี้สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้อยู่ในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ และมีสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV อยู่ในระดับที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม รวมทั้งงานวิจัยนี้ใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก หาได้ง่ายในประเทศไทย แบบที่เรียสามารถใช้ในการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ได้ดี จึงทำให้เป็นส่วนหนึ่งในการช่วยลดต้นทุนการผลิตด้วย

## รายการอ้างอิง

- Ariffin, N., R. Abdullah, Rashdan M. M., J. Lourdes, N. A. Emran, M. R. Ismail, I. Ismail, M. F. M. Fadzil, K. L. Ling, Y. Siddiqui, A. A. Amir, Z. Berahim and O. M. Husni (2011). "Constructions of expression vectors of polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) and transient expression of transgenes in immature oil palm embryos." Plasmid 66(3): 136-143.
- Artham, T. and M. Doble (2008). "Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Polycarbonates." Macromolecular Bioscience 8(1): 14-24.
- Ashby, R. D., D. K. Y. Solaiman, G. D. Strahan, C. Zhu, R. C. Tappel and C. T. Nomura (2012). "Glycerine and levulinic acid: Renewable co-substrates for the fermentative synthesis of short-chain poly (hydroxyalkanoate) biopolymers." Bioresource Technology 118: 272-280.
- Bernard, M. (2014). "Industrial Potential of Polyhydroxyalkanoate Bioplastic: A Brief Review." University of Saskatchewan Undergraduate Research Journal 1(1): 1-14.
- Brandl, H., R. A. Gross, R. Lenz, W., and R. C. Fuller (1990). Plastics from bacteria and for bacteria: Poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. Microbial Bioproducts, Springer Berlin Heidelberg. 41: 77-93.
- Contreras, A. R., Koller, M., Dias, M. M. S., Monfort, M. C., Braunegg, G. and Calvo, M. S. M. (2013). "High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain." Journal of applied microbiology 114(5): 1378-1387.
- Chen, G. Q. (2010). Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. Plastics from Bacteria. G. G.-Q. Chen, Springer Berlin Heidelberg. 14: 17-37.
- Chen, L. J. and M. Wang (2002). "Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer." Biomaterials 23(13): 2631-2639.

- Cho, K. S., Ryu, H. W., Park, C. H. and Goodrich, P. R. (2001). "Utilization of swine wastewater as a feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD." Journal of Bioscience and Bioengineering 91(2): 129-133.
- Choi, J. I. and S. Y. Lee (1999). "High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*." Applied and environmental microbiology 65(10): 4363-4368.
- Comeau, Y., Hall, K.J., and Oldham, W.K. 1998. Determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and poly- $\beta$ -hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography. Apply Environmental Microbiology 54: 2325-2327.
- Cuellar, M. R. L., J. A. Flores, J. N. G. Rodríguez and F. P. Guevara (2011). "Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source." International journal of biological macromolecules 48(1): 74-80.
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K., 1986. "Nuclear magnetic resonance studies on poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) and a copolymer of  $\beta$ -hydroxybutyrate and  $\beta$ -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* h 16." Macromolecule, 19: 2860-2864.
- Du, G. C., J. Chen, J. Yu and S. Lun (2001). "Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*." Biochemical Engineering Journal 8(2): 103-110.
- Girdhar, A., M. Bhatia, S. Nagpal, A. Kanampalliwar and T. Tiwari (2013). "Process Parameters for Influencing Polyhydroxyalkanoate Producing Bacterial Factories: An Overview." Petroleum & Environmental Biotechnology 4(5): 1-8.
- Inoue, Y. and Yoshie, N. (1992). "Structure and physical properties of bacterially synthesized polyesters." Progress in Polymer Science 17(4): 571-610.

