

การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) โดยการเพาะเลี้ยง

*Bacillus megaterium* P-12 แบบสองระยะในถังหมัก

นางสาววิยฉันทน์ เมืองเก่า

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 Graduate School.

PRODUCTION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE)  
BY TWO-PHASE CULTIVATION OF *Bacillus megaterium* P-12 IN A FERMENTOR

Miss Wiyanan Muangkao

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 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวา  
เลอเรต) โดยการเพาะเลี้ยง *Bacillus megaterium* P-12  
แบบสอง ระยะในถังหมัก

โดย

นางสาววิยนันท์ เมืองเก่า

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. ส่องศรี กุลปรีชา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ ดร. ฉัญฉุา ทองจุล

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่องศรี กุลปรีชา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(อาจารย์ ดร. ฉัญฉุา ทองจุล)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปทุมพร นิมนต์)

วิทยนัท เมืองเกา : การผลิตพอลิ (3 – ไฮดรอกซีบิวทิเรต - โค - 3 - ไฮดรอกซีวาลเอเรต)  
โดย *Bacillus megaterium* P-12 แบบสองระยะในถังหมัก. (PRODUCTION OF POLY  
(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) BY TWO-PHASE  
CULTIVATION OF *Bacillus megaterium* P-12 IN A FERMENTOR) อ. ที่ปริกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. สังกศรี กุลปริษา, อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ. ดร.  
ณัฐฐา ทองจุล, 160 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ชนิด พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลเอเรต) หรือ PHBV จากการเลี้ยง *Bacillus megaterium* P-12 แบบสองระยะ พบว่า กล้าเชื้อ *B. megaterium* P-12 ที่เหมาะสมคือกล้าเชื้อที่เจริญในอาหาร Basal culture medium (BCM) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.15 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 และอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.29 ในชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ การเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรในระยะแรก ใช้กล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมง ใช้ น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นและความเข้มข้นน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้นต่อการผลิตเซลล์ พบว่า เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร เป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนการผลิตเซลล์ ซึ่งได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 14.79 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการศึกษาเพื่อเพิ่มผลผลิตของเซลล์ โดยการเพิ่มปริมาณของแหล่งไนโตรเจน(ยูเรีย)ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน C/N (โมล/โมล) เท่ากับ 10 ต่อ 1 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเป็น 19.07 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นศึกษาการผลิต PHBV โดยเติมแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลในน้ำอ้อย (แหล่งคาร์บอนตั้งต้นของมอนอเมอร์ 3HB) และ โซเดียมโพรพิโอเนต (แหล่งคาร์บอนตั้งต้นของมอนอเมอร์ 3HV) พบว่า การเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่ประกอบด้วยน้ำตาล 9 กรัมต่อลิตร และโซเดียมโพรพิโอเนต 4.5 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ได้ความเข้มข้นของ PHBV เท่ากับ 4.67 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHBV เท่ากับ 23.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้งและสัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 17 โมลเปอร์เซ็นต์ ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยความเข้มข้นของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ได้จากงานวิจัยนี้สูงกว่าการผลิตโดยการเติมโซเดียมโพรพิโอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มต้น 4 เท่า โดยได้ความเข้มข้น PHBV เท่ากับ 1.27 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นสัดส่วนโดยโมลของ 3HV เท่ากับ 25 โมลเปอร์เซ็นต์ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ การสกัดและทำบริสุทธิ์โคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้เพื่อวิเคราะห์สมบัติบางประการ พบว่า มีอุณหภูมิหลอมเหลว อุณหภูมิกลาสรานสีชั้น ความสามารถในการต้านแรงดึง เปอร์เซ็นต์การยืด และมอดูลัสของสภาพยืดหยุ่น เท่ากับ 162 องศาเซลเซียส -0.9 องศาเซลเซียส 41 MPa 2.7 เปอร์เซ็นต์ และ 2.4 GPa ตามลำดับ

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิติ.....  
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่อ อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
ปีการศึกษา.....2554.....ลายมือชื่อ อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

# # 5272541623 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : *Bacillus megaterium* P-12/ POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE)/TWO-PHASE CULTIVATION

WIYANAN MUANGKAO: PRODUCTION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) BY TWO-PHASE CULTIVATION OF *Bacillus megaterium* P-12 IN A FERMENTOR. ADVISOR: ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Dr.Eng., CO-ADVISOR : NUTTHA THONGCHUL, Ph.D., 160 pp.

This work aimed to investigate the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) so called PHBV by the two-phase cultivation of *Bacillus megaterium* P-12 in the Basal Culture Medium (BCM) in a 5 L fermentor. The maximum dry cell weight (DCW) of 5.15 g/l was obtained at 12 h while the high specific growth rate of 0.29 h<sup>-1</sup> was observed at 6 h cultivation. The 6 h inoculum culture of *B. megaterium* P-12 in the shaken flask was inoculated into the 5 L fermentor containing the culture medium with sugarcane liquor and urea as the carbon and nitrogen sources, respectively in the initial phase. The effects of the inoculums size and the initial sugar concentration in the sugarcane liquor on cell biomass production were investigated. It was found that with 10% (v/v) inoculum and the initial sugar concentration in the culture medium of 30 g/l, the highest cell concentration of 14.79 g/l was obtained at 6 h cultivation. Further increasing cell biomass was observed when increasing the urea concentration in the medium. At the mole ratio of carbon to nitrogen (C/N ratio) of 10:1, the highest cell concentration of 19.07 g/l was achieved at 9 h cultivation. PHBV production was induced by an addition of the mixed carbon sources including sugarcane liquor as the 3HB-generating backbone and sodium propionate as the 3HV-generating backbone. When the mixed carbon sources containing 9 g/l sugar and 4.5 g/l sodium propionate was added into the fermentor after cultivation for 6 h, the highest concentration of PHBV of 4.67 g/l corresponded to 23.01% (wt) with the 3HV mole fraction of 17 % (mol) after further cultivating for another 9 h was achieved. The copolymer production by this method was about 4 times higher than the conventional technique when sodium propionate was added initially (the obtained PHBV concentration of 1.27 g/l with the corresponded 3HV mole fraction of 25% at 12 h cultivation). The obtained copolymer was subjected to separation and purification before characterization. It was elucidated that the melting temperature, the glass temperature, the tensile strength, the % elongation, and the elastic modulus of the extracted copolymer were 162 °C, -0.9 °C, 41 MPa, 2.7 % and 2.4 GPa respectively.

Department : ..... Microbiology ..... Student's Signature.....

Field of Study : ..... Industrial Microbiology ..... Advisor's Signature.....

Academic Year : ..... 2011 ..... Co-advisor's Signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. ัญญา ทองจุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำแก่ข้าพเจ้าเกี่ยวกับงานวิจัย ทำให้สามารถทำงานวิจัยได้สำเร็จ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการสอบ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปทุมพร ภูมิเอนก ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ศรินทิพ สุกใส สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือวิเคราะห์ตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ บริษัท มิตรผลวิจัยและพัฒนา ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำอ้อยเพื่อใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ ในห้องวิจัย 462 ตลอดจนเพื่อนๆ และเจ้าหน้าที่ภาคอุตสาหกรรมชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ซึ่งเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดที่คอยสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทโครงการวิจัยและพัฒนาเชิงยุทธศาสตร์อุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพจากสำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ (องค์การมหาชน) ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ถ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	พ
<b>บทที่</b>	
1     บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการ.....	1
1.2 มุมเหตุจูงใจในการทำวิจัย.....	4
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	5
1.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
2     ปริทรรศน์วรรณกรรม.....	6
2.1 การจำแนกชนิดของ PHAs.....	8
2.2 การสังเคราะห์ PHA โดยสิ่งมีชีวิต.....	10
2.3 ลักษณะทางชีวโมเลกุลและชีวเคมีของการสังเคราะห์ PHA.....	10
2.4 พลาสติกชีวภาพกลุ่ม SCL-PHAs.....	15
2.5 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิต PHA.....	25
2.6 การผลิต P(3HB-co-3HV) โดยการเติมสารอาหาร.....	27
2.7 แนวทางการประยุกต์ใช้ PHA.....	28
2.8 การผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม.....	28
3     อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	31
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	31
3.2 เคมีภัณฑ์.....	32
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	34

บทที่	หน้า
3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา.....	34
3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	34
3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	36
3.3.4 การศึกษาอายุของกล้าเชื้อ <i>B. megaterium</i> P-12 ในระดับขวดทดลอง ที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตเซลล์ในระดับถังหมัก.....	36
3.3.5 การเพาะเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในระดับถังหมักระยะที่ 1 เพื่อผลิตและเพิ่มปริมาณเซลล์.....	37
3.3.6 การเพาะเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในระดับถังหมักระยะที่ 2 เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดย.....	38
3.3.7 การสกัดโคพอลิเมอร์จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์.....	38
3.3.8 การศึกษาสมบัติกายภาพและอุณหภูมิบางประการของโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ที่ผลิตได้จาก <i>Bacillus</i> sp. P-12.....	39
3.4 วิเคราะห์.....	39
3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	39
3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด.....	40
3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณยูเรีย.....	40
3.4.4 การวิเคราะห์สัดส่วนของมอนอเมอร์และปริมาณของพอลิเมอร์ โดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography: GC).....	40
3.4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำอ้อยด้วย เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC).....	42
3.4.6 การวิเคราะห์หาปริมาณของเกลือ โซเดียม โพรพิโอเนต โดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี.....	42
4 ผลการทดลอง.....	43
4.1 การหาปริมาณกล้าเชื้อ <i>B. megaterium</i> P-12 ในระดับขวดทดลอง ที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตเซลล์ในระดับถังหมัก.....	43
4.2 การเพาะเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในระดับถังหมักระยะที่ 1 เพื่อผลิตและเพิ่มปริมาณเซลล์.....	45
4.2.1 แปรผันปริมาณกล้าเชื้อและความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น....	45



บทที่	หน้า
4.2.2 แปรผันอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน.....	63
4.3 การเพาะเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12ในระดับถังหมักระยะที่ 2 เพื่อการผลิต โพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) .....	71
4.3.1 ช่วงเวลาในการเติมแหล่งคาร์บอนผสม.....	71
4.3.2 สัดส่วนของแหล่งคาร์บอนผสม.....	71
4.3.3 ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นในแหล่งคาร์บอนผสม.....	71
4.4 สมบัติทางกายภาพและอุณหภูมิของ โพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) ที่ผลิตได้ จาก <i>B. megaterium</i> P-12 .....	96
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	97
รายการอ้างอิง.....	107
ภาคผนวก.....	117
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	118
ภาคผนวก ข สูตรคำนวณ.....	120
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน.....	122
ภาคผนวก ง โครมาโทแกรม.....	126
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	133

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	การจำแนกชนิดของพลาสติกชีวภาพ ..... 9
2.2	เอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ PHA ..... 14
2.3	สมบัติทางกายภาพและอุณหภูมิจาก P(3HB-co-3HV) เปรียบเทียบกับ PP..... 20
2.4	แบคทีเรียที่สร้างและสะสม P(3HB-co-3HV) จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ..... 21
2.5	ชนิดของแหล่งคาร์บอนราคาถูกที่ใช้ในการผลิต P(3HB-co-3HV) โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ..... 22
2.6	องค์ประกอบของน้ำอ้อย..... 23
2.7	บริษัทที่มีการพัฒนาการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHA..... 29
4.1	น้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการเจริญจำเพาะเมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 44
4.2	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณ น้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 47
4.3	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณ น้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 48
4.4	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณ น้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 49

ตารางที่	หน้า
4.5	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 50</p>
4.6	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 51</p>
4.7	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 52</p>
4.8	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 53</p>
4.9	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 54</p>

ตารางที่	หน้า
4.10	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 55</p>
4.11	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 56</p>
4.12	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 57</p>
4.13	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 58</p>
4.14	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 59</p>

ตารางที่	หน้า
4.15	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 60</p>
4.16	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 61</p>
4.17	<p>เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด อัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไป เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นและปริมาณหัวเชื้อ ต่างๆกัน ..... 62</p>
4.18	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 ต่อ 1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 64</p>
4.19	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 ต่อ 1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 65</p>
4.20	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15 ต่อ 1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 66</p>

ตารางที่	หน้า
4.21	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) ความเข้มข้นของ P(3HB) อัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไป เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆกัน ..... 67
4.22	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพธิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 73
4.23	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพธิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 74
4.24	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพธิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 75
4.25	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพธิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 76
4.26	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพธิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 77

ตารางที่	หน้า
<p>4.27    น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม                      โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์                      เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ                      6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก                      อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	78
<p>4.28    น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม                      โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์                      เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ                      9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก                      อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	79
<p>4.29    น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม                      โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์                      เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ                      9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก                      อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	80
<p>4.30    น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม                      โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์                      เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ                      9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก                      อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	81
<p>4.31    น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม                      โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์                      เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ                      6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก                      อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	82

ตารางที่	หน้า
4.32	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 83</p>
4.33	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 84</p>
4.34	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 85</p>
4.35	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 86</p>
4.36	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 87</p>



ตารางที่	หน้า
4.37	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 88</p>
4.38	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 89</p>
4.39	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 90</p>
4.40	<p>เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV สัดส่วนมอนอเมอร์ อัตราผลผลิตของเซลล์และอัตราผลผลิตของ PHBV เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมของน้ำตาลในน้ำอ้อยและโซเดียมโพรพิโอเนตอัตราส่วน 1:0.25 ที่ชั่วโมงและความเข้มข้นน้ำตาลต่างกัน ..... 92</p>
4.41	<p>เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV สัดส่วนมอนอเมอร์ อัตราผลผลิตของเซลล์และอัตราผลผลิตของ PHBV เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมของน้ำตาลในน้ำอ้อยและโซเดียมโพรพิโอเนตอัตราส่วน 1:0.25 ที่ชั่วโมงและความเข้มข้นน้ำตาลต่างกัน ..... 93</p>

ตารางที่	หน้า
4.42	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณ โซเดียม โพรฟิไอเนต ความเข้มข้นของ PHBV สัดส่วนมอนอเมอร์ อัตราผลผลิต ของเซลล์และอัตราผลผลิตของ PHBV เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมของน้ำตาล ในน้ำอ้อยและ โซเดียมโพรฟิไอเนตอัตราส่วน 1:0.25 ที่ชั่วโมงและความเข้มข้น น้ำตาลต่างกัน ..... 94
5.1	น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้น PHBV ปริมาณ PHBV อัตราผลผลิต PHBV และ สัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> P-12 จากการ เติมแหล่งคาร์บอนผสมที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น เท่ากับ 6 และ 9 กรัมต่อลิตร ..... 103
5.2	เปรียบเทียบการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยใช้จุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนและ เทคนิคการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน ..... 104
5.3	เปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพและอุณหภูมิของ P(3HB-co-3HV) ที่สัดส่วน 3HV ต่างกัน ..... 105

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	โครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ..... 8
2.2	กระบวนการสังเคราะห์ PHA ..... 13
2.3	ภาวะการทำงานของเอนไซม์สำหรับการสังเคราะห์ PHA..... 15
2.4	โครงสร้างทางเคมีของ P(3HB-co-3HV)..... 16
2.5	กระบวนการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) จากกรดโพรพิโอนิก และกรดไขมันต่างๆ ที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคี่ ..... 17
2.6	กระบวนการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) จากกลูโคสและกรดโพรพิโอนิก โดย <i>R. eutropha</i> ..... 18
2.7	กระบวนการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) จากกลูโคสและโพรพิโอนेट โดย <i>R. eutropha</i> ..... 19
4.1	รูปแบบการเจริญและอัตราการเจริญจำเพาะของ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ..... 44
4.2	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณ น้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 47
4.3	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณ น้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 48
4.4	น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณ น้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 49

ภาพที่	หน้า
4.5	50
<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	
4.6	51
<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	
4.7	52
<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	
4.8	53
<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	
4.9	54
<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	

ภาพที่	หน้า
4.10	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 55</p>
4.11	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 56</p>
4.12	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 57</p>
4.13	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 58</p>
4.14	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 59</p>

ภาพที่	หน้า
4.15	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 60</p>
4.16	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตรและปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 61</p>
4.17	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่ภาวะความเข้มข้นน้ำตาล และปริมาณกล้าเชื้อต่างกัน ..... 63</p>
4.18	<p>เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่ภาวะความเข้มข้น น้ำตาลและปริมาณกล้าเชื้อต่างกัน ..... 63</p>
4.19	<p>อัตราผลผลิตของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่ภาวะความเข้มข้นน้ำตาล และปริมาณกล้าเชื้อต่างกัน ..... 64</p>
4.20	<p>อัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่ภาวะ ความเข้มข้นน้ำตาลและปริมาณกล้าเชื้อต่างกัน ..... 64</p>
4.21	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่อัตราส่วน ของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 5 ต่อ 1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 66</p>
4.22	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่อัตราส่วน ของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 ต่อ 1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 67</p>

ภาพที่	หน้า
4.23	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15 ต่อ 1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 68</p>
4.24	<p>เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) และความเข้มข้นของ P(3HB) เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน ต่างๆกัน ..... 70</p>
4.25	<p>เปรียบเทียบอัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรดที่ถูกใช้ไป เมื่อเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆกัน ..... 70</p>
4.26	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 73</p>
4.27	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 74</p>
4.28	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 75</p>

ภาพที่	หน้า
4.29	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 76</p>
4.30	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 77</p>
4.31	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 78</p>
4.32	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 79</p>
4.33	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 80</p>



ภาพที่	หน้า
<p>4.34    น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม                      โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์                      เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ                      9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก                      อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	81
<p>4.35    น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม                      โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์                      เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ                      6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก                      อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	82
<p>4.36    น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม                      โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์                      เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ                      6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก                      อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	83
<p>4.37    น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม                      โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์                      เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ                      6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก                      อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	84
<p>4.38    น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม                      โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์                      เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ                      9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก                      อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 .....</p>	85

ภาพที่	หน้า
4.39	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 86</p>
4.40	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 87</p>
4.41	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 88</p>
4.42	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 89</p>
4.43	<p>น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียม โพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ..... 90</p>
4.44	<p>เปรียบเทียบความเข้มข้นของ PHA สัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV และอัตราผลผลิตของ PHA เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 1:0.5 หรือ 1:1 ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> P-12 ..... 95</p>

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ตัวย่อ	คำอธิบาย
DCW	น้ำหนักเซลล์แห้ง
g/l	กรัมต่อลิตร
g/l/h	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
h	ชั่วโมง
PHB / P(3HB)	พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)
PHBV / P(3HB-co-3HV)	พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)
P(3HB) conc.	ความเข้มข้นของ P(3HB)
PHA conc.	ความเข้มข้นของ PHA
% by wt.	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง
$\mu$	อัตราการเติบโตจำเพาะ

# บทที่ 1

## บทนำ

การพัฒนาทางอุตสาหกรรมที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน ส่งผลให้เกิดปัญหาเรื่องมลภาวะสิ่งแวดล้อมหลายด้าน โดยเฉพาะปัญหาจากขยะประเภทพลาสติกซึ่งส่วนใหญ่ได้มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น พอลิเอทิลีน (polyethylene, PE) พอลิโพรพิลีน (polypropylene, PP) พอลิไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride, PVC) เป็นต้น ซึ่งพลาสติกสังเคราะห์เหล่านี้เป็นที่นิยมในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสม โดยเป็นวัสดุที่มีความแข็งแรง ทนทาน มีน้ำหนักเบาและราคาไม่แพง อย่างไรก็ตามพลาสติกจากปิโตรเคมีมีข้อเสีย คือ ย่อยสลายได้ยากในสิ่งแวดล้อม (Loo และ Sudesh, 2007) ดังนั้นการกำจัดขยะพลาสติกจึงเป็นปัญหาสำคัญ เนื่องจากวิธีการกำจัดส่วนมากใช้การฝังดิน และการเผา (Brandl และคณะ, 1994) ซึ่งส่งผลกระทบต่อและก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา อีกทั้งในปัจจุบันทรัพยากรทางปิโตรเคมีเริ่มลดน้อยลง ดังนั้นในการพัฒนากระบวนการผลิตพลาสติกชีวภาพเพื่อนำไปใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากปิโตรเคมีจึงเป็นแนวทางเลือกใหม่ที่มีความเป็นไปได้สูง

ตัวอย่างของพลาสติกชีวภาพ (bioplastics) ที่รู้จักกันแพร่หลาย ได้แก่ พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid หรือ PLA) พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (polybutylene succinate หรือ PBS) และพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (polyhydroxyalkanoates หรือ PHAs) PLA และ PBS เป็นพลาสติกชีวภาพซึ่งได้มาจากการทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของมอนอเมอร์ที่ได้มาจากกระบวนการหมัก โดยกระบวนการผลิตจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การหมักเพื่อผลิตมอนอเมอร์ และการทำพอลิเมอร์ไรเซชันของมอนอเมอร์ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะแตกต่างจากการผลิต PHAs ซึ่งมีเพียงขั้นตอนเดียว โดยจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์และสะสม PHAs ในรูปของพอลิเมอร์ไว้ภายในเซลล์จุลินทรีย์เอง นอกจากนี้แล้วยังพบว่า PHAs ซึ่งเป็นพอลิเอสเตอร์สายตรง (linear polyester) สามารถขึ้นรูปได้ด้วยความร้อน ได้เป็นพลาสติกที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ใช้ทั่วไปในอุตสาหกรรม (Loo และ Sudesh, 2007) จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ เช่น *Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp. เป็นต้น ที่สามารถสร้างและสะสม PHAs ในภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปและมีไนโตรเจน หรือฟอสฟอรัส หรือออกซิเจนในปริมาณจำกัด (Steinbüchel และ Fächtenbusch, 1998) ทั้งนี้ภาวะดังกล่าวจะไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Chen และคณะ, 2001) โดยแหล่งคาร์บอนจะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบไฮดรอกซีอัลคานอยด์ เป็นสายพอลิเมอร์ที่สะสมอยู่ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ในรูปของแกรนูล ดังนั้น PHAs จึงเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยมอนอเมอร์ของกรดไขมัน (3-hydroxy fatty acid) ที่มีความยาวของ

สายพอลิเมอร์ตั้งแต่  $10^3$  ถึง  $10^4$  มอนอเมอร์ (Suriyamongkol และคณะ, 2007) ที่ผ่านมาพบว่ามี การศึกษาการผลิตและสังเคราะห์ PHAs จากแหล่งคาร์บอนหลากหลายชนิด รวมถึงการใช้ ทรัพยากรที่สามารถผลิตทดแทนใหม่ได้ (renewable resources) เช่น น้ำมันพืช (Bhubalan และคณะ , 2008) กากน้ำตาล (Albuquerque และคณะ, 2007; Kulpreecha และคณะ, 2009) แป้ง (Chen และ คณะ, 2006) หางนม (Koller และคณะ, 2008) และกากตะกอนจากอุตสาหกรรม (Bengtsson และ Werker, 2008) โดยชนิดของ PHAs ที่มีการศึกษากันโดยทั่วไปมีทั้งที่เป็นโฮโมพอลิเมอร์ ได้แก่ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [poly(3-hydroxybutyrate)] หรือ P(3HB) หรือ PHB และโคพอลิเมอร์ ได้แก่ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)] หรือ P(3HB-co-3HV) หรือ PHBV สำหรับพอลิเมอร์ P(3HB) ซึ่งประกอบด้วย มอนอเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) พบได้จากการสังเคราะห์โดย *Bacillus megaterium* (Kulpreecha และคณะ, 2009) *B. cereus* (Suriyamongkol และคณะ, 2007) *Ralstonia eutropha* (Yu และ Heiko, 2008; Haas และคณะ, 2008) P(3HB) มีคุณสมบัติที่ดี กล่าวคือ สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อ สิ่งมีชีวิตได้ (biocompatibility) ดังนั้น จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และเกษตรกรรม ได้แก่ การนำมาใช้เป็นวัสดุทางศัลยกรรม เช่น หลอดเลือดเทียม กระดูกเทียม เข็ม ใหมเย็บแผล แคลปซูลบรรจุยา เป็นต้น หรืออาจนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านเกษตรกรรม โดยใช้เป็นส่วนห่อหุ้มของปุ๋ยและฮอร์โมนพืช (control release) และใช้เป็นวัสดุคลุมดิน (mulch film) ในการ เพาะเลี้ยงต้นกล้าได้ เป็นต้น นอกจากนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์หรือ อุปกรณ์ใช้สอยอื่นๆ ได้แก่ ขวด ถูพลาสติก เป็นต้น (Braunegg และคณะ 1998; Steinbuchel และ Fuchtenbusch, 1998) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของ P(3HB) พบว่ามีอุณหภูมิ กลาสทรานซิชัน ( $T_g$ ) และอุณหภูมิหลอมเหลว ( $T_m$ ) ประมาณ 4 และ 180 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ค่ายังส์โมดูลัส (Young's Modulus) เท่ากับ 3.5 GPa ค่าต้านแรงดึง (tensile strength) เท่ากับ 43 MPa และเปอร์เซ็นต์การยืด (% elongation to break) เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ P(3HB) มีข้อด้อย คือ แข็ง (stiffness) และเปราะ (brittleness) หรือมีความยืดหยุ่นต่ำ (Sudesh และ คณะ, 2000) ทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปขึ้นรูปเพื่อใช้งานค่อนข้างมาก

ต่อมาจึงมีการปรับปรุงคุณสมบัติของพอลิเมอร์กลุ่ม PHAs ให้มีคุณสมบัติทางกายภาพให้ดีขึ้น โดยพัฒนาการผลิตให้อยู่ในรูปของโคพอลิเมอร์ เช่น P(3HB-co-3HV) ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) เชื่อมต่อกับมอนอเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV) ด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกกับหมู่ไฮดรอกซีและมีการเรียงตัวของมอนอเมอร์เป็นแบบสุ่ม (Bloembergen และคณะ, 1986) โดยวิธีการสังเคราะห์ต้องมีทั้งแหล่งคาร์บอนสำหรับ มอนอเมอร์ 3HB และจะต้องเติมสารตั้งต้นสำหรับมอนอเมอร์ 3HV เช่น โซเดียมโพรพิโอเนต (sodium propionate) โดยพบว่าเมื่อเติมโพรพิโอเนตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โพรพิโอเนตถูก

เปลี่ยนเป็นโพรพิโอนิลโคเอ (propionyl-CoA) ซึ่งโพรพิโอนิลโคเอสามารถถูกเปลี่ยนเป็นอะเซทิลโคเอได้โดยปล่อยคาร์บอนในหมู่คาร์บอนิลออกมา ดังนั้น 3-ไฮดรอกซีวาลเอเรต (3HV) ได้มาจากปฏิกิริยาระหว่างโพรพิโอนิลโคเอร่วมกับอะเซทิลโคเอ สำหรับ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) จะได้จากกรรวมตัวกันของอะเซทิลโคเอสองโมเลกุล (Doi และคณะ, 1987) ที่ผ่านมาพบงานวิจัยที่มีการศึกษาการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ใน *Ralstonia eutropha* (Du และคณะ, 2001; Marangoni และคณะ, 2002) *Haloferax mediterranei* (Chen และคณะ, 2006) *Cupriavidus necator* (Lee และคณะ, 2008) จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพพบว่า P(3HB-co-3HV) มีคุณสมบัติที่ดีกว่า P(3HB) โดยที่สัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 20 โมลเปอร์เซ็นต์ พบว่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (Tg) และอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) มีค่าประมาณ -1 และ 145 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ค่ายังส์โมดูลัส (Young's Modulus) เท่ากับ 1.2 GPa ค่าต้านแรงดึง (tensile strength) เท่ากับ 32 MPa และเปอร์เซ็นต์การยืด (% elongation to break) เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีแนวโน้มลดลงตามสัดส่วนของ 3HV ที่เพิ่มขึ้น จากคุณสมบัตินี้ทำให้ P(3HB-co-3HV) มีความแข็งแรงลดลงและมีผลให้ความเหนียว (toughness) เพิ่มขึ้น หรือมีความยืดหยุ่น (flexible) เพิ่มขึ้น (Sudesh และคณะ, 2000; Doi, 1990) ซึ่งคุณสมบัติของ P(3HB-co-3HV) ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของ 3HV โดยโคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนโดยโมล (mole fraction) ของ 3HV ในช่วง 11-25 โมลเปอร์เซ็นต์ จะมีสมบัติด้านต่างๆ ที่ดีกว่า โดยมีคุณสมบัติที่เหนียวขึ้นคล้ายกับพอลิโพรพิลีน (PP) และมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้ดีกว่า P(3HB) (Chen และ Wang, 2002; Holmes และคณะ, 1985; Doi, 1990) แต่หากสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV สูงขึ้นตั้งแต่ 47 ถึง 100 โมลเปอร์เซ็นต์จะทำให้โคพอลิเมอร์กลับมีสมบัติที่แข็งและเปราะเหมือน P(3HB) (Bloembergen และคณะ, 1986) ทำให้ไม่เหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ การสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ให้ได้สัดส่วนของ 3HV ที่เหมาะสมสามารถทำในขั้นตอนการผลิตโดยมีการควบคุมทั้งชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลกับกรดหรือเกลือของกรดอินทรีย์ เช่น กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) หรือโซเดียมโพรพิโอเนต และกรดวาลเอเรก (valeric acid) หรือโซเดียมวาลเอเรต (sodium valerate) (Byrom, 1997) ระยะเวลาในการเติมสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ 3HV มีผลต่อปริมาณของโคพอลิเมอร์นี้ โดยหากเติมกรดหรือเกลือของกรดอินทรีย์ในช่วงต้นของการเจริญจะส่งผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ ถ้าเติมในช่วงหลังการเจริญของเซลล์ จะส่งผลให้เซลล์สะสม 3HB ในปริมาณมาก และได้สัดส่วนของ 3HV ในปริมาณน้อย ดังนั้น จึงศึกษาการพัฒนาวิธีการหมักที่แตกต่างกับการหมักเพื่อผลิต P(3HB) โดยการเลือกช่วงเวลาสำหรับการเติมสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ 3HV จำเป็นต้องเลือกช่วงเวลาที่มีการเจริญของเซลล์เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ความเข้มข้นสูงรวมทั้งมีการสะสมโคพอลิเมอร์ปริมาณสูงและมีสัดส่วนของ 3HV ที่เหมาะสมด้วย (Du และคณะ,

2001) นอกจากนี้ยังต้องควบคุมปัจจัยการเลี้ยงเชื้ออื่นๆ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และความสามารถในการนำซับสเตรตไปใช้ในการผลิต 3HV (สุดา สุภาวสินสวัสดิ์, 2542)

ศันสนีย์ สันติอรรถพันธุ์ (2550) ได้คัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติจำนวน 20 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต P-12 สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณสูงเท่ากับ 44.54 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Mineral Salt Medium (MSM) ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน จากการศึกษาต่อมาเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีของไอโซเลต P-12 ที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและชนิดของแบคทีเรีย คือ *Bacillus megaterium* (วันกุลศล ชนะสิทธิ์, 2553) รวมทั้งมีการศึกษาเบื้องต้นในการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมเป็นน้ำอ้อย (sugarcane liquor) และโซเดียมโพรพิโอเนต ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตรในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นยูเรีย (urea) 1 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้โซเดียมโพรพิโอเนต ได้เซลล์แห้งสูงสุดเป็น 3.51 กรัมต่อลิตร สะสมโคพอลิเมอร์ได้ ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 36.36 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของโคพอลิเมอร์ 1.27 กรัมต่อลิตร และสัดส่วนของ 3HV ประมาณ 25 โมลเปอร์เซ็นต์ ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ในอาหาร Mineral Salt Medium (MSM) การใช้สารตั้งต้นมอนอเมอร์ 3HV เป็นโซเดียมโพรพิโอเนต นั้น ทำให้ได้ปริมาณสัดส่วนของ 3HV ที่เหมาะสมแต่น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคพอลิเมอร์ค่อนข้างต่ำ(งานวิจัยเบื้องต้น)

### มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHAs) เป็นพลาสติกชีวภาพชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากปิโตรเคมี โดยชนิดที่ศึกษากันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ โสโมพอลิเมอร์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต P(3HB) และโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) เนื่องจาก P(3HB-co-3HV) มีสมบัติเชิงกลที่ดีกว่า P(3HB) ทั้งในด้านของความแข็งแรง ความเหนียวและความยืดหยุ่น จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย คณะผู้วิจัย โดยศันสนีย์ สันติอรรถพันธุ์ (2550) และวันกุลศล ชนะสิทธิ์ (2553) ได้คัดแยกแบคทีเรียชนิดใหม่ *Bacillus megaterium* P-12 และพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตและสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณมาก อีกทั้งยังสามารถผลิต P(3HB-co-3HV) ได้จากแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารตั้งต้นของ 3HB เช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ และแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารตั้งต้นของ 3HV เช่น กลีเซอรอลโพรพิโอเนต หรือกลีเซอรอลควาเลอริก จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่ากลีเซอรอลโพรพิโอเนตเป็นสารตั้งต้นของ 3HV ที่เหมาะสม ดังนั้น การเลือกใช้นิวคลีโอไทด์และปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม รวมไปถึงการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตโคพอลิเมอร์ของ *Bacillus* sp. P-12 ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้สามารถผลิต

โคพอลิเมอร์ได้ในปริมาณมากขึ้น และราคาต้นทุนต่อหน่วยต่ำลง เพื่อให้สามารถใช้พลาสติกชีวภาพทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ที่มีราคาถูกกว่าได้ และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าปริมาณโคพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ยังคงมีปริมาณค่อนข้างต่ำ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จะพัฒนาเทคนิคการหมัก โดยแบ่งเป็น 2 ระยะ โดยระยะแรกจะทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูง โดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นในระยะที่ 2 จะกระตุ้นให้เซลล์สะสม 3HB และ 3HV โดยการเติมสารตั้งต้นของ 3HV ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ช่วงเวลาเหมาะสม เพื่อให้ได้ผลผลิตโคพอลิเมอร์ในปริมาณมาก และมีสัดส่วนของมอนอเมอร์ตามต้องการ

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะเพิ่มอัตราผลผลิตของ P(3HB-co-3HV) ให้สูงขึ้น โดย *B. megaterium* P-12 โดยพัฒนาขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อและการหมักเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูง รวมทั้งมีการสะสมโคพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นและได้องค์ประกอบหรือสัดส่วนของ 3HV ที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ ต่อไป

### ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาอายุของกล้าเชื้อ *B. megaterium* P-12 ในระดับขวดทดลองที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตเซลล์ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร
2. เลี้ยงเชื้อในถังหมักระยะที่ 1 เพื่อผลิตและเพิ่มปริมาณเซลล์ของ *B. megaterium* P-12
3. เลี้ยงเชื้อในถังหมักระยะที่ 2 เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดย *B. megaterium* P-12

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงภาวะและปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) รวมถึงได้ผลผลิตของ P(3HB-co-3HV) จาก *Bacillus megaterium* P-12 เพิ่มขึ้นโดยมีสัดส่วนของมอนอเมอร์ตามต้องการ



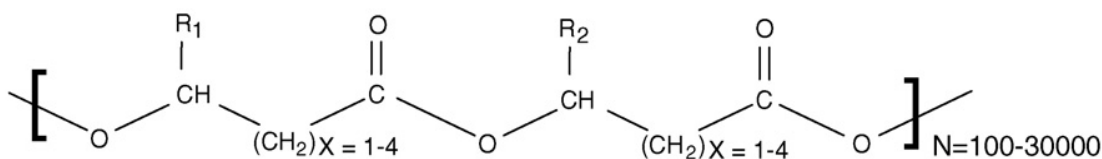
## บทที่ 2

### ปริทรรศน์วรรณกรรม

ปัจจุบันการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรและความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีที่พัฒนาอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้การดำรงชีวิตของมนุษย์เปลี่ยนแปลงไปโดยมีความต้องการการใช้ทรัพยากรทางธรรมชาติที่เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย เป็นผลให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมอันเป็นสาเหตุทำให้เกิดปัญหาต่างๆ ตามมา โดยเฉพาะปัญหาใหญ่ที่เกิดขึ้น คือ ภาวะโลกร้อน เนื่องมาจากชั้นบรรยากาศที่ถูกทำลายโดยสารพิษต่างๆ ที่ถูกปล่อยมาจากโรงงานอุตสาหกรรมและจากกิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ที่ต้องใช้ทรัพยากรต่างๆ อยู่ตลอดเวลา เมื่อมีการใช้ทรัพยากรจำนวนมาก ปัญหาหนึ่งที่เกิดขึ้นตามมา คือ ปัญหาการกำจัดขยะ โดยเฉพาะขยะประเภทพลาสติก ซึ่งส่วนมากใช้วิธีการเผาหรือฝังกลบ ในกระบวนการกำจัดขยะโดยการเผาส่งผลให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) ซึ่งเป็นพิษต่อมนุษย์และทำลายชั้นบรรยากาศ ส่วนวิธีการฝังกลบ ก็ใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนานหรือไม่ย่อยสลายเลยรวมถึงทำให้เกิดการสะสมของสารพิษในดินและไหลลงสู่ทะเล (Keshavarz และ Roy., 2010) เป็นผลทำให้ปริมาณขยะประเภทพลาสติกมีจำนวนเพิ่มขึ้นมากและยากต่อการกำจัดแนวทางแก้ไขปัญหาลำนี้ทำได้โดยการลดการใช้ถุงพลาสติกหรือการใช้ซ้ำ ซึ่งช่วยแก้ปัญหาได้บ้าง อีกวิธีหนึ่งคือการนำมาผ่านกระบวนการรีไซเคิล (recycle) แต่มีข้อจำกัดตรงที่สมบัติหลายอย่างเสียไป (Loo และ Sudesh, 2007) ทำให้ไม่เหมาะต่อการนำกลับมาใช้งาน แต่เนื่องจากยังมีความจำเป็นที่ต้องใช้พลาสติกในอุตสาหกรรมต่างๆ อยู่มาก จึงมีแนวคิดเรื่องการผลิตพลาสติกที่สามารถใช้ทดแทนพลาสติกที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี คือ การผลิตพลาสติกชีวภาพ ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อมโดยใช้ระยะเวลาไม่นาน รวมทั้งมีสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีด้วย จากนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยเรื่องการผลิตพลาสติกชีวภาพ ซึ่งเน้นให้มีสมบัติทางเคมีและกายภาพเหมือนหรือใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี แต่มีข้อดีตรงที่สามารถย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิดในสิ่งแวดล้อม (biodegradable) (Steinbüchel และคณะ., 1988)

มีการศึกษาวิจัยและค้นพบสารกลุ่มพอลิเอสเทอร์ คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB) สะสมเป็นแกรนูลอยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926) ทำให้พลาสติกชนิด พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) เป็นพลาสติกชีวภาพชนิดแรกและพบมากที่สุดในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) (Keshavarz และ Roy, 2010) จากนั้นในอีกหลายปีต่อมาจึงพบ PHA ชนิดที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 2 ชนิด คือ มอนอเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) และ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (3HV) ในภาคตะกอนของเสีย (Wallen และคณะ, 2000)