- Inoue, Y. (1998). "Solid-state structure and properties of bacterial copolyesters." Journal of Molecular Structure 441(2-3): 119-127.
- Kedia, G., Passanha, P., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J. and Esteves, S. R. (2014). "Evaluation of feeding regimes to enhance PHA production using acetic and butyric acids by a pure culture of *Cupriavidus necator*." Biotechnology and Bioprocess Engineering 19(6): 989-995.
- Keshavarz, T. and Roy, I. (2010). "Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda." Current Opinion in Microbiology 13(3): 321-326.
- Kanjanachumpol, P., Kulpreecha, S., Tolieng, V. and Thongchul, N. (2013). "Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019." Bioprocess and Biosystems Engineering 36(10): 1463-1474.
- Karbasi, F., Ardjmand, M., Yunesi, H., Kordi, S. A. and Yaghmaei, A. (2011). "Investigation of Optimum Fermentation Condition for PHA Production by Four Species: *Hydrogenophaga pseudoflava* DSMZ 1034, *Azohydromonas lata* DSMZ 1123, *Cupriavidus necator* DSMZ 545, *Azotobacter beijinckii* DSMZ 1041." World Applied Sciences Journal 14: 36-47.
- Khanna, S. and A. K. Srivastava (2005). "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates." Process Biochemistry 40(2): 607-619.
- Kim, G. J., I. Y. Lee, S. C. Yoon, Y. C. Shin and Y. H. Park (1997). "Enhanced yield and a high production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in a two-step fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* by combined use of glucose and octanoate." Enzyme and Microbial Technology 20(7): 500-505.
- Koller, M., Salerno, A., Muhr, A., Reiterer, A. and BrauneGG, G. (2012). "Polyhydroxyalkanoate: Biodegradable polymers and plastic from renewable resources" Materiali In Technologije 44: 23-30.

- Koller, M., Salerno, A., Reiterer, A., Malli, H., Malli, K., Kettl, K. H., Narodoslowsky, M., Schnitzer, H., Chiellini, E. and Braunegg, G. (2012). "Sugar cane as feedstock for biomediated polymer production." Sugarcane production, cultivation and uses. Nova Science Pub Inc, Hauppauge.
- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B. and Thongchul, N. (2009). "Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*." Journal of Bioscience and Bioengineering 107(3): 240-245.
- Kumar, N., Ravikumar, M. N.V., Domb, A. J. (2001). "Biodegradable block copolymers" Advanced Drug Delivery Reviews 53: 23-44.
- Lee, S. Y. (1996). "Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria." Trends in Biotechnology 14(11): 431-438.
- Lee, W. H., C. Y. Loo, C. T. Nomura and K. Sudesh (2008). "Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors." Bioresource Technology 99(15): 6844-6851.
- Liu, X. W., H. H. Wang, J. Y. Chen, X. T. Li and G. Q. Chen (2009). "Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli* harboring propionyl-CoA synthase gene (prpE) or propionate permease gene (prpP)." Biochemical Engineering Journal 43(1): 72-77.
- Loo, C. Y. and Sudesh, K. <sup>a</sup> (2007). "Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbial plastics and their properties." Malaysian Polymer Journal 2(2): 31-57.
- Loo, C. Y. and Sudesh, K. <sup>b</sup> (2007). "Biosynthesis and native granule characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans*" International Journal of Biological Macromolecules 40: 466-471.

- Naheed, N. and Jamil, N. (2014). "Optimization of biodegradable plastic production on sugar cane molasses in *Enterobacter* sp. SEL2." Brazilian Journal of Microbiology 45(2): 417-426.
- Maaloul, E. Z., I. Trabelsi, L. Elleuch, H. Chouayekh and R. B. Salah (2013). "Purification and characterization of two polyhydroxyalkanoates from *Bacillus cereus*." International journal of biological macromolecules 61: 82-88.
- Marangoni, C., A. Furigo and M. F. Gláucia (2002). "Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding." Process Biochemistry 38(2): 137-141.
- Matsumoto, K., K. Kitagawa, S. J. Jo, Y. Song and S. Taguchi (2011). "Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* using propionate as a precursor." Journal of Biotechnology 152(4): 144-146.
- Mohan, S. K. and T. Srivastava (2011). "Microbial deterioration and degradation of polymeric materials." Journal of Biochemical Technology 2(4): 210-215.
- Nath, A., Dixit, M., Bandiya, A., Chavda, S. and Desai, A. J. (2008) "Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24." Bioresource Technology 99: 5749–5755.
- Ojumu, T. V., J. Yu and B. O. Solomon (2004). "Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers." African Journal of Biotechnology 3(1): 18-24.
- Patwardhan, P. R. and A. K. Srivastava (2004). "Model-based fed-batch cultivation of *R. eutropha* for enhanced biopolymer production." Biochemical Engineering Journal 20(1): 21-28.
- Philip, S., T. Keshavarz and I. Roy (2007). "Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications." Journal of Chemical Technology and Biotechnology 82(3): 233-247.

- Poliakoff, M. and I. Noda (2004). "Plastic bags, sugar cane and advanced vibrational spectroscopy: taking Green Chemistry to the Third World." Green Chemistry 6: 37-38.
- Raj, R., T. Keshavarz, J. A. Roether, A. R. Boccaccini and I. Roy (2011). "Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future." Materials Science and Engineering: R: Reports 72(3): 29-47.
- Ramsay, B. A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P. and Ramsay, J. A. (1990). "Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids." Applied and environmental microbiology 56(7): 2093-2098.
- Ray, S., S., and M. Bousmina (2005). "Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world." Progress in Materials Science 50(8): 962-1079.
- Reddy, C. S. K., Ghai, R. and Kalia, V. C. (2003). "Polyhydroxyalkanoates: an overview." Bioresource Technology 87(2): 137-146.
- Reddy, M. M., Vivekanandhan, S., Misra, M., Bhatia, S. K. and Mohanty, A. K. (2013). " Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities." Progress in Polymer Science 38(10-11): 1653-1689.
- Rehm, B. H. A. (2003). "Polyester synthases: natural catalysts for plastics." Biochemical Journal 376( 1): 15-33.
- Rudnik, E. (2008). Chapter 2 - Compostable polymer materials — definitions, structures and methods of preparation. Compostable Polymer Materials. E. Rudnik. Amsterdam, Elsevier: 10-36.
- Sathiyarayanan, G., G. S. Kiran, J. Selvin and G. Saibaba (2013). "Optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus megaterium* MSBN04 under solid state culture." International journal of biological macromolecules 60(0): 253-261.



- Savenkova, L., Gercberga, Z., Bibers, I. and Kalnin, M. (2000). "Effect of 3-hydroxy valerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum*" Process Biochemistry 36: 445–450.
- Sayed, E., Azhar, A., Abdelhady, H. M., Hafez, A. M. A. and Khodair, T. A. (2009). "Batch Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Ralstonia eutropha* and *Alcaligenes latus* Using Bioreactor Different Culture Strategies." Journal of Applied Sciences Research 5(5): 556-564.
- Shah, A. A., F. Hasan, A. Hameed and S. Ahmed (2008). "Biological degradation of plastics: A comprehensive review." Biotechnology Advances 26(3): 246-265.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A. (2010) "Degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a newly isolated *Actinomadura* sp. AF-555, from soil" International Biodeterioration & Biodegradation 64: 281-285.
- Shang, L., Yim, S. C., Park, H. G. and Chang, H. N. (2004). "Sequential Feeding of Glucose and Valerate in a Fed-Batch Culture of *Ralstonia eutropha* for Production of Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with High 3-Hydroxyvalerate Fraction." Biotechnology Progress 20(1): 140-144.
- Shrivastav, A., H. Y. Kim and Y. R. Kim (2013). "Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system." BioMed research international.
- Sudesh, K., H. Abe and Y. Doi (2000). "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters." Progress in Polymer Science 25(10): 1503-1555.
- Sun, Z., Ramsay, J. A., Guay, M. and Ramsay, B. A. (2007). "Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440." Applied microbiology and biotechnology 74(1): 69-77.

- Suriyamongkol, P., R. Weselake, S. Narine, M. Moloney and S. Shah (2007). "Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants—a review." Biotechnology Advances 25(2): 148-175.
- Suwannasing, W., Imai, T. and Kaewkannetra, P. (2015). "Cost-effective defined medium for the production of polyhydroxyalkanoates using agricultural raw materials" Bioresource Technology 194: 67–74.
- Tan, G. Y. A., C. L. Chen, L. Li, L. Ge, L. Wang, I. M. N. Razaad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo and J. Y. Wang (2014). "Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review." Polymers 6(3): 706-754.
- Tanaka, T., M. Fujita, A. Takeuchi, Y. Suzuki, K. Uesugi, K. Ito, T. Fujisawa, Y. Doi and T. Iwata. (2006). "Formation of Highly Ordered Structure in Poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate] High-Strength Fibers." Macromolecules 39: 2940-2946.
- Tseng, H. C., C. L. Harwell, C. H. Martin and K. L. J. Prather (2010). "Biosynthesis of chiral 3-hydroxyvalerate from single propionate-unrelated carbon sources in metabolically engineered *E. coli*." Microbial cell factories 9(1): 96.
- Wang, B., Shivappa, R. R. S., Olson, J. W. and Khan, S. A. (2013). "Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice." Industrial Crops and Products 43(0): 802-811.
- Ward, P. G., G. D. Roo and E. Kevin, O. (2005). "Accumulation of polyhydroxyalkanoate from styrene and phenylacetic acid by *Pseudomonas putida* CA-3." Applied and environmental microbiology 71(4): 2046-2052.
- Waser, P., Rueping, M., Seebach, D., Duchardt, E. and Schwalbe, H. (2001). "On the Solution Structure of PHB: Preparation and NMR Analysis of Isotopically Labeled Oligo[(R)-3-hydroxybutanoic Acids] (OHBs)." Helvetica Chimica Acta 84(6): 1821-1845.