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) เป็นพลาสติกชนิดพอลิเอสเทอร์ (polyester) ที่สามารถขึ้นรูปได้ด้วยความร้อน (thermoplastic) สามารถสังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ หลายชนิดที่อยู่ในดิน (Wu และคณะ, 2000) รวมไปถึงจุลินทรีย์อื่นที่อยู่ในอากาศ ทะเล หรือในภาวะที่ไม่เหมาะสม (extreme environments) ก็่มจัด หรือ อุณหภูมิสูง (Chen., 2010) เช่น *Bacillus megaterium* (Kulpreecha และคณะ, 2009) *B. cereus* (Suriyamongkol และคณะ, 2007) *Ralstonia eutropha* (Haas และคณะ, 2008) เป็นต้น โดยสะสมเป็นแกรนูลอยู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์ เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนให้แก่เซลล์ โดย PHA ถูกสังเคราะห์โดยเอนไซม์พีเอส เอซินเทส(PHA synthase) และสะสมภายในแกรนูล (granule) ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหาร (แหล่งคาร์บอน) ในภาวะที่แหล่งคาร์บอนมากเกินไปและในภาวะที่จำกัดหรือขาดแคลนสารอาหาร บางชนิด เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือ trace elements (แมกนีเซียม แคลเซียม เหล็ก) (Anderson และ Dawes, 1990; Lee, 1996) พลาสติกกลุ่มนี้สามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เอส (depolymerase) และเอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) และจากการย่อยสลายจะให้สารที่ไม่เป็นอันตราย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก (Evans และ Sikdar, 1990) โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ P(3HB) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ คือ 3-hydroxybutyrate หรือ (3HB) มากกว่า 140 โมโนเมอร์ สมบัติของ PHB มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความหลากหลายของวัตถุดิบหรือแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตซึ่งส่งผลต่อองค์ประกอบของพอลิเมอร์ (Steinbüchel และ Valentin, 1995) โครงสร้างหลักของ PHAs ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ R-hydroxyalkanoic acid (HA) (ดังแสดงในภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต  $R_1$  และ  $R_2$  คือ alkyl groups ( $C_1$ - $C_{13}$ )

(Keshavarz และคณะ., 2010)

X = 1	เมื่อ R = ไฮโดรเจน(H) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต)	; P(3HP)
	เมื่อ R = เมทิล( $CH_3$ ) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	; P(3HB)
	เมื่อ R = เอทิล( $C_2H_5$ ) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	; P(3HV)
	เมื่อ R = โพรพิล( $C_3H_7$ ) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต)	; P(3HHX)
	เมื่อ R = บิวทิล( $C_4H_9$ ) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต)	; P(3HHp)
	เมื่อ R = เพนทิล( $C_5H_{11}$ ) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต)	; P(3HO)
	เมื่อ R = เฮกซิล( $C_6H_{13}$ ) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีโนนาโนเอต)	; P(3HN)
	เมื่อ R = เฮปทิล( $C_7H_{15}$ ) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีเดคาโนเอต)	; P(3HD)
	เมื่อ R = ออกซิล( $C_8H_{17}$ ) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีอันเดคาโนเอต)	; P(3HUD)
	เมื่อ R = โนนิล( $C_9H_{19}$ ) สารนี้คือ	พอลิ(3-ไฮดรอกซีโดเดคาโนเอต)	; P(3HDD)
X = 2	เมื่อ R = ไฮโดรเจน(H) สารนี้คือ	พอลิ(4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	; P(4HB)
X = 3	เมื่อ R = ไฮโดรเจน(H) สารนี้คือ	พอลิ(5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	; P(5HP)

## 2.1 การจำแนกชนิดของ PHAs

สามารถจำแนกได้จากหลายเกณฑ์ เช่น ลักษณะการสังเคราะห์ทางชีวภาพหรือทางเคมี ขนาดของมอนอเมอร์ จำนวนชนิดของมอนอเมอร์ และชนิดของพอลิเอสเทอร์ที่สะสมในเซลล์ จุลินทรีย์ (ดังแสดงในตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 การจำแนกชนิดของพลาสติกชีวภาพ (Luengo และคณะ, 2003)

Classification of microbial bioplastics according to different criteria.	
Biosynthetic origin	<p>Natural bioplastics: those produced by microorganisms from general metabolites (i.e. PHBs and aliphatic PHAs).</p> <p>Semisynthetic bioplastics: those that require the addition to the culture broth of some precursors that cannot be synthesised by the microbe (i.e. PHAs containing aromatic monomers)</p> <p>Synthetic bioplastics: those polyesters that resemble the natural ones but that can only be obtained by chemical synthesis (i.e. synthetic thermoplastic polymers)</p>
Chemical nature of the monomers	<p>Bioplastic containing aliphatic fatty acid derivatives: saturated or unsaturated (with double or triple bonds) monomers; linear or branched monomers; substituted or not (with functional groups in the monomers).</p> <p>Bioplastics containing aromatic fatty acid derivatives</p> <p>Bioplastics containing both aliphatic and aromatic fatty acid derivatives</p> <p>Bioplastics containing other different compounds (e.g. poly-g-glutamic acid, poly-e-L-lysine, poly-b-L-malic acid, polyglycolic acid, cyanophycin)</p>
Monomer size	<p>Bioplastics containing a short-chain length (sclPHB and derivatives sclPHAs; C3–C5 monomers)</p> <p>Bioplastics containing a medium-chain length (mclPHAs; C6–C14)</p> <p>Bioplastics containing a long-chain length (lclPHAs; &gt;C14)</p>
Number of monomers in the polyesters	<p>Homopolymeric bioplastic: a single monomer is present in the bioplastic</p> <p>Heteropolymeric bioplastic (copolymer): more than one monomer is present in the bioplastic</p>
Type of polyesters accumulated by the microbe	<p>Unique (a single bioplastic)</p> <p>More than one (mixed bioplastics)</p>

*ชนิดของมอนอเมอร์*

จำแนกตามจำนวนคาร์บอน แบ่งออกเป็น 2 ประเภท

1. Short Chain Length (SCL) มีจำนวนคาร์บอน 3-5 อะตอม เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) เป็นต้น

2. Medium Chain Length (MCL) มีจำนวนคาร์บอน 6-16 อะตอม เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) เป็นต้น

### ชนิดของพอลิเมอร์

จำแนกตามจำนวนชนิดของมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสาย PHA แบ่งออกเป็น 2 ประเภท

1. โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน ตัวอย่างเช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ PHB
2. เฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ดังนี้
  - โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือ P(3HB - co - 3HV) หรือ PHBV
  - เทอริพอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB-3HV - 4HB)

### 2.2 การสังเคราะห์ PHA โดยสิ่งมีชีวิต

การสังเคราะห์ PHA ทำได้โดยกระบวนการทางเคมีหรือจากกระบวนการทางชีวภาพ (Kemnitzer และคณะ, 1993 ; He และคณะ, 1999) พบว่าการสังเคราะห์จากกระบวนการทางชีวภาพ (biosynthesis) ได้สารที่น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าการใช้วิธีทางเคมี แต่ไม่สามารถควบคุมโครงสร้างของมอนอเมอร์ในสายพอลิเมอร์ของ PHA ได้ เนื่องจากความจำเพาะของเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ คือ PHA polymerase หรือ PHA synthase การสังเคราะห์ PHA โดยจุลินทรีย์สามารถทำได้ในภาวะที่เหมาะสม โดยใช้แหล่งคาร์บอนหรือสารอาหารที่มีอยู่มาก เช่น แป้ง น้ำตาล กรดไขมัน รวมทั้งสามารถใช้สารอาหารในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมได้ ดังนั้นการสังเคราะห์ PHA จึงเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และมีความยั่งยืนสามารถใช้ทดแทนพลาสติกที่มีผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีซึ่งมีแนวโน้มการใช้ลดลงในอนาคตด้วย

### 2.3 ลักษณะทางชีวโมเลกุลและชีวเคมีของการสังเคราะห์ PHA

จากการศึกษาการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ PHA ในหลายปีที่ผ่านมาพบว่า  $\beta$ -hydroxyalkanoyl-CoA เป็นสารตั้งต้นหลักสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์ PHA synthase โดยที่  $\beta$ -hydroxyalkanoyl-CoA ได้มาจาก Acetyl-CoA หรือได้จากกระบวนการบีตาออกซิเดชัน ( $\beta$ -oxidation) ของกรดไขมัน นอกจากนี้ยังมีอื่นหลายๆ ยีน ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHA หลายชนิด แตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ (ดังแสดงในตารางที่ 2.1) โดยที่กระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพสามารถเกิดขึ้นได้จากหลายกระบวนการ (ดังแสดงในภาพ

ที่ 2.1 ตารางที่ 2.1) กระบวนการสังเคราะห์แบบที่ 1 เกี่ยวข้องกับเอนไซม์หลัก 3 ชนิด คือ  $\beta$ -ketothiolase, NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase และ acetoacetyl-CoA reductase โดยที่ PHA synthase ควบคุมโดยยีน *phaA*, *phaB* และ *phaC* กระบวนการนี้พบใน *Ralstonia eutropha* ในขณะที่เดียวกันพบกระบวนการที่เกิดขึ้นคู่ขนานกัน คือ กระบวนการย่อยสลายของ PHA (PHA degradation) ซึ่งควบคุมโดยเอนไซม์ PHA depolymerase, dimer hydrolase, 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, และ acetoacetyl-CoA synthase กระบวนการนี้พบใน *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas stutzeri*, *R. eutropha*, และ *Pseudomonas oleovorans* (Sudesh และคณะ, 2000)

กระบวนการสังเคราะห์แบบที่ 2 เกี่ยวข้องกับการใช้กรดไขมัน (fatty acid) ของจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการปฏิกิริยาออกซิเดชัน ( $\beta$ -oxidation) โดยหลังจากเกิดกระบวนการนี้จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ PHA คือ 3-hydroxyacyl-CoA และมีการสังเคราะห์ PHA โดยใช้เอนไซม์ 3-ketoacyl-CoA reductase, epimerase, (*R*)-enoyl-CoA hydratase/enoyl-CoA hydratase I, acyl-CoA oxidase (putative), and enoyl-CoA hydratase I (putative) กระบวนการสังเคราะห์แบบนี้พบในการสังเคราะห์ medium chain length (mcl) หรือโคพอลิเมอร์ เช่น (*R*)-3-hydroxybutyrate (R3HB) และ (*R*)-3-hydroxyhexanoate (PHBHHx) ของ *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, และ *A. hydrophila*

กระบวนการสังเคราะห์แบบที่ 3 มีการสร้าง PHA monomer 3-hydroxyacyl-CoA จาก 3-hydroxyacyl-ACP โดยใช้เอนไซม์ 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transferase (PhaG) และ malonyl-CoA-ACP transacylase (FabD) จากนั้นควบคุมการสังเคราะห์ PHA โดย PHA synthase (Sudesh และคณะ, 2000; Zheng และคณะ, 2005; Taguchi และคณะ, 1999)

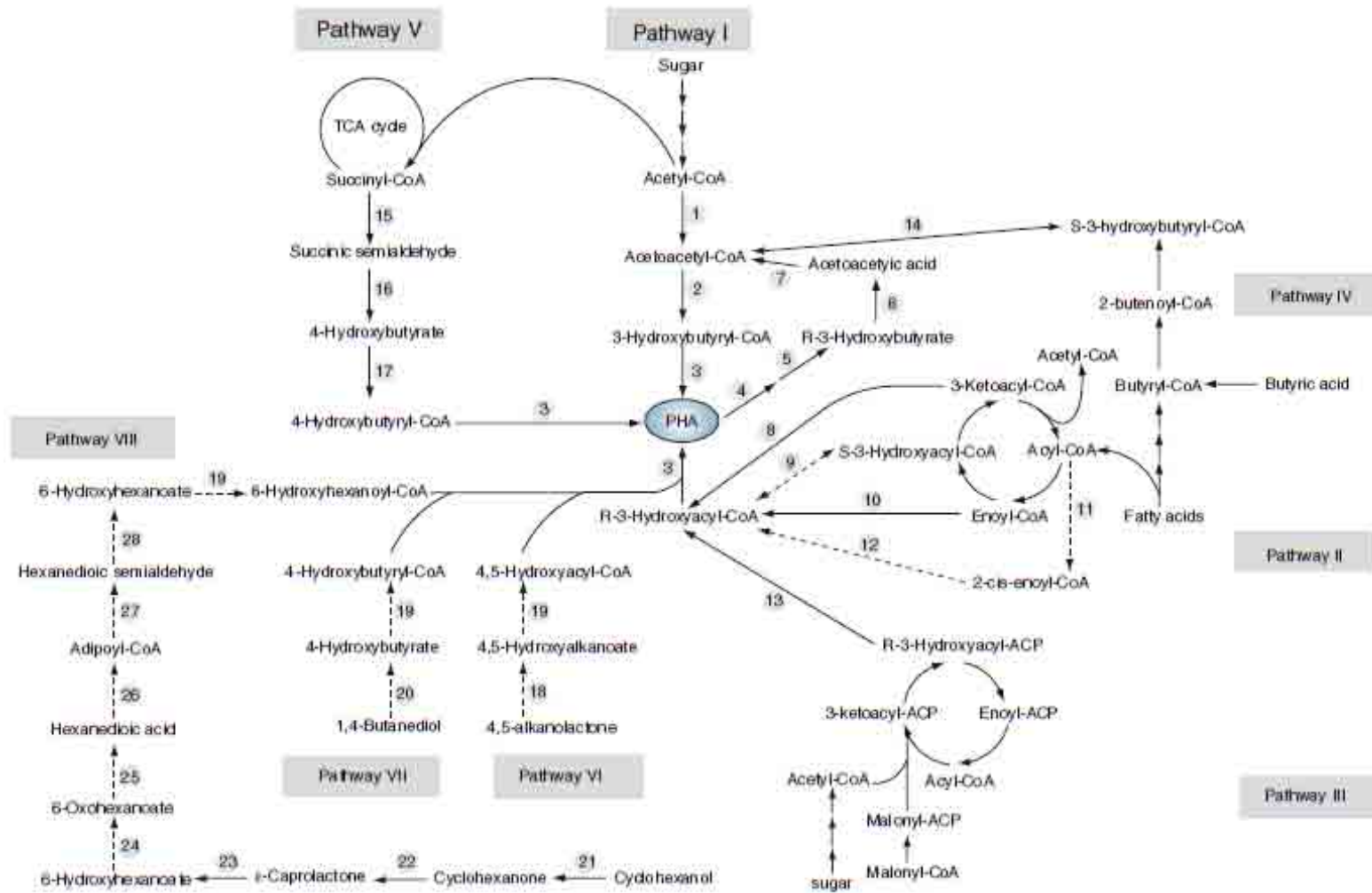
กระบวนการสังเคราะห์แบบที่ 4 เอนไซม์ NADH-dependent acetoacetyl-CoA reductase เปลี่ยน (*S*)-(+)-3-hydroxybutyryl-CoA เป็น acetoacetyl-CoA จากนั้นจึงสังเคราะห์เป็น poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] (PHB) พบใน *Rhizobium (Cicer) sp. strain CC 1192* (Chohan และ Copeland 1998)

กระบวนการสังเคราะห์แบบที่ 5 สังเคราะห์ 4-hydroxybutyrate จาก 4-hydroxybutyryl-CoA โดยใช้เอนไซม์ succinic semialdehyde dehydrogenase (SucD) พบใน *Clostridium kluyveri* (Valentin และ Dennis 1997).

กระบวนการสังเคราะห์แบบที่ 6 เอนไซม์ lactonase และ hydroxyacyl-CoA synthase เปลี่ยน 4,5-alkanolactone เป็น 4,5-hydroxyacyl-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ PHA (Valentin และ Steinbüchel 1995)

กระบวนการสังเคราะห์แบบที่ 7 1,4-butanediol ออกซิไดส์เป็น 4-hydroxybutyrate โดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase จากนั้นเปลี่ยนเป็น 4-hydroxybutyryl-CoA และมีการสังเคราะห์ PHA พบใน *A. hydrophila* 4AK4 (Xie และ Chen 2008)

กระบวนการสังเคราะห์แบบที่ 8 ใช้เอนไซม์ทั้งหมด 8 ชนิด ในการเปลี่ยน cyclohexanol เป็น 6-hydroxyhexanoate และ PHA เช่น Cyclohexanol dehydrogenase 6-Hydroxyhexanoate dehydrogenase Hydroxyacyl-CoA synthase, putative เป็นต้น (ดังแสดงในตารางที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 กระบวนการสังเคราะห์ PHA



ตารางที่ 2.2 เอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์

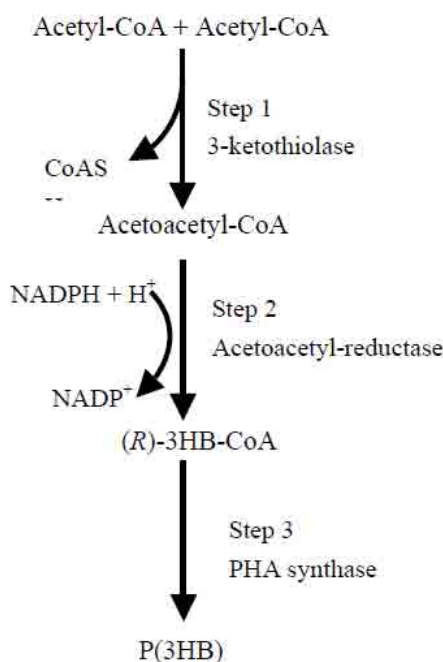
No.	Pathway	Abbreviation	Enzyme	Species	Reference
1	Pathway I	PhaA	Beta-Ketothiolase	<i>Ralstonia eutropha</i>	Sudesh และคณะ, 2000
2		PhaB	NADPH dependent acetoacetyl-CoA reductase		
3		PhaC	PHA synthase		
4	Associated Way	PhaZ	PHA depolymerase	<i>Aeromonas hydrophila</i> 4AK4	Sudesh และคณะ, 2000
5			Dimer hydrolase		
6			(R)-3-Hydroxybutyrate dehydrogenase		
7	Pathway II	FabG	Acetoacetyl-CoA synthetase	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Sudesh และคณะ, 2000
8			3-Ketoacyl-CoA reductase		
9			Epimerase		
10	Pathway III	PhaJ	(R)-Enoyl-CoA hydratase/enoyl-CoA hydratase I Acyl-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sudesh และคณะ, 2000
11			CoA oxidase, putative		
12			Enoyl-CoA hydratase I, putative		
13	Pathway III	PhaG	3-Hydroxyacyl-ACP-CoA transferase	<i>Pseudomonas mendocina</i> , Recombinant <i>Escherichia coli</i>	Sudesh และคณะ, 2000; Zheng และคณะ, 2005; Taguchi และคณะ, 1999
		FabD	CoA-ACP tranacylase		
14	Pathway IV	SucD	NADH-dependent acetoacetyl-CoA reductase	<i>Rhizobium</i> (Cicer) sp. CC 1192	Chohan และ Copeland, 1998
15			Succinic semialdehyde dehydrogenase		
16	Pathway V	4hbD	4-Hydroxybutyrate dehydrogenase	<i>Clostridium kluyveri</i>	Valentin และ Dennis, 1997
17			4-Hydroxybutyrate-CoA:CoA transferase		
18	Pathway VI		Lactonase, putative	Mutants and recombinant of <i>Alcaligenes eutrophus</i>	Valentin และ Steinbüchel, 1995
19			Hydroxyacyl-CoA, putative		
20	Pathway VII		Alcohol dehydrogenase, putative	<i>A. hydrophila</i> 4AK4	Xie และ Chen, 2008
21	Pathway VIII	ChnA	Cyclohexanol dehydrogenase	<i>Acinetobacter</i> sp. SE19, <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU	Brzostowicz และคณะ, 2002
22		ChnB	Cyclohexanone monooxygenases		
23		ChnC	Caprolactone hydrolase		
24		ChnD	6-Hydroxyhexanoate dehydrogenase		
25		ChnE	6-Oxohexanoate dehydrogenase		
26			Semialdehyde dehydrogenase, putative		
27			6-Hydroxyhexanoate dehydrogenase, putative		
28			Hydroxyacyl-CoA synthase, putative		

## 2.4 พลาสติกชีวภาพกลุ่ม SCL-PHAs

ชนิดของพลาสติกชีวภาพที่มีการศึกษากันส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ Short Chain Length (SCL) เนื่องจากมีสมบัติทางฟิสิกส์และสมบัติเชิงกลที่ใกล้เคียงกับพลาสติกที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี และสามารถย่อยสลายได้สมบูรณ์ในสิ่งแวดล้อม (Nanthini และคณะ, 2006) PHAs ในกลุ่มนี้ เช่น P(3HB), P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-4HB) และ P(3HB-co-3HHx)

### 2.4.1 โอลิโพลิเมอร์

P(3HB) เป็นโพลิเมอร์ชนิดแรกที่พบว่าสร้างและสะสมภายในเซลล์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะขาดแคลนสารอาหารหรือในภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อเซลล์ (Dawes และ Senior, 1973) โดยมีการศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมและการควบคุมการสังเคราะห์ P(3HB) ในเซลล์จุลินทรีย์หลายชนิด เช่น การสังเคราะห์ P(3HB) ใน *Wautersia eutropha* ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (ดังแสดงในภาพที่ 2.3) และมี  $\beta$ -ketothiolase เป็นเอนไซม์หลักที่ควบคุมการสังเคราะห์ P(3HB)



ภาพที่ 2.3 ภาวะการทำงานของเอนไซม์สำหรับการสังเคราะห์ PHA

### ภาวะการเจริญไม่สมดุล (imbalanced growth conditions)

เอนไซม์ citrate synthase ถูกยับยั้งจากภาวะที่เซลล์ขาดสารอาหาร ทำให้ระดับของ NADH และ acetyl-CoA เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อความเข้มข้นของ coenzyme A ลดลง ทำให้ 3-ketothiolase ไม่ถูกยับยั้งโดย coenzyme A และเกิดการสังเคราะห์ P(3HB)

### ภาวะสมดุล (balanced growth conditions)

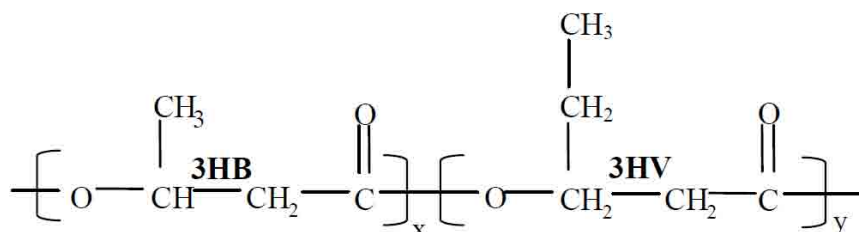
acetyl-CoA ที่ได้จาก TCA cycle ลดลง ส่งผลให้ 3-ketothiolase ถูกยับยั้งจาก coenzyme A ที่เพิ่มสูงขึ้น และหยุดการสังเคราะห์ P(3HB)

### สมบัติทางกายภาพของ P(3HB)

มีการศึกษาสมบัติทางกายภาพของ P(3HB) เปรียบเทียบกับพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี พบว่า สมบัติทางกายภาพของ P(3HB) เช่น tensile strength เท่ากับ 43 MPa มีค่าใกล้เคียงกับ polypropylene (PP) ซึ่งเท่ากับ 38 MPa แต่อย่างไรก็ตาม P(3HB) มี % elongation เท่ากับ 5 % ซึ่งต่ำกว่า PP (400%) ทำให้ P(3HB) มีความแข็งและเปราะมากกว่าเมื่อเทียบกับ PP

### 2.4.2 โคพอลิเมอร์

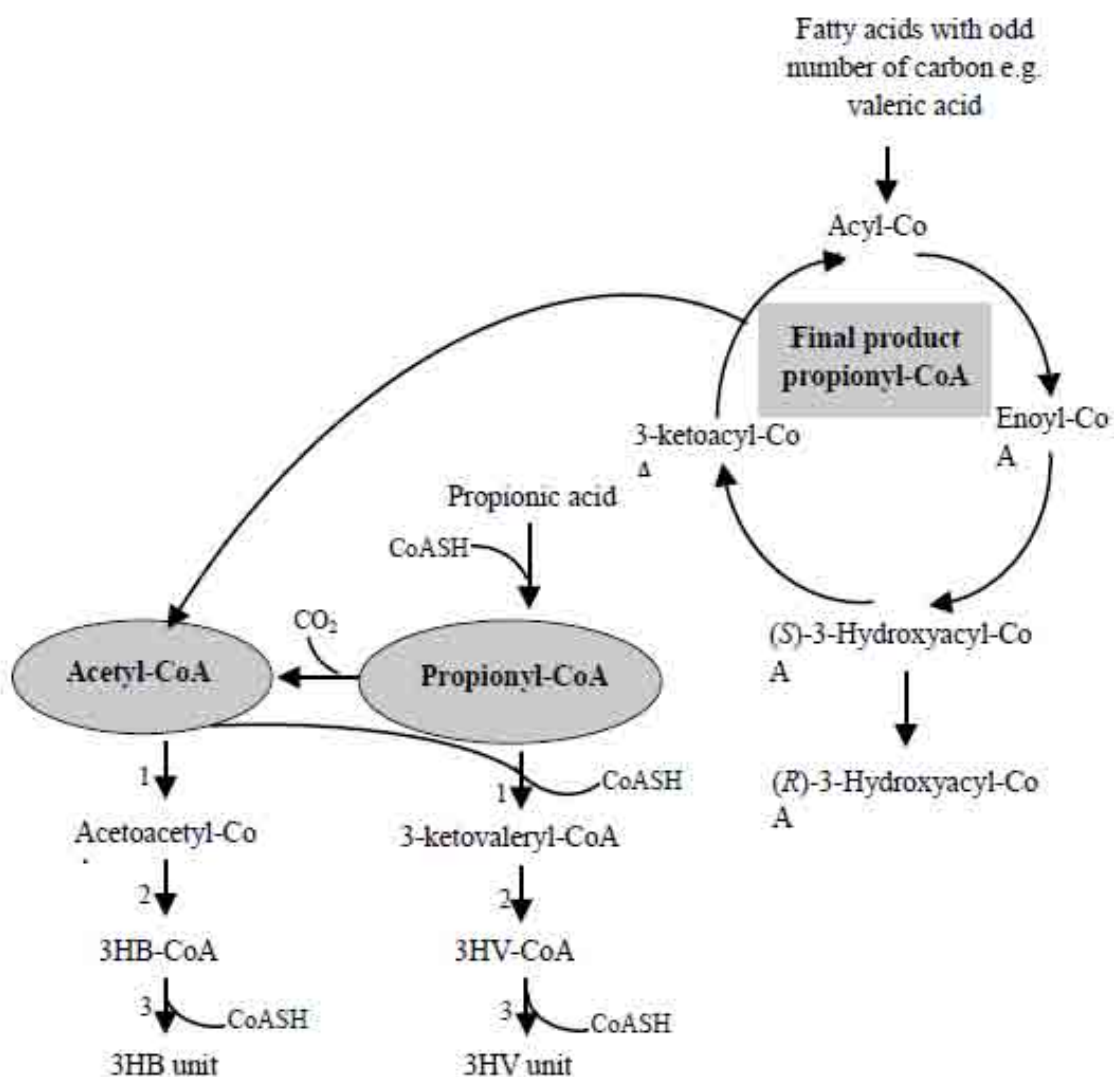
การสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ โดยส่วนใหญ่ประกอบไปด้วย C3 และ C5 เช่น poly[(R)-3-hydroxypropionate-co-(R)-3-hydroxybutyrate] นอกจากนี้ใน *Pseudomonas* spp. ยังมีการสะสมของ mcl PHA ที่ประกอบด้วย C6 - C12 เช่น poly[(R)-3-hydroxyhexanoate-co-(R)-3-hydroxyoctanoate-co-(R)-3-hydroxydecanoate] และ poly[(R)-3-hydroxyhexanoate-co-(R)-3-hydroxyoctanoate-co-(R)-3-hydroxydecanoate-co-(R)-3-hydroxydodecanoate] (Lageveen และคณะ, 1988) โดยทั้ง scl copolymer และ mcl copolymer มีสมบัติที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาและใช้งานในรูปแบบต่างๆ มากกว่าโฮโมพอลิเมอร์ ซึ่งได้มีการพัฒนาโคพอลิเมอร์ชนิด Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) หรือ [P(3HB-co-3HV)] หรือ PHBV ซึ่งมีสมบัติที่ดีกว่า P(3HB) คือ มีความยืดหยุ่นและแข็งแรงมากขึ้น รวมทั้งมีความเป็นผลึกและจุดหลอมเหลวลดลงทำให้ง่ายต่อกระบวนการขึ้นรูป (Suriyamongkol และคณะ, 2007)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของ P(3HB-co-3HV)

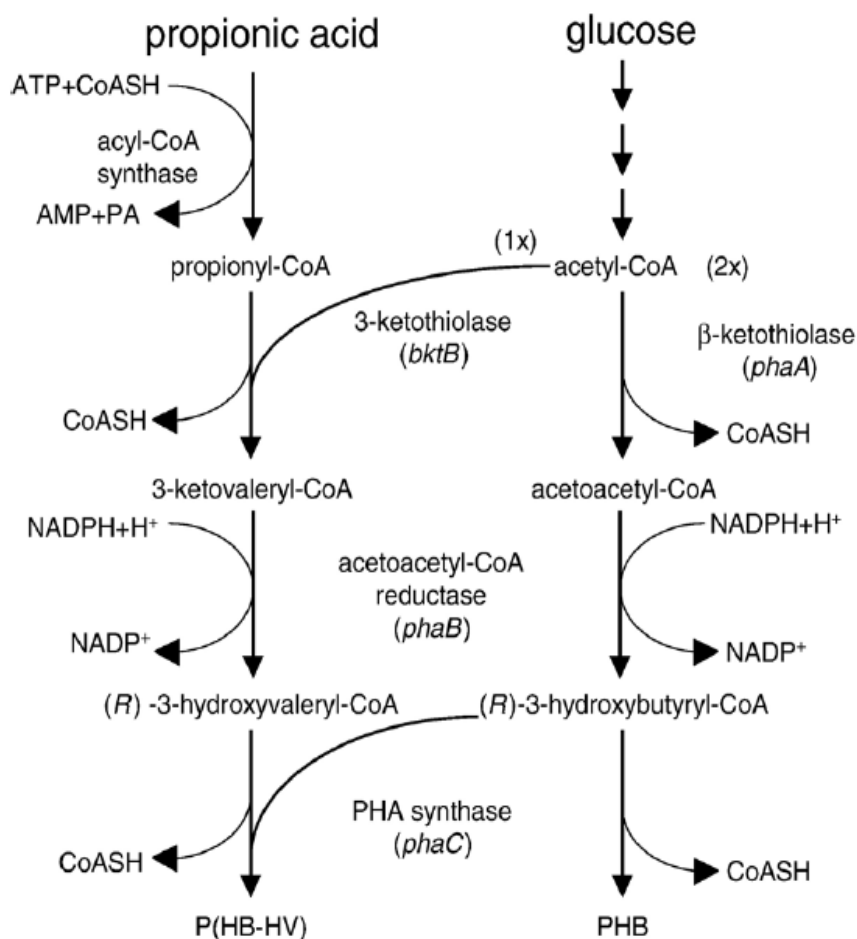
### 2.4.2.1 การสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV)

การสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) (ดังแสดงในภาพที่ 2.4) ต้องการสารตั้งต้น 2 ชนิด คือ 3HB-CoA และ 3HV-CoA แล้วจึงพอลิเมอไรซ์ (polymerize) เป็น scl PHA โดยเอนไซม์ PHA synthase (Steinbüchel และคณะ, 2003) โดยที่ 3HV-CoA ได้จาก propionyl-CoA ร่วมกับ acetyl-CoA ได้เป็น 3-ketovaleryl-CoA และสุดท้ายได้เป็น 3HV-CoA (ดังแสดงในภาพที่ 2.5 ภาพที่ 2.6 ภาพที่ 2.7)

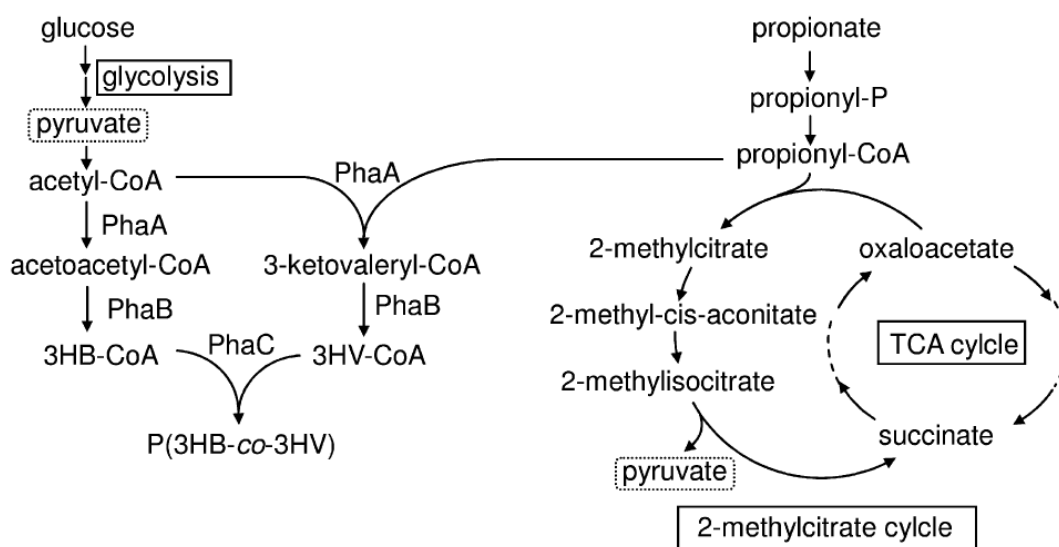


ภาพที่ 2.5 กระบวนการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) จากกรดโพรพิโอนิกและกรดไขมันต่างๆ ที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคี่ โดยใช้เอนไซม์ 1, 3-ketothiolase; 2, NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase; 3, PHA synthase

การสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) สามารถสังเคราะห์ได้จากสารตั้งต้นหลายชนิดเช่น กรดไขมันอะลิฟาติก ที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคี่ เช่น propionic valeric heptanoic และ nonanoic acids เพราะสารตั้งต้นเหล่านี้จะเกิดกระบวนการปฏิกิริยาออกซิเดชัน ( $\beta$  - oxidation) และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น acetyl-CoA จากนั้นรวมกับ propionyl-CoA ที่ได้จากกรดโพรพิโอนิกได้เป็นมอนอเมอร์ของ 3HV นอกจากนี้การศึกษาการสังเคราะห์ P(3HB-CO-3HV) จากสารตั้งต้นอื่นๆ เช่น 4-ketovaleric acid (Valentin และ Steinbüchel, 1995) n-pentanol (Yamane และคณะ, 1996) และกรดไขมันต่างๆ เช่น valine isoleucine threonine และ methionine (Steinbüchel และ Lütke-Eversloh, 2003)



ภาพที่ 2.6 กระบวนการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) จากกลูโคสและกรดโพรพิโอนิก โดย *R. eutropha*



ภาพที่ 2.7 กระบวนการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) จากกลูโคสและโพรพิโอเนต โดย *R. eutropha*

ดังนั้นการเติมสารตั้งต้นของ 3HV จึงจำเป็นสำหรับการสร้าง 3HV-CoA ซึ่งในอุตสาหกรรมได้มีการพัฒนาการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ให้มีองค์ประกอบของมอนอเมอร์ 3HV ตั้งแต่ 0 – 30 โมลเปอร์เซ็นต์ โดย Imperial Chemical Industries (ICI) ที่พัฒนาการผลิตโดยการเติมกรดโพรพิโอนิกและกลูโคส ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ 3HV และ 3HB ตามลำดับ (Byrom, 1992 ; Holmes และคณะ, 1985) การใช้กรดโพรพิโอนิกมีข้อด้อยอยู่ 2 ประการ คือ กรดโพรพิโอนิกไม่สร้างมอนอเมอร์ของ 3HV โดยตรง แต่เปลี่ยนเป็น acetyl-CoA ซึ่งเป็นสารตัวกลางของมอนอเมอร์ 3HB (Doi และคณะ, 1987) หมายความว่า การใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ก็สามารถสร้างและสะสมได้ทั้งมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV รวมถึงสัดส่วนของ 3HV ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของสารตั้งต้น 3HV ต่อสารตั้งต้นของ 3HB ด้วย (Doi และคณะ, 1987 ; Doi, 1990) (ดังแสดงในตารางที่ 2.4) ข้อเสียเปรียบอีกประการ คือ การใช้กรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้นสูงเกินไปทำให้เกิดพิษต่อเซลล์และทำให้เซลล์ตายได้ (Yu และคณะ, 2002) ดังนั้นการใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นสารตั้งต้น จึงต้องมีการติดตามและเติมในความเข้มข้นต่ำ เพื่อป้องกันการเกิดพิษต่อเซลล์และยับยั้งการเจริญของเซลล์

### 2.4.2.2 ผลของสัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV ต่อสมบัติด้านต่างๆ

สมบัติทางกายภาพของ P(3HB-co-3HV) ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV (ดังแสดงในตารางที่ 2.3) โดยค่า Young's Modulus ลดลงเมื่อสัดส่วนของ 3HV เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0-25 โมลเปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ P(3HB-co-3HV) มีความเหนียวและยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น ทำให้ทนต่อแรงได้มากขึ้น และโดยทั่วไปแล้ว tensile strength จะลดลงเมื่อสัดส่วนของ 3HV เพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 2.3 สมบัติทางกายภาพและอุณหภูมิของ P(3HB-co-3HV) เปรียบเทียบกับ PP (Holmes และคณะ, 1985 ; Doi, 1990)

Properties	P(3HB-co-3HV) [3HV composition (mol%)]									PP
	0	3	9	11	14	20	25	28	34	
Melting temperature, $T_m$	179	170	162	157	150	145	137	102	97	178
Glass transition temperature, $T_g$	10	8	6	9	4	-1	-6	-8	-9	-
Young's Modulus (GPa)	3.5	2.9	1.9	3.8	1.5	1.2	0.7	1.5	1.2	1.7
Tensile strength (MPa)	40	38	37	45	35	32	30	21	18	39

### 2.4.2.3 การสร้างและสะสม P(3HB-co-3HV) โดยจุลินทรีย์บางชนิด

มีรายงานการศึกษาการสร้างและสะสม P(3HB-co-3HV) จากแบคทีเรียหลายชนิด โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (ดังแสดงในตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 แบคทีเรียที่สร้างและสะสม P(3HB-co-3HV) จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	อ้างอิง
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	กรดโพรฟิโอนิก	Holmes, 1985
<i>Pseudomonas cepacia</i>	ฟรุกโตสและกรดโพรฟิโอนิก	Ramsay และคณะ, 1990
<i>Methylobacterium extorquens</i>	เมธานอลและไซเดียมวาเลอเรต	Bourgue และคณะ, 1992
<i>Chromobacterium violaceum</i>	กรดวาเลอริก	Steinbüchel และคณะ, 1992
<b>Bacillus sp. ชนิดต่างๆ</b>		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	กลูโคสและกรดโพรฟิโอนิก	Chen และคณะ, 1991
<i>Bacillus mycoides</i>	กลูโคสและกรดวาเลอริก	
<i>Bacillus sphaericus</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Bacillus thuringiensis</i>		
<i>Bacillus megaterium</i>		
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Bacillus circulans</i>		