- Xu, J. and Guo, B. H. (2010). Microbial Succinic Acid, Its Polymer Poly(butylene succinate), and Applications. Plastics from Bacteria. G. G.-Q. Chen, Springer Berlin Heidelberg. 14: 347-388.
- Yang, Y. H., C. J. Brigham, E. Song, J. M. Jeon, C. K. Rha and A. J. Sinskey (2012). "Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) containing a predominant amount of 3-hydroxyvalerate by engineered *Escherichia coli* expressing propionate-CoA transferase." Journal of applied microbiology 113(4): 815-823.
- Zarei, M., S. A. Ataei and M. H. Fazaelpoor (2013). "Regulation of Metabolic Pathway of Polyhydroxyalkanoates Production Using Reducing Agents." World Applied Sciences Journal 21(2): 244-249.
- Zhang, Y. Z., G. M. Liu, W. Q. Weng, J. Y. Ding and S. J. Liu (2015). "Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose." Journal of Biotechnology 195: 82-88.
- กิติพงศ์ ปวรางกูร, 2545. การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ที่มีสัดส่วนโดยโมลของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตสูง โดย *Bacillus* sp. BA-019 ในถังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปวุติ กาญจนชุมพล, 2553. การขยายส่วนการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ในเฟดแบตช์ โดย *Bacillus megaterium* BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เลิศวรสิริกุล, อ. (2554). "พอลิแลกติกแอซิด : พอลิเอสเทอร์จากทรัพยากรที่สร้างทดแทนใหม่ได้." วิศวกรรมสาร 77(24): 99-110.
- วิษณุวัฒน์ เมืองเก่า, 2554. การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) โดยการเพาะเลี้ยง *Bacillus megaterium* P-12 แบบสองระยะในถังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- วันกุล ชนะสิทธิ์, 2553. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลอเรต) โดย *Bacillus* sp. P-12. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศรียุญา แก้วประดับ, 2553. การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) จากน้ำอ้อยโดย *Bacillus megaterium* BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- คันสนีย์ สันติอรธพันธ์, 2550. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิบีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตซึ่งเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากแหล่งดินและบ่อบำบัดน้ำเสีย. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุดา สุภาชินสวัสดิ์, 2542. ผลของสับสเตรตต่อสัดส่วนของ 3-ไฮดรอกซีวาลอเรตในพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลอเรต) ซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อดิพล บุญเรืองถาวร, 2543. การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดยการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 แบบป้อนเป็นงวดภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก  
วิธีการเตรียมสารเคมี

**1. การเตรียมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์**

เตรียมจากการละลายฟีนอล 5.0 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

**2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในยูเรีย**

2.1 สารละลายบอริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

เตรียมจากการละลายกรดบอริกปริมาณ 40 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

2.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 32 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

เตรียมจากการละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 320 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

2.3 สารโพแทสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟต

เตรียมโพแทสเซียมซัลเฟต 95 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัมผสมรวมกัน

## ภาคผนวก ข

## สูตรคำนวณ

## 1.การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์-น้ำหนักถ้วยเปล่า} \times 1000}{30}$$

## 2.การคำนวณปริมาณมอนอเมอร์ (กรัมต่อลิตร) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี

การคำนวณปริมาณมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV (กรัมต่อลิตรต่อเซลล์แห้ง 0.02 กรัม) ทำการประมวลผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Star chromatogram : version 4.02 ซึ่งจำทำการคำนวณปริมาณมอนอเมอร์ (กรัมต่อลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในสถานะเดียวกัน การคำนวณปริมาณมอนอเมอร์

$$\text{ปริมาณมอนอเมอร์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าจากการวิเคราะห์ (กรัมต่อลิตร)} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)}}{20}$$

## 3.การคำนวณสัดส่วน(โมลเปอร์เซ็นต์) ของแต่ละมอนอเมอร์จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี

การคำนวณองค์ประกอบขององค์ประกอบของมอนอเมอร์ในโคพอลิเมอร์ (mole fraction)

- 3.1 คำนวณหาปริมาณของแต่ละมอนอเมอร์ (กรัมต่อลิตร)
- 3.2 คำนวณหาจำนวนโมลของแต่ละมอนอเมอร์ โดยการหารด้วยน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละมอนอเมอร์ (น้ำหนักโมเลกุลของ 3HB และ 3HV = 86 และ 100 ตามลำดับ)
- 3.3 คำนวณหาสัดส่วนของแต่ละมอนอเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)

$$\text{สูตร โมลเปอร์เซ็นต์ของแต่ละมอนอเมอร์} = \frac{\text{จำนวนโมลของมอนอเมอร์} \times 100}{\text{ผลรวมของจำนวนโมลของมอนอเมอร์ทั้งหมด}}$$

#### 4.การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำหมัก (กรัมต่อลิตร)

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร} \times \text{ค่าการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครส}}$$

#### 5.การคำนวณปริมาณยูเรียในน้ำหมัก (กรัมต่อลิตร)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{(\text{ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก} \times \text{ปริมาตรกรดที่ใช้} \times 1.4)}{\text{ปริมาตรน้ำหมัก}}$$

$$\text{ปริมาณยูเรีย (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก} \times \text{ปริมาตรกรดที่ใช้} \times 1.4)}{0.047 \text{ เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน}}$$

#### 6.การคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์

$$\text{อัตราการเจริญจำเพาะ(ต่อชั่วโมง) (\mu)} = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t}$$

$$\text{สัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไป (Y<sub>x/s</sub>)} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$$

$$\text{ค่าอัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) (Productivity)} = \frac{P_t - P_0}{t}$$

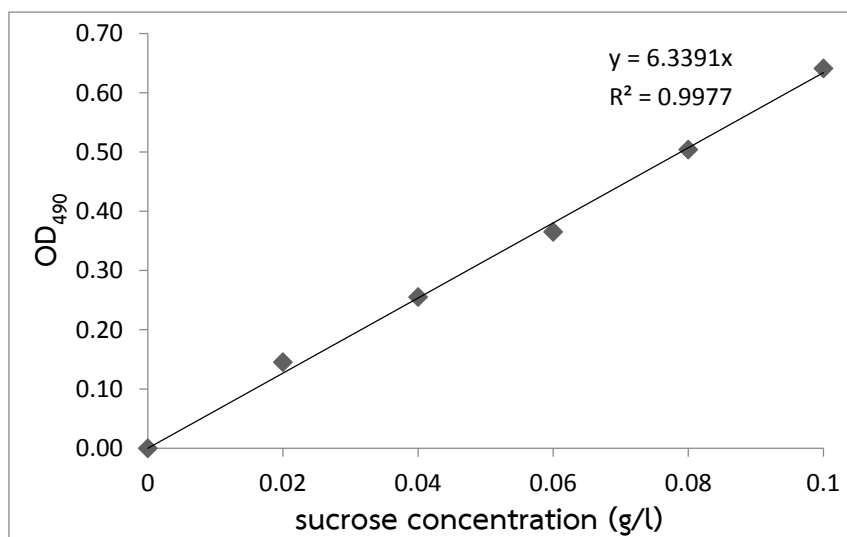
|       |                |     |   |
|-------|----------------|-----|---|
| เมื่อ | X <sub>0</sub> | คือ | น้ำหนักรวมเซลล์แห้งเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)         |
|       | X <sub>t</sub> | คือ | น้ำหนักรวมเซลล์แห้ง ณ เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)       |
|       | P <sub>0</sub> | คือ | ปริมาณพอลิเมอร์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)             |
|       | P <sub>t</sub> | คือ | ปริมาณพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ณ เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร) |
|       | S <sub>0</sub> | คือ | ปริมาณสับสเตรตเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)              |
|       | S <sub>t</sub> | คือ | ปริมาณสับสเตรตที่ถูกใช้ไป ณ เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร) |
|       | T              | คือ | เวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)              |



## ภาคผนวก ค

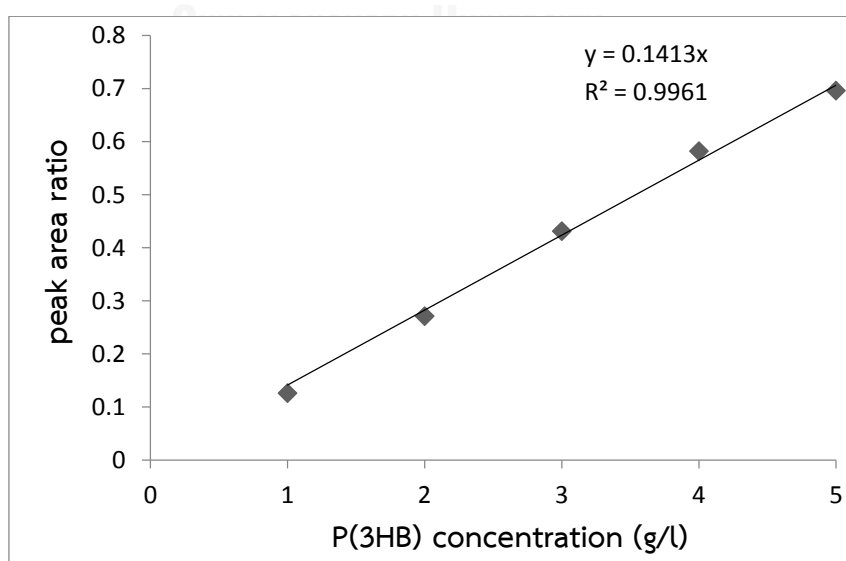
## กราฟมาตรฐาน

## 1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครส วิเคราะห์ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก



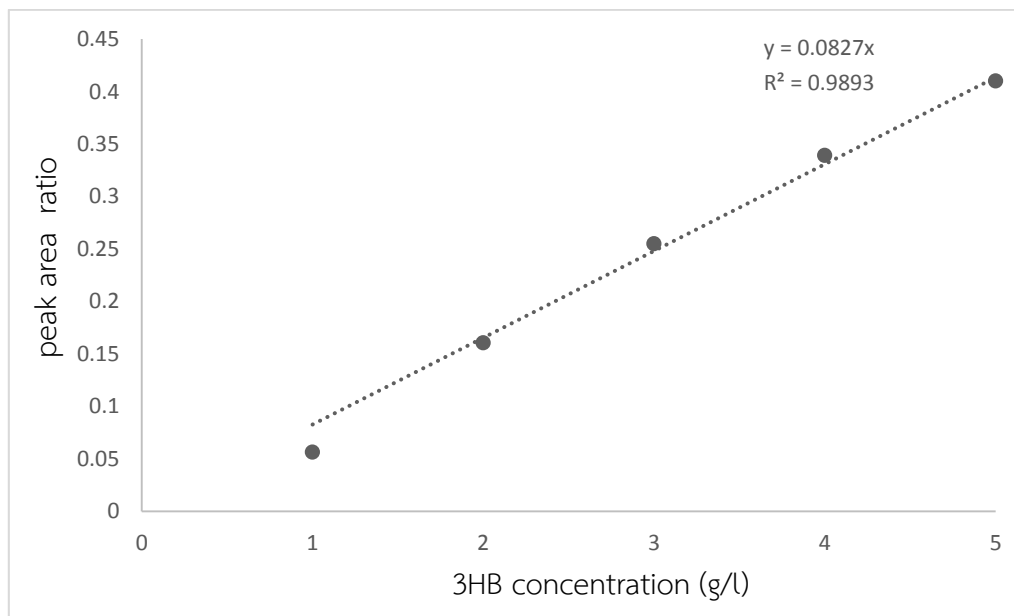
กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้น 0-1.0 กรัมต่อลิตร ค่าความชันเท่ากับ 6.3391