#### 2.4.2.4 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิต P(3HB-co-3HV)

##### แหล่งคาร์บอน

ปัจจุบันราคาของพลาสติกชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ยังมีราคาสูง (กิโลกรัมละ 16 ดอลลาร์สหรัฐ) เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกจากปิโตรเคมี (Byrom, 1994) เนื่องจากกระบวนการสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ซึ่งเป็นส่วนที่มีค่าใช้จ่ายสูง (Ramsay และคณะ, 1990) ดังนั้นการเลือกแหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและมีราคาถูก จึงเป็นทางเลือกในการช่วยลดต้นทุนการผลิตรวมทั้งสามารถผลิต P(3HB-co-3HV) ที่มีสมบัติที่เหมาะสมด้วย จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต P(3HB-co-3HV) โดยการเลือกใช้แหล่งคาร์บอน(ดังแสดงในตารางที่ 2.5) ที่มีราคาถูก



ตารางที่ 2.5 ชนิดของแหล่งคาร์บอนราคาถูกที่ใช้ในการผลิต P(3HB-co-3HV) โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

แหล่งคาร์บอน	ชนิดของจุลินทรีย์	อ้างอิง
Hydrolyzed corn oil	<i>Pseudomonas putida</i>	Shang และคณะ, 2008
Sugar cane molasses	Mixed bacteria	Albuquerque และคณะ, 2007
Enzymatic extruded starch	<i>Haloferax mediterranei</i>	Chen และคณะ, 2006
Paper mill wastewater	Activated sludge	Bengtsson และคณะ, 2008
Plant oils	<i>Cupriavidus necator</i> H16	Lee และคณะ, 2008

### ผลของแหล่งคาร์บอนต่อสัดส่วนของ 3HV

โดยในการศึกษาวิจัยมีทั้งการใช้แหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวและแหล่งคาร์บอนผสม ซึ่งการศึกษาของ สุดา สุภาวสินสวัสดิ์ (2542) พบว่า เมื่อใช้โพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว ได้สัดส่วนของ 3HV เพียง 2 โมลเปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Doi และคณะ (1987) ที่ศึกษาการผลิต P(3HB-co-3HV) โดยเชื้อ *Alcaligenes eutropha* รายงานว่า เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว โพรพิโอนิกถูกนำไปใช้สังเคราะห์หีมอนอเมอร์ 3HB มากกว่า 3HV เนื่องจากโพรพิโอนิลโคเอภายในเซลล์ จะถูกสลายเป็นอะเซทิลโคเอ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ 3HB เช่นเดียวกับ Lee และคณะ (1994) พบว่า เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเพียงอย่างเดียว พบการสะสมของไพรูเวท (pyruvate) ในปริมาณสูง เช่นเดียวกับในอาหารที่มีปริมาณกลูโคสสูง ซึ่งอาจเนื่องมาจากกระบวนการกลูโคนีโอเจเนซิส (gluconeogenesis) ของอะเซทิลโคเอ จึงทำให้มีการผลิตมอนอเมอร์ของ 3HB ซึ่งใช้อะเซทิลโคเอเป็นสารตั้งต้นได้สูงกว่าการผลิต 3HV จะเห็นได้ว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยวทำให้ได้สัดส่วนของ 3HV ต่ำ ดังนั้นการใช้แหล่งคาร์บอนผสมเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์จึงเหมาะสมมากกว่า

การผลิต P(3HB-co-3HV) ทำได้โดยการเติมกรดหรือเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดโพรพิโอนิก กรดวาเลอริก โซเดียมโพรพิโอเนต หรือโซเดียมวาเลอเรต ร่วมกับแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาล โดยการศึกษาของ Park และคณะ (1997) ได้รายงานว่ *Bacillus thuringiensis* R-510 สามารถผลิต P(3HB-co-3HV) ได้สูง จากการใช้ยับสเตรตเป็นโซเดียมโพรพิโอเนตกับกลูโคส นอกจากนี้ Obruca และคณะ (2010) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Cupriavidus necator* โดยใช้โพรพิโอเนตและวาเลอเรต พบว่า การใช้วาเลอเรตให้สัดส่วนของ 3HV สูงกว่า แต่ได้ความเข้มข้นเซลล์ และ P(3HB-co-3HV) ต่ำกว่าการใช้โพรพิโอเนต Lee และคณะ, 2008 ศึกษาการเปรียบเทียบการผลิต P(3HB-co-3HV) จากการเลี้ยงเชื้อ *Cupriavidus necator* H16

พบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำมันพืชกับโซเดียมโพรพิโอเนต ได้ P(3HB-co-3HV) สูงกว่าการใช้กับโซเดียมวาเลอเรต และ สูดา สุภาววินสวัสดิ์ (2542) ศึกษาการผลิต P(3HB-co-3HV) โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่า การใช้โพรพิโอเนต ในรูปของเกลือโซเดียม ทำให้ได้โคพอลิเมอร์สูงกว่าการใช้กรดโพรพิโอนิกและกรดวาเลอริก

สำหรับงานวิจัยนี้ เลือกใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและน้ำตาลในน้ำอ้อยเป็นสารตั้งต้นของมอนอเมอร์ 3HB เพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกมากในประเทศไทย และเป็นพืชที่สามารถตัดและเก็บเกี่ยวได้หลายครั้ง ซึ่งในน้ำอ้อยจะประกอบไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์อยู่หลายชนิด เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรักโตส รวมทั้งวิตามินและธาตุอาหารเป็นจำนวนมาก (ดังแสดงในตารางที่ 2.6) จึงสามารถนำมาใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้

ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบของน้ำอ้อย (มิตรผลวิจัย, 2551)

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

การใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต P(3HB-co-3HV) มีข้อดีคือ มีขั้นตอนการเตรียมก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก (pretreatment) เพียงเล็กน้อย และได้จากขั้นตอนแรกของ

กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งถือว่าประหยัดพลังงาน รวมทั้งการแยกและทำบริสุทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ทำได้ง่ายมากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลทรายหรือกากน้ำตาล และการบำบัดของเหลือทิ้งจากน้ำหมัก (effluent treatment) ก็ทำได้ง่ายและสะดวก

เลือกใช้โซเดียมโพรพิโอเนต เป็นสารตั้งต้นของมอนอเมอร์ 3HV เนื่องจากสามารถผลิตได้ P(3HB-CO-3HV) ได้สัดส่วนของ 3HV ที่เหมาะสม และมีราคาถูกกว่าโซเดียมวาเลอเรต 2 เท่า

### แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Nelson และ Cox, 2005) โดยที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการไนโตรเจนแตกต่างกันออกไป สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ใช้สำหรับการผลิต PHAs สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท (Annuaire และ คณะ, 2008) ดังนี้

#### (1) แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปของกรดอะมิโน เคซีน เปปโติน ยีสต์ สกัด สารสกัดจากเนื้อ หรือยูเรีย เป็นต้น

#### (2) แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน

แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหมัก ได้แก่

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

แหล่งไนโตรเจนที่นิยมนำมาใช้ในการผลิต PHAs และมีราคาถูก ได้แก่  $\text{NH}_4\text{Cl}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  โมโนโซเดียมกลูตาเมต และยูเรีย (Groom และคณะ, 1998; Quillaguamán และคณะ, 2008) โดยแหล่งไนโตรเจนที่กล่าวมาพบว่ายูเรียมีราคาถูกที่สุด (Lee และคณะ, 2008)

## 2.5 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิต PHA

### 2.5.1 ระดับขวดเขย่า (shake flask)

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

### 2.5.2 ระดับถังหมักห้องปฏิบัติการ (lab scale fermenter)

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

#### 2.5.2.1 กระบวนการหมักแบบแบช (Batch cultivation)

เป็นกระบวนการหมักที่ทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ภายในระบบปิด โดยเลือกใช้สารอาหารและภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ของเซลล์ สารอาหารที่ใช้ในระบบปิดมีปริมาณจำกัด เนื่องจากไม่มีการเติมสารอาหารเพิ่มลงไป เมื่อสารอาหารถูกใช้หมด อาจทำให้ภาวะภายในถังหมักเปลี่ยนแปลง เช่น ความเป็นกรดต่างเปลี่ยนไป มีการสะสมสารพิษ เป็นต้น โดยที่รูปแบบการเจริญหรือวัฏจักรการเจริญ (growth cycle) ในกระบวนการหมักแบบแบช แบ่งได้ดังนี้ (Aiba และคณะ, 1973; Scragg, 1991)

1. ระยะการพักตัว (lag phase) หลังจากการถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่ ระยะนี้จะไม่ค่อยเห็นการ

เปลี่ยนแปลงของการเจริญของเซลล์ โดยขึ้นกับเชื่อว่ามีสามารถในการปรับตัวเมื่อเจริญอยู่ในสภาพแวดล้อมใหม่ได้มากน้อยเพียงใด ดังนั้นถ้าอาหารและสิ่งแวดล้อมมีความเหมาะสมสำหรับการเจริญของเซลล์ ช่วงเวลาการพักตัวก็จะสั้นหรือไม่มีเลย โดยช่วงพักตัวอาจมีระยะยาวนานถ้าองค์ประกอบของอาหารแตกต่างจากอาหารที่ใช้เลี้ยงกล้าเชื้อมาก

2. ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (exponential หรือ log phase) หลังจากระยะการพักตัวแล้ว อัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเริ่มคงที่ โดยที่ภายใต้ภาวะนี้การสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์เพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ และต่อเนื่องอยู่ช่วงหนึ่ง อย่างไรก็ตามแม้ว่าช่วงนี้จะมีการเจริญที่สมดุลย์ แต่เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพที่ต่อเนื่องเช่นกัน เนื่องจากมีการใช้สารอาหาร และการสะสมสารผลิตภัณฑ์ควบคู่ไปด้วย

3. ระยะการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) เป็นช่วงสุดท้ายของการเจริญแบบทวีคูณ ซึ่งอัตราการเจริญลดลงจนกระทั่งถึงศูนย์ โดยน้ำหนักรวมของเซลล์แห้งเริ่มคงที่ โดยอาจมีการเจริญบ้างแต่มีใกล้เคียงกับการตายของเซลล์ สาเหตุที่เซลล์หยุดการเจริญเนื่องจากสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญหมดลง เกิดการสะสมสารพิษตลอดจนการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อม แต่การที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ได้ เนื่องจากมีการใช้สารที่เก็บสะสมในเซลล์เป็นแหล่งอาหาร

4. ระยะการตาย (death phase) เป็นระยะหลังจากการเจริญแบบคงที่ ซึ่งมีอัตราการตายเพิ่มมากกว่าอัตราการเจริญ

#### 2.5.2.1 กระบวนการหมักแบบเฟดแบช (Fed batch cultivation)

เป็นกระบวนการหมักแบบเติมสารอาหารที่ทำเป็นอย่างต่อเนื่องแล้วหยุด หรือใส่เป็นครั้งคราว โดยไม่มีการดึงเอาน้ำหมักออกจากระบบจนกว่าจะสิ้นสุดการหมัก (Yoshida และคณะ, 1984) กระบวนการนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับควบคุมการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* ในการเลี้ยงแบบแบชโดยใช้มอลต์เป็นสับสเตรต เนื่องจากมีปัญหาอยู่ 2 ประการ คือ ความเข้มข้นของมอลต์ที่สูงเกินไปทำให้ได้อทานอลเกิดขึ้นแทนการผลิตเป็นมวลชีวภาพ แต่ถ้าควบคุมให้มอลต์มีความเข้มข้นต่ำ การเจริญของยีสต์ก็จะถูกจำกัด ดังนั้นจึงใช้วิธีการเลี้ยงแบบเฟดแบชแทน โดยค่อยๆ เติมมอลต์ลงไปในช่วงการเลี้ยงเชื้อ

## 2.6 การผลิต P(3HB-co-3HV) โดยการเติมสารอาหาร

การศึกษาการผลิต P(3HB-co-3HV) ส่วนใหญ่เป็นการเติมสารอาหารแบบต่อเนื่อง (exponential feeding) ในการหมักแบบเฟดแบช ซึ่งสามารถเพิ่มผลผลิตได้ และมีบางงานวิจัยที่ไม่ได้เติมสารอาหารแบบต่อเนื่องแต่ใช้การเติมสารอาหารเป็นระยะ

Du และคณะ (2001) ศึกษาการผลิต P(3HB-co-3HV) จาก *Ralstonia eutropha* DSM 545 โดยใช้กลูโคสและกรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบ pulse feeding คือ การเติมกรดโพรพิโอนิกครั้งละเท่าๆ กัน นาน 24 ชั่วโมงโดยเติมเป็นระยะทุก 8 ชั่วโมง แปรรูปปัจจัยคือ ช่วงเวลาที่เริ่มเติมกรดโพรพิโอนิก (early growth phase, mid-phase และ late phase) และปริมาณกรดโพรพิโอนิกที่เติมในแต่ละครั้ง (1, 2, 3 และ 4 กรัมต่อลิตร) จากผลการทดลอง พบว่าการเติมกรดโพรพิโอนิกช่วงระยะ mid-phase ให้ความเข้มข้นของ P(3HB-co-3HV) สูงสุด โดยถ้าเติมกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้นสูง ได้สัดส่วนของ 3HV สูง และความเข้มข้นของ PHA ต่ำ แต่ถ้าเติมกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้นต่ำ ได้ความเข้มข้นของ PHA สูง และสัดส่วนของ 3HV ต่ำ

Marangoni และคณะ (2002) ศึกษาการผลิต P(3HB-co-3HV) จาก *Ralstonia eutropha* โดยใช้น้ำตาลและหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นเติมโพรพิโอเนตเป็นระยะทุก 1.5 ชั่วโมง โดยควบคุมความเข้มข้นของโพรพิโอเนตให้มีปริมาณที่ 1 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดลองได้ความเข้มข้นของ PHA เท่ากับ 3.93 กรัมต่อลิตร และสัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV เท่ากับ 38 โมลเปอร์เซ็นต์

การใช้วิธีเติมสารตั้งต้นของมอนอเมอร์ 3HV เป็นระยะ สามารถช่วยเพิ่มผลผลิต PHA ได้ปริมาณหนึ่ง ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการเติมที่ช่วงเวลาต่างๆ แทนการเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่อง อาจช่วยลดขั้นตอนหรือช่วยประหยัดพลังงานในการเลี้ยงเชื้อได้ด้วย สำหรับงานวิจัยนี้เลือกการเติมสารอาหารเพียงครั้งเดียว เนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นว่าเป็นเชื้อที่ใช้สารอาหารในการเจริญได้เร็ว และมีอายุการเจริญอยู่ในช่วง 3 ถึง 9 ชั่วโมง ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อแบบแบชและการเติมสารอาหารทั้งหมดลงเพียงครั้งเดียว (two-phase cultivation) น่าจะเหมาะสมที่จะช่วยให้เชื้อสามารถนำอาหารไปใช้ได้เพียงพอ อีกทั้งยังลดขั้นตอนและความยุ่งยากในการเลี้ยงเชื้ออีกด้วย ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบมากกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบช

## 2.7 แนวทางการประยุกต์ใช้ PHA (Chen, 2010b ; Bian และคณะ, 2009)

### 1. การประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรมและปศุสัตว์

1.1 ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุปุ๋ย ฮอร์โมน growth factors ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช โดยแคปซูลจะค่อยๆ สลายทีละน้อย ทำให้สารที่บรรจุข้างในถูกปล่อยออกมาให้สารคงอยู่ในดินหรือตำแหน่งที่ต้องการใช้งานได้เป็นเวลานาน จึงเป็นการช่วยประหยัดแรงงาน เวลา และลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้ยังใช้ทำเป็นผ้าพลาสติกคลุมดินรักษาความชื้น ซึ่งเมื่อหมดเวลาการใช้งานจะค่อยๆ ถูกย่อยสลายไปโดยธรรมชาติ

1.2 ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยาโรคและวัคซีนต่างๆ ในสัตว์เลี้ยง เช่น วัคซีนป้องกันโรคระบบทางเดินหายใจ และบรรจุยาประเภทที่มีกลไกการออกฤทธิ์นาน เป็นต้น

### 2. การใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

PHAs ถูกนำมาใช้งานทางการแพทย์เนื่องจากความสามารถเข้ากับได้กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ (biocompatibility) ความสามารถถูกดูดซึม (bioresorbable) และยังสามารถย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradable)

2.1 วัสดุสิ้นเปลืองในงานด้านศัลยกรรม เช่น ใช้ทำหลอดเลือดเทียม เข็มเย็บแผล ไหมเย็บแผล ผ้าซับเลือด และผ้าสมานแผล เป็นต้น

2.2 วัสดุเพื่อการบำบัดรักษาโรค ได้แก่ แคปซูลบรรจุยา หรือวัคซีนที่ต้องการให้ด้วยาค่อยๆ ปล่อยออกมาทีละน้อย เป็นระยะเวลาานาน ใช้ทำกระดูกเทียมโดยอาศัยสมบัติเป็น piezoelectric ของ PHA ซึ่งคล้ายกับสมบัติที่มีในกระดูกธรรมชาติ จึงใช้เป็นแผ่นยึดกระดูก มีผลต่อการสร้างกระดูกใหม่ขึ้นทดแทน

### 3. การใช้เป็นวัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์ หรือส่วนประกอบของอุปกรณ์บางประเภท

ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก PHA เช่น ฟ้านามัย ฟ้าย้อมสำเร็จรูป ด้ามมีดโกน ขวดแชมพู ขวดใส่น้ำมันเครื่องรถยนต์ ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป และแผ่นฟิล์มถนอมอาหาร เป็นต้น

## 2.8 การผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม

ปัจจุบันมีการพัฒนาการผลิตพลาสติกชีวภาพ PHA ในระดับอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวางโดยชนิดของพลาสติกชีวภาพที่สามารถผลิตได้มีหลายชนิดแตกต่างกันในแต่ละบริษัท (ดังแสดงในตารางที่ 2.7)

ตารางที่ 2.7 บริษัทที่มีการพัฒนาการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHA (Chen, 2010a)

Company	Types of PHA	Production scale (tons/year)	Period	Applications
ICI, UK	PHBV	300	1980-1990	Packaging
Chemie Linz, Austria	PHB	20 – 100	1980s	Packaging and drug delivery
BTF, Austria	PHB	20 – 100	1990s	Packaging and drug delivery
Biomers, Germany	PHB	Unknown	1990s to present	Packaging and drug delivery
BASF, Germany	PHB, PHBV	Pilot scale	1980-2005	Blending with Ecoflex
Metabolix, USA	Several PHA	Unknown	1980 to present	Packaging
Tepha, USA	Several PHA	PHA medical implants	1990 to present	Medical bioimplants
ADM, USA (with metabolix)	Several PHA	50,000	2005 to present	Raw materials
P&G, USA	Several PHA	Contract manufacture	1980-2005	Packaging
Monsanto, USA	PHB, PHBV	Plant PHA production	1990s	Raw materials
Meridian, USA	Several PHA	10,000	2007 to present	Raw materials
Kaneka, Japan (with P&G)	Several PHA	Unknown	1990 to present	Packaging
Mitsubishi, Japan	PHB	10	1990s	Packaging
Biocycles, Brazil	PHB	100	1990 to present	Raw materials
Bio-On, Italy	PHA (Unclear)	10,000	2008 to present	Raw materials
Zhejiang Tian An, China	PHBV	2,000	1990 to present	Raw materials
Jiangmen Biotech Center, China	PHBHHx	Unknown	1990s	Raw materials
Yikeman, Shandong, China	PHA (Unclear)	3,000	2008 to present	Raw materials
Tianjin Northern Food, China	PHB	Pilot scale	1990s	Raw materials
Shantou Lianyi Biotech, China	Several PHA	Pilot scale	1990-2005	Packaging and medicals
Jiangsu Nan Tian, China	PHB	Pilot scale	1990 to present	Raw materials
Shenzhen O'Bioer, China	Several PHA	Unknown	2004 to present	Unclear
Tianjin Green Bioscience (+DSM)	P3HB4HB	10,000	2004 to present	Raw materials and Packaging
Shandong Lukang, China	Several PHA	Pilot scale	2005 to present	Raw materials and medicals

*PHBV* Poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate], *PHB* Poly[(R)-3-hydroxybutyrate], *PHBHHx* Poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate], *P3HB4HB* Poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxyvalerate],



### การผลิต PHBV ในอุตสาหกรรม

ในอุตสาหกรรมมีการผลิต PHBV โดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส โดยได้ความเข้มข้นของ PHBV เท่ากับ 70-80 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 70 ของการเลี้ยงเชื้อ (Byrom, 1992) ซึ่ง PHBV ที่ผลิตได้นำมาขึ้นรูปทำเป็นบรรจุภัณฑ์คือ ขวดใส่แชมพู ในนามของบริษัท Biopol ซึ่งวางขายในตลาดของยุโรป จากนั้นมีการขายลิขสิทธิ์การผลิต PHBV ให้กับบริษัท Monsanto และต่อมาขายให้กับบริษัท metabolix

ต่อมาบริษัท Ningbo TianAn ของประเทศจีน ได้ร่วมมือกับห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาของมหาวิทยาลัยในประเทศจีน เพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยเลี้ยงเชื้อ *R. eutropha* ในถังหมักขนาด 1,000 ลิตร ได้ความหนาแน่นเซลล์ 160 กรัมต่อลิตร สะสม PHBV 80% และอัตราผลผลิตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีองค์ประกอบของมอนอเมอร์ 3HV อยู่ในช่วง 8-10 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งวิธีการนี้ช่วยให้ราคาต้นทุนการผลิตลดลงมากกว่าเดิม ดังนั้น PHBV จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่ได้จากปิโตรเคมีได้ในอนาคต

### บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์

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

- 3.1.17 หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.18 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.19 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.20 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของบริษัท Forma Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.24 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.24 ไมโครปิเปต ขนาด 100 200 1,000 และ 5,000 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส
- 3.1.25 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ 2 ของบริษัท Whatman ประเทศอังกฤษ
- 3.1.27 หลอดทดลองฝาเกลียว (screw-cap tube) ของบริษัท PYREX ประเทศเยอรมนี
- 3.1.28 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 Nacalai tesque ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.5 กรดอะซิติก ( $C_2H_4O_2$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.6 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.7 กลีเซอรอล ( $C_3H_8O_3$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.10 ซูโครส ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.11 คลอโรฟอร์ม ( $CHCl_3$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.12 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) ของบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.13 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.14 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.15 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

- 3.2.16 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.17 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.18 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ของบริษัท Clorox ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.20 โซเดียมซัลเฟต ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.19 ไดคลอโรมีเทน ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.20 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 3.2.21 นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.22 โซเดียมโพรพิโอเนต ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2\text{Na}$ ) ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 3.2.23 โซเดียมอะซิเตต ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.24 สารมาตรฐานพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [P(3HB)] ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.25 สารมาตรฐานพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-12%3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [P(3HB-co-12%3HV)] ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.26 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.27 แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $\text{MgCl}_2$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.28 แบคโททริปโทส (Bacto tryptose) ของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.29 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.30 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Unilab ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.31 เมทานอล ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.32 เอทานอล ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.33 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.34 แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.35 ยูเรีย ( $\text{N}_2\text{H}_6\text{CO}$ ) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.36 สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Labscan Asia ประเทศไอร์แลนด์
- 3.2.37 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Springer ประเทศฝรั่งเศส
- 3.2.38 เปปโทน (peptone) ของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.39 เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

- 3.2.40 แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  ของบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.41 แอมโมเนียมซัลเฟต  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.42 น้ำอ้อย ของบริษัทมิตรผลวิจัย จำกัด ประเทศไทย
- 3.2.43 วุ้นผง (agar) ของบริษัทบิกเบน โปรดัคตอรา เดอ อะการ์ เอส. เอ ประเทศชิลี
- 3.2.44 ก๊าซไฮโดรเจน ( $\text{H}_2$ ) ของบริษัท PRAXAIR ประเทศไทย
- 3.2.45 ก๊าซออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) ของบริษัท TIG (Thai Industrial Gas) ประเทศไทย
- 3.2.46 ก๊าซไนโตรเจน ( $\text{N}_2$ ) ของบริษัท PRAXAIR ประเทศไทย

### 3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Bacillus megaterium* P-12 เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ใหม่ในห้องปฏิบัติการโดยศันสนีย์ สันติอรรถพันธุ์ (2550) และวรรณกุล ชนะสิทธิ์ (2553) คัดแยกได้จากดินบริเวณใกล้บ่อน้ำพุร้อนหนองหญ้าปล้อง อำเภอหนองหญ้าปล้อง จังหวัดเพชรบุรี สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่นที่ศึกษา

#### 3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.2.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
แบคโททริปโทส	5.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม

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

3.3.2.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) ใช้สูตรของ Doi และคณะ (1986) ซึ่งศึกษาปรับปรุงโดย สุดา สุภาขวินสวัสดิ์ (2542) 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	10.0	กรัม
แบคโททริปโทส	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5.0	กรัม

โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
น้ำตาลทราย	10.0	กรัม

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

3.3.2.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตและสะสมไฮโมพอลิเมอร์ PHB และโคพอลิเมอร์ PHBV คือ อาหาร Mineral Salt Medium (MSM) (อดิพล บุญเรือง ถาวร, 2543) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน(น้ำอ้อย)	30.0	กรัม
ยูเรีย	1.0	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

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

สารละลาย trace element ใน 1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.30	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.20	กรัม
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 การเตรียมน้ำอ้อยสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

1. นำน้ำอ้อยมากรองผ่านตะแกรงกรองแบบละเอียด (fine sieve) เพื่อกำจัดเศษดินและเศษขานอ้อยที่มาจากกระบวนการหีบอ้อย
2. นำน้ำอ้อยที่ผ่านการกรองแล้ว ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์และปั่นแยกตะกอนด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำ จำนวน 2 รอบ)
3. นำน้ำอ้อยที่ผ่านการปั่นแยกตะกอนออกแล้วมาวิเคราะห์ห้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม

### 3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

#### 3.3.3.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

เก็บจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเก็บเชื้อเชือก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเชือกเชือกลงบนอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

#### 3.3.3.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

เก็บจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.2.2 นำไปเลี้ยงในตูบ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลว ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl จากนั้นปั่นแยกเซลล์และทำซ้ำอีกรอบ กระจ่ายเซลล์ใน 10% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและปรับให้อยู่ในช่วง 0.8-1.0 (จำนวน  $10^9$  CFU/ml) บรรจุลงในหลอดเยือกแข็ง (cryotube) ที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือนหรือเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

### 3.3.4 การศึกษาอายุของกล้าเชื้อ *B. megaterium* P-12 ในระดับขวดทดลองที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตเซลล์ในระดับถังหมัก

เตรียมกล้าเชื้อโดยเก็บ *B. megaterium* P-12 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง nutrient agar (NA) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) เพื่อเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอย วัดและปรับความขุ่นของเซลล์แขวนลอยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ (เซลล์แขวนลอย) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร (6

เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0 นาน 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้ง และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร นำค่าน้ำหนักแห้งไปคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์แล้วนำมาวาดกราฟการเจริญเพื่อประเมินศึกษาอายุของกล้าเชื้อที่มีความเหมาะสม กล่าวคือ มีลักษณะทางสรีรวิทยา (physiologically active culture) ที่จะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญโดยอาศัยอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) เป็นตัวบ่งชี้

### 3.3.5 การเพาะเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในระดับถังหมักระยะที่ 1 เพื่อผลิตและเพิ่มปริมาณเซลล์

นำกล้าเชื้อที่มีอายุเหมาะสม (จากการทดลองที่ 3.3.4) เพาะลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MSM (อดิพล บุญเรืองถาวร, 2543) โดยงานวิจัยนี้ใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาตรสุทธิของน้ำหมักเท่ากับ 3 ลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที และควบคุมค่าพีเอชที่ 7.0 เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (ในรูปของน้ำตาลที่เหลือและไนโตรเจนที่เหลือ ปริมาณ 3HB ที่เชื้อสร้างขึ้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) โดยแปรปัจจัยต่างๆ ดังนี้

3.3.5.1 แปรผันปริมาณของกล้าเชื้อจากขวดเขย่าเท่ากับ 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ และแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลในน้ำอ้อยเท่ากับ 10 20 30 50 และ 70 กรัมต่อลิตร

3.3.5.2 เลือกภาวะ(ปริมาณกล้าเชื้อจากขวดเขย่าและความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลในน้ำอ้อย) ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.3.5.1 เพื่อเลี้ยงเชื้อโดยทำการแปรผันอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน (โดยโมล) เป็น 5 ต่อ 1 10 ต่อ 1 และ 15 ต่อ 1

เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ ความเข้มข้นของน้ำตาล ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณพอลิเมอร์ PHB ที่ผลิตได้ คำนวณหาค่าอัตราการผลิต (productivity) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ใช้ไป ( $Y_{x/s}$ ) ตามลำดับ โดยค่าพารามิเตอร์เหล่านี้หาได้จากสมการทางคณิตศาสตร์ (ภาคผนวก ข) เพื่อใช้เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญ การสังเคราะห์และสะสมพอลิเมอร์ของเชื้อ *B. megaterium* P-12



### 3.3.6 การเพาะเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในระดับถังหมักระยะที่ 2 เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

เลี้ยงเชื้อด้วยสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.3.5 จากนั้นเติมอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนผสมประกอบด้วยน้ำตาลในน้ำอ้อยและเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต โดยแปรผันปัจจัยต่างๆ ดังนี้

3.3.6.1 ช่วงเวลาในการเติมแหล่งคาร์บอนผสม คือ ชั่วโมงที่ 3 6 และ 9

3.3.6.2 สัดส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำอ้อยที่เติมลงในถังหมักกับปริมาณเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต เป็น 1:0.25 1:0.5 และ 1:1

3.3.6.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำอ้อย(ในแหล่งคาร์บอนผสม)เริ่มต้นที่เติมลงในถังหมักเป็น 6 9 และ 12 กรัมต่อลิตร (ไม่รวมความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลือในถังหมักก่อนเติมแหล่งคาร์บอนผสม)

เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลและเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต ปริมาณไนโตรเจน สัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HB และ 3HV ปริมาณโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้ คำนวณหาค่าอัตราการผลิต และ  $Y_{x/s}$  ตามลำดับ

### 3.3.7 การสกัดโคพอลิเมอร์จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์

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

### 3.3.8 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและอุณหภูมิจาก (mechanical and thermal properties) บางประการของโพลีเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. P-12

3.3.8.1 การวิเคราะห์หาอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature,  $T_m$ ) และ อุณหภูมิกลาสทรานสิชัน (glass transition temperature,  $T_g$ ) ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC)

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

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

(2) ทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจาก 200 องศาเซลเซียส เป็น -100 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์หาค่า  $T_g$  ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิจาก -100 องศาเซลเซียสเป็น 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที

(ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

#### 3.3.8.2 การวิเคราะห์หาสมบัติทางกายภาพบางประการ

เตรียมตัวอย่างโดยใช้ PHBV 0.5 กรัม ละลายในคลอโรฟอร์ม และทำเป็นแผ่นฟิล์ม ขนาด 10 x 10 เซนติเมตร ทดสอบสมบัติเชิงกลด้วยเครื่อง Universal Testing Machine ยี่ห้อ Hounsfield รุ่น H 10 KM ตามมาตรฐานของ ASTM D 3500 และคำนวณหาค่า tensile stress elastic modulus และ % elongation

(ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

### 3.4 วิธีวิเคราะห์

#### 3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (ความเข้มข้นของเซลล์)

นำสารตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร จากสมการดังต่อไปนี้

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) =  $\frac{\text{น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมที่มีเซลล์} - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า} \times 1,000}{10}$

10

### 3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

นำสารตัวอย่างเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมสารละลายอินเวอร์เทส 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เพื่อทำปฏิกิริยา 20 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ Bernfeld (1995) โดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid, DNSA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในอ่างน้ำเย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำตาลซูโครส (ภาคผนวก ก) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

### 3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณยูเรียในน้ำหมัก

โดยวิธีของ Kjeldahl (A.O.A.C., 1975) นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยโพแทสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟต อัตราส่วน 95:5 ลงไป 7 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนสารละลายใส เป็นเวลา 45 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจนและเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 32 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50-60 มิลลิลิตร หรือจนสารละลายเป็นสีดำ แล้วกลั่นจับก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่เติมอินดิเคเตอร์เป็นเมทิลเรดเมทิลีนบลู (methyl red methylene blue) ปริมาตร 2 หยด กลั่นจนสารละลายบอริกมีปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่กลั่นได้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตแล้วคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน

### 3.4.4 การวิเคราะห์สัดส่วนของมอนอเมอร์และปริมาณของพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography : GC)

โดยวิธีของ Comeau และคณะ (1988) โดยการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ไปอบแห้งประมาณ 10-12 ชั่วโมง แล้วชั่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียว แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มี

กรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสนาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของมอนอเมอร์ไปสกัดแยกกรดและการเซลล์ตามวิธีข้างต้นอีกครั้ง เก็บชั้นคลอโรฟอร์มใส่ในหลอดฝาเกลียวแล้วนำไปวิเคราะห์ที่สัดส่วนของมอนอเมอร์และปริมาณพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟีภายใต้ภาวะ ดังนี้

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

การวิเคราะห์ชนิดของมอนอเมอร์โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายมาตรฐาน P(3HB) และ P(3HB-co-12% 3HV) แล้วคำนวณปริมาณพอลิเมอร์แสดงเป็นปริมาณต่อปริมาตรของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร) และแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน แสดงกราฟมาตรฐานของสารต่างๆและโครมาโทแกรม ในภาคผนวก ค และภาคผนวก ง ตามลำดับ

การคำนวณปริมาณมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV (กรัมต่อลิตรต่อ dried cell 20 มิลลิกรัม) จะใช้โปรแกรม Star chromatogram : version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณมอนอเมอร์โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

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

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

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

### 3.4.6 การวิเคราะห์หาปริมาณของเกลือโซเดียมโพสเฟอไรต์ โดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี

โดยวิธีของ Ramsay และคณะ (1990) โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดฝาเกลียว เติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นและไดคลอโรมีเทนอย่างละ 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อ นาที นาน 10 นาที เก็บชั้น ไดคลอโรมีเทน (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของมอนอเมอร์ ใส่ในหลอดฝาเกลียวแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี ภายใต้สภาวะเดียวกับการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์

คำนวณหาปริมาณเกลือโซเดียมโพสเฟอไรต์และโซเดียมวาเลอเรตโดยใช้โปรแกรม Star chromatogram : version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณมอนอเมอร์โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน แสดงกราฟมาตรฐานของสารต่างๆ และโครมาโทแกรม ในภาคผนวก ค และภาคผนวก ง ตามลำดับ

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การหาปริมาณกล้าเชื้อ *B. megaterium* P-12 ในระดับขวดทดลองที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตเซลล์ในระดับถังหมัก

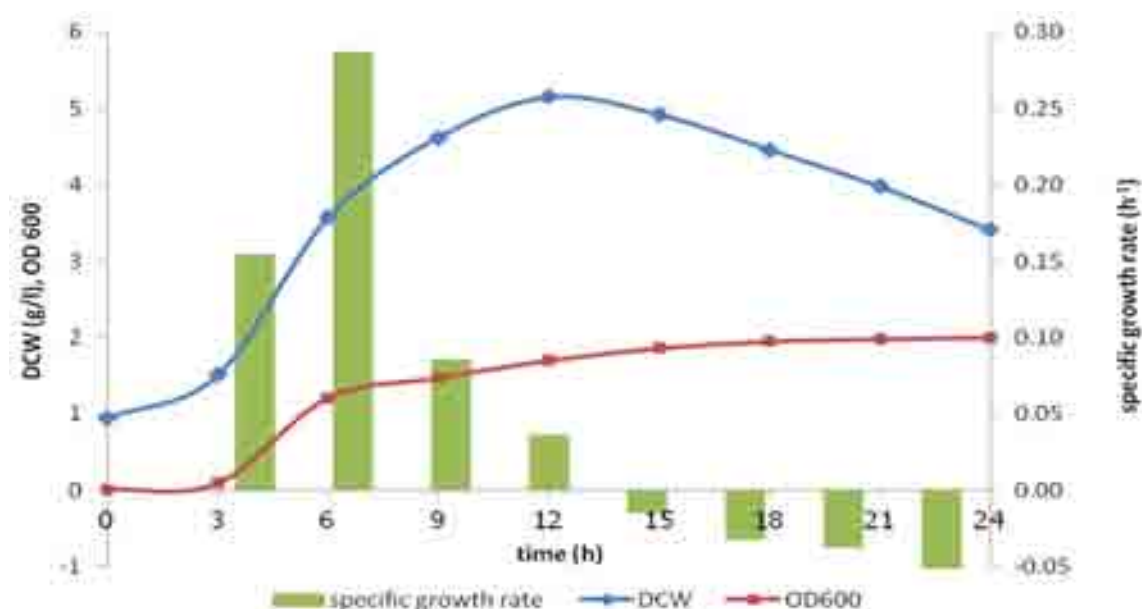
สรีรวิทยาของจุลินทรีย์ในแต่ละช่วงอายุที่มีความแตกต่างกัน ส่งผลต่อกิจกรรมต่างๆที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ รวมถึงการผลิตสารผลิตภัณฑ์ โดยช่วงอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมนั้น เซลล์มีกิจกรรมภายในเซลล์ที่ดี ใช้สารอาหารในการเจริญได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้สามารถเจริญได้เร็วเมื่อถ่ายกล้าเชื้อลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จึงส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์และสะสมสารผลิตภัณฑ์ได้ดีขึ้นด้วย (สุดา สุภาวสินสวัสดิ์, 2542; อติศักดิ์ หิรัญรัตนกร, 2541) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนากล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเป็นหัวเชื้อในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ เพื่อให้เซลล์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเป็นเซลล์ที่มีลักษณะทางสรีรวิทยาในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้สูงสุด

การศึกษากล้าเชื้อของ *B. megaterium* P-12 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BCM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดตามการเจริญและเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์อยู่ในระยะพักตัว (lag phase) 3 ชั่วโมง จากนั้นจะเข้าสู่ระยะเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (exponential phase) จนถึงชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีน้ำหนักรวมเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.15 กรัมต่อลิตรและเริ่มเข้าสู่ระยะลดจำนวน (death phase) ในชั่วโมงที่ 15 ส่วนอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ 0.29 (ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ภาพที่ 4.1) ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมง สำหรับการศึกษานี้ต่อไป

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการเจริญจำเพาะเมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชั่วโมง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
0	0.95 ± 0.10	0.01±0.00	-
3	1.51 ± 0.13	0.09±0.01	0.15
<b>6</b>	<b>3.57 ± 0.11</b>	<b>1.21±0.00</b>	<b>0.29</b>
9	4.62 ± 0.12	1.47±0.02	0.09
12	5.15 ± 0.11	1.70±0.03	0.04
15	4.92 ± 0.10	1.86±0.01	-0.02
18	4.46 ± 0.10	1.95±0.03	-0.03
21	3.98 ± 0.09	1.98±0.05	-0.04
24	3.41 ± 0.07	2.00±0.04	-0.05

หมายเหตุ : ± SD ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 4.1 รูปแบบการเจริญและอัตราการเจริญจำเพาะของ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## 4.2 การเพาะเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในระดับถังหมักระยะที่ 1 เพื่อผลิตและเพิ่มปริมาณเซลล์

เซลล์แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบเหมาะสม ซึ่งเซลล์สามารถนำเอาสารอาหารเหล่านั้นไปใช้เพื่อการเจริญ สังเคราะห์สารต่างๆ และใช้ในกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ โดยในการเลี้ยงเชื้อในอาหารเพื่อเพิ่มผลผลิตของเซลล์จำเป็นต้องมีความเหมาะสมของสัดส่วนระหว่างปริมาณกลีเซอรอลและปริมาณขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น เพราะช่วยให้เซลล์ได้รับสารอาหารในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญ รวมทั้งความเข้มข้นหรือปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ต้องไม่มากเกินไป จนยับยั้งการเจริญของเซลล์ยูจินิตรีย์ (Yamane และคณะ, 1996; Matsumoto และคณะ, 2011) ดังนั้นการแปรผันปริมาณกลีเซอรอลเพื่อให้ได้ปริมาณกลีเซอรอลที่เหมาะสมกับปริมาณสารอาหารที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเหมาะสมของปริมาณแหล่งคาร์บอน จึงช่วยให้เซลล์เจริญได้ดีเพิ่มขึ้น

**4.2.1** แปรผันปริมาณของกลีเซอรอลจากขวดเขย่าเท่ากับ 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ และแปรผันความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลในน้ำอ้อยเท่ากับ 10 20 30 50 และ 70 กรัมต่อลิตร

นำกลีเซอรอลอายุ 6 ชั่วโมง เพาะลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MSM ปริมาตรเท่ากับ 3 ลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที และควบคุมค่าพีเอชที่ 7.0 เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB)

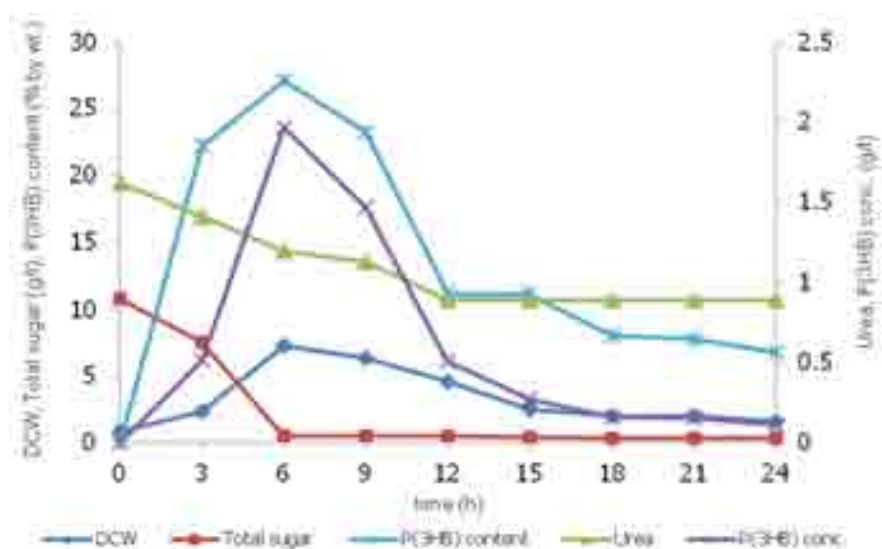
จากผลการศึกษาพบว่า การเจริญของเซลล์เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้นเท่ากับ 10 20 30 และ 50 กรัมต่อลิตร แนวโน้มการเจริญเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยได้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อและเซลล์มีอัตราการเจริญสูงสุดในช่วงการเจริญชั่วโมงที่ 3 ถึงชั่วโมงที่ 6 จากนั้นเซลล์เข้าสู่ระยะ death phase ซึ่งการเจริญสอดคล้องกับการใช้น้ำตาลของเซลล์ที่ลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 3 ถึงชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกัน (ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ภาพที่ 4.2 ตารางที่ 4.3 ภาพที่ 4.3 ตารางที่ 4.4 ภาพที่ 4.4 ตารางที่ 4.5 ภาพที่ 4.5 ตารางที่ 4.6 ภาพที่ 4.6 ตารางที่ 4.7 ภาพที่ 4.7 ตารางที่ 4.8 ภาพที่ 4.8 ตารางที่ 4.9 ภาพที่ 4.9 ตารางที่ 4.10 ภาพที่ 4.10 ตารางที่ 4.11 ภาพที่ 4.11 ตารางที่ 4.12 ภาพที่ 4.12 ตารางที่ 4.13 ภาพที่ 4.13) ผลการเจริญของเซลล์ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 70 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ แต่การใช้น้ำตาลของเซลล์ที่ลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 3 ถึงชั่วโมงที่ 6 เช่นเดียวกัน (ดังแสดงในตารางที่ 4.14 ภาพที่ 4.14



ตารางที่ 4.15 ภาพที่ 4.15 ตารางที่ 4.16 ภาพที่ 4.16) การใช้แหล่งไนโตรเจน คือ ยูเรีย มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยมีช่วงที่เซลล์เข้าสู่ระยะ death phase ความเข้มข้นของยูเรียคงที่ การสะสมของ P(3HB) ในระหว่างการเจริญของเซลล์ ส่วนใหญ่ได้ความเข้มข้น P(3HB) และปริมาณ P(3HB) สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 6 หรือ 9 ซึ่งเป็นชั่วโมงเดียวกับที่มีการเจริญสูงสุดเช่นเดียวกัน (ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ภาพที่ 4.2 ตารางที่ 4.3 ภาพที่ 4.3 ตารางที่ 4.4 ภาพที่ 4.4 ตารางที่ 4.5 ภาพที่ 4.5 ตารางที่ 4.6 ภาพที่ 4.6 ตารางที่ 4.7 ภาพที่ 4.7 ตารางที่ 4.8 ภาพที่ 4.8 ตารางที่ 4.9 ภาพที่ 4.9 ตารางที่ 4.10 ภาพที่ 4.10 ตารางที่ 4.12 ภาพที่ 4.12 ตารางที่ 4.13 ภาพที่ 4.13 ตารางที่ 4.16 ภาพที่ 4.16) แต่ที่การเลี้ยงเชื้อในภาวะความเข้มข้นน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร ปริมาณกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 70 กรัมต่อลิตร ปริมาณกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ และที่ความเข้มข้นน้ำตาล 70 กรัมต่อลิตร ปริมาณกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ พบความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 6 แต่การเจริญสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ (ดังแสดงในตารางที่ 4.11 ภาพที่ 4.11 ตารางที่ 4.14 ภาพที่ 4.14 ตารางที่ 4.15 ภาพที่ 4.15) ปริมาณของ P(3HB) เพิ่มสูงสุดในช่วงชั่วโมงที่ 3 ถึงชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นก็มีแนวโน้มลดลงสอดคล้อง ความเข้มข้นของ P(3HB) และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ลดลง

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

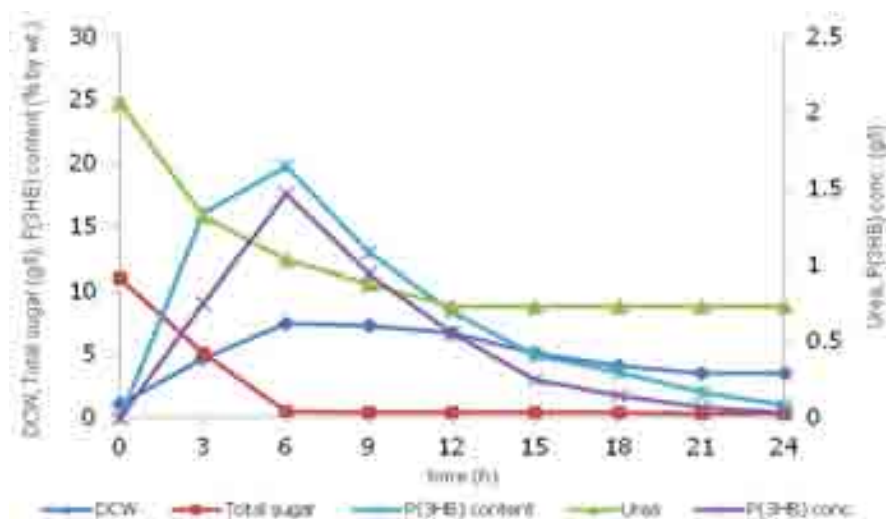
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.79±0.03	10.77±0.04	1.62±0.01	-	-
3	2.33±0.05	7.48±0.06	1.41±0.03	0.52	22.16
6	<b>7.23±0.01</b>	0.49±0.09	1.19±0.03	<b>1.96</b>	<b>27.14</b>
9	6.31±0.08	0.47±0.08	1.12±0.01	1.47	23.24
12	4.56±0.05	0.45±0.08	0.89±0.00	0.51	11.13
15	2.46±0.11	0.38±0.04	0.89±0.00	0.27	11.08
18	2.00±0.04	0.35±0.05	0.89±0.00	0.16	8.01
21	1.97±0.08	0.33±0.03	0.89±0.00	0.15	7.73
24	1.61±0.10	0.32±0.07	0.89±0.00	0.11	6.76



ภาพที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

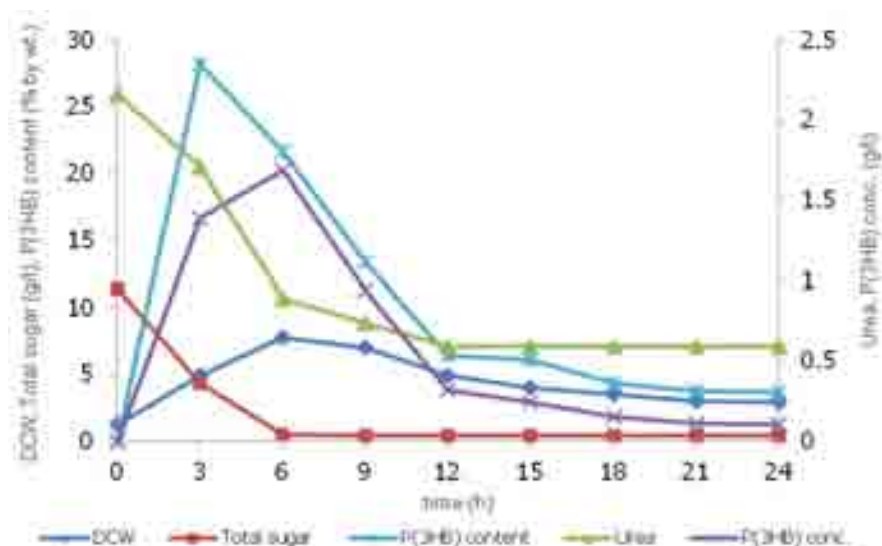
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	1.05±0.07	10.92±0.04	2.06±0.02	-	-
3	4.68±0.06	5.08±0.06	1.32±0.01	0.75	16.06
6	<b>7.41±0.04</b>	0.50±0.08	1.03±0.03	<b>1.46</b>	<b>19.72</b>
9	7.29±0.11	0.43±0.04	0.88±0.03	0.94	12.95
12	6.66±0.04	0.42±0.09	0.73±0.00	0.55	8.32
15	5.08±0.03	0.38±0.10	0.73±0.00	0.25	4.95
18	4.06±0.10	0.38±0.07	0.73±0.00	0.15	3.61
21	3.53±0.08	0.34±0.06	0.73±0.00	0.07	1.96
24	3.52±0.05	0.30±0.06	0.73±0.00	0.04	1.02



ภาพที่ 4.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.4 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

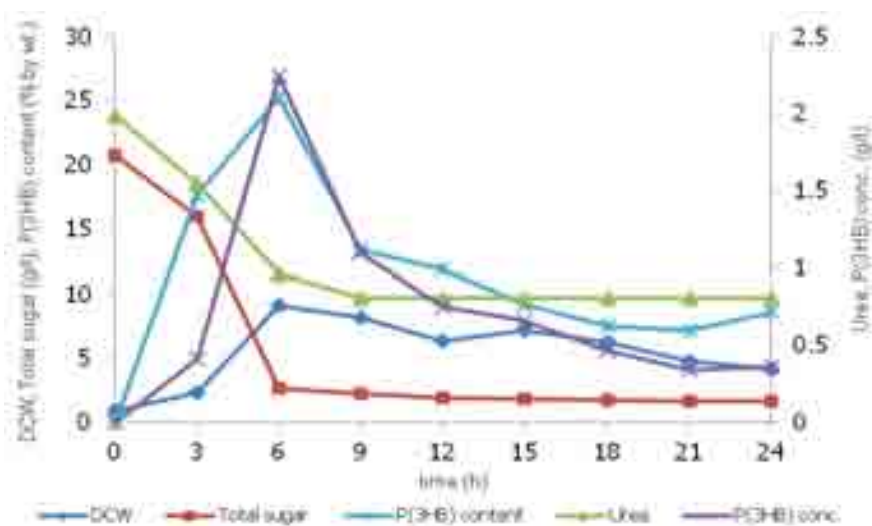
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	1.20±0.10	11.35±0.03	2.16±0.04	-	-
3	4.92±0.09	4.31±0.07	1.71±0.02	1.39	<b>28.18</b>
6	<b>7.77±0.08</b>	0.46±0.06	0.89±0.02	<b>1.68</b>	21.66
9	7.01±0.06	0.43±0.11	0.74±0.00	0.94	13.37
12	4.94±0.04	0.41±0.10	0.59±0.00	0.32	6.43
15	3.97±0.07	0.40±0.09	0.59±0.00	0.24	6.07
18	3.46±0.03	0.39±0.12	0.59±0.00	0.15	4.35
21	2.99±0.05	0.37±0.08	0.59±0.00	0.11	3.76
24	2.91±0.08	0.36±0.07	0.59±0.00	0.11	3.63



ภาพที่ 4.4 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.5 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

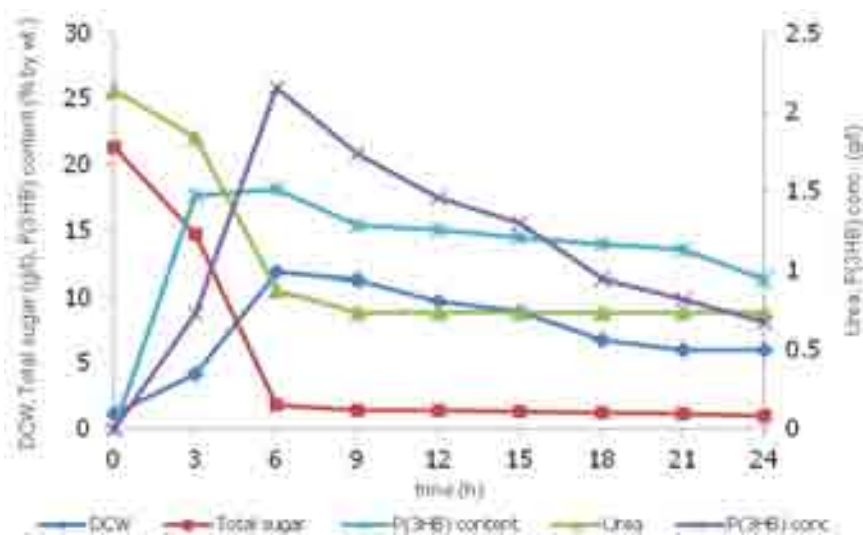
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.89±0.07	20.75±0.09	1.99±0.05	-	-
3	2.34±0.04	15.96±0.04	1.55±0.04	0.41	17.66
6	<b>9.09±0.06</b>	2.63±0.03	0.96±0.01	<b>2.25</b>	<b>25.29</b>
9	8.19±0.10	2.21±0.04	0.81±0.00	1.10	13.39
12	6.37±0.05	1.90±0.09	0.81±0.00	0.76	11.86
15	7.15±0.05	1.80±0.05	0.81±0.00	0.66	9.22
18	6.24±0.07	1.73±0.05	0.81±0.00	0.47	7.48
21	4.72±0.04	1.69±0.04	0.81±0.00	0.34	7.16
24	4.18±0.08	1.65±0.07	0.81±0.00	0.36	8.59



ภาพที่ 4.5 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.6 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

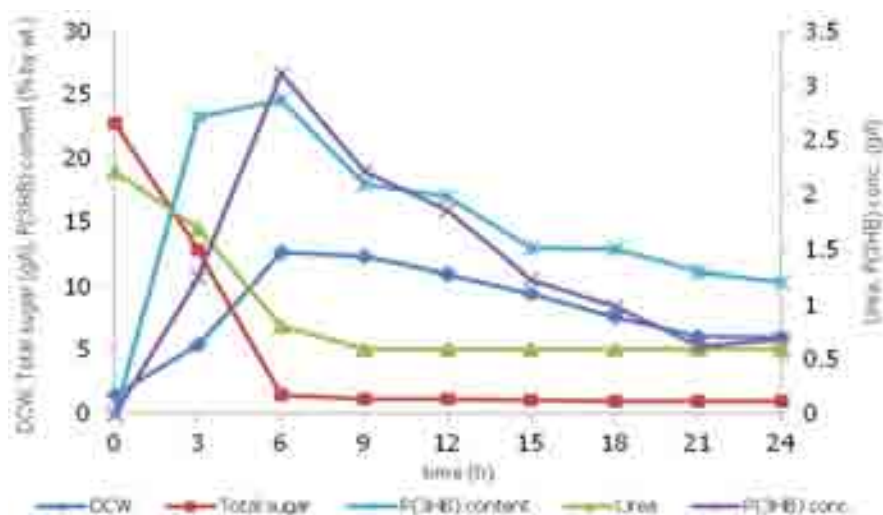
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	1.12±0.07	21.34±0.05	2.14±0.07	-	-
3	4.15±0.09	14.68±0.04	1.84±0.03	0.73	17.68
6	<b>11.89±0.06</b>	1.83±0.06	0.88±0.02	<b>2.15</b>	<b>18.12</b>
9	11.27±0.04	1.42±0.09	0.74±0.00	1.74	15.42
12	9.67±0.07	1.38±0.08	0.74±0.00	1.46	15.09
15	8.96±0.09	1.28±0.08	0.74±0.00	1.30	14.47
18	6.76±0.04	1.21±0.05	0.74±0.00	0.95	13.98
21	6.04±0.05	1.16±0.09	0.74±0.00	0.82	13.56
24	6.00±0.08	1.02±0.05	0.74±0.00	0.68	11.28



ภาพที่ 4.6 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

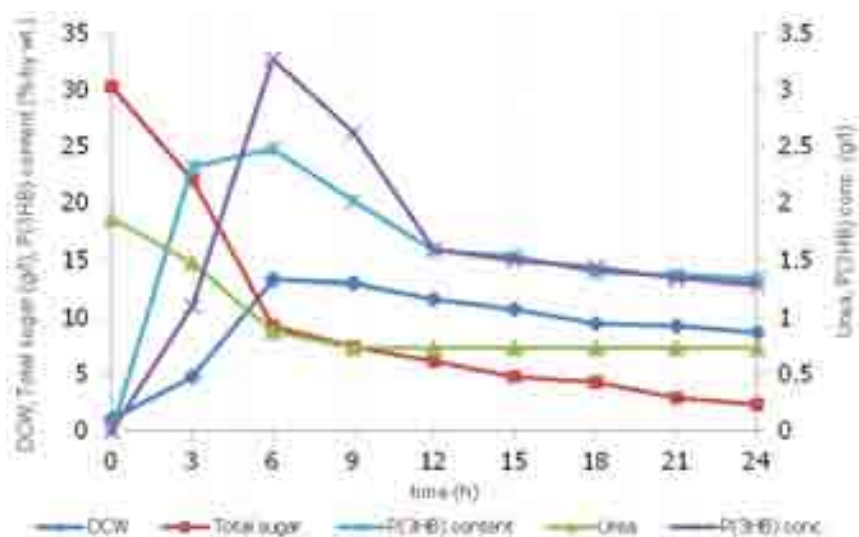
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	1.46±0.04	22.73±0.03	2.21±0.05	-	-
3	5.39±0.08	12.79±0.05	1.69±0.06	1.25	23.24
6	<b>12.65±0.08</b>	1.53±0.05	0.81±0.04	<b>3.11</b>	<b>24.58</b>
9	12.32±0.11	1.17±0.02	0.59±0.00	2.22	17.98
12	10.93±0.09	1.15±0.08	0.59±0.00	1.85	16.94
15	9.44±0.03	1.05±0.07	0.59±0.00	1.22	12.96
18	7.63±0.10	0.99±0.09	0.59±0.00	0.98	12.89
21	6.11±0.11	0.97±0.04	0.59±0.00	0.62	11.12
24	5.98±0.09	0.96±0.06	0.59±0.00	0.68	10.34



ภาพที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.8 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	1.03±0.09	30.23±0.03	1.86±0.02	-	-
3	4.73±0.12	22.02±0.08	1.47±0.01	1.10	23.27
6	<b>13.22±0.08</b>	9.30±0.07	0.88±0.01	<b>3.27</b>	<b>24.74</b>
9	13.00±0.07	7.39±0.09	0.73±0.00	2.63	20.21
12	11.61±0.11	6.15±0.06	0.73±0.00	1.59	15.79
15	10.73±0.06	4.77±0.10	0.73±0.00	1.49	15.29
18	9.46±0.03	4.23±0.10	0.73±0.00	1.43	13.84
21	9.29±0.07	2.95±0.04	0.73±0.00	1.33	13.65
24	8.71±0.02	2.29±0.03	0.73±0.00	1.29	13.35

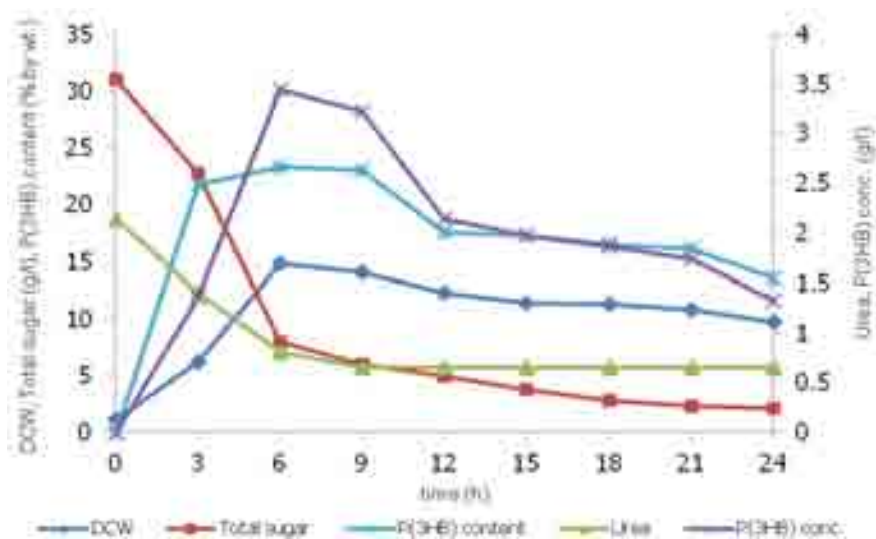


ภาพที่ 4.8 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB)เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0



ตารางที่ 4.9 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

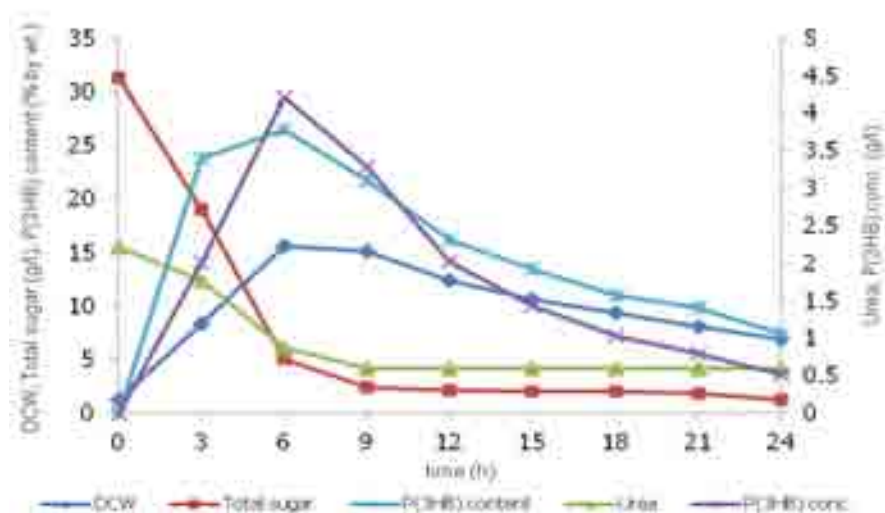
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	1.11±0.09	31.04±0.10	2.14±0.02	-	-
3	6.23±0.04	22.77±0.05	1.40±0.03	1.36	21.80
6	<b>14.79±0.04</b>	7.98±0.03	0.81±0.01	<b>3.45</b>	<b>23.32</b>
9	14.01±0.07	6.04±0.09	0.66±0.00	3.22	23.00
12	12.24±0.09	4.95±0.08	0.66±0.00	2.15	17.54
15	11.41±0.08	3.78±0.08	0.66±0.00	1.97	17.29
18	11.29±0.11	2.79±0.05	0.66±0.00	1.87	16.53
21	10.79±0.03	2.33±0.11	0.66±0.00	1.73	16.08
24	9.74±0.12	2.09±0.03	0.66±0.00	1.32	13.58



ภาพที่ 4.9 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.10 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

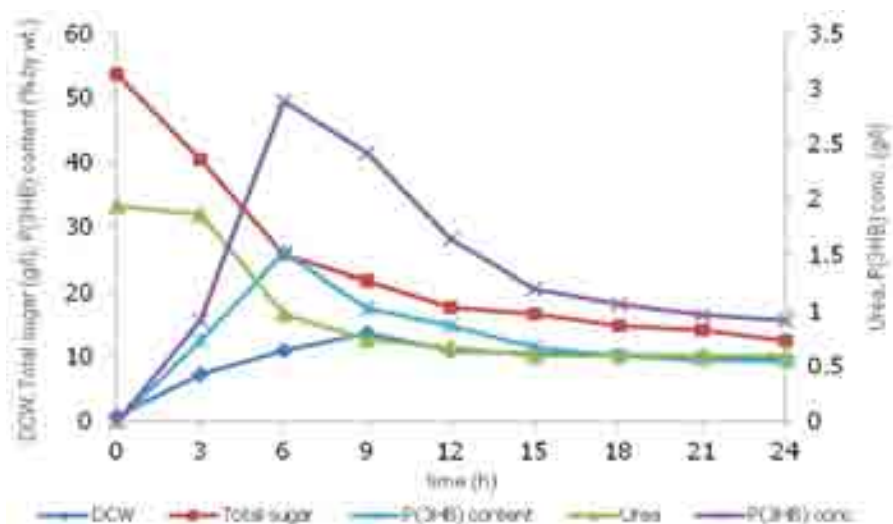
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	1.28±0.06	31.37±0.09	2.21±0.01	-	-
3	8.43±0.06	18.98±0.09	1.77±0.02	2.01	23.84
6	<b>15.63±0.08</b>	5.03±0.11	0.88±0.02	<b>4.21</b>	<b>26.47</b>
9	15.08±0.04	2.45±0.05	0.59±0.00	3.29	21.80
12	12.43±0.11	2.11±0.07	0.59±0.00	2.02	16.23
15	10.62±0.03	2.07±0.12	0.59±0.00	1.43	13.47
18	9.38±0.08	2.01±0.08	0.59±0.00	1.03	10.98
21	8.04±0.11	1.82±0.08	0.59±0.00	0.79	9.83
24	6.94±0.09	1.26±0.04	0.59±0.00	0.51	7.36



ภาพที่ 4.10 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.11 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

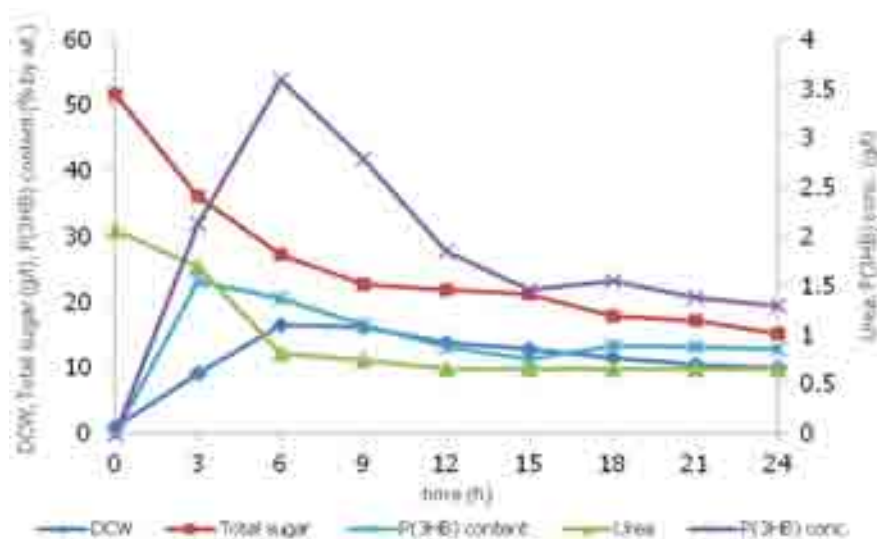
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.88±0.11	53.72±0.09	1.94±0.03	-	-
3	7.37±0.09	40.43±0.07	1.86±0.03	0.92	12.48
6	11.07±0.08	25.71±0.05	0.97±0.02	<b>2.89</b>	<b>26.14</b>
9	<b>13.74±0.05</b>	21.65±0.06	0.74±0.01	2.42	17.62
12	11.07±0.06	17.71±0.04	0.67±0.01	1.64	14.84
15	10.46±0.04	16.77±0.03	0.59±0.00	1.20	11.47
18	10.42±0.06	14.88±0.06	0.59±0.00	1.07	10.23
21	10.12±0.02	14.24±0.11	0.59±0.00	0.97	9.58
24	9.86±0.03	12.57±0.09	0.59±0.00	0.91	9.27



ภาพที่ 4.11 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.12 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

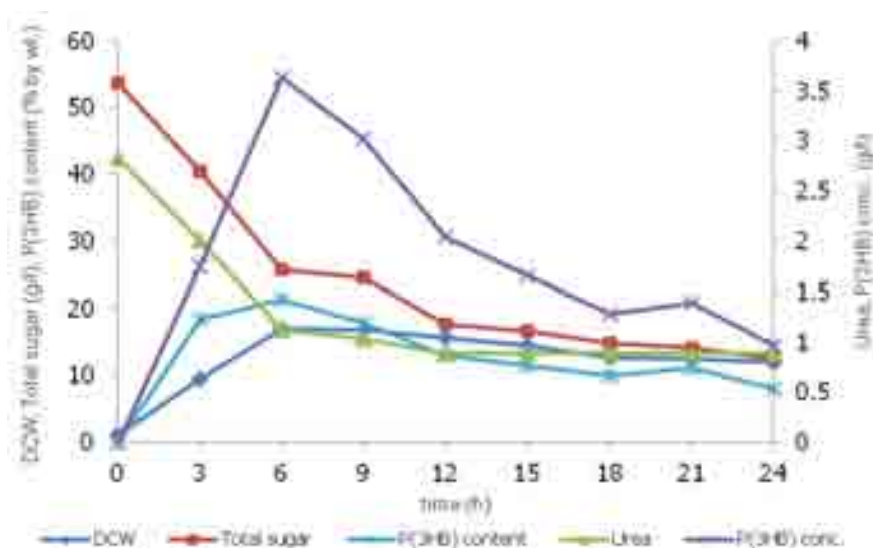
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.98±0.04	51.73±0.05	2.06±0.03	-	-
3	9.16±0.08	36.06±0.09	1.69±0.01	2.13	<b>23.26</b>
6	<b>16.51±0.07</b>	27.27±0.10	0.81±0.02	<b>3.60</b>	20.54
9	16.18±0.06	22.68±0.11	0.74±0.05	2.79	16.50
12	13.93±0.05	21.92±0.08	0.66±0.00	1.85	13.25
15	12.91±0.03	21.28±0.05	0.66±0.00	1.46	11.32
18	11.55±0.09	17.84±0.06	0.66±0.00	1.54	13.36
21	10.48±0.11	17.20±0.07	0.66±0.00	1.38	13.18
24	10.01±0.10	15.16±0.08	0.66±0.00	1.29	12.91



ภาพที่ 4.12 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.13 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

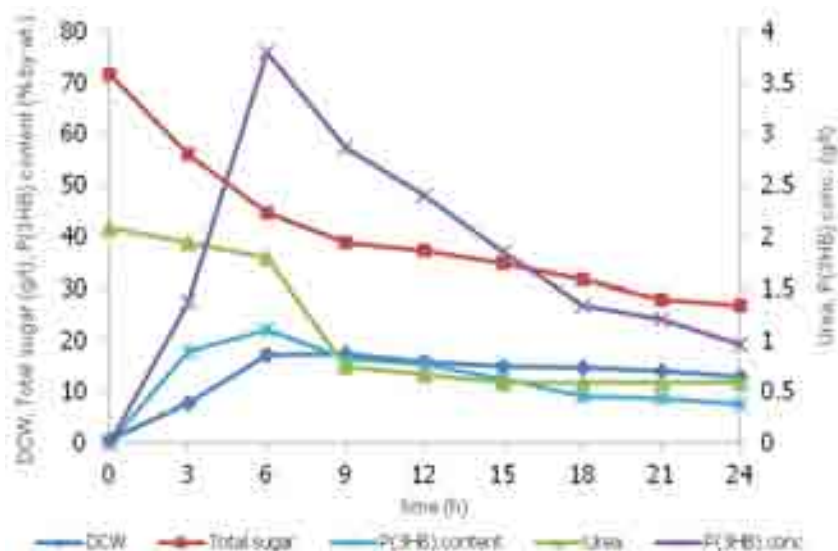
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	1.17±0.06	53.72±0.09	2.83±0.01	-	-
3	9.56±0.06	40.43±0.06	2.01±0.04	1.75	18.31
6	<b>16.98±0.08</b>	25.71±0.10	1.12±0.03	<b>3.63</b>	<b>21.39</b>
9	16.94±0.04	24.65±0.11	1.04±0.02	3.02	17.83
12	15.73±0.11	17.71±0.06	0.89±0.00	2.04	12.97
15	14.45±0.03	16.77±0.12	0.89±0.00	1.66	11.46
18	12.72±0.08	14.88±0.08	0.89±0.00	1.28	10.07
21	12.47±0.08	14.24±0.03	0.89±0.00	1.40	11.20
24	12.06±0.07	12.57±0.02	0.89±0.00	0.97	8.03



ภาพที่ 4.13 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.14 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

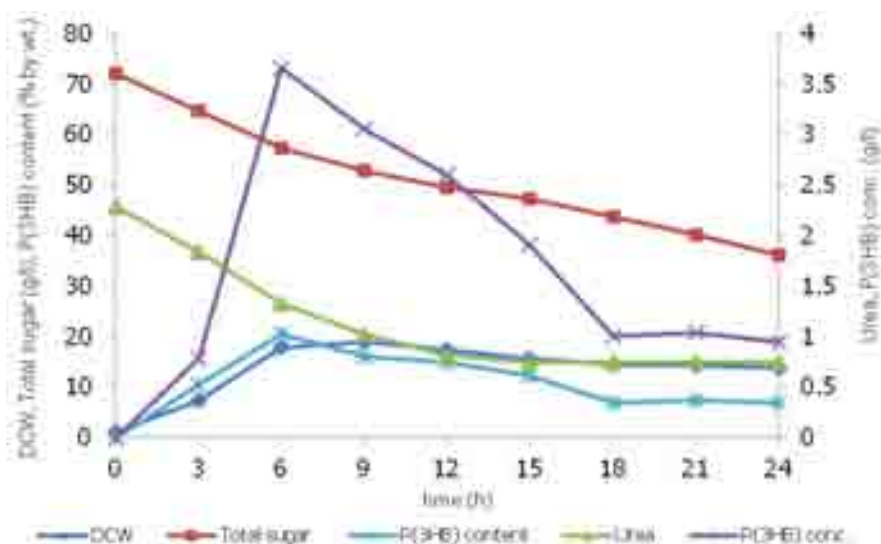
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.65±0.08	71.66±0.09	2.08±0.02	-	-
3	7.77±0.08	56.03±0.05	1.94±0.02	1.37	17.70
6	17.24±0.05	44.63±0.04	1.79±0.03	<b>3.79</b>	<b>22.00</b>
9	<b>17.33±0.11</b>	38.76±0.10	0.74±0.01	2.86	16.53
12	15.7±0.06	37.21±0.12	0.67±0.00	2.40	15.27
15	14.82±0.03	34.85±0.06	0.59±0.00	1.85	12.50
18	14.79±0.03	31.76±0.04	0.59±0.00	1.34	9.05
21	14.01±0.07	27.93±0.09	0.59±0.00	1.20	8.60
24	12.79±0.05	26.79±0.09	0.59±0.00	0.95	7.46



ภาพที่ 4.14 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.15 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

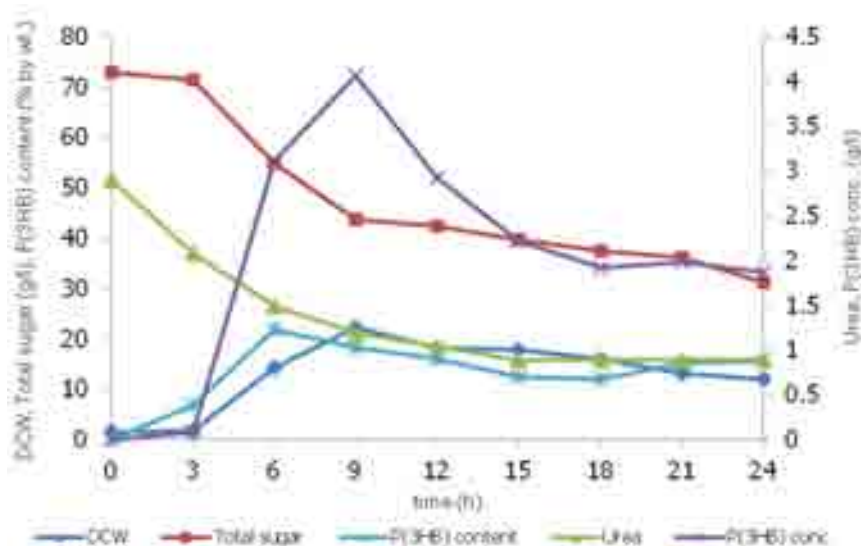
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	1.06±0.06	72.12±0.08	2.29±0.01	-	-
3	7.40±0.06	64.68±0.04	1.84±0.01	0.78	10.54
6	17.83±0.08	57.34±0.04	1.33±0.03	<b>3.66</b>	<b>20.54</b>
9	<b>19.01±0.04</b>	52.78±0.09	1.03±0.00	3.05	16.07
12	17.35±0.10	49.60±0.06	0.81±0.00	2.60	14.96
15	15.51±0.11	47.22±0.10	0.74±0.00	1.90	12.28
18	14.46±0.09	43.65±0.11	0.74±0.00	1.00	6.94
21	14.21±0.05	40.08±0.11	0.74±0.00	1.03	7.26
24	13.88±0.08	36.11±0.09	0.74±0.00	0.95	6.85



ภาพที่ 4.15 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.16 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	1.56±0.08	72.88±0.05	2.90±0.04	-	-
3	1.69±0.10	71.45±0.04	2.08±0.02	0.08	6.91
6	14.27±0.05	54.84±0.09	1.49±0.02	3.11	<b>21.80</b>
9	<b>22.27±0.05</b>	43.6±0.09	1.19±0.01	<b>4.06</b>	18.25
12	18.33±0.08	42.46±0.10	1.04±0.00	2.92	15.92
15	17.7±0.03	39.78±0.08	0.89±0.00	2.22	12.55
18	16.08±0.07	37.37±0.06	0.89±0.00	1.92	11.93
21	13.03±0.02	36.08±0.10	0.89±0.00	1.98	15.19
24	11.95±0.11	31.12±0.04	0.89±0.00	1.87	15.62



ภาพที่ 4.16 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย เริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

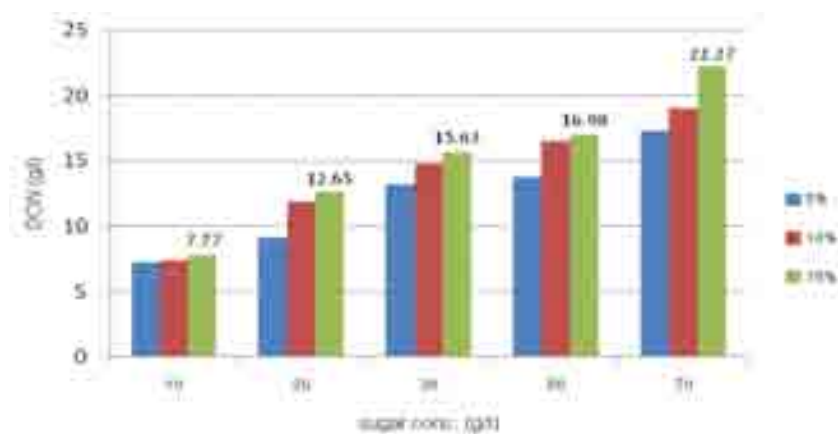


ตารางที่ 4.17 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด อัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไป เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นและปริมาณหัวเชื้อต่างๆกัน

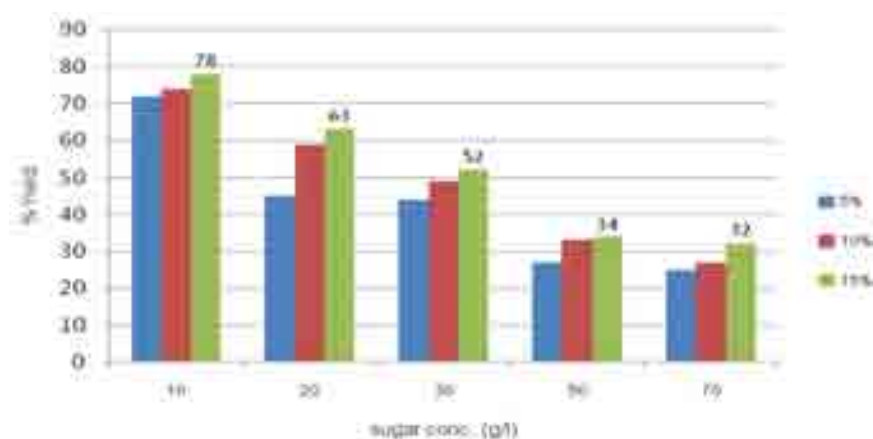
initial sugar (g/l)	% inoculum	Time (h)	DCW (g/l)	residual sugar (g/l)	cell productivity (g/l/h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Y <sub>x/s</sub> overall
10	5	6	7.23±0.01	0.49±0.09	1.07	0.37	0.63
	10	6	7.41±0.04	0.50±0.08	1.06	0.33	0.61
	15	6	7.77±0.08	0.46±0.06	1.10	0.31	0.60
20	5	6	9.09±0.06	2.63±0.03	1.37	0.39	0.45
	10	6	11.89±0.06	1.83±0.06	1.80	0.39	0.55
	15	6	12.65±0.08	1.53±0.05	1.87	0.36	0.53
30	5	6	13.22±0.08	9.30±0.07	2.03	0.43	0.58
	<b>10</b>	6	<b>14.79±0.04</b>	7.98±0.03	<b>2.28</b>	<b>0.43</b>	<b>0.59</b>
	15	6	15.63±0.08	5.03±0.11	2.34	0.41	0.54
50	5	9	13.74±0.05	24.65±0.06	1.43	0.31	0.40
	10	6	16.51±0.07	27.27±0.10	2.59	0.47	0.63
	15	6	16.98±0.08	25.71±0.10	2.64	0.45	0.56
70	5	9	17.33±0.11	38.76±0.10	1.85	0.36	0.51
	10	9	19.01±0.04	52.78±0.09	1.99	0.32	0.93
	15	9	22.27±0.05	43.60±0.09	2.30	0.30	0.71

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของ *B. megaterium* P-12 ในแต่ละสถานะที่เลี้ยงเชื้อ พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้น และสูงสุดเมื่อใช้กล้าเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (ดังแสดงในภาพที่ 4.17) แต่เมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 50 และ 70 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลที่เหลือปริมาณสูง ทำให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตต่ำประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ หลังจากสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ที่เซลล์

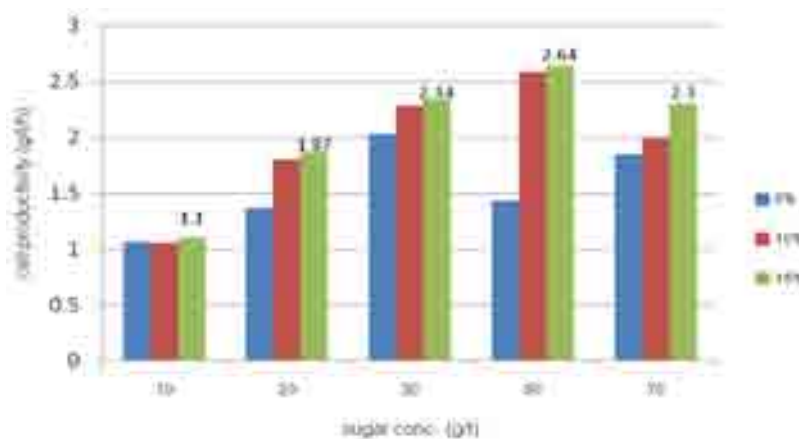
เจริญได้ดีและใช้น้ำตาลได้เกือบหมดและเปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูง (ดังแสดงในภาพที่ 4.18) โดยเมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร พบว่ามีอัตราผลผลิตของเซลล์เฉลี่ยสูงสุด ซึ่งที่ปริมาณกล้ำเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ มีผลผลิตของเซลล์ต่ำสุด คือ 2.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ปริมาณกล้ำเชื้อเริ่มต้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ได้ค่าผลผลิตของเซลล์ใกล้เคียงกัน คือ 2.28 และ 2.34 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ(ดังแสดงในภาพที่ 4.19) แต่การใช้ปริมาณกล้ำเชื้อเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ ค่าอัตราการเจริญจำเพาะและสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไป มีค่าสูงสุด คือ 0.43 และ 0.59 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 4.17) ดังนั้นจึงเลือกใช้ภาวะที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตรและใช้ปริมาณกล้ำเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการวิจัยขั้นต่อไป



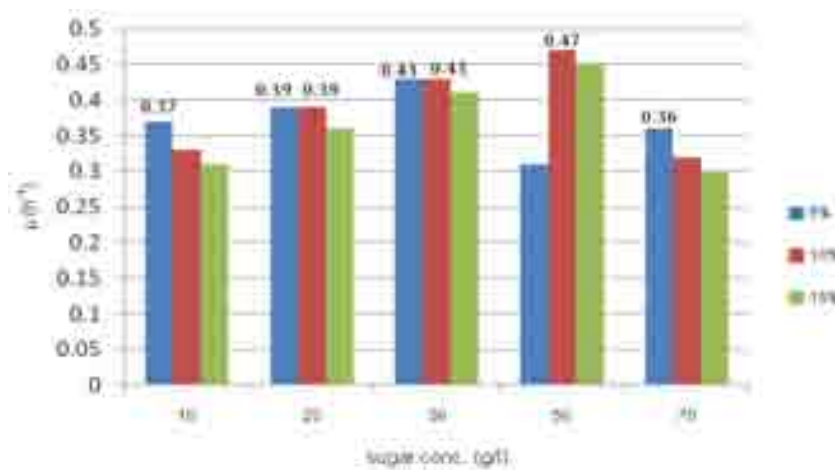
ภาพที่ 4.17 น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่ภาวะความเข้มข้นน้ำตาลและปริมาณกล้ำเชื้อต่างกัน



ภาพที่ 4.18 เปอร์เซนต์ผลผลิตของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่ภาวะความเข้มข้นน้ำตาลและปริมาณกล้ำเชื้อต่างกัน



ภาพที่ 4.19 อัตราผลผลิตของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่ภาวะความเข้มข้นน้ำตาลและปริมาณกล้าเชื้อต่างกัน



ภาพที่ 4.20 อัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่ภาวะความเข้มข้นน้ำตาลและปริมาณกล้าเชื้อต่างกัน

**4.2.2** แปรผันอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน (โดยโมล) เท่ากับ 5 ต่อ 1 10 ต่อ 1 และ 15 ต่อ 1

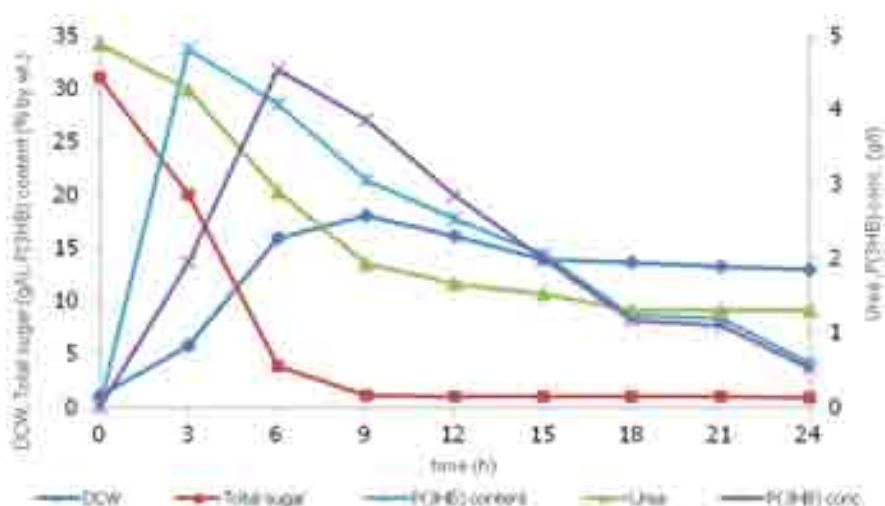
การเพิ่มการเจริญของเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพนั้น เซลล์ต้องได้รับสารอาหารทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีปริมาณและสัดส่วนเหมาะสมเพื่อให้เซลล์เจริญได้ดีเพิ่มขึ้น (Ramsay และคณะ, 1992) ซึ่งจากการเลี้ยงเชื้อที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตรและใช้ปริมาณกลีเซอรีนเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อได้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุด ปริมาณน้ำตาลยังคงเหลืออยู่ แต่ปริมาณของไนโตรเจนเหลือน้อยมากซึ่งอาจจะเป็นผลให้ขาดแหล่งไนโตรเจนและเซลล์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ดังนั้นถ้าเพิ่มปริมาณของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเพิ่มในปริมาณที่มีสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ จะช่วยเพิ่มผลผลิตของเซลล์ให้มากขึ้นจากเดิมได้

ทำการศึกษาโดย ถ่ายกลีเซอรีนอายุ 6 ชั่วโมง ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก ลงในถังหมักที่มีอาหาร MSM ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร และใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน(โดยโมล)ของ C/N เท่ากับ 5 ต่อ 1 10 ต่อ 1 และ 15 ต่อ 1

ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจน เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการใช้น้ำตาล โดยได้การเจริญของเซลล์สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อโดยที่ C/N เท่ากับ 10 ต่อ 1 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 19.07 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ C/N เท่ากับ 5 ต่อ 1 และ 15 ต่อ 1 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 18.02 และ 17.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แนวโน้มการใช้อูเรียลดลงและคงที่ในเซลล์เข้าสู่ระยะ death phase เช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา ความเข้มข้นของ P(3HB)และปริมาณ P(3HB) ที่สะสมระหว่างการเจริญของเซลล์ แตกต่างกันโดยที่ C/N เท่ากับ 10 ต่อ 1 ได้ความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 4.97 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ C/N เท่ากับ 5 ต่อ 1 และ 15 ต่อ 1 ซึ่งได้ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.54 และ 4.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.18 ภาพที่ 4.17 ตารางที่ 4.19 ภาพที่ 4.18 ตารางที่ 4.20 ภาพที่ 4.19

ตารางที่ 4.18 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 ต่อ 1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

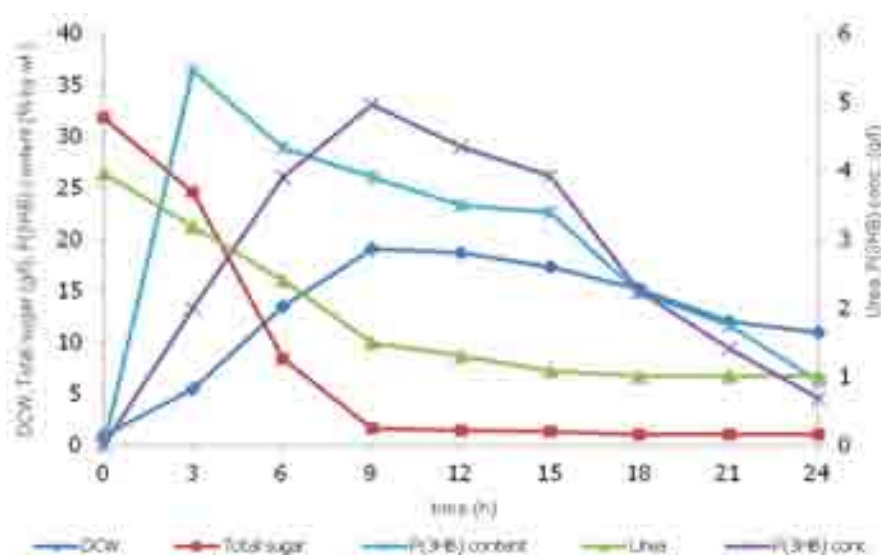
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	1.07±0.04	31.03±0.09	4.88±0.02	-	-
3	5.76±0.05	19.98±0.07	4.27±0.02	1.94	<b>33.71</b>
6	15.89±0.07	3.80±0.07	2.90±0.03	<b>4.54</b>	28.55
9	<b>18.02±0.07</b>	1.06±0.03	1.93±0.01	3.86	21.40
12	16.08±0.08	1.02±0.07	1.66±0.01	2.84	17.69
15	13.86±0.10	0.99±0.09	1.52±0.00	1.99	14.38
18	13.56±0.12	0.94±0.03	1.30±0.00	1.17	8.62
21	13.22±0.09	0.93±0.03	1.30±0.00	1.10	8.33
24	12.89±0.10	0.92±0.06	1.30±0.00	0.53	4.09



ภาพที่ 4.21 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 5 ต่อ 1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.19 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 10 ต่อ 1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

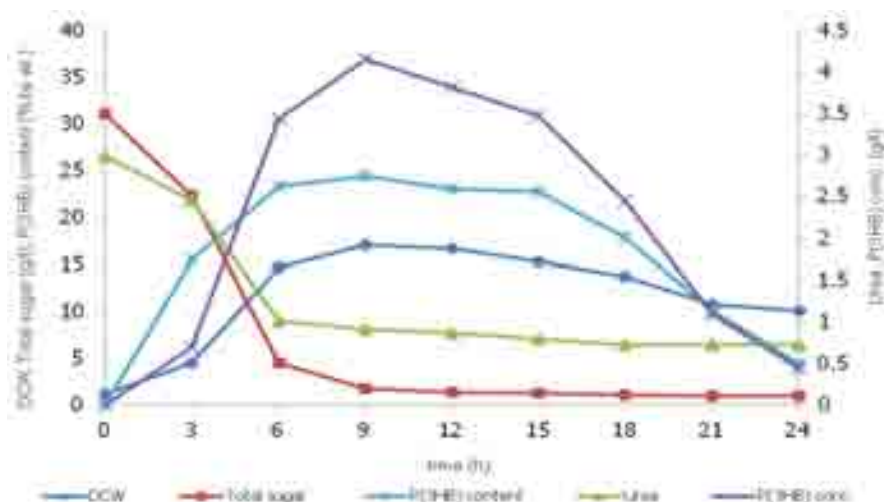
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	0.94±0.02	31.8±0.04	3.96±0.02	-	-
3	5.49±0.04	24.61±0.03	3.19±0.03	2.00	<b>36.42</b>
6	13.54±0.07	8.37±0.07	2.41±0.03	3.91	28.91
9	<b>19.07±0.08</b>	1.68±0.02	1.49±0.02	<b>4.97</b>	26.08
12	18.66±0.06	1.40±0.04	1.30±0.00	4.34	23.28
15	17.31±0.02	1.33±0.05	1.08±0.00	3.92	22.67
18	15.19±0.03	1.09±0.03	1.01±0.00	2.25	14.82
21	12.02±0.05	1.08±0.13	1.01±0.00	1.40	11.66
24	10.94±0.10	1.02±0.08	1.01±0.00	0.68	6.23



ภาพที่ 4.22 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 10 ต่อ 1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.20 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 15 ต่อ 1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)
0	1.13±0.11	31.01±0.03	2.99±0.01	-	-
3	4.49±0.09	22.36±0.05	2.46±0.01	0.70	15.49
6	14.70±0.04	4.48±0.06	1.01±0.02	3.43	23.36
9	<b>17.01±0.08</b>	1.73±0.05	0.91±0.03	<b>4.15</b>	<b>24.43</b>
12	16.59±0.08	1.37±0.07	0.87±0.00	3.81	22.97
15	15.29±0.06	1.24±0.09	0.79±0.00	3.47	22.71
18	13.68±0.03	1.05±0.04	0.72±0.00	2.44	17.84
21	10.77±0.02	0.94±0.03	0.72±0.00	1.09	10.11
24	10.03±0.02	0.90±0.07	0.72±0.00	0.44	4.42



ภาพที่ 4.23 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นของ P(3HB) และปริมาณ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 15 ต่อ 1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 4.21 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) ความเข้มข้นของ P(3HB) อัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไป เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆกัน

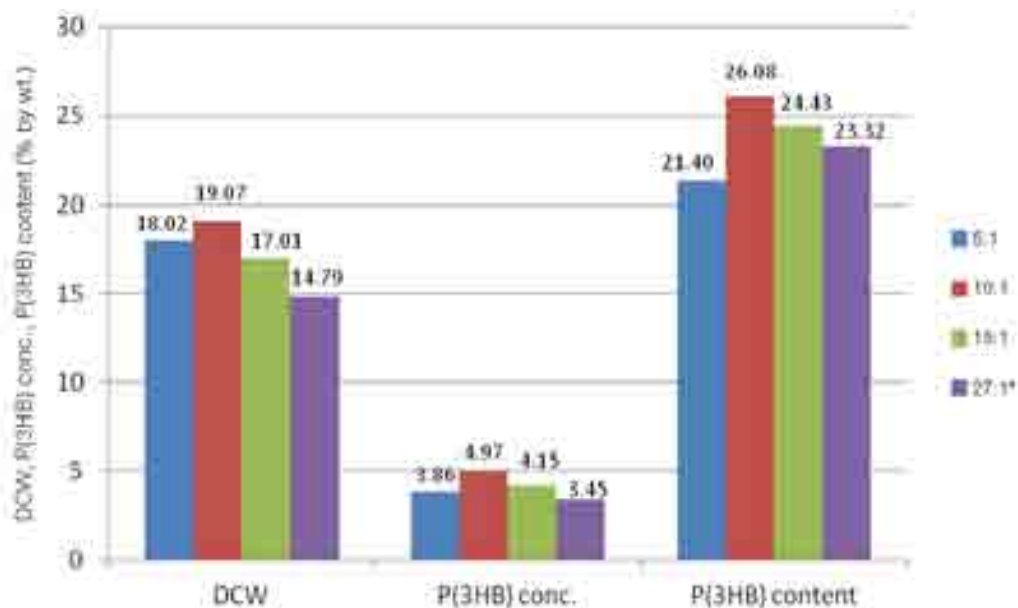
C/N ratio	time (h)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% by wt.)	Cell productivity (g/l/h)	P(3HB) Productivity (g/l/h)	Yx/s
5 : 1	9	18.02±0.07	3.86	21.40	1.88	0.43	0.57
<b>10 : 1</b>	9	<b>19.07±0.08</b>	<b>4.97</b>	<b>26.08</b>	<b>2.01</b>	<b>0.55</b>	<b>0.60</b>
15 : 1	9	17.01±0.08	4.15	24.43	1.76	0.46	0.54
27: 1*	6	14.79±0.04	3.45	23.32	2.28	0.57	0.59

\* ชุดควบคุม (ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.1 คือ น้ำตาล 30 g/l ปริมาณกลีเซอรีน 10 % และ ยูเรีย 1 g/l)

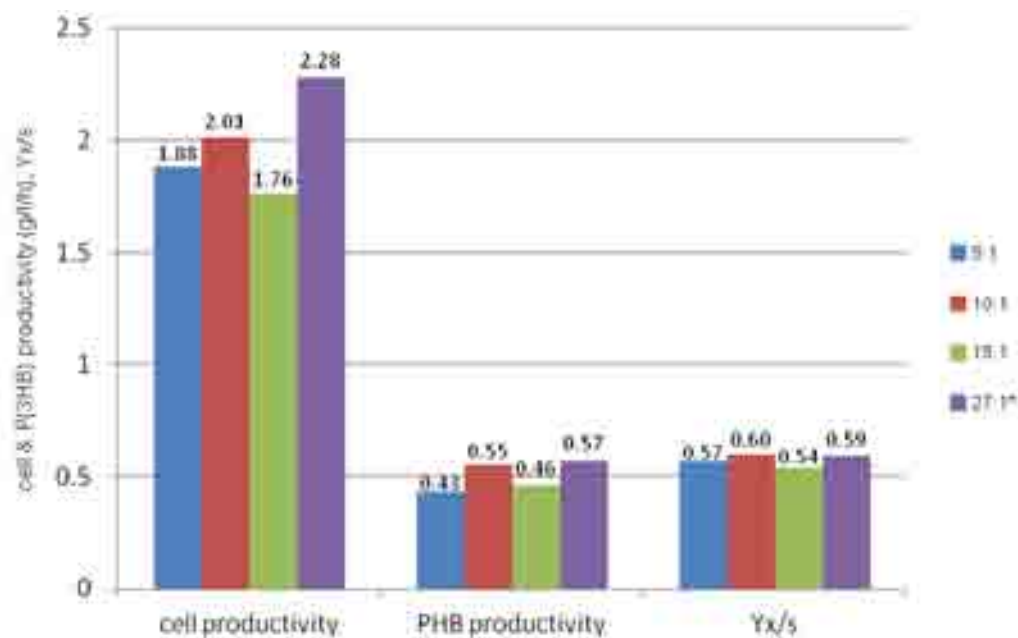
ตารางที่ 4.21 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของ *B. megaterium* P-12 ความเข้มข้นของ P(3HB) P(3HB) content อัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไป (Yx/s) ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆกัน พบว่า ที่อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 10 ต่อ 1 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 19.07 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.97 กรัมต่อลิตร ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 26.08 เปอร์เซ็นต์ และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไปเท่ากับ 0.60 (ดังแสดงในภาพที่ 4.20 ภาพที่ 4.21) ซึ่งมีค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับที่ C/N ต่างๆ ส่วนอัตราผลผลิตของเซลล์ และ อัตราผลผลิตของ P(3HB) ลดลงจากชุดควบคุมเล็กน้อย (ดังแสดงในภาพที่ 4.21) เนื่องจากระยะเวลาที่เซลล์เจริญสูงสุดเพิ่มขึ้นจาก 6 ชั่วโมงเป็น 9 ชั่วโมง

ดังนั้นจึงเลือกใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน (น้ำตาลในน้ำอ้อยต่อยูเรีย) เท่ากับ 10 ต่อ 1 เพื่อการศึกษาในขั้นตอนต่อไป





ภาพที่ 4.24 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) และความเข้มข้นของ P(3HB) เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างกัน



ภาพที่ 4.25 เปรียบเทียบอัตราผลผลิตของเซลล์ อัตราผลผลิตของ P(3HB) และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไป เมื่อเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ที่อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างกัน

### 4.3 การเพาะเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในระดับถังหมักระยะที่ 2 เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV)

การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ต้องมีการเติมสารตั้งต้นของมอนอเมอร์ 3HV ซึ่งจากงานวิจัยนี้คือ โซเดียมโพรพิโอเนต โดยถ้าเติมโซเดียมโพรพิโอเนตในช่วงเริ่มต้นการเลี้ยงเชื้อ ทำให้ความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนตที่สูงเกินไปเกิดพิษต่อเซลล์และทำให้เซลล์ตายได้ (Yu และคณะ, 2002) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพัฒนาวิธีการผลิตเป็น 2 ขั้นตอน ในขั้นตอนแรกเป็นการเพิ่มความเข้มข้นเซลล์ให้ได้เพียงพอก่อนแล้วจึงเติมโซเดียมโพรพิโอเนต โดยเติมในรูปแบบของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลและโซเดียมโพรพิโอเนต เนื่องจากได้โคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV สูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวที่ได้มอนอเมอร์ของ 3HB สูง (Doi และคณะ, 1987 ; Lee และคณะ , 1994)

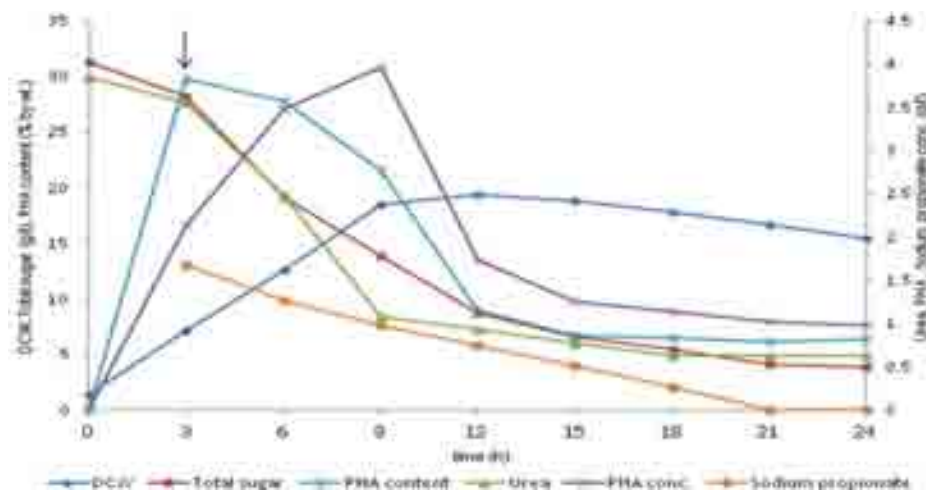
เลี้ยงเชื้อโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในขั้นต้น คือ ถ่ายกล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมง ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงในถังหมักที่มีอาหาร MSM 3 ลิตร โดยใส่น้ำอ้อยที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 10 ต่อ 1 (น้ำตาลในน้ำอ้อย 30 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 8.12 กรัมต่อลิตร) จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลในน้ำอ้อย ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HB (3HB-generating carbon source) และเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์มอนอเมอร์ 3HV (3HV-generating carbon source) ในปริมาณที่ทำให้ปริมาตรอาหารในถังหมักเป็น 3 ลิตร โดยแปรปัจจัยต่างๆ ดังนี้

- 4.3.1 ช่วงเวลาในการเติมแหล่งคาร์บอนผสม คือ ชั่วโมงที่ 3 6 และ 9
- 4.3.2 สัดส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำอ้อยที่เติมลงในถังหมักกับปริมาณเกลือโซเดียมโพรพิโอเนต เท่ากับ 1:0.25 1:0.5 และ 1:1
- 4.3.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำอ้อย(ในแหล่งคาร์บอนผสม) ที่เติมลงในถังหมักเป็น 6 9 และ 12 กรัมต่อลิตร (ไม่รวมความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลือในถังหมักก่อนเติมแหล่งคาร์บอนผสม)

ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมมีการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น ระยะเวลาการเจริญของเซลล์สูงสุดเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 9 เป็นชั่วโมงที่ 12 โดยเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่ ชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 6 ความเข้มข้นของ PHA ค่อยๆเพิ่มขึ้นจากระยะเวลาที่เริ่มเลี้ยงเชื้อ และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของน้ำตาลและยูเรียลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา การใช้โซเดียมโพรฟิไอเนตพบว่าความเข้มข้นของโซเดียมโพรฟิไอเนตลดลงและให้สัดส่วนของ 3HV เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ การสะสมของ PHBV แตกต่างกันตามช่วงเวลาเติมแหล่งคาร์บอนผสม (ดังแสดงในตารางที่ 4.22 ภาพที่ 4.22 ตารางที่ 4.23 ภาพที่ 4.23 ตารางที่ 4.24 ภาพที่ 4.24 ตารางที่ 4.25 ภาพที่ 4.25 ตารางที่ 4.26 ภาพที่ 4.26 ตารางที่ 4.27 ภาพที่ 4.27 ตารางที่ 4.28 ภาพที่ 4.28 ตารางที่ 4.29 ภาพที่ 4.29 ตารางที่ 4.30 ภาพที่ 4.30) และการเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่ชั่วโมงที่ 9 ทำให้ความเข้มข้นของ PHBV สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 (ดังแสดงในตารางที่ 4.31 ภาพที่ 4.31 ตารางที่ 4.32 ภาพที่ 4.32 ตารางที่ 4.33 ภาพที่ 4.33 ตารางที่ 4.34 ภาพที่ 4.34 ตารางที่ 4.35 ภาพที่ 4.35 ตารางที่ 4.36 ภาพที่ 4.36 ตารางที่ 4.37 ภาพที่ 4.37 ตารางที่ 4.38 ภาพที่ 4.38 ตารางที่ 4.39 ภาพที่ 4.39) และปริมาณของ PHA (เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อในทุกภาวะการทดลอง

ตารางที่ 4.22 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

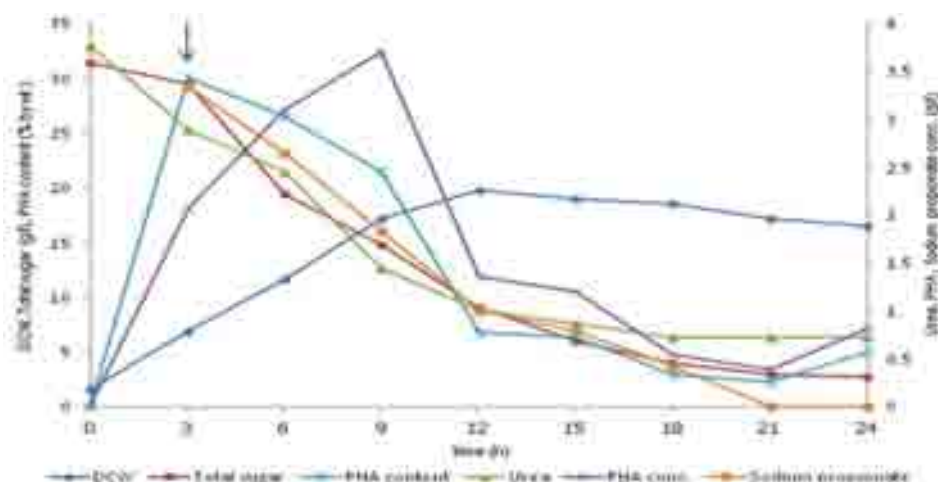
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (%)	
							3HB	3HV
0	1.34±0.04	31.28±0.02	-	3.85±0.02	-	-	-	-
3	7.12±0.08	28.21±0.03	1.68±0.15	3.55±0.03	2.12	29.78	100	0
6	12.56±0.03	19.12±0.05	1.26±0.18	2.47±0.03	3.48	27.71	98	2
9	<b>18.44±0.04</b>	13.86±0.05	0.98±0.21	1.08±0.01	<b>3.96</b>	21.48	95	5
12	19.36±0.05	8.74±0.04	0.74±0.14	0.93±0.01	1.74	8.99	94	6
15	18.82±0.06	6.56±0.03	0.51±0.25	0.77±0.00	1.25	6.64	91	9
18	17.75±0.04	5.49±0.04	0.26±0.31	0.62±0.00	1.14	6.42	93	7
21	16.64±0.03	4.08±0.03	0.00±0.00	0.62±0.00	1.02	6.13	94	6
24	15.43±0.07	3.87±0.03	0.00±0.00	0.62±0.00	0.97	6.29	94	6



ภาพที่ 4.26 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.23 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

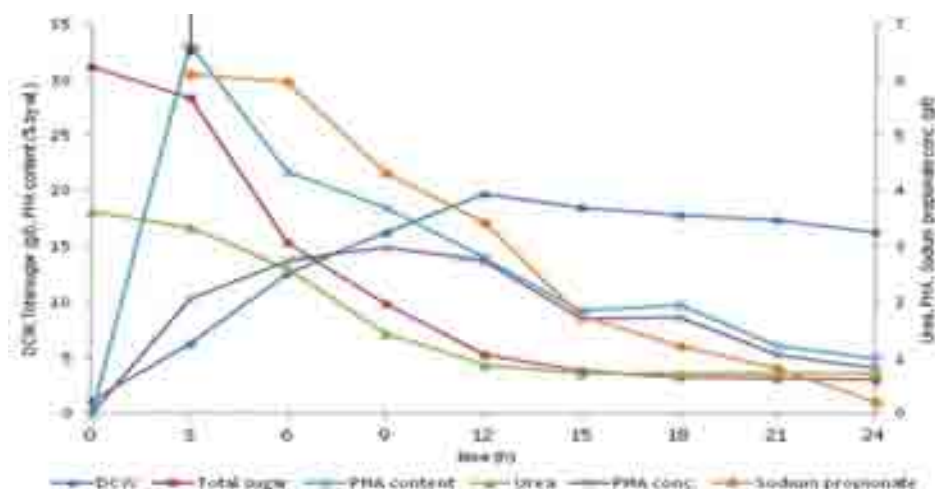
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (%)	
							3HB	3HV
0	1.56±0.05	31.41±0.06	-	3.77±0.09	-	-	-	-
3	6.87±0.05	29.48±0.06	3.35±0.35	2.90±0.05	2.06	30.03	100	0
6	11.70±0.03	19.47±0.05	2.65±0.36	2.46±0.03	3.11	26.55	97	3
9	<b>17.23±0.09</b>	14.77±0.08	1.84±0.23	1.45±0.02	<b>3.71</b>	21.54	93	7
12	19.82±0.11	9.06±0.03	1.01±0.24	1.01±0.02	1.36	6.85	81	19
15	19.04±0.10	6.06±0.07	0.78±0.19	0.87±0.00	1.20	6.30	83	<b>17</b>
18	18.52±0.09	3.93±0.02	0.43±0.29	0.72±0.00	0.54	2.92	85	15
21	17.21±0.07	2.98±0.09	0.00±0.00	0.72±0.00	0.39	2.26	86	14
24	16.57±0.07	2.72±0.04	0.00±0.00	0.72±0.00	0.82	4.96	87	13



ภาพที่ 4.27 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.24 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

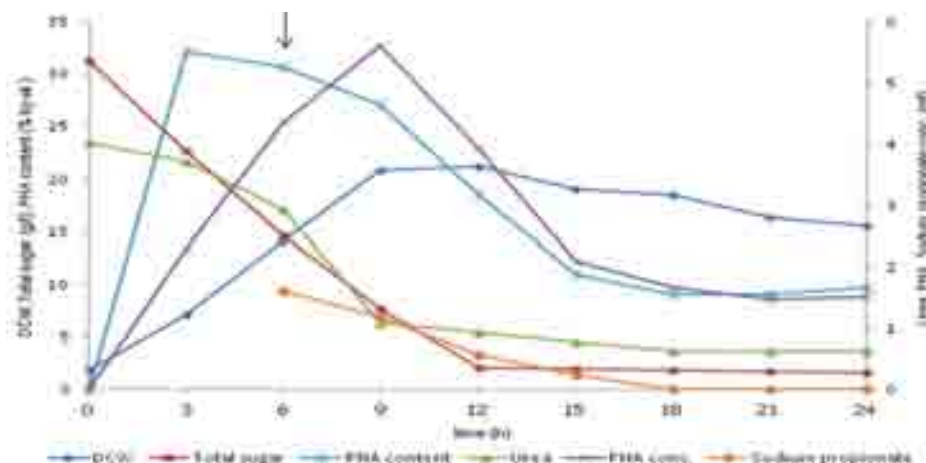
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.13±0.06	31.16±0.06	-	3.62±0.06	-	-	-	-
3	6.25±0.05	28.33±0.06	6.10±0.26	3.33±0.05	2.07	33.19	100	0
6	12.65±0.09	15.32±0.09	5.96±0.29	2.61±0.04	2.75	21.72	93	7
9	<b>16.17±0.12</b>	9.91±0.03	4.33±0.34	1.45±0.04	<b>2.98</b>	18.42	89	<b>11</b>
12	19.69±0.11	5.28±0.08	3.43±0.31	0.87±0.03	2.75	13.96	83	17
15	18.41±0.04	3.80±0.05	1.76±0.25	0.72±0.00	1.70	9.26	82	18
18	17.73±0.05	3.23±0.04	1.21±0.27	0.72±0.00	1.74	9.84	83	17
21	17.38±0.05	3.20±0.08	0.80±0.31	0.72±0.00	1.05	6.06	85	15
24	16.22±0.07	3.04±0.04	0.21±0.37	0.72±0.00	0.80	4.91	86	14



ภาพที่ 4.28 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 3 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.25 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

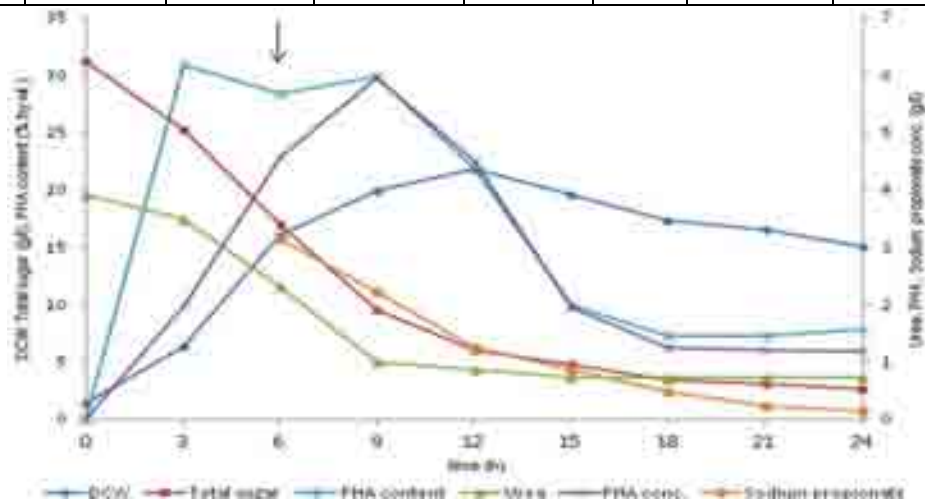
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.76±0.06	31.26±0.07	-	4.01±0.05	-	-	-	-
3	7.12±0.05	22.68±0.04	-	3.70±0.04	2.29	32.22	100	0
6	14.15±0.08	14.60±0.05	1.62±0.35	2.93±0.04	4.34	30.69	100	0
9	20.79±0.09	7.69±0.09	1.18±0.28	1.08±0.02	<b>5.62</b>	27.02	96	4
12	<b>21.18±0.04</b>	2.07±0.05	0.56±0.32	0.93±0.01	<b>3.91</b>	18.47	92	<b>8</b>
15	<b>19.03±0.03</b>	1.94±0.07	0.24±0.26	0.77±0.00	<b>2.10</b>	11.03	89	<b>11</b>
18	18.49±0.10	1.84±0.02	0.00±0.00	0.62±0.00	1.67	9.01	91	9
21	16.29±0.09	1.66±0.03	0.00±0.00	0.62±0.00	1.48	9.10	92	8
24	15.56±0.08	1.61±0.08	0.00±0.00	0.62±0.00	1.52	9.76	93	7



ภาพที่ 4.29 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.26 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.34±0.06	31.16±0.04	-	3.91±0.05	-	-	-	-
3	6.37±0.06	25.18±0.01	-	3.48±0.03	1.97	30.91	100	0
6	16.11±0.10	16.98±0.03	3.14±0.29	2.32±0.01	4.56	28.32	100	0
9	<b>19.92±0.11</b>	9.47±0.03	2.22±0.37	1.01±0.01	<b>5.96</b>	29.90	89	<b>11</b>
12	<b>20.56±0.09</b>	6.07±0.06	1.25±0.25	0.87±0.00	<b>4.50</b>	21.87	87	<b>13</b>
15	19.52±0.04	4.82±0.07	0.86±0.27	0.72±0.00	1.95	9.98	88	12
18	17.29±0.06	3.46±0.03	0.49±0.35	0.72±0.00	1.25	7.25	91	9
21	16.48±0.08	3.09±0.05	0.23±0.34	0.72±0.00	1.20	7.28	93	7
24	15.04±0.08	2.59±0.05	0.15±0.23	0.72±0.00	1.18	7.86	92	8

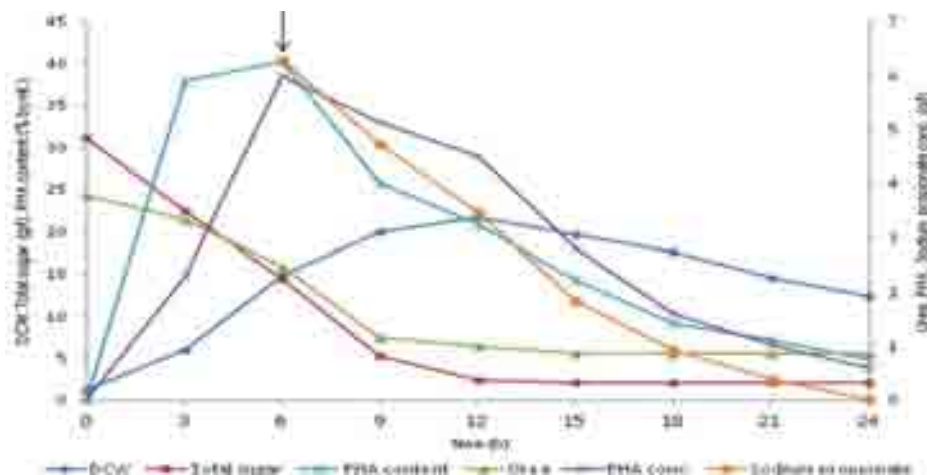


ภาพที่ 4.30 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PH และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )



ตารางที่ 4.27 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

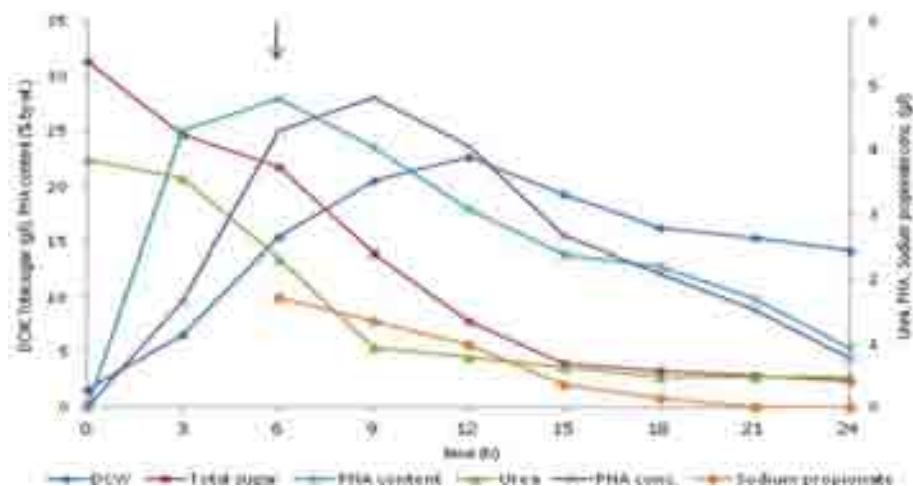
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.27±0.05	31.06±0.04	-	3.77±0.04	-	-	-	-
3	6.05±0.05	22.44±0.06	-	3.33±0.04	2.29	37.88	100	0
6	14.88±0.03	14.37±0.03	6.28±0.38	2.46±0.03	5.99	40.23	100	0
9	19.86±0.08	5.21±0.03	4.72±0.26	1.16±0.02	5.13	25.81	94	6
12	<b>21.65±0.09</b>	2.42±0.09	3.46±0.29	1.01±0.00	<b>4.51</b>	20.83	86	<b>14</b>
15	19.59±0.11	2.13±0.05	1.84±0.34	0.87±0.00	2.80	14.28	80	20
18	17.59±0.11	2.11±0.06	0.94±0.23	0.87±0.00	1.61	9.14	83	17
21	14.52±0.03	2.07±0.02	0.38±0.27	0.87±0.00	1.03	7.09	91	9
24	12.32±0.06	2.03±0.07	0.00±0.00	0.87±0.00	0.59	4.78	96	4



ภาพที่ 4.31 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.28 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

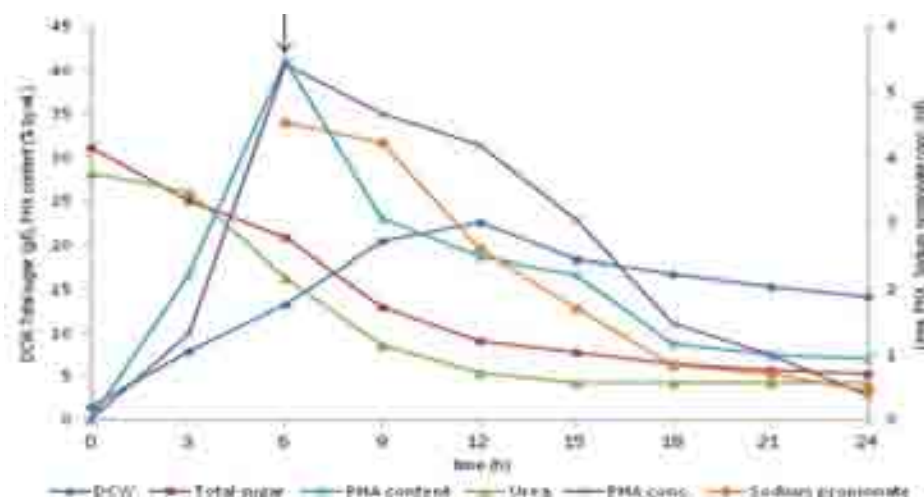
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.64±0.11	31.33±0.04	-	3.85±0.04	-	-	-	-
3	6.60±0.13	24.68±0.03	-	3.55±0.03	1.65	25.04	100	0
6	15.40±0.09	21.79±0.06	1.71±0.41	2.31±0.03	4.30	27.93	100	0
9	<b>20.47±0.07</b>	13.88±0.07	1.34±0.27	0.93±0.02	<b>4.82</b>	23.55	92	<b>8</b>
12	<b>22.69±0.04</b>	7.86±0.09	0.98±0.38	0.77±0.01	<b>4.05</b>	17.87	88	<b>12</b>
15	19.31±0.06	3.92±0.05	0.35±0.29	0.62±0.00	2.67	13.82	87	13
18	16.24±0.05	3.23±0.07	0.13±0.26	0.47±0.00	2.07	12.75	86	14
21	15.30±0.05	2.84±0.05	0.00±0.00	0.47±0.00	1.51	9.90	89	11
24	14.20±0.09	2.40±0.08	0.00±0.00	0.47±0.00	0.76	5.34	90	10



ภาพที่ 4.32 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.29 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

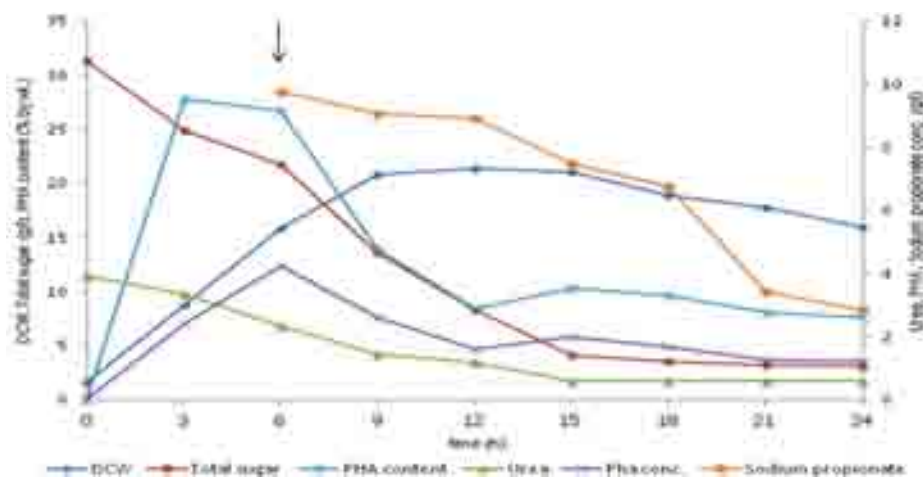
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.52±0.06	31.09±0.03	-	3.77±0.05	-	-	-	-
3	7.87±0.12	24.96±0.02	-	3.48±0.03	1.32	16.79	100	0
6	13.19±0.09	20.79±0.05	4.54±0.28	2.17±0.03	5.43	41.20	100	0
9	<b>20.31±0.08</b>	13.02±0.05	4.22±0.35	1.16±0.02	<b>4.67</b>	23.01	83	<b>17</b>
12	<b>22.50±0.06</b>	9.11±0.06	2.60±0.40	0.72±0.00	<b>4.19</b>	18.63	81	<b>19</b>
15	<b>18.32±0.07</b>	7.77±0.04	1.71±0.31	0.58±0.00	<b>3.05</b>	16.63	79	<b>21</b>
18	16.77±0.07	6.42±0.09	0.83±0.26	0.58±0.00	1.47	8.75	77	23
21	15.34±0.03	5.67±0.04	0.69±0.29	0.58±0.00	0.99	7.39	81	19
24	14.13±0.04	5.29±0.03	0.46±0.26	0.58±0.00	0.37	7.03	83	17



ภาพที่ 4.33 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.30 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

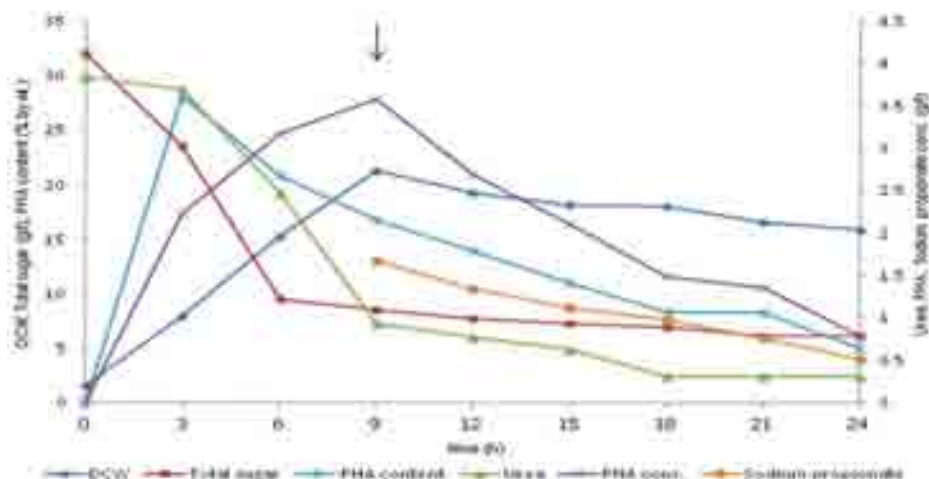
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.56±0.06	31.33±0.05	-	3.91±0.02	-	-	-	-
3	8.74±0.06	24.83±0.07	-	3.33±0.01	2.43	27.80	100	0
6	15.80±0.12	21.77±0.08	9.76±0.35	2.32±0.03	4.22	26.71	100	0
9	<b>20.78±0.09</b>	13.54±0.03	9.07±0.24	1.45±0.02	<b>2.62</b>	13.96	90	<b>10</b>
12	21.36±0.04	8.22±0.04	8.91±0.38	1.16±0.00	1.59	8.39	85	15
15	20.99±0.05	4.09±0.07	7.50±0.29	0.58±0.00	1.99	10.27	81	19
18	18.93±0.08	3.48±0.05	6.75±0.41	0.58±0.00	1.68	9.67	76	24
21	17.80±0.07	3.21±0.05	3.43±0.26	0.58±0.00	1.27	8.01	77	23
24	15.91±0.10	3.04±0.09	2.82±0.36	0.58±0.00	1.21	7.60	80	20



ภาพที่ 4.34 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.31 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

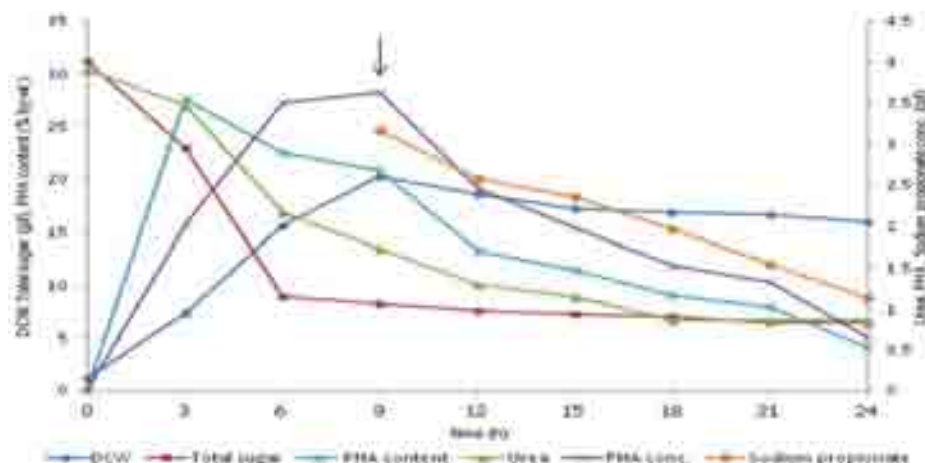
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.56±0.02	32.03±0.04	-	3.85±0.05	-	-	-	-
3	7.95±0.11	23.51±0.05	-	3.70±0.04	2.23	28.05	100	0
6	15.28±0.05	9.56±0.03	-	2.47±0.04	3.18	20.81	100	0
9	21.34±0.04	8.46±0.04	1.68±0.39	0.93±0.03	3.58	16.78	100	0
12	19.26±0.03	7.68±0.03	1.34±0.25	0.77±0.02	2.69	13.97	97	3
15	<b>18.15±0.03</b>	7.21±0.02	1.12±0.36	0.62±0.00	<b>2.11</b>	10.95	91	<b>9</b>
18	17.97±0.04	6.95±0.02	0.97±0.25	0.31±0.00	1.49	8.31	88	12
21	16.54±0.03	6.12±0.07	0.76±0.37	0.31±0.00	1.36	8.22	90	10
24	15.87±0.08	6.08±0.05	0.51±0.28	0.31±0.00	0.79	4.98	92	8



ภาพที่ 4.35 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.32 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

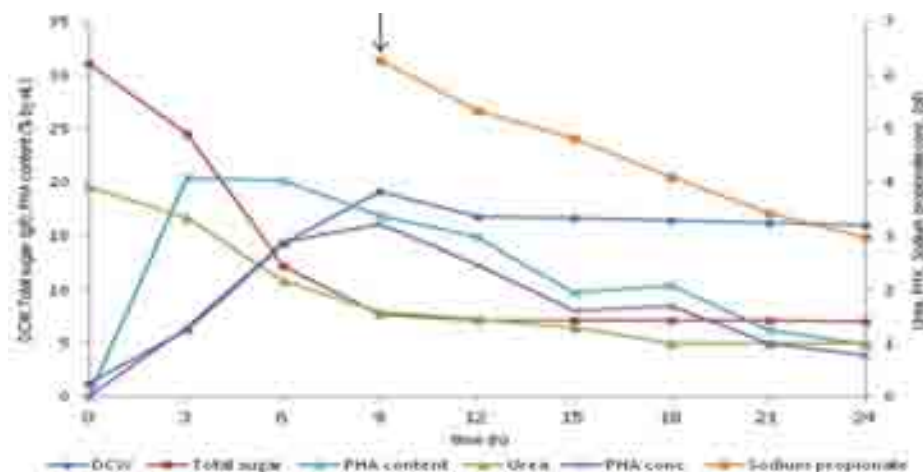
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.18±0.05	31.21±0.06	-	3.91±0.05	-	-	-	-
3	7.32±0.06	22.98±0.04	-	3.48±0.05	2.02	27.54	100	0
6	15.63±0.03	8.95±0.05	-	2.17±0.02	3.51	22.45	100	0
9	20.23±0.12	8.23±0.03	3.17±0.43	1.74±0.01	3.63	20.80	100	0
12	18.58±0.04	7.64±0.04	2.57±0.38	1.30±0.00	2.45	13.19	93	7
15	<b>17.19±0.06</b>	7.25±0.02	2.35±0.29	1.16±0.00	<b>1.97</b>	11.48	83	<b>17</b>
18	16.85±0.11	6.98±0.08	1.97±0.31	0.87±0.00	1.53	9.09	81	19
21	16.68±0.10	6.52±0.06	1.55±0.37	0.87±0.00	1.33	7.95	82	18
24	15.93±0.09	6.41±0.09	1.14±0.40	0.87±0.00	0.65	4.11	83	17



ภาพที่ 4.36 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.33 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.29±0.05	31.05±0.04	-	3.91±0.04	-	-	-	-
3	6.29±0.03	24.50±0.03	-	3.33±0.03	1.28	20.40	100	0
6	14.27±0.09	12.21±0.04	-	2.17±0.03	2.87	20.11	100	0
9	19.12±0.13	7.68±0.05	6.28±0.41	1.59±0.02	3.22	16.83	100	0
12	<b>16.70±0.11</b>	7.18±0.05	5.35±0.29	1.45±0.00	<b>2.48</b>	14.84	89	<b>11</b>
15	16.67±0.09	7.16±0.03	4.81±0.34	1.30±0.00	1.61	9.69	86	14
18	16.35±0.07	7.12±0.02	4.10±0.25	1.01±0.00	1.71	10.46	80	20
21	16.13±0.10	7.09±0.07	3.41±0.32	1.01±0.00	1.00	6.23	83	17
24	16.01±0.05	7.04±0.06	2.96±0.37	1.01±0.00	0.78	4.87	82	18

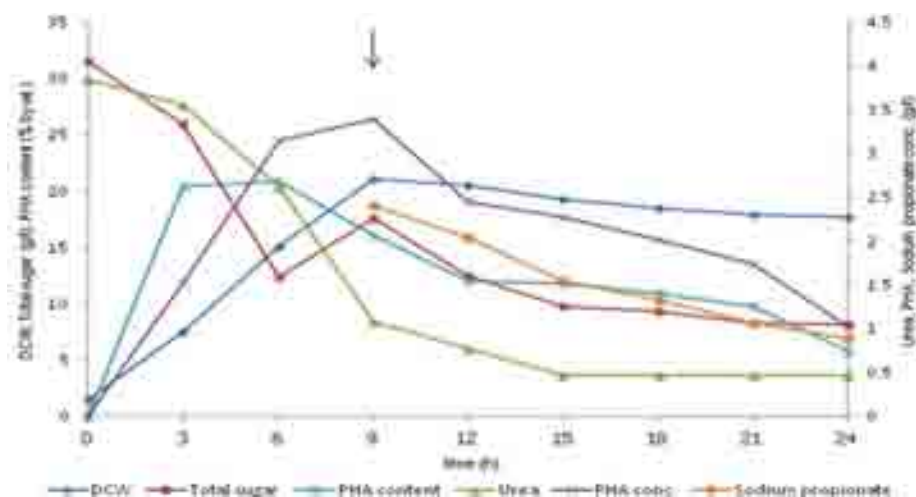


ภาพที่ 4.37 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )



ตารางที่ 4.34 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.43±0.07	31.46±0.05	-	3.85±0.03	-	-	-	-
3	7.45±0.09	25.98±0.07	-	3.55±0.04	1.52	20.40	100	0
6	15.12±0.06	12.35±0.08	-	2.62±0.02	3.15	20.83	100	0
9	21.08±0.11	17.59±0.04	2.41±0.34	1.08±0.01	3.39	16.08	100	0
12	20.48±0.05	12.42±0.03	2.04±0.46	0.77±0.00	2.45	11.96	95	5
15	<b>19.21±0.12</b>	9.73±0.09	1.55±0.26	0.47±0.00	<b>2.27</b>	11.82	90	<b>10</b>
18	<b>18.47±0.09</b>	9.28±0.05	1.32±0.29	0.47±0.00	<b>2.01</b>	10.88	86	<b>14</b>
21	17.95±0.04	8.23±0.06	1.06±0.37	0.47±0.00	1.74	9.69	87	13
24	17.72±0.06	8.14±0.03	0.89±0.34	0.47±0.00	1.02	5.76	87	13

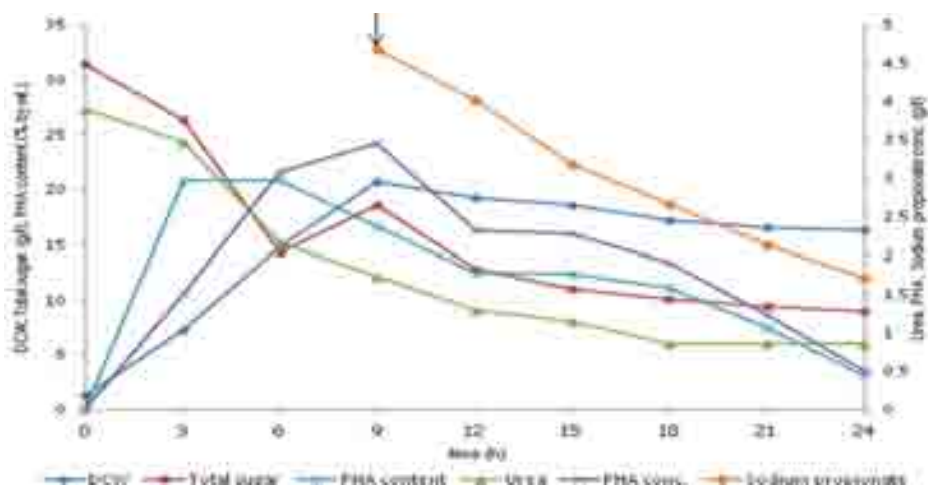


ภาพที่ 4.38 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )



ตารางที่ 4.35 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

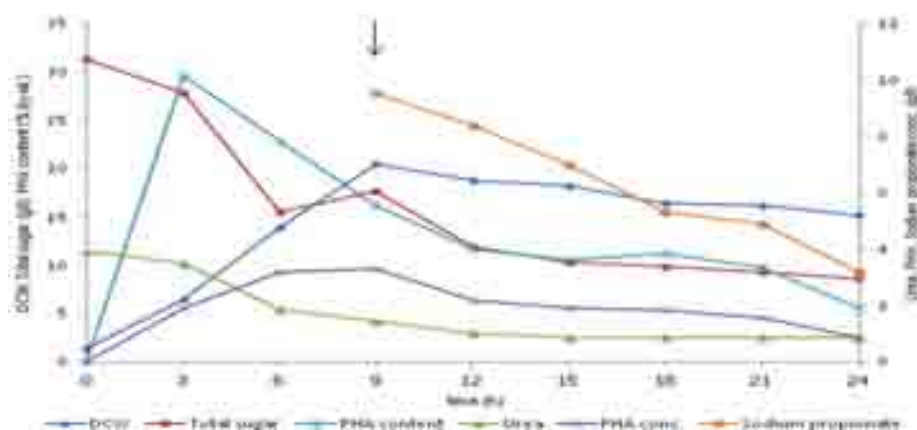
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.28±0.11	31.40±0.06	-	3.91±0.05	-	-	-	-
3	7.26±0.09	26.38±0.04	-	3.48±0.03	1.51	20.76	100	0
6	14.87±0.09	14.26±0.07	-	2.17±0.01	3.09	20.78	100	0
9	20.71±0.05	18.50±0.05	4.69±0.42	1.74±0.01	3.45	16.68	100	0
12	<b>19.25±0.06</b>	12.79±0.05	4.02±0.38	1.30±0.01	<b>2.32</b>	12.45	90	<b>10</b>
15	<b>18.51±0.03</b>	10.96±0.09	3.18±0.29	1.16±0.00	<b>2.28</b>	12.32	82	<b>18</b>
18	17.22±0.08	10.03±0.03	2.67±0.25	0.87±0.00	1.91	11.10	80	20
21	16.49±0.07	9.40±0.04	2.13±0.32	0.87±0.00	1.24	7.50	83	17
24	16.32±0.02	8.90±0.08	1.72±0.38	0.87±0.00	0.50	3.08	83	17



ภาพที่ 4.39 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.36 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

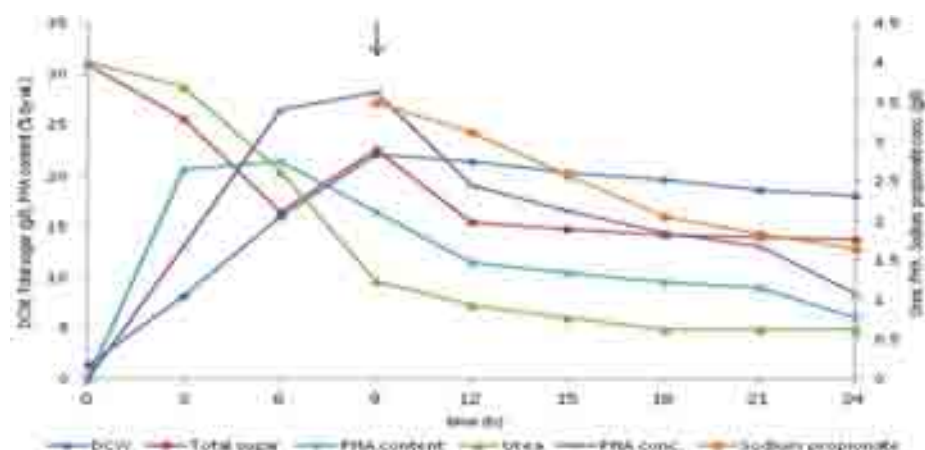
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.34±0.09	31.31±0.08	-	3.91±0.05	-	-	-	-
3	6.43±0.05	27.84±0.07	-	3.48±0.03	1.90	29.62	100	0
6	13.97±0.05	15.51±0.05	-	1.88±0.01	3.19	22.86	100	0
9	20.45±0.07	17.63±0.05	9.53±0.27	1.45±0.01	3.30	16.14	100	0
12	<b>18.73±0.10</b>	11.85±0.03	8.36±0.29	1.01±0.00	<b>2.19</b>	11.69	92	8
15	<b>18.25±0.09</b>	10.26±0.04	6.96±0.34	0.87±0.00	<b>1.92</b>	10.50	77	<b>23</b>
18	16.43±0.12	9.88±0.08	5.30±0.42	0.87±0.00	1.84	11.21	81	19
21	16.18±0.11	9.29±0.02	4.90±0.36	0.87±0.00	1.57	9.70	82	18
24	15.15±0.04	8.58±0.06	3.20±0.35	0.87±0.00	0.84	5.56	82	18



ภาพที่ 4.40 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.37 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

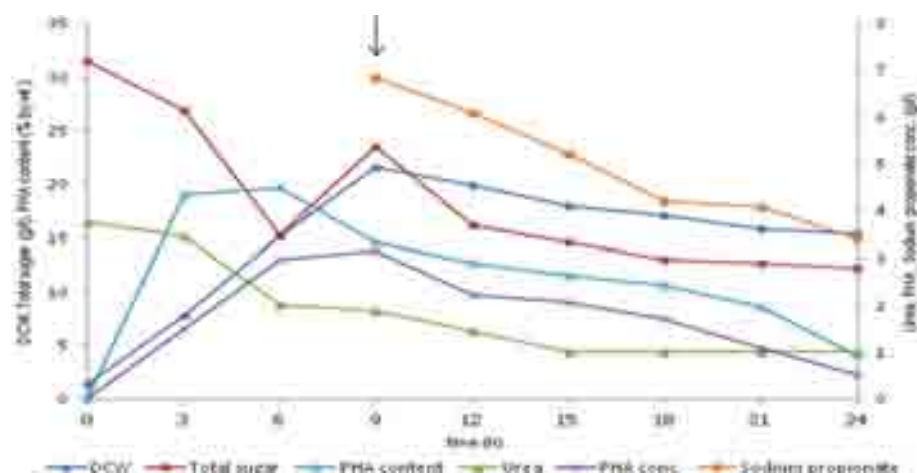
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.35±0.08	30.97±0.05	-	4.01±0.04	-	-	-	-
3	8.14±0.11	25.64±0.05	-	3.70±0.02	1.68	20.64	100	0
6	15.95±0.09	16.42±0.04	-	2.62±0.01	3.41	21.38	100	0
9	22.06±0.05	22.59±0.07	3.49±0.39	1.24±0.01	3.62	16.41	100	0
12	<b>21.38±0.03</b>	15.36±0.08	3.12±0.25	0.93±0.01	<b>2.44</b>	11.41	90	<b>10</b>
15	<b>20.26±0.07</b>	14.73±0.02	2.58±0.31	0.77±0.00	<b>2.12</b>	10.46	82	<b>18</b>
18	19.54±0.06	14.12±0.03	2.06±0.26	0.62±0.00	1.85	9.47	80	20
21	18.63±0.06	13.98±0.07	1.83±0.29	0.62±0.00	1.67	8.96	81	19
24	17.98±0.09	13.75±0.04	1.64±0.35	0.62±0.00	1.08	6.01	82	18



ภาพที่ 4.41 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.25 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.38 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

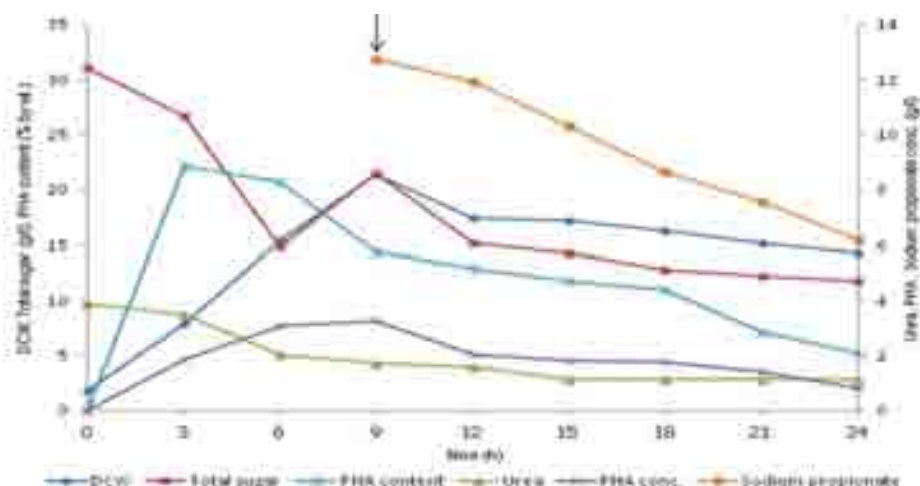
Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.38±0.11	31.56±0.05	-	3.77±0.04	-	-	-	-
3	7.86±0.04	26.88±0.03	-	3.48±0.03	1.49	18.99	100	0
6	15.13±0.12	15.23±0.07	-	2.03±0.01	2.98	19.71	100	0
9	21.65±0.07	23.49±0.04	6.85±0.38	1.88±0.01	3.15	14.56	100	0
12	<b>19.87±0.08</b>	16.14±0.04	6.11±0.41	1.45±0.00	<b>2.23</b>	12.69	89	<b>11</b>
15	<b>17.98±0.04</b>	14.55±0.09	5.23±0.25	1.01±0.00	<b>2.07</b>	11.51	81	<b>19</b>
18	17.10±0.09	13.04±0.02	4.22±0.32	1.01±0.00	1.72	10.64	77	23
21	15.79±0.03	12.68±0.06	4.09±0.37	1.01±0.00	1.09	8.64	80	20
24	15.34±0.03	12.17±0.07	3.41±0.43	1.01±0.00	0.51	4.12	82	18



ภาพที่ 4.42 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:0.5 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

ตารางที่ 4.39 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Sodium propionate (g/l)	Urea (g/l)	PHA conc. (g/l)	PHA content (% by wt.)	Monomer fraction (mol %)	
							3HB	3HV
0	1.86±0.11	31.11±0.05	-	3.91±0.03	-	-	-	-
3	7.98±0.05	26.71±0.06	-	3.48±0.02	1.90	29.62	100	0
6	15.34±0.08	14.87±0.03	-	2.17±0.02	3.19	22.86	100	0
9	21.32±0.08	21.46±0.08	12.74±0.32	2.03±0.01	3.30	16.14	100	0
12	<b>17.45±0.04</b>	15.12±0.06	11.96±0.41	1.59±0.01	<b>2.19</b>	11.69	87	<b>13</b>
15	<b>17.14±0.09</b>	14.23±0.05	10.31±0.28	1.16±0.00	<b>1.92</b>	10.50	78	<b>22</b>
18	16.24±0.06	12.84±0.09	8.62±0.24	1.16±0.00	1.84	11.21	75	25
21	15.21±0.03	12.17±0.03	7.55±0.35	1.16±0.00	1.57	9.70	78	22
24	14.28±0.07	11.76±0.02	6.21±0.38	1.16±0.00	0.84	5.56	79	21



ภาพที่ 4.43 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHA ปริมาณ PHA และสัดส่วนมอนอเมอร์ เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในถังหมัก อัตราการกวน 600 rpm อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ( ↓ หมายถึง ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม )

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณโซเดียมโพรฟิไอเนต ปริมาณ PHBV ความเข้มข้นของ PHBV สัดส่วนมอนอเมอร์ และอัตราผลผลิตของ PHBV เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมของน้ำตาลในน้ำอ้อยและโซเดียมโพรฟิไอเนตอัตราส่วน 1:0.25 ที่ ชั่วโมงและปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น ได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 คือ เติมแหล่งคาร์บอนผสมที่ชั่วโมงที่ 6 เติมน้ำตาลเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของ PHBV ปริมาณ PHBV และอัตราผลผลิตของ PHBV เท่ากับ 4.05 กรัมต่อลิตร 17.87 เปอร์เซ็นต์ และ 0.34 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และสัดส่วนของ 3HV สูงสุดที่ 12 โมลเปอร์เซ็นต์ ณ ชั่วโมงที่ 12 (ดังแสดงในตารางที่ 4.40)

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.5 คือ เติมแหล่งคาร์บอนผสมที่ชั่วโมงที่ 6 เติมน้ำตาลเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของ PHBV ปริมาณ PHBV และอัตราผลผลิตของ PHBV เท่ากับ 4.67 กรัมต่อลิตร 23.01 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ 0.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และสัดส่วนของ 3HV สูงสุดที่ 17 โมลเปอร์เซ็นต์ ณ ชั่วโมงที่ 9 (ดังแสดงในตารางที่ 4.41)

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:1 คือ เติมแหล่งคาร์บอนผสมที่ชั่วโมงที่ 6 เติมน้ำตาลเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของ PHBV ปริมาณ PHBV และอัตราผลผลิตของ PHBV เท่ากับ 4.51 กรัมต่อลิตร 20.83 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ 0.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และสัดส่วนของ 3HV สูงสุดที่ 14 โมลเปอร์เซ็นต์ ณ ชั่วโมงที่ 12 (ดังแสดงในตารางที่ 4.42)

ตารางที่ 4.40 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV สัดส่วนมอนอเมอร์ อัตราผลผลิตของเซลล์และอัตราผลผลิตของ PHBV เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมของน้ำตาลในน้ำอ้อยและโซเดียมโพรพิโอเนตอัตราส่วน 1:0.25 ที่ช่วงโม่งและความเข้มข้นน้ำตาลต่างกัน

Time* (h)	Fed sugar** (g/l)	Cultivation time (h)	DCW (g/l)	PHBV conc. (g/l)	Monomer		cell productivity (g/l/h)	PHBV productivity (g/l/h)
					fraction (mol %)			
					3HB	3HV		
3	6	6	12.56±0.03	3.48	95	5	2.09	0.44
		9	18.44±0.04	3.96	94	6	2.05	0.15
6	6	9	20.79±0.09	5.62	96	4	2.31	0.62
		12	21.18±0.04	3.91	92	8	1.77	0.33
6	9	9	20.47±0.07	3.82	92	8	2.27	0.42
		12	<b>22.69±0.04</b>	<b>4.05</b>	88	<b>12</b>	<b>1.89</b>	<b>0.34</b>
9	6	12	19.26±0.03	2.69	97	3	1.61	0.22
		15	18.15±0.03	2.11	91	9	1.21	0.14
9	9	12	20.48±0.05	2.45	95	5	1.71	0.20
		15	19.21±0.12	2.27	95	10	1.28	0.15
9	12	12	21.38±0.03	2.44	90	10	1.78	0.20
		15	20.26±0.07	2.12	82	18	1.35	0.14

\*ช่วงโม่งที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม

\*\*ความเข้มข้นน้ำตาลที่เติมลงในถังหมัก (ไม่รวมความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือในถังหมักก่อนเติม)

ตารางที่ 4.41 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV สัดส่วนมอนอเมอร์ อัตราผลผลิตของเซลล์และอัตราผลผลิตของ PHBV เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมของน้ำตาลในน้ำอ้อยและโซเดียมโพรพิโอเนตอัตราส่วน 1:0.5 ที่ชั่วโมงและความเข้มข้นน้ำตาลต่างกัน

Time* (h)	Fed sugar** (g/l)	Cultivation time (h)	DCW (g/l)	PHBV conc. (g/l)	Monomer fraction (mol %)		cell productivity (g/l/h)	PHBV productivity (g/l/h)
					3HB	3HV		
3	6	6	11.70±0.03	3.11	97	3	1.95	0.52
		9	17.23±0.09	3.71	93	7	1.91	0.41
6	6	9	19.92±0.11	5.96	89	11	2.21	0.66
		12	20.56±0.09	4.50	87	13	1.71	0.37
6	9	<b>9</b>	<b>20.31±0.08</b>	<b>4.67</b>	83	<b>17</b>	<b>2.26</b>	<b>0.52</b>
		12	22.50±0.06	4.19	81	19	1.88	0.35
9	6	12	18.58±0.04	2.45	93	7	1.55	0.20
		15	17.19±0.06	1.97	83	17	1.15	0.16
9	9	12	19.25±0.06	2.32	90	10	1.60	0.19
		15	18.51±0.03	2.28	82	18	1.23	0.18
9	12	12	19.87±0.08	2.23	89	11	1.66	0.19
		15	17.98±0.04	2.07	81	19	1.20	0.17

\*ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม

\*\*ความเข้มข้นน้ำตาลที่เติมลงในถังหมัก (ไม่รวมความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือในถังหมักก่อนเติม)



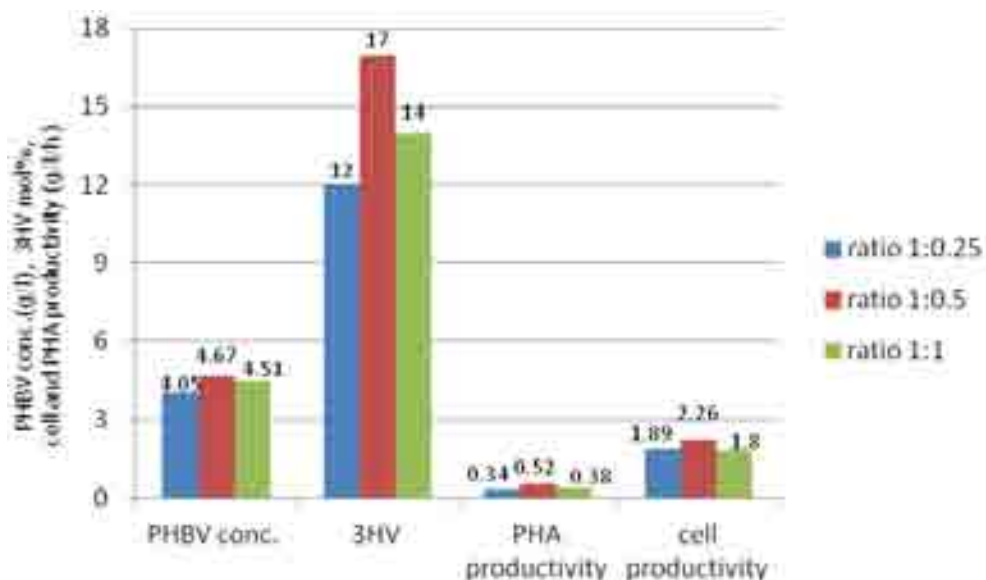
ตารางที่ 4.42 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ปริมาณโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นของ PHBV สัดส่วนมอนอเมอร์ อัตราผลผลิตของเซลล์และอัตราผลผลิตของ PHBV เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมของน้ำตาลในน้ำอ้อยและโซเดียมโพรพิโอเนตอัตราส่วน 1:1 ที่ชั่วโมงและความเข้มข้นน้ำตาลต่างกัน

Time* (h)	Fed sugar** (g/l)	Cultivation time (h)	DCW (g/l)	PHBV conc. (g/l)	Monomer fraction (mol %)		cell productivity (g/l/h)	PHBV productivity (g/l/h)
					3HB	3HV		
3	6	6	12.65±0.09	2.75	93	7	2.11	0.31
		9	16.17±0.12	2.98	89	11	1.80	0.33
6	6	9	19.86±0.08	5.13	94	6	2.21	0.57
		12	<b>21.65±0.09</b>	<b>4.51</b>	86	<b>14</b>	<b>1.80</b>	<b>0.38</b>
6	9	9	20.78±0.09	2.62	90	10	2.31	0.29
		12	21.36±0.04	1.59	85	15	1.78	0.13
9	6	12	16.70±0.11	2.48	89	11	1.39	0.21
		15	16.67±0.09	1.61	86	14	1.11	0.13
9	9	12	18.73±0.10	2.19	92	8	1.56	0.18
		15	18.25±0.09	1.92	77	23	1.22	0.16
9	12	12	17.45±0.04	2.05	87	13	1.45	0.17
		15	17.14±0.09	1.84	78	22	1.14	0.15

\*ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม

\*\*ความเข้มข้นน้ำตาลที่เติมลงในถังหมัก (ไม่รวมความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือในถังหมักก่อนเติม)

เมื่อเปรียบเทียบภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมในช่วงเวลาต่างกัน พบว่าเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมในอัตราส่วน 1:0.25 1:0.5 และ 1:1 ที่ชั่วโมงที่ 6 ได้ความเข้มข้น PHA ปริมาณ PHA และอัตราผลผลิตของ PHA สูงสุด โดยที่ได้สัดส่วน 3HV อยู่ในช่วงที่เหมาะสม โดยภาวะที่เหมาะสมของการเติมแหล่งคาร์บอนผสมในแต่ละอัตราส่วน มีดังนี้ ที่อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนผสม 1:0.25 เติมน้ำตาลความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตรได้ค่าที่เหมาะสม ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ที่อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนผสม 1:0.5 เติมน้ำตาลความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตรได้ค่าที่เหมาะสม ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ และที่อัตราส่วนแหล่งคาร์บอนผสม 1:1 เติมน้ำตาลความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตรได้ค่าที่เหมาะสม ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ(ดังแสดงในภาพที่ 4.40) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบภาวะการเลี้ยงเชื้อจากทั้ง 3 ภาวะ พบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ คือ เติมน้ำตาลในน้ำอ้อยเพิ่มในถังหมักเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร และสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมเท่ากับ 1:0.5 โดยได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 20.31 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น PHA เท่ากับ 4.67 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHA เท่ากับ 23.01 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV เท่ากับ 17 โมลเปอร์เซ็นต์ อัตราผลผลิตของ PHA เท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราผลผลิตของเซลล์ เท่ากับ 2.26 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ดังแสดงในภาพที่ 4.40)



ภาพที่ 4.44 เปรียบเทียบความเข้มข้นของ PHA สัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV และอัตราผลผลิตของ PHA เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วน 1:0.25 1:0.5 หรือ 1:1 ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง *B.megaterium* P-12

#### 4.4 สมบัติทางกายภาพและอุณหภูมิของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จาก *B. megaterium* P-12

งานวิจัยนี้สามารถผลิต PHBV ที่มีสัดส่วนมอนอเมอร์ของ 3HV ที่แตกต่างกันขึ้นกับปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของมอนอเมอร์ 3HB และ 3HV และเวลาที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม โดยผู้วิจัยได้ศึกษา สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางอุณหภูมิของ PHBV ที่ได้จากการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 ในภาวะที่เหมาะสมโดยมีปริมาณมอนอเมอร์ 3HV เท่ากับ 17 โมลเปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน (Sudesh และคณะ, 2000 ; Volova, 2004 และ Rudnik, 2008) พบว่าสมบัติทางอุณหภูมิ ของ PHBV มีอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) และอุณหภูมิกลาสทรานสิชัน (Tg) เท่ากับ 162.2 และ -0.9 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สมบัติเชิงกล พบว่า tensile strength เท่ากับ 41 MPa elastic modulus เท่ากับ 2.4 GPa และ % elongation เท่ากับ 2.7 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ง)

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเลี้ยง *Bacillus megaterium* P-12 ในถังหมักในระยะแรกเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูง และมีการเติมแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลในน้ำอ้อยและโซเดียม โพรพิโอเนตในระยะที่ 2 เพื่อการผลิต PHBV มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มอัตราผลผลิตของโคพอลิเมอร์ให้สูงขึ้น เนื่องจาก PHBV ถูกผลิตขึ้นอยู่ภายในเซลล์ (intracellular) ดังนั้น การทำให้เซลล์มีปริมาณมาก จึงเป็นวิธีที่เพิ่มการผลิตโคพอลิเมอร์ให้ได้มากขึ้นด้วย วิธีการเลี้ยงเชื้อโดยเติมแหล่งคาร์บอนผสมภายหลัง จึงเป็นวิธีซึ่งสามารถเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูง โดยขึ้นกับปัจจัยหลายประการที่ศึกษาในงานวิจัยและสรุปผลได้ดังนี้

#### 5.1 อายุของกล้าเชื้อ *Bacillus megaterium* P-12 ในระดับขวดทดลองที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตเซลล์ในระดับถังหมัก

เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญในแต่ละช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ลักษณะทางสรีรวิทยาที่เกิดขึ้นในเซลล์รวมถึงการผลิตสารผลิตภัณฑ์ มีความแตกต่างกันด้วย โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ จะมีกิจกรรมภายในเซลล์ที่ดีกว่าการเจริญในช่วงเวลาอื่น รูปแบบการเจริญของ *B. megaterium* P-12 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ พบว่าเซลล์อยู่ในระยะพักตัวใน 3 ชั่วโมงแรก เป็นช่วงที่เชื้ออยู่ในระยะปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ หลังจากนั้นเซลล์มีการเจริญแบบทวีคูณตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 จนถึงชั่วโมงที่ 12 จึงเข้าสู่ระยะลดจำนวน ในชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 24 ความเข้มข้นเซลล์ที่ได้สูงสุดเท่ากับ 5.15 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญและคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ พบว่า เซลล์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.29 ที่ชั่วโมงที่ 6 รวมทั้งเป็นช่วงกลางในระยะการเจริญแบบทวีคูณด้วย ดังนั้น จึงเลือกอายุกล้าเชื้อที่ 6 ชั่วโมง สำหรับการใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตเซลล์และโคพอลิเมอร์ในระดับถังหมัก

#### 5.2 การเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมักระยะที่ 1 เพื่อผลิตและเพิ่มปริมาณเซลล์ของ *Bacillus megaterium* P-12

การศึกษาการผลิตพอลิเมอร์ของ *B. megaterium* P-12 ในเบื้องต้นพบว่าการผลิตพอลิเมอร์สัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ คือ จุลินทรีย์จะมีการสะสมพอลิเมอร์ในระหว่างการเจริญ (growth-associated product formation) และจากการศึกษาเบื้องต้นที่ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *B.*

*megaterium* P-12 ในถังหมักเพื่อการผลิต PHBV และใช้โซเดียมโพรพิโอเนตเป็นสารตั้งต้นของมอนอเมอร์ 3HV เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เวลาเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ พบว่า ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 3.51 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของโคพอลิเมอร์ 1.27 กรัมต่อลิตร และอัตราผลผลิตเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าต่ำ เพราะโซเดียมโพรพิโอเนตยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Du และคณะ, 2000) ดังนั้น เมื่อต้องการผลิตโคพอลิเมอร์ โดยมีการเติมโซเดียมโพรพิโอเนตซึ่งเป็นสารตั้งต้นของมอนอเมอร์ 3HV ต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายประการ เพราะถ้าเติมโซเดียมโพรพิโอเนต ตั้งแต่เริ่มต้นการเลี้ยงเชื้อ ทำให้เซลล์เจริญได้น้อย และได้ปริมาณโคพอลิเมอร์ต่ำ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงปรับปรุงวิธีการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง ก่อนที่จะเติมสารตั้งต้นของมอนอเมอร์ 3HV โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มการเจริญของเซลล์ ดังนี้

### 5.2.1 แปรผันปริมาณกล้าเชื้อจากขวดเขย่าเป็น 5 10 และ 15 เปอร์เซนต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้นเป็น 10 20 30 50 และ 70 กรัมต่อลิตร

การเจริญของเซลล์และการใช้แหล่งคาร์บอน(น้ำตาลในน้ำอ้อย) มีความสอดคล้องกัน คือในช่วงการเจริญสูงสุด เซลล์นำน้ำตาลไปใช้อย่างรวดเร็ว ในส่วนของการเจริญมีความแตกต่างกัน โดยที่น้ำตาลความเข้มข้นเท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร เซลล์เจริญสูงสุดช้ากว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ คือ จากชั่วโมงที่ 6 เป็นชั่วโมงที่ 9 อาจเป็นเพราะความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงเกินไปเป็นพิษต่อเซลล์ (Gouda และคณะ, 2001) ทำให้เซลล์เจริญได้ช้าลง การใช้แหล่งไนโตรเจน(ยูเรีย) ในช่วงท้ายที่มีค่าคงที่ อาจเป็นเพราะเซลล์เข้าสู่ระยะ death phase เซลล์จึงไม่มีการนำเอาไนโตรเจนไปใช้ หรืออาจเป็นเพราะไนโตรเจนที่เหลือ อยู่ในสภาพที่เซลล์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ ส่วนของความเข้มข้น P(3HB) และปริมาณ P(3HB) ที่ได้ส่วนใหญ่สอดคล้องกับชั่วโมงที่มีการเจริญสูงสุด โดยการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง แต่ใช้ปริมาณกล้าเชื้อต่ำ ได้การเจริญของเซลล์ กับ ความเข้มข้น P(3HB) สูงสุด ที่ชั่วโมงแตกต่างกัน อาจเป็นเพราะน้ำตาลเข้มข้นสูงโดยที่มีปริมาณกล้าเชื้อต่ำ จึงเกิดพิษต่อเซลล์ได้มาก แต่อย่างไรก็ตามแหล่งคาร์บอนที่มีมากเกินไปทำให้เซลล์สะสม P(3HB) ได้ตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่เซลล์ที่เจริญเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 9 นั้น เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังนั้น ความเข้มข้น P(3HB) จึงสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาผลของปริมาณกล้าเชื้อและความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการเจริญของเซลล์มีความสำคัญ เนื่องจากปริมาณกล้าเชื้อและความเข้มข้น น้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสม ทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ในเวลารวดเร็ว รวมถึงความเข้มข้นของน้ำตาลไม่ส่งผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ด้วย การทดลองนี้จึงแปรผัน 2 ปัจจัยนี้ โดยเปรียบเทียบผลการทดลอง ณ เวลาที่ได้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุด

ของการเลี้ยงเชื้อ พบว่า ที่ความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาลในน้ำอ้อย ณ ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อที่ได้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุด เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 10 และ 20 กรัมต่อลิตร เซลล์สามารถใช้น้ำตาลในการเจริญได้เกือบหมด ส่วนที่ความเข้มข้นน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลเหลือเล็กน้อย แต่ที่น้ำตาลเข้มข้น 50 และ 70 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 9 และมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น แสดงถึงความสามารถของเซลล์ที่ใช้และทนต่อน้ำตาลในช่วงความเข้มข้น 10–30 กรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร มีอัตราผลผลิตของเซลล์สูงสุดด้วย

การทดลองที่ปริมาณกล้าเชื้อ 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ในทุกความเข้มข้นของน้ำตาล ให้ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นตามลำดับโดยที่ปริมาณกล้าเชื้อ 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ความเข้มข้นของเซลล์เคียงใกล้กัน และ ที่ปริมาณกล้าเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่ได้ความเข้มข้นเซลล์สูงกว่าที่ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อมากนัก แต่ถ้าใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ความเข้มข้นเซลล์ต่ำที่สุด อาจเป็นเพราะปริมาณกล้าเชื้อที่น้อยเกินไปทำให้เชื้อเจริญได้ช้าลง ดังนั้นปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมคือ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการเจริญของเซลล์ที่ดี ควรมีปริมาณเซลล์พอเหมาะกับปริมาณองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น

โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำอ้อย 30 กรัมต่อลิตร และใช้ปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจาก เซลล์สามารถใช้ในน้ำตาลในการเจริญได้อย่างมีประสิทธิภาพ อัตราการเจริญจำเพาะ อัตราผลผลิตของเซลล์ และสัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ใช้ไปมีค่าสูงด้วย โดยที่ภาวะนี้ได้ความเข้มข้นเซลล์ 14.79 กรัมต่อลิตร และอัตราผลผลิตของเซลล์เท่ากับ 2.28 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง สรุปได้ว่า ทั้งปริมาณกล้าเชื้อและความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของเซลล์ที่จะใช้เป็นเซลล์สำหรับการผลิต PHBV

## 5.2.2 แปรผันอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน (โดยโมล) เป็น 5 ต่อ 1 10 ต่อ 1 และ 15 ต่อ 1

จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์จากปริมาณกล้าเชื้อและความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น พบว่าภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ปริมาณของยูเรียซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเป็นสารสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อการเจริญของเซลล์ เหลืออยู่ปริมาณน้อยมาก คือ 0.81 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นลดลงเหลือ 0.66 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ถึงชั่วโมงที่ 24 แสดงว่าปริมาณของแหล่ง

ไนโตรเจนที่เหลือนั้น เซลล์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ หรือถูกจำกัดด้วยปริมาณไนโตรเจน ดังนั้นจึงแปรผันอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนพบว่าที่อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 15 ต่อ 1 ที่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ได้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุด 17.01 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 4.15 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณยูเรียเหลืออยู่เพียง 0.91 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าปริมาณยูเรียอาจยังไม่เพียงพอต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ของเซลล์ ที่อัตราส่วน 10 ต่อ 1 ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ 19.07 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 4.97 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเมอร์ 26.08 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราส่วน 5 ต่อ 1 ซึ่งมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนสูงสุด พบว่า ได้ความเข้มข้นเซลล์ 18.02 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 3.86 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ปริมาณผลผลิตต่ำกว่าที่อัตราส่วน 10 ต่อ 1 แสดงให้เห็นว่าปริมาณของไนโตรเจนที่สูงเกินไปไม่ได้ทำให้ความเข้มข้นของเซลล์และพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะปริมาณไนโตรเจนที่มากเกินไปจะไปยับยั้งกิจกรรมต่างๆของเซลล์ รวมถึงยับยั้งการสังเคราะห์พอลิเมอร์ ตามรายงานผลการทดลองของ Ramsay และคณะ (1992) และ Suzuki และคณะ (1996) หรือที่สัดส่วน C/N เท่ากับ 10 ต่อ 1 เป็นปริมาณที่ไม่เกินส่วนประกอบของธาตุภายในเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถนำแหล่งไนโตรเจนไปใช้ได้ดีกว่าตามการศึกษาของ Yamane และคณะ (1996) ที่ได้ศึกษาปริมาณธาตุที่ประกอบอยู่ในเซลล์ของ *Alcaligenes latus* เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ให้สัดส่วนใกล้เคียงกับธาตุที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถนำธาตุอาหารไปใช้ได้ดีกว่าและเป็นการประหยัดต้นทุนในอีกทางหนึ่ง เพราะไม่ต้องใช้องค์ประกอบในอาหารในปริมาณที่สูงเกินไป สรุปได้ว่า C/N เท่ากับ 10 ต่อ 1 เป็นสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ของเซลล์

### 5.3 การเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมักระยะที่ 2 เพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) โดย *Bacillus megaterium* P-12

จากการทดลองในระยะที่ 1 เพื่อเพิ่มผลผลิตของเซลล์พบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ คือ ใช้ปริมาณกลีเซอรีน 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำอ้อยเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 10 ต่อ 1 จากนั้นทำการทดลองต่อในขั้นของการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยการเติมแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลในน้ำอ้อย และ โซเดียม โพรพิโอเนต โดยแปรผันปัจจัยต่างๆ คือ

### 5.3.1 ชั่วโมงที่เติมแหล่งคาร์บอนผสม คือ ชั่วโมงที่ 3 ชั่วโมงที่ 6 และชั่วโมงที่ 9

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของ PHBV ณ ชั่วโมงที่ได้ค่าสูงสุดในแต่ละสภาวะ พบว่า การเติมแหล่งคาร์บอนผสมชั่วโมงที่ 6 ให้ความเฉลี่ยสูงสุด เพราะ ชั่วโมงที่ 6 เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสม คือ เป็นช่วงกลางของการเจริญแบบทวีคูณของเซลล์ ที่เซลล์จะมีกิจกรรมต่างๆ รวมทั้งการสังเคราะห์ PHBV ได้สูงที่สุดด้วย ส่วนการเติมชั่วโมงที่ 3 ความเข้มข้นเซลล์ และ PHBV ต่ำกว่าเล็กน้อย และการเติมที่ชั่วโมงที่ 9 ได้เซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ได้ความเข้มข้นของ PHBV ปริมาณ PHBV ลดลง รวมทั้งอัตราผลผลิตลดลงมากด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ Du และคณะ (2001) ที่ศึกษาการผลิต PHBV จาก *Ralstonia eutropha* โดยการเติมกรดโพธิโอติก ใน 3 ช่วงเวลา คือ early growth phase mid-log phase และ late phase พบว่า การเติมกรดโพธิโอติกที่ช่วง mid-log phase ได้รับความเข้มข้นเซลล์และ PHBV สูงสุด เป็นเพราะการเติมกรดโพธิโอติกเร็วเกินไปจะส่งผลยับยั้งการเจริญของเซลล์และการสะสมพอลิเมอร์ แต่ถ้าเติมช้าเกินไปจะทำให้เซลล์สังเคราะห์ P(3HB) สะสมในเซลล์สูง ทำให้ได้สัดส่วนของ 3HV ต่ำ

5.3.2 เติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีสัดส่วนระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำอ้อยกับปริมาณไซโตียมโพธิโอเนต เป็น 1:0.25 1:0.5 และ 1:1 โดยปรับความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำอ้อย ณ เวลาที่เติมเป็น 6 9 และ 12 กรัมต่อลิตร ปริมาตรเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักเท่ากับ 3 ลิตร

เมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีไซโตียมโพธิโอเนตเป็นสารตั้งต้นของมอนอเมอร์ 3HV ในแต่ละช่วงเวลา และพิจารณาประสิทธิภาพการนำไซโตียมโพธิโอเนตไปใช้ในการสังเคราะห์ 3HV พบว่า ถ้าเติมที่ชั่วโมงที่ 3 ก็จะมีการสะสมมอนอเมอร์ 3HV สูงสุดเท่ากับ 18-19 โมลเปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 12 หรือ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนการเติมที่ชั่วโมงที่ 6 ได้ 3HV สูงสุดเท่ากับ 23-24 โมลเปอร์เซ็นต์ ณ ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ และถ้าเติมชั่วโมงที่ 9 ได้ 3HV สูงสุดเท่ากับ 25 โมลเปอร์เซ็นต์ ณ ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกัน อาจเป็นเพราะการเติมที่ชั่วโมงที่ 9 เซลล์เริ่มลดการเจริญ ทำให้การนำไซโตียมโพธิโอเนตไปใช้ในการเจริญและสะสม PHBV ได้น้อย จึงได้สัดส่วนของ 3HV ใกล้เคียงกันทั้งการเติมที่ชั่วโมงที่ 6 และ 9 ดังนั้นการเติมแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ การเติมในช่วงการเจริญแบบทวีคูณของเซลล์ เพราะเซลล์สามารถนำสารตั้งต้นไปใช้ในการสังเคราะห์ 3HV ได้ดีที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ Slater และคณะ (1992) ที่ศึกษาการผลิต P(3HB-co-3HV) โดย recombinant *E. coli* โดยใช้โพธิโอเนตเป็นสารตั้งต้นของ 3HV พบว่าสามารถเพิ่มสัดส่วนของ 3HV ได้โดยการเติมกลูโคสและโพธิโอเนตในช่วง log phase



จากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า เวลาที่ *B. megaterium* P-12 ผลิต PHBV ได้สัดส่วนของ 3HV สูงสุด กับเวลาที่ได้ความเข้มข้นของ PHBV สูงสุด แตกต่างกัน

การสะสมมอนอเมอร์ของ 3HV ใน 12 ชั่วโมงแรก ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนผสม เซลล์มีการสร้างและสะสมมอนอเมอร์ 3HV อย่างรวดเร็ว ในช่วงที่มีความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนตสูง หลังจากนั้นเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิโอเนตลดลง สัดส่วนของ 3HV ก็ลดลงด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ Slater และคณะ (1992) ที่แสดงให้เห็นว่ามีการสะสมของ 3HV ใน recombinant *E. coli* สูงในช่วงแรกที่มีความเข้มข้นของกลูโคสและโซเดียมโพรพิโอเนตสูง เช่นเดียวกับ Park และคณะ (1997) Ramsay และคณะ (1990) Kim และคณะ (1992) และ Cho และคณะ (1997) ที่รายงานว่าสัดส่วนของ 3HV สูงขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เช่นกัน โดยช่วงที่มีการสะสมได้ความเข้มข้นของ PHBV สูง และมีสัดส่วนของ 3HV ที่เหมาะสม อยู่ในช่วง 3 ชั่วโมงหลังการเติมแหล่งคาร์บอนผสม หลังจากนั้นมีการสังเคราะห์และสะสมมอนอเมอร์ของ 3HV เพิ่มขึ้น แต่ความเข้มข้นของเซลล์และ PHBV ลดลง อาจเป็นเพราะเมื่อเซลล์ลดการเจริญและเริ่มตายลง มีการสลายของพอลิเมอร์แต่เซลล์ยังใช้โซเดียมโพรพิโอเนตในการสังเคราะห์ 3HV อยู่ ซึ่งจากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์และการย่อยสลายพอลิเมอร์ภายในเซลล์นั้นเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นจึงต้องพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ความเข้มข้นของ PHBV สูง รวมทั้งได้สัดส่วนของ 3HV ที่เหมาะสมด้วย

เมื่อพิจารณาจากช่วงเวลาเติมแหล่งคาร์บอนผสม พบว่าการเติมที่ชั่วโมงที่ 6 ให้ผลผลิตทั้งเซลล์และ PHBV สูงสุด จากนั้นพิจารณาต่อว่าการเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น และสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมเป็นเท่าใด จึงจะให้ผลผลิตสูงสุด และได้สัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV ที่เหมาะสม

จากการทดลองที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่ชั่วโมงที่ 6 มีการเติมแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลในน้ำอ้อยและโซเดียมโพรพิโอเนตในอัตราส่วน เป็น 1:0.25 1:0.5 และ 1:1 โดยเติมน้ำตาลในน้ำอ้อยลงถึงหมักเท่ากับ 6 หรือ 9 กรัมต่อลิตร (ดังแสดงในตารางที่ 5.1) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ คือ เติมน้ำตาลในน้ำอ้อยลงถึงหมักเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร และสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมเป็น 1:0.5 โดยได้ความเข้มข้นของเซลล์ 20.31 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น PHBV 4.67 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHBV 23 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนของมอนอเมอร์ 3HV เท่ากับ 17 โมลเปอร์เซ็นต์ และอัตราผลผลิตของ PHBV เท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่ 5.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้น PHBV ปริมาณ PHBV อัตราผลผลิต PHBV และสัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV จากการเลี้ยง *B. megaterium* P-12 จากการเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมน้ำตาลในน้ำอ้อย เท่ากับ 6 และ 9 กรัมต่อลิตร

ratio	1:0.25	1:0.5	1:1
<b>Sugar concentration (g/l)</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>6</b>
DCW (g/l)	22.69	<b>20.31</b>	21.65
PHBV concentration (g/l)	4.05	<b>4.67</b>	4.51
cell productivity (g/l/h)	1.89	<b>2.26</b>	1.80
PHBV productivity (g/l/h)	0.34	<b>0.52</b>	0.38
3HV unit (mol%)	12	<b>17</b>	14

สัดส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมเท่ากับ 1:0.5 และความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอ้อยเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร เป็นสัดส่วนระหว่าง 3HB - generating carbon source และ 3HV - generating carbon source ที่เหมาะสมสำหรับเซลล์ *B. megaterium* P-12 ที่สามารถนำไปใช้ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ได้ PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้งาน

เมื่อเปรียบเทียบการผลิต PHBV กับงานวิจัยอื่น พบว่ามีความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนที่ใช้ และวิธีการเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังมีอัตราผลผลิตของ PHBV สูงกว่าในหลายงานวิจัย (ดังแสดงในตารางที่ 5.2)

ตารางที่ 5.2 เปรียบเทียบการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยใช้จุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนและเทคนิคการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน

Strains	3HB/3HV-generating carbon source	Culture mode	PHBV conc. (g/l)	PHBV content (% by wt.)	PHBV productivity (g/l)	Monomer 3HV	References
<i>Bacillus megaterium</i> P-12	sugarcane-liquor/sodium propionate	batch (two-phase)	4.67	23	0.52	17	งานวิจัยนี้
<i>Bacillus megaterium</i> P-12	sugarcane-liquor/sodium propionate	batch	0.71	24	0.08	18	วรรณกุล ชนะสิทธิ์, 2553
<i>Bacillus megaterium</i> BA-019	sucrose/ sodium propionate	batch	1.54	32	ND	20	สุดา สุภาชวินสวัสดิ์, 2542
<i>Cupriavidus necator</i>	waste rapeseed oil/propionate	batch	7.30	52	0.09	13	Obruca และคณะ, 2010
<i>Caldimonas taiwanesis</i>	gluconate/propionate	batch	1.04	52	ND	12	Sheu และคณะ, 2009
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	glucose/propionate	fed-batch	6.00	47	ND	28	Matsumoto และคณะ, 2011
<i>Burkholderia sacchari</i>	sucrose/propionic acid	fed-batch (pH-stat)	ND	60	1.00	10	Rocha และคณะ, 2008
<i>Ralstonia eutropha</i>	glucose/sodium propionate	fed-batch	2.71	40	0.25	40	Yu และคณะ, 2005
<i>Ralstonia eutropha</i>	whey, invert sugar/propionic acid	fed-batch	3.93	37	0.17	38	Marangoni และคณะ, 2002
<i>Ralstonia eutropha</i>	glucose/ propionic acid	pulse feeding	44.1	80	0.82	10	Du และคณะ, 2001
<i>Ralstonia eutropha</i>	glucose/ propionic acid	feeding	8.40	28	0.28	10	Marangoni และคณะ, 2000

ND หมายถึง ไม่มีรายงานข้อมูล

#### 5.4 สมบัติทางกายภาพและอุณหภูมิของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จาก *B. megaterium* P-12

สมบัติเชิงกลและอุณหภูมิของโคพอลิเมอร์ PHBV ขึ้นอยู่กับสัดส่วนมอนอเมอร์ 3HV ใน PHBV (Loo และ Sudesh, 2007) จากการศึกษาและวิเคราะห์ PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 17 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบกับสมบัติของ PHBV ที่สัดส่วน 3HV ต่างๆ (ดังแสดงในตารางที่ 5.3) พบว่า อุณหภูมิหลอมเหลว อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน มีค่าใกล้เคียงกับ PHBV ที่มีสัดส่วนของ 3HV ใกล้เคียงกัน ส่วนสมบัติเชิงกล คือ tensile stress และ % elongation มีค่าแตกต่างกัน โดยค่า % elongation มีค่าค่อนข้างต่ำ แสดงว่ามีความยืดหยุ่นน้อย อาจเป็นเพราะว่า PHBV ที่สกัดได้มีสิ่งเจือปนอยู่ ทำให้สมบัติที่ได้แตกต่างจากงานวิจัยอื่นๆ จึงสรุปได้ว่า PHBV ที่ผลิตได้มีสมบัติทางอุณหภูมิที่เหมาะสม ส่วนสมบัติทางกายภาพพบว่ามีค่าความยืดหยุ่นไม่สูงมากนัก

ตารางที่ 5.3 เปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพและอุณหภูมิของ PHA และ polypropylene ที่สัดส่วน 3HV ต่างกัน (Holmes และคณะ, 1985 ; Doi, 1990)

Types	Composition Mol % HV	Melting Temperature (°C)	Glass transition Temperature (°C)	Tensile Strength (MPa)	Elongation (%)	Elastic modulus (GPa)
PP	-	176	-10	38	400	3.5
PHB	-	179	10	40	4	3.8
PHBV	3	170	8	38	ND	ND
	9	162	6	37	ND	ND
	11	157	2	38	5	3.7
	14	150	4	35	ND	ND
	<b>17*</b>	<b>162</b>	<b>-0.9</b>	<b>41</b>	<b>2.7</b>	<b>2.4</b>
	20	145	-1	32	27	1.9
	25	137	-6	30	ND	ND
	28	102	-8	21	700	1.5
	34	97	-9	18	970	1.2

\*งานวิจัยนี้

ND หมายถึง ไม่มีรายงานข้อมูล

อาจเป็นเพราะในขั้นตอนการสกัดทำให้ได้สายพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV ต่ำ เนื่องจากตกตะกอนได้ง่ายกว่าสายพอลิเมอร์ที่มี 3HV สูง จึงส่งผลให้พอลิเมอร์ที่ได้มีสมบัติไปทาง PHB ดังนั้นถ้าปรับปรุงการสกัดเพื่อให้ได้สายพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV สูง มาจำนวนมากพอ ก็ส่งผลให้พอลิเมอร์ที่สกัดได้มีความยืดหยุ่นที่ดีขึ้น และสามารถนำไปใช้งานได้จริง

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV โดยเติมแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลในน้ำอ้อยกับไซโตลิมโพรฟิโอบีโอนตในช่วงที่เซลล์มีการเจริญเต็มที่ (Two-phase cultivation) ซึ่งถือเป็นวิธีการเลี้ยงเชื้อวิธีหนึ่ง ที่สามารถผลิตเซลล์และโคพอลิเมอร์ได้ดีกว่าวิธีการเลี้ยงเชื้อแบบแบช (batch cultivation) อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบผลผลิตกับงานวิจัยอื่น พบว่าอยู่ในระดับปานกลาง (ดังแสดงในตารางที่ 5.2) ดังนั้นในอนาคตอาจต้องมีการปรับปรุงวิธีการผลิตเพิ่มเติม เช่นปรับปรุงวิธีการเติมสารอาหารหรือสารตั้งต้นของ 3HV โดยการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบช (fed-batch cultivation) เพื่อให้สามารถควบคุมสารอาหารที่เติมลงไปได้ดีขึ้น ป้องกันการสะสมของสารตั้งต้นของมอนอเมอร์ 3HV ที่จะส่งผลให้เกิดพิษต่อเซลล์ (Lee, 1996 ; Khanna และ Srivastava, 2005) หรือศึกษาถึงการควบคุมเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและสลาย PHBV โดยวิธีการทางเมตาบอลิกเอนจิเนียริง (metabolic engineering) เพื่อควบคุมให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตและสะสม PHBV ได้เพิ่มขึ้น รวมทั้งต้องมีการปรับปรุงวิธีการเพื่อลดต้นทุนในการผลิตด้วย อย่างไรก็ตามข้อได้เปรียบของงานวิจัยนี้ คือ การใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างน้ำตาลในน้ำอ้อยกับไซโตลิมโพรฟิโอบีโอนต และแหล่งไนโตรเจน คือ ยูเรีย ที่มีราคาไม่แพง และเชื้อ *B. megaterium* P-12 ที่เลือกใช้ เป็นเชื้อที่เจริญได้เร็ว จึงสามารถสังเคราะห์และสะสมโคพอลิเมอร์ได้เร็วด้วย ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตในแง่ของ ราคาวัตถุดิบ ระยะเวลาและพลังงานที่ต้องใช้ในการผลิต รวมถึงสมบัติทางกายภาพของ PHBV ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ตามความเหมาะสมของวัสดุที่ต้องการผลิต จึงช่วยให้ PHBV สามารถแข่งขันกับพลาสติกสังเคราะห์ได้

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- พิสิษฐ คงกำเนิด. 2540. ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 และการผลิตพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลเอเรต). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วันกุศล ชนะสิทธิ์. 2553. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลเอเรต) โดย *Bacillus* sp. P-12. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สันสนีย์ สันติอรอดพันธุ์. 2550. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิปีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตซึ่งเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากแหล่งดินและบ่อบำบัดน้ำเสีย. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุดา สุภาชวินสวัสดิ์. 2542. ผลของขั้วเสตรงต่อสัดส่วนของของ 3-ไฮดรอกซีวาลเอเรตในพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลเอเรต) ซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อดิศักดิ์ หิรัญรัตน์นกร. 2541. การเพิ่มอัตราการผลิต P(3HB-co-3HV) โดยการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-O4 แบบกึ่งต่อเนื่องเพื่อให้มีความหนาแน่นเซลล์สูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

- Abe, H., and Doi, Y. 1999. Crystalline morphology, thermal properties, and enzymatic degradability of (R)-3-hydroxybutyric acid-based copolyesters. Focused on Ecomolecular Science Research. RIKEN Rev.42.
- Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R., and Reis, M.A.M. 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. J. Biotechnol. 130:411-421.

- Alderete, J.E., Karl, D.W., and Park, C.H. 1993. Production of poly(hydroxybutyrate) homopolymer and copolymer from ethanol and propanol in fed-batch culture. Biotechnol.Progr. 9:520-525.
- Anderson, A.J., Haywood, G.W., and Dawes, E.A. 1990. Biosynthesis and composition of bacterial poly(hydroxyalkanoates). Int. J. Biol. Macromol. 12:102–105.
- Annuar, M.S.M., Irene, K.P.T., and Ramachandran, K.B. 2008. Evaluation of nitrogen sources for growth and production of medium-chain-length poly-(3-hydroxyalkanoates) from palm kernel oil by *Pseudomonas putida* PGA1. AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol. 16 (1):11-15.
- Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S., and Goulet, J. 1995. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. Appl. Environ. Microb. 61:165-169.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., and Welander, T. 2008. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. Bioresour. Technol. 99: 509-516.
- Bernfeld, F. Amylase alpha and beta. In Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.(eds.), Method in Enzymology, pp.149-150. New York : Academic Press, 1955.
- Bian, Y.Z., Wang, Y., Guli, S., Chen, G.Q., and Wu, Q. 2009. Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. Biomaterials. 30:217–225
- Bloembergen, S., Holden, D.A., Bluhm, T.L., Hamer, G.K., and Marchessault, R.H. 1986. Study of composition and crystallinity of bacterial poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate). Macromolecules. 19:2868-2871.
- Bourgne, D., Ouellette, B., Andra, G., and Grolean, D. 1992. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from methanol characterization of new isolate of *Methylobacterium extorquens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:7-12 .
- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., and Fuller, R.C. 1990. Plastic from bacterial: Poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural biocompatible and biodegradable polymers. Adv.Biochem.Eng.Biot. 41: 77-93.
- Braunegg, G.,Lefebvre ,G., and Genser,K.F.1998. Polyhydroxyalkanoates ,biopolyesters from renewable resources : physiology and engineering aspects. J.Biotechnol. 65 : 127-161.

- Brzostowicz, P.C., Blasko, M.S., and Rouviere, P.E. 2002. Identification of two gene clusters involved in cyclohexanone oxidation in *Brevibacterium epidermidis* strain HCU. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:781–789.
- Bhubalan, K., Lee, W.H., Loo, C.Y., Yamamoto, T., Tsuge, T., Doi, Y., and Sudesh, K. 2008. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. Polym. Degrad. & Stab. 93:17-23.
- Byrom, D. 1992. Production of poly- $\beta$ -hydroxyvalerate copolymers. FEMS Microbiol. Lett. 103:247-250.
- Byrom, D. 1994. Polyhydroxyalkanoates, pp. 5-33. In: D.P. Mobley(ed.), *Plastics from microbe : microbial of polymers and polymers precursors*. Hanser Munich.
- Byrom, D. 1997. Polymer synthesis by microorganisms; technology and economics. Trends in Biotechnol. 5:246-250
- Chen, G.Q., Konig, K.H., and Lafferty, M. 1991. Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. FEMS Microbiol. Lett. 84:173-176.
- Chen, L. J., and Wang, M. 2002.. Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer. Biomaterials. 23:2631-2639.
- Chen, C.W., Don, T.M., and Yen, H.F. 2006. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. Proc. Biochem. 41:2289-2296.
- Chen, G.Q. 2009. A polyhydroxyalkanoates based bio- and materials industry. Chem Soc Rev. 38:2434–2446.
- Chen, G.Q. 2010a. Industrial Production of PHA. Microbiol. Monograph. 14:121–132.
- Chen, G.Q. 2010b. Plastics completely synthesized by bacteria: Polyhydroxyalkanoates. Microbiol. Monograph. 14:17–37.
- Chen, J.Y., Liu, T., Zheng, Z., Chen, J.C., and Chen, G.Q. 2004. Polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas stutzeri* 1317 had different substrate specificities. FEMS Microbiol. Lett. 234:231–237.
- Cho, K.S., Ryu, H.W., Park, C.H., and Goodrich, P.R. 1997. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from swine waste liquor by *Azotobacter vinelandii* UWD. Biotechnol. Lett. 19:7-10.



- Chohan, S.N., and Copeland, L. 1998. Acetoacetyl coenzyme A reductase and polyhydroxybutyrate synthesis in *Rhizobium* (Cicer) sp. strain CC 1192. Appl. Environ. Microbiol. 64:2859–2863.
- Chung, C.W., Kim, Y.S., Kim, Y.B., Bae, K.S., and Rhee, Y.H. 1999. Isolation of a *Pseudomonas* sp. Strain exhibiting unusual behavior of poly(3-hydroxyalkanoates) biosynthesis and characterization of synthesized polyesters. J. Microbiol. Biotechnol. 9:847–853.
- Comeau, Y., Hall, K.J., and Oldham, W.K. 1998. Determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and poly- $\beta$ -hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography. Appl. Environ. Microb. 54 : 2325-2327.
- Dawes, E.A., and Senior, P.J. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. Adv. Microb. Physiol. 10:135-266.
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., and Soga, K. 1987. Biosynthesis of copolymer in *Alcaligenes eutrophus* H16 from  $^{13}\text{C}$ -labelled acetate and propionate. Macromolecules. 20: 2988-2991.
- Doi, Y. 1990. Microbial polyesters. VCH. New York.
- Doi, Y., Kitamane, S., and Kideki, A. 1995. Microbial synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyhexanoate) Macromolecules. 28:4822-4828.
- Du, G. C., Chen, J., Yu, J., and Lun, S. 2001. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. Biochem. Eng. J. 8:103-110.
- Evan, D.J., and Sikdar, K.S. 1990. Biodegradable Plastic. Chemtech. 5 : 38-42.
- Gouda, M.K., Swellam, A.E., and Omar, S.H. 2001. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. Microbiol. Res. 156:201-207.
- Gould, P.L., Holland, S.J., and Tighe, B.J. 1987. Polymers for biodegradable medical devices. 4-Hydroxybutyrate valerate copolymers as nondisintegrating matrices for controlled-release oral dosage forms. Int. J. Pharm. 38:231–237.
- Groom, C.A., Luong, J.H.T., and Mulchandani, A. 1998. On-line culture fluorescence measurement during the batch cultivation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate producing *Alcaligenes eutrophus*. J. Biotechnol. 8:271-278.

- Haas, R., Jin, B., and Zepf, F.T. 2008. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. Biosci. iotechnol. Biochem. 72(1): 253-256.
- He, W.N., Zhang, Z.M., Hu, P., and Chen, G.Q. 1999. Microbial synthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by strain DG17 from glucose. Acta. Polym. Sin. 6:709–714.
- Holmes, P.A., Wright, L.F., and Colins, S.H. 1985.  $\beta$ -Hydroxybutyrate polymer. Eur.Pat.Appl. 5:3459.
- Iwata, T., Tsunoda, K., Aoyagi, Y., Kusaka, S., Yonezawa, N., and Doi, Y. 2003. Mechanical properties of uniaxially cold-drawn films of poly([R]-3-hydroxybutyrate). Polym. Degrad. Stab. 79:217-224.
- Kemnitzer, J.E., McCarthy, S.P., and Gross, R.A. 1993. Preparation of predominantly syndiotactic poly(beta-hydroxybutyrate) by the tributyltin methoxide catalyzed ring-opening polymerization of racemic beta-butyrolactone. Macromolecules. 26:1221–1229.
- Keshavarz, T., and Roy, I. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. Curr. Opin. Microbiol. 13:1-6.
- Khanna, S., and Srivastava, A.K. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates Process Biochem. 40: 607–619.
- Kim, J.H., Kim, B.G., and Choi, C.Y. 1992. Effect of propionic acid on poly( $\beta$ -hydroxybutyric-co- $\beta$ -hydroxyvaleric) acid production by *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol.Lett. 14: 903-906.
- Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Fernandes, E.G., Horvat, P., Kutschera, C., Hesse, P., and Braunegg, G. 2008. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. Bioresour. Technol. 99:4854-4863.
- 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*. J. Biosci. Bioeng. 107:240-245.
- Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., and Witholt, B. 1988. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. Appl. Environ. Microbiol. 54:2924–2932.

- Lee, I.Y., Kim, M.K., Chang, H.N., and Park, Y.H. 1994. Effects of propionate on accumulation of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co-  $\beta$ -hydroxyvalerate) and excretion of pyruvate in *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol. Lett. 16:611-616.
- Lee, S.Y. 1996. Plastic bacteria progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Trends Biotechnol. 14:431-438.
- Lee, W. H., Loo, C.Y., Nomura, C. T., and Sudesh, K. 2008. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. Bioresour.Technol. 99:6844-6851.
- Lemoigne, M. 1926. Products of dehydration and of polymerization of  $\beta$ -hydroxybutyric acid. Bull Soc Chem Biol. 8:770-782.
- Loo, C.Y., and Sudesh, K. 2007. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. Malays. Polym. J. 2:31-57.
- Luengo, J.M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharo, G., and Olivera, E.R. 2003. Bioplastics from microorganisms. Curr. Opin. Microbiol. 6:251-260.
- Marangoni, C., Furigo, A., and Aragão, G. M. F. 2000. Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. Biotechnol. Letters. 22:1635-1638.
- Marangoni, C., Furigo, A., and Aragão, G. M. F. 2002. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. Process Biochem. 38:137-141.
- Matsumoto, K.I., Kitagawa, K., Jo, S.J., Song Y., and Taguchi, S. 2011. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* using propionate as a precursor. J. of Biotechol. 152:144-146
- Nanthini, S., Kesaven, B., and Sudesh, K. 2006. Degradation of commercially important polyhydroxyalkanoates in tropical mangrove ecosystem. Polym. Degrad. Stab. 91:2931-2940.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. 2005. Principle of biochemistry. 4<sup>th</sup>(ed). W.H.Freeman and Company. New York.

- Obruca, S., Marova, I., Snajdar, O., Mravcova, L., and Svoboda, Z. 2010. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. Biotechnol Lett. 32:1925–1932.
- Oeding, V., and Schlegel, H.G. 1973.  $\beta$ -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism. J. Biochem. 134:239-248.
- Park, S.K., Lee, K.T., Kim, Y.B., and Rhee, Y.H. 1997. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). by *Bacillus thuringiensis* R-510. J. Microbiol. 35:127-133.
- Quillaguamán, J., Doan-Van, T., Guzmán, H., Guzmán, D., Martín, J., Everest, A., and Hatti-Kaul, R. 2008. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. Appl. Environ. Biotechnol. 78:227-232.
- Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., Lomaliza, K., Chavarie, C., and Bataille, P. 1990. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids copolymers. Appl. Environ. Microbiol. 56:2093–2098.
- Ramsay, B. A., Saracovan, I., Ramsay, J. A. and Marchessault, R. H. 1992. Effect of nitrogen limitation on long-side chain poly-*b*hydroxyalkanoate synthesis by *Pseudomonas resinovorans*. Appl. Environ. Microbiol. 58:744-746.
- Rocha, R.C.S., Silva, L.F., Taciro, M.K. and Pradella, J.G.C. 2008. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. J. Microbiol. Biotechnol. 24:427-431.
- Rudnik, E. 2008. Compostable Polymer Materials. Elsevier. New York.
- Saito, Y., Nakamura, S., Hiramitsu, M., and Doi, Y. 1996. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). Polym. Int. 39:169–174.
- Sheu, D. S., Chen, W. M., Yang, J. Y., and Chang, R. C. 2009. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. Enzyme Microb. Technol. 44:289–294.
- Shimamura, E., Scandola, M., and Doi, Y. 1994. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate). Macromolecules. 27:4429–4435.

- Slater, S., Gallaher, T., and Dennis, D. 1992. Production of Poly-(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain. Appl. and Environ. Microb. 58:1089-1094.
- Steinbüchel, A., Husted, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A., and Valentin, H. 1992. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of hydroxyalkanoic acid in bacterial. FEMS. Microbiol. Rev. 103:217-230
- Steinbüchel, A., and Fuchtenbusch, B. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. Tibtech. 16:419-427.
- Steinbüchel, A., and Eversloh, T. L. 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. Biochem. Eng. J. 16: 81–96.
- Steinbüchel, A., and Schmack, G. 1995. Large-Scale production of poly(3-hydroxyvaleric acid) by fermentation of *Chromobacterium violaceum*, processing, and characterization of the homopolyester. J. Environ. Polym. Degrad. 3:243–258.
- Steinbüchel, A., Valentin, H.E., and Schünebaum, A. 1994. Application of recombinant gene technology for production of polyhydroxyalkanoic acids: biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) homopolyester. J. Environ. Polym. Degrad. 2:67–74
- Sudesh, K., Abe, H., and Doi, Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog. Polym. Sci. 25:1503-1555.
- Suriyamngkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., and Shah, S. 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. Biotechnol. Adv. 25:148-175.
- Suzuki, T., Miyake, M., Tokiwa, Y., Saegusa, H., Saito, T., and Asada, Y. 1996. A recombinant cyanobacterium that accumulations poly-(hydroxybutyrate). Biotechnol. Lett. 18:1047-1050.
- Taguchi, K., Aoyagi, Y., Matsusaki, H., Fukui, T., and Doi, Y. 1999. Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB101. Biotechnol. Lett. 21:579–584.
- Tokiwa, Y., and Calabia, B.P., 2004. Degradation of microbial polyesters. Biotechnol letters. 26:1181-1189.

- Valentin, H.E., and Dennis, D. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. J. Biotechnol. 58:33–38.
- Valentin, H.E., and Steinbüchel, A. 1995. Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid-co-4-hydroxyvaleric acid) by mutants and recombinant strains of *Alcaligenes eutrophus*. J. Environ. Polym. Degrad. 3:169–175.
- Volova, T.G. 2004. Polyhydroxyalkanoates-Plastic materials of the 21<sup>st</sup> century : production, properties, and application. Nova Science Publisher. Inc. New York.
- Wallen, L.L., and Rohwedder, W.K. 1974. Poly-beta-hydroxyalkanoate from activated sludge. Environ Sci Technol. 8:576-579.
- Wang, H.H., and Chen, G.Q. 2009. Production and characterization of homopolymer polyhydroxyheptanoate (P3HHp) by a *fadBA* knockout mutant *Pseudomonas putida* KTOY06 derived from *P. putida* KT2442. Process Biochem. 44:106–111.
- Wang, Z.H., Wu, H.N., Chen, J., Zhang, J., and Chen, G.Q. 2008. A novel self-cleaving phasin tag for purification of recombinant proteins based on hydrophobic nanoparticles. Lab Chip . 8:1957–1962.
- Weiner, R.M. 1997. Biopolymers from marine prokaryotes. Trends Biotechnol. 15:390–394.
- Wu, Q., Sun, S.Q., Yu, P.H.F., Chen, A.X.Z., and Chen, G.Q. 2000. Environmental dependence of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates. Acta. Polym. Sin. 6:751–756.
- Xie, W.P., Chen, G.Q. 2008. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *phaPCJ*. Biochem. Eng. J. 38:384–389.
- Yamane, T., Fukunaga, M., Lee, Y.W. 1996. Increased PHB productivity by high-cell-density fed batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. Biotechnol. Bioeng. 50:197-202.
- Yu, J., and Heiko, S. 2008. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. Bioresour. Technol. 99: 8042-8048.
- Yu, J., Si, Y., Wong, W.K.R. 2002. Kinetics modeling of inhibition and utilization of mixed volatile fatty acids in the formation of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha*. Process Biochem. 37:731-738.

- Yu, S.T., Lin, C.C., and Too, J. R. 2005. PHBV production by *Ralstonia eutropha* in a continuous stirred tank reactor. Process Biochem. 40:2729-2734.
- Zhang, X.J., Luo, R.C., Wang, Z., Deng, Y., and Chen, G.Q. 2009. Applications of (*R*)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuel. Biomacromolecules. 10:218-236.
- Zhao, W., and Chen, G.Q. 2007. Production and Characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *phaAB*. Process Biochem. 42:1342–1347.
- Zheng LZ, Li Z, Tian HL, Li M, Chen GQ (2005) Molecular cloning and functional analysis of (*R*)-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein:coenzyme A transacylase from *Pseudomonas mendocina* LZ. FEMS Microbiol. Lett. 252:299–307.

ภาคผนวก



## ภาคผนวก ก

### การเตรียมวัตถุดิบและสารที่ใช้ในการวิจัย

#### 1. การเตรียมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

##### 2.1 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

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

##### 2.2 สารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส

เตรียมจากการละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส 0.15 กรัม ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

#### 2. การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

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

#### 4. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในยูเรีย

##### 4.1 สารละลายบอริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

เตรียมจากการละลายกรดบอริกปริมาณ 40 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ประจุ เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ

##### 4.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 32 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

เตรียมจากการละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 320 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอด

##### 4.3 สารโพแทสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟต

เตรียมโพแทสเซียมซัลเฟต 95 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม ผสมรวมกัน

### การคำนวณการเตรียมแหล่งคาร์บอนผสม

วิธีการคำนวณปริมาณน้ำอ้อยและโซเดียมโพรฟิไอเนตที่เติมลงในถังหมัก ณ เวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ

คิดจากความเข้มข้นรวมของน้ำตาลในน้ำอ้อย 120 กรัมต่อลิตร

ชั่วโมง ที่เติม	ความเข้มข้น น้ำตาลที่เติม (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วนน้ำตาลใน น้ำอ้อยต่อโซเดียม โพรฟิไอเนต	ส่วนประกอบของแหล่งคาร์บอนผสมที่เติม ลงในถังหมัก*		
			ปริมาตร น้ำอ้อย (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	โซเดียม โพรฟิไอเนต (กรัม)
3	6	1:0.25	150	0	1.5
		1:0.5	150	0	3
		1:1	150	0	6
6	6	1:0.25	150	75	1.5
		1:0.5	150	75	3
		1:1	150	75	6
9	9	1:0.25	225	0	2.25
		1:0.5	225	0	4.5
		1:1	225	0	9
12	12	1:0.25	300	0	3
		1:0.5	300	0	6
		1:1	300	0	12

\*ปริมาตรรวมของแหล่งคาร์บอนผสมที่สามารถเติมได้สูงสุด เท่ากับปริมาตรที่ถูกเก็บตัวอย่างออกมา (หลังจากเติมแหล่งคาร์บอนผสมแล้วจะได้ปริมาตรรวมเริ่มต้นเท่ากับ 3 ลิตร)

## ภาคผนวก ข

### สูตรคำนวณ

#### 1. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) =  $\frac{\text{น้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์} - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า}}{10}$  x 1000

10

#### 2. การคำนวณปริมาณมอนอเมอร์ (กรัมต่อลิตร) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี

การคำนวณปริมาณมอนอเมอร์ของ 3HB และ 3HV (กรัมต่อลิตรต่อ เซลล์แห้ง 0.02 กรัม) ทำการประมวลผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Star chromatogram : version 4.02 ซึ่งจะทำให้การคำนวณปริมาณ มอนอเมอร์ (กรัมต่อลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในสถานะเดียวกัน

การคำนวณปริมาณ มอนอเมอร์แต่ละชนิด (กรัมต่อลิตร)

สูตร ปริมาณมอนอเมอร์ =  $\frac{\text{ค่าจากการวิเคราะห์(กรัมต่อลิตร)} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร)}}{10}$

20

#### 3. การคำนวณสัดส่วน (โมลเปอร์เซ็นต์) ของแต่ละมอนอเมอร์ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี

การคำนวณสัดส่วนองค์ประกอบของมอนอเมอร์ใน โคพอลิเมอร์ (mole fraction)

3.1 คำนวณหาปริมาณของแต่ละมอนอเมอร์ (กรัมต่อลิตร)

3.2 คำนวณหาจำนวนโมลของแต่ละมอนอเมอร์ โดยการหารด้วยน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละมอนอเมอร์ (น้ำหนักโมเลกุลของ 3HB และ 3HV = 86 และ 100 ตามลำดับ)

3.3 คำนวณหาสัดส่วนของแต่ละมอนอเมอร์ (โมลเปอร์เซ็นต์)

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

#### 4. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก (กรัมต่อลิตร)

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

#### 5. การหาปริมาณยูเรียในน้ำหมัก (กรัมต่อลิตร)

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

ปริมาณยูเรีย (กรัมต่อลิตร) = (ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก x ปริมาตรกรดที่ใช้ x 1.4) /  
0.047 เปอร์เซ็นต์ในโตรเจน

หมายเหตุ 60 คือ น้ำหนักโมเลกุลของยูเรีย

28 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจนในยูเรีย

## 6. การคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์

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

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

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

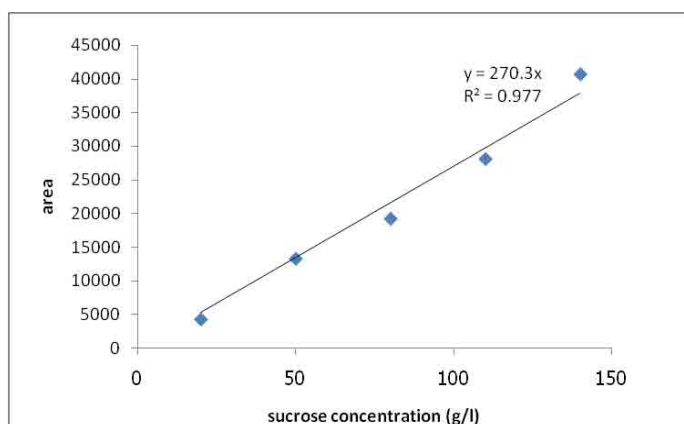
เมื่อ	$\mu$	คือ	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
	$Y_{x/s}$	คือ	สัมประสิทธิ์ปริมาณเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไป
	Productivity	คือ	ค่าอัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

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

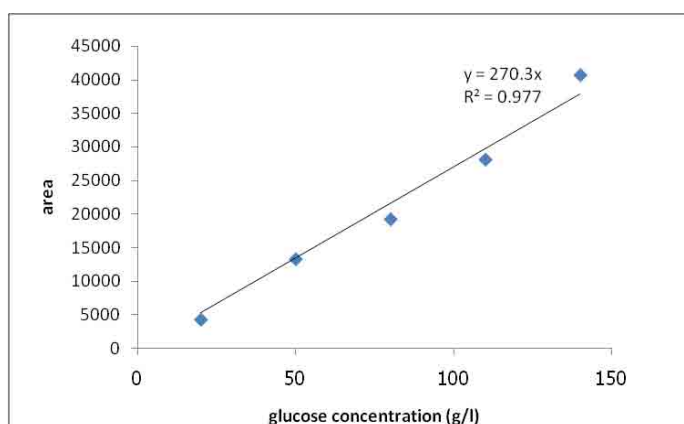
## ภาคผนวก ค

### กราฟมาตรฐาน

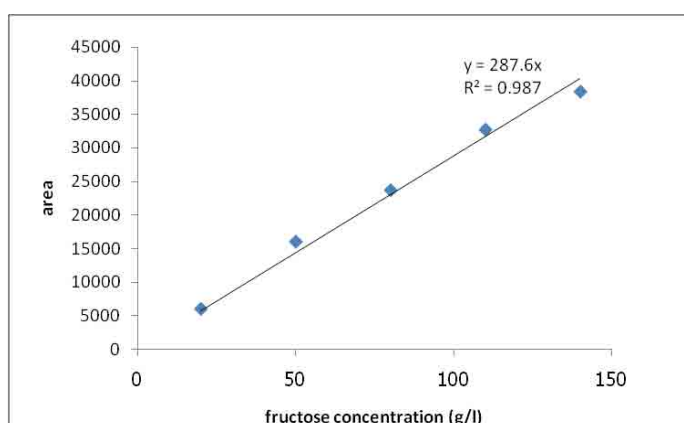
#### 1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส วิเคราะห์โดย HPLC



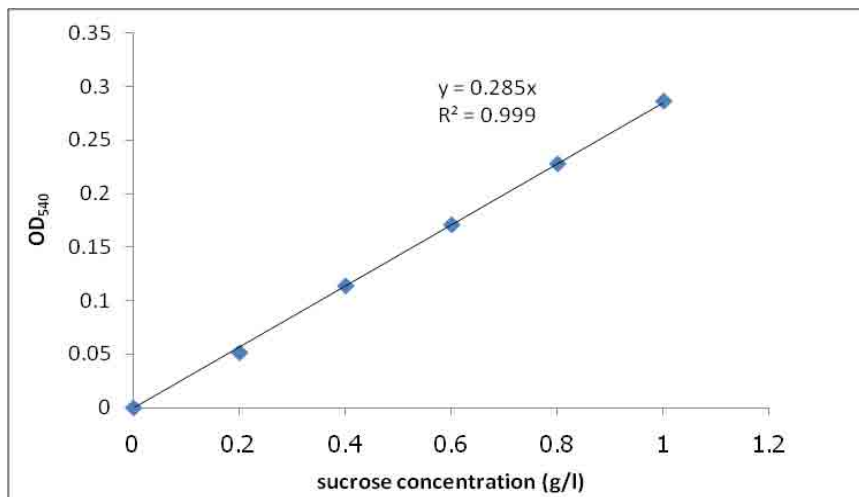
#### 2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส วิเคราะห์โดย HPLC



#### 3. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรุคโตส วิเคราะห์โดย HPLC

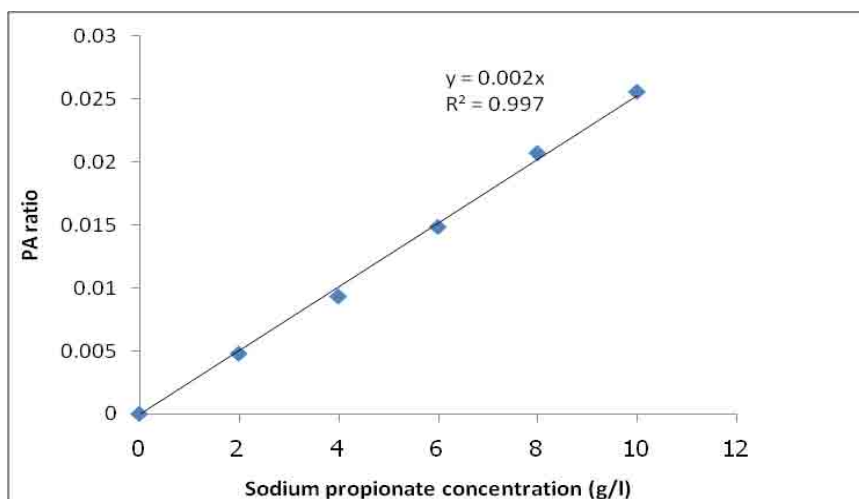


#### 4. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวิซ์



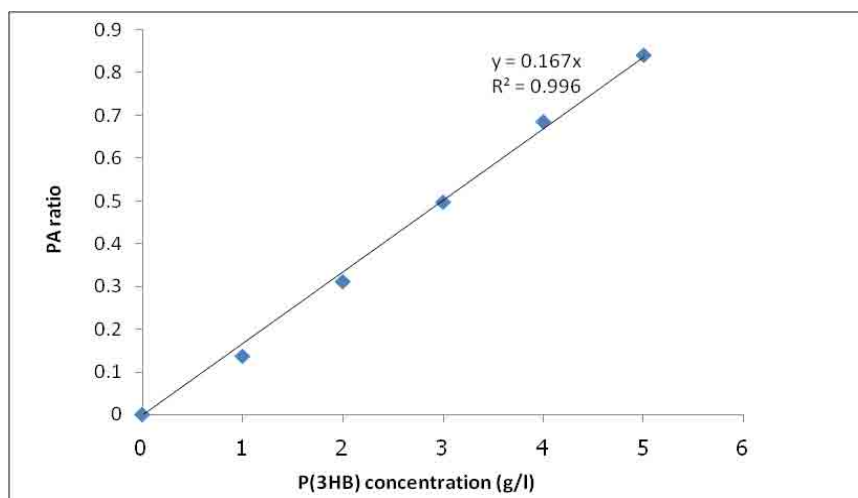
กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสในช่วง 0-1.0 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.285

#### 5. กราฟมาตรฐานของโซเดียมโพรพิโอเนต



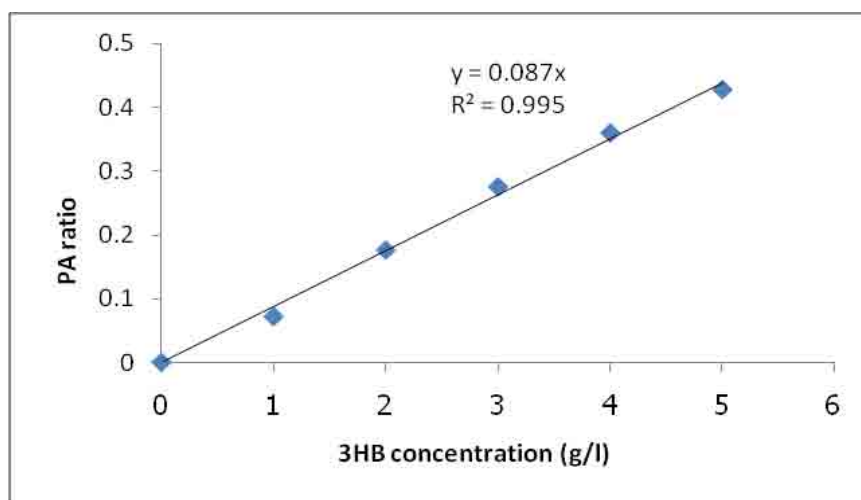
กราฟมาตรฐานของโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้น 0-10 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.002

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

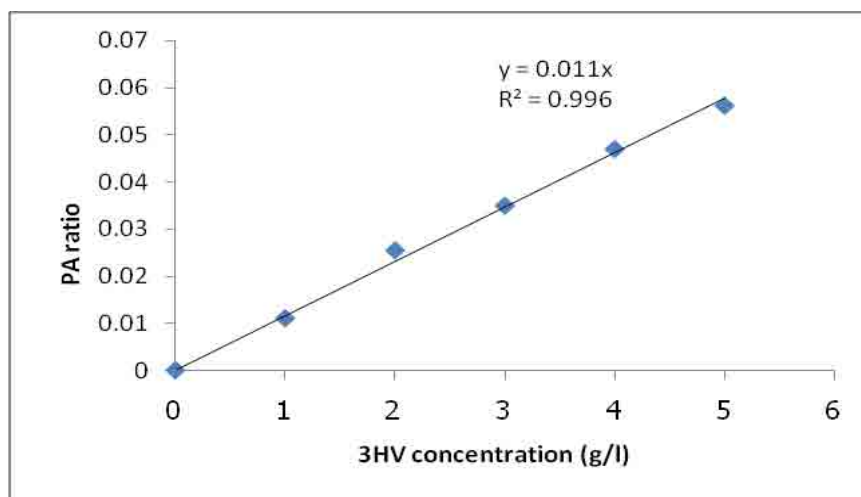


กราฟมาตรฐานของ P(3HB) ความเข้มข้น 0-5 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.167

### 7. กราฟมาตรฐานของโคพอลิเมอร์ PHBV วิเคราะห์ด้วยวิธี GC



กราฟมาตรฐานของมอนอเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ความเข้มข้น 0-5 กรัมต่อลิตร  
มีค่าความชันเท่ากับ 0.087



กราฟมาตรฐานของมอนอเมอร์ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต ความเข้มข้น 0-5 กรัมต่อลิตร  
มีค่าความชันเท่ากับ 0.0165

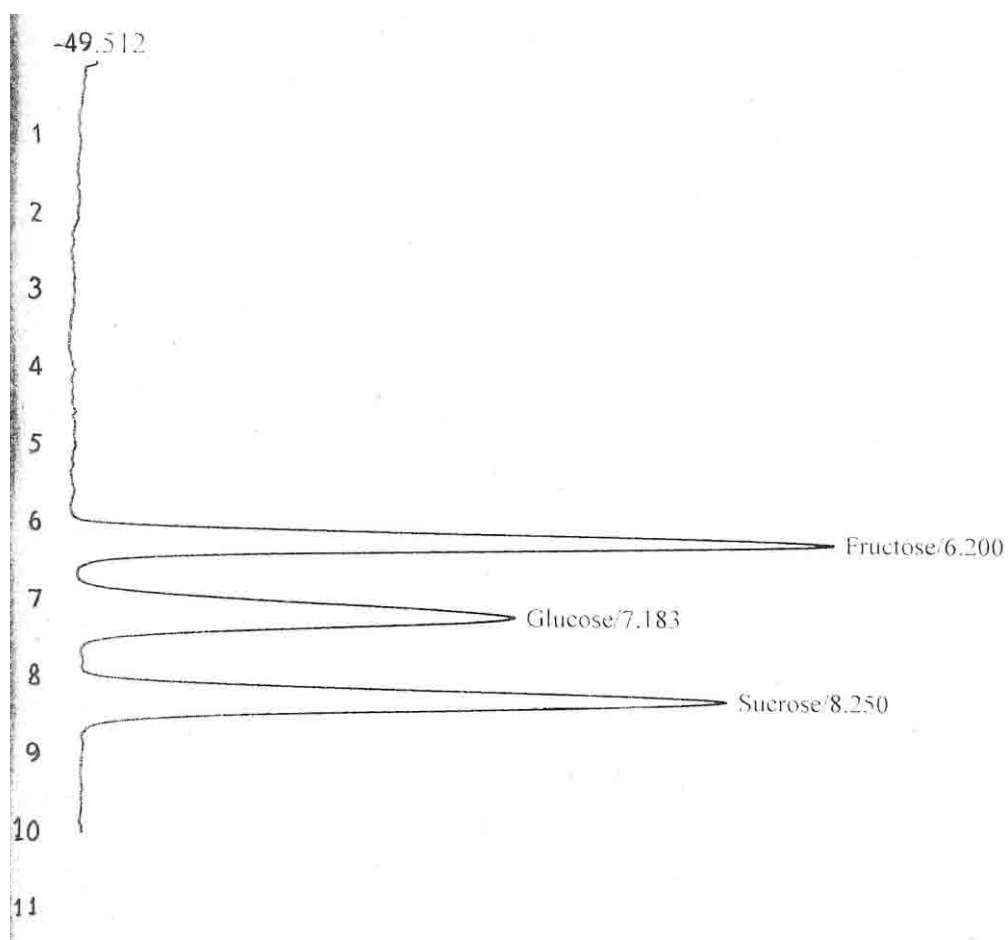


## ภาคผนวก ง

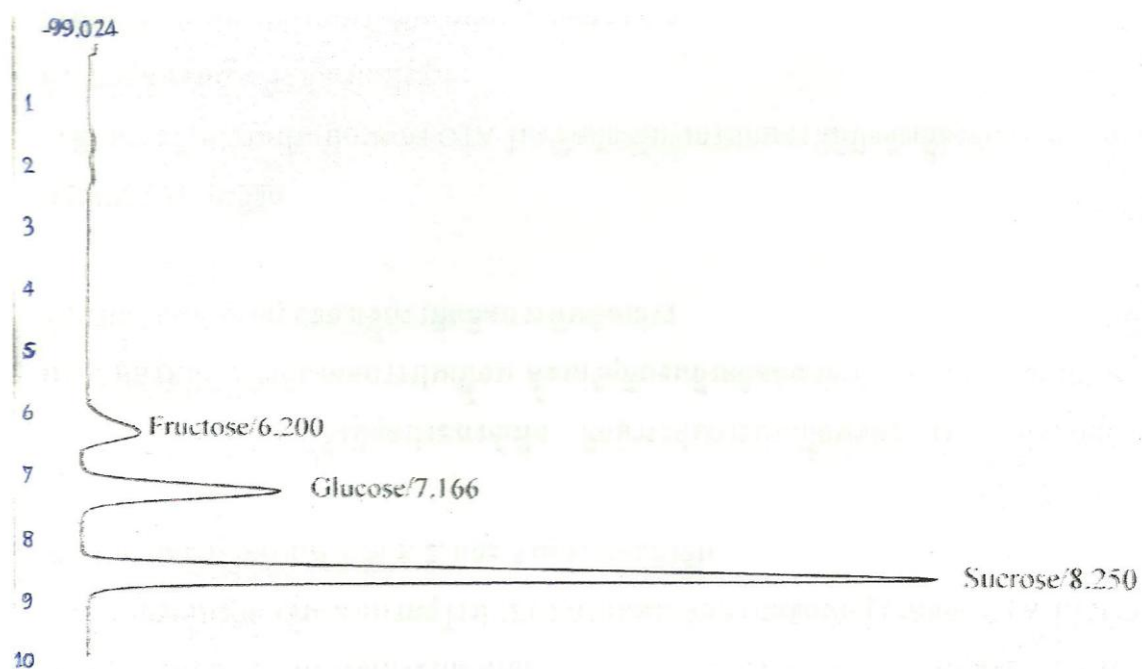
### โครมาโทแกรมและกราฟ

#### โครมาโทแกรม

- โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำอ้อยด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิดโครมาโทกราฟี

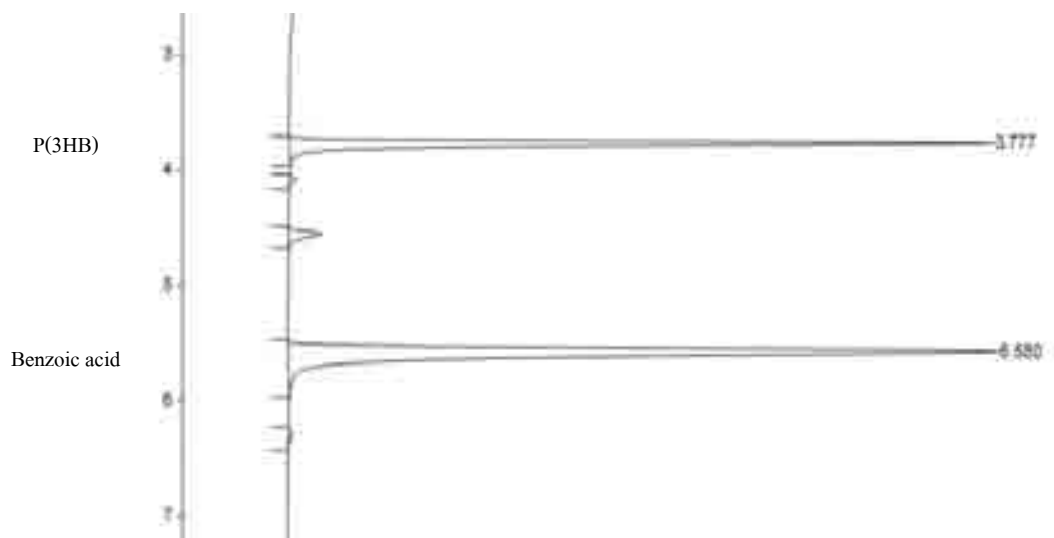


โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และ ซูโครส

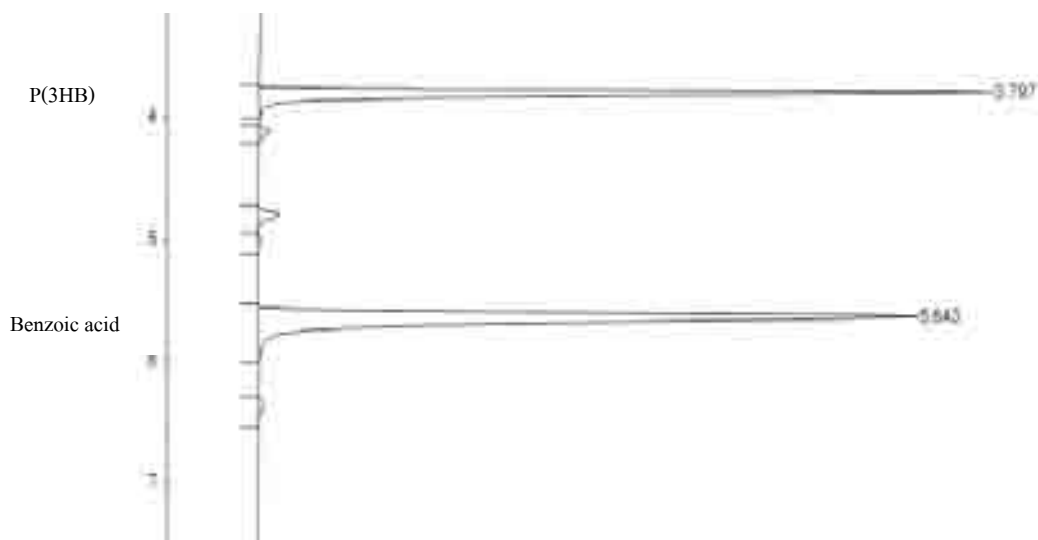


น้ำอ้อย มีซูโครสเป็นองค์ประกอบหลักเฉลี่ยประมาณ 86.91 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสเฉลี่ยประมาณ 9.55 เปอร์เซ็นต์ และฟรักโทสเฉลี่ยประมาณ 3.67 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณได้จากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำอ้อยซึ่งมีค่าเท่ากับ 209.28 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยซูโครส 181.64 กรัมต่อลิตร กลูโคส 19.96 กรัมต่อลิตรและฟรักโทส 7.68 กรัมต่อลิตร)

## 2. โครมาโทแกรมวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี