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

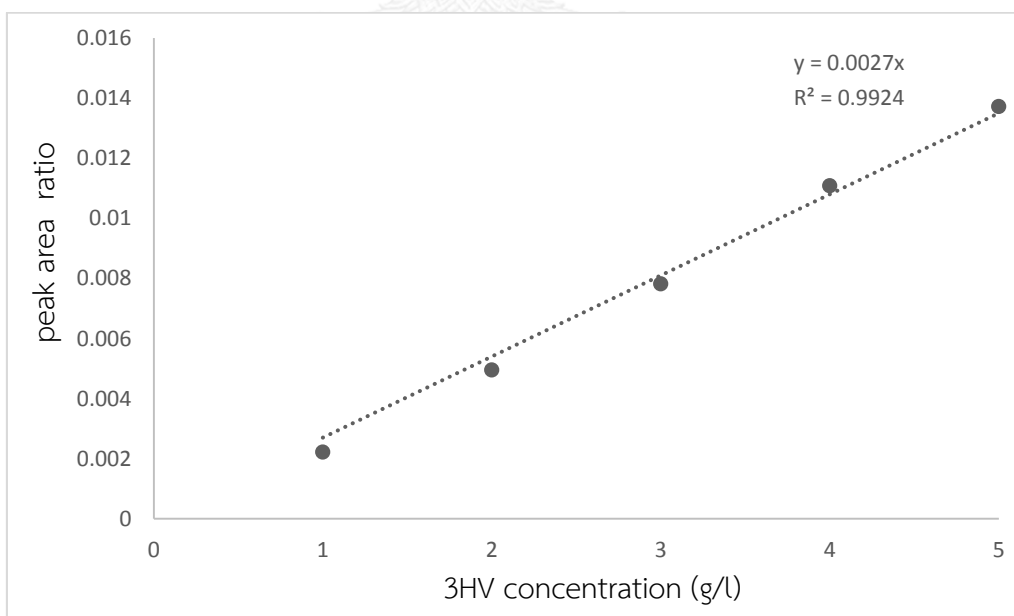


กราฟมาตรฐานของ P(3HB) ที่มีความเข้มข้น 0-5.0 กรัมต่อลิตร ค่าความชันเท่ากับ 0.1413

### 3.กราฟมาตรฐานของโคพอลิเมอร์ PHBV วิเคราะห์ด้วยวิธี GC



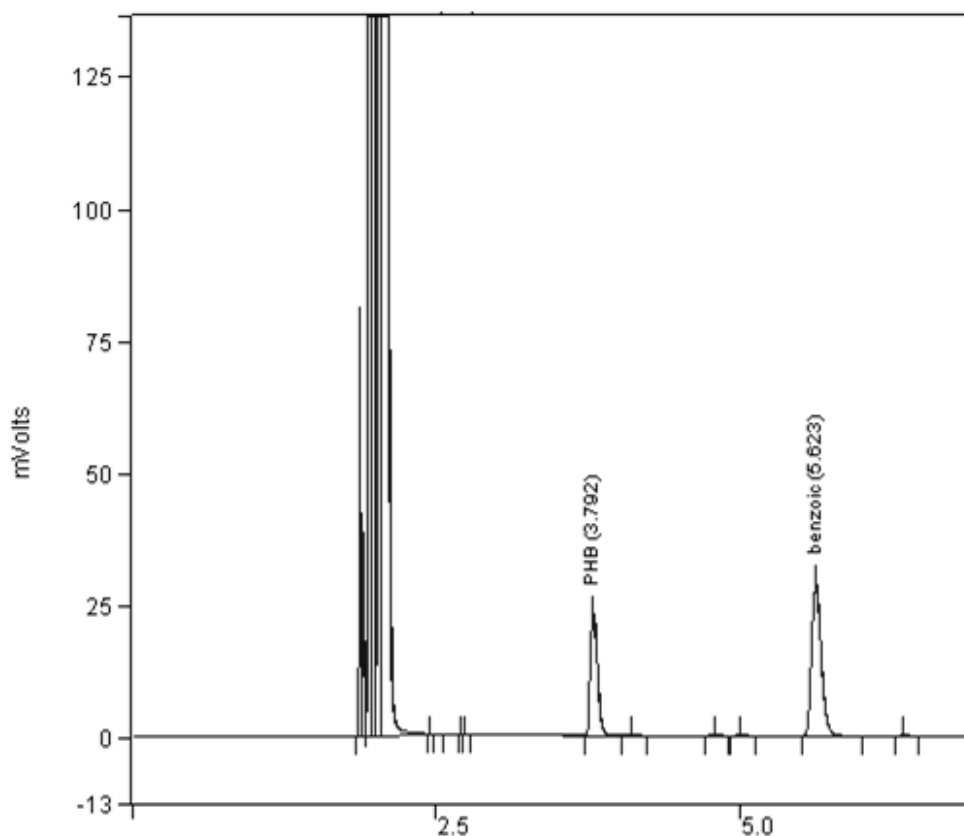
กราฟมาตรฐานของมอนอเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต  
ที่มีความเข้มข้น 0-5.0 กรัมต่อลิตร ค่าความชันเท่ากับ 0.1413



กราฟมาตรฐานของมอนอเมอร์ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต  
ที่มีความเข้มข้น 0-5.0 กรัมต่อลิตร ค่าความชันเท่ากับ 0.0027

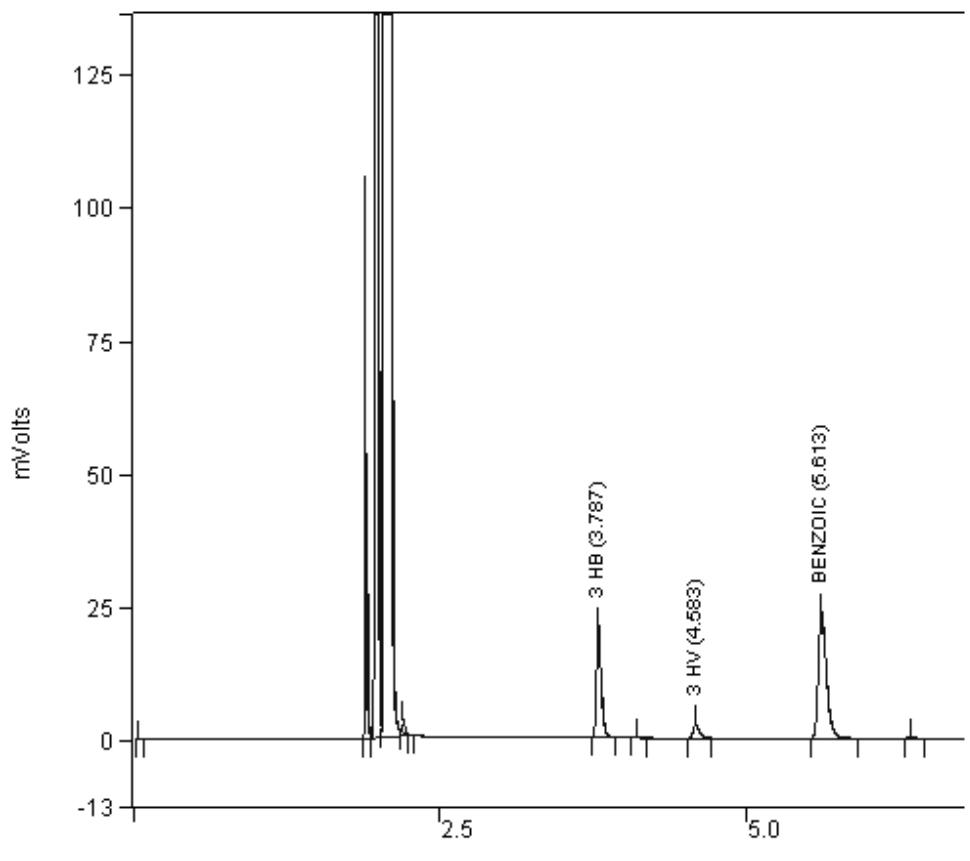
ภาคผนวก ง  
โครมาโทแกรม

1.โครมาโทแกรมวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี



ตัวอย่างโครมาโทแกรมของโพลิเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ซึ่งผลิตได้จาก *Bacillus megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและมียูเรีย 6 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน

## 2.โครมาโทแกรมวิเคราะห์ปริมาณ PHBV โดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี



ตัวอย่างโครมาโทแกรมของไฮโมพอลิเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต ซึ่งผลิตได้จาก *Bacillus megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและมียูเรีย 6 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยที่มีการเติมกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 และมีการเติมแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตรและโซเดียมโพรพิโอเนต 10 กรัม ที่ชั่วโมงที่ 9 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายจักรพรรดิ สุวรรณภูฏ เกิดวันที่ 19 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2533 ที่จังหวัดอุบลราชธานี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2554 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555

ในระหว่างศึกษาได้เข้าร่วมเสนอผลงานบางส่วนในงาน Burapha University International Conference 2015 จัดโดยมหาวิทยาลัยบูรพา ณ โรงแรมบางแสนเฮอริเทจโฮเทล จ.ชลบุรี ระหว่างวันที่ 10-12 กรกฎาคม พ.ศ. 2558 ในหัวข้อ “Production of Poly(3-hydroxybutyrate): The Biodegradable Plastic, By The Newly Isolated Bacillus megaterium Strain P-12 From Sugarcane Molasses”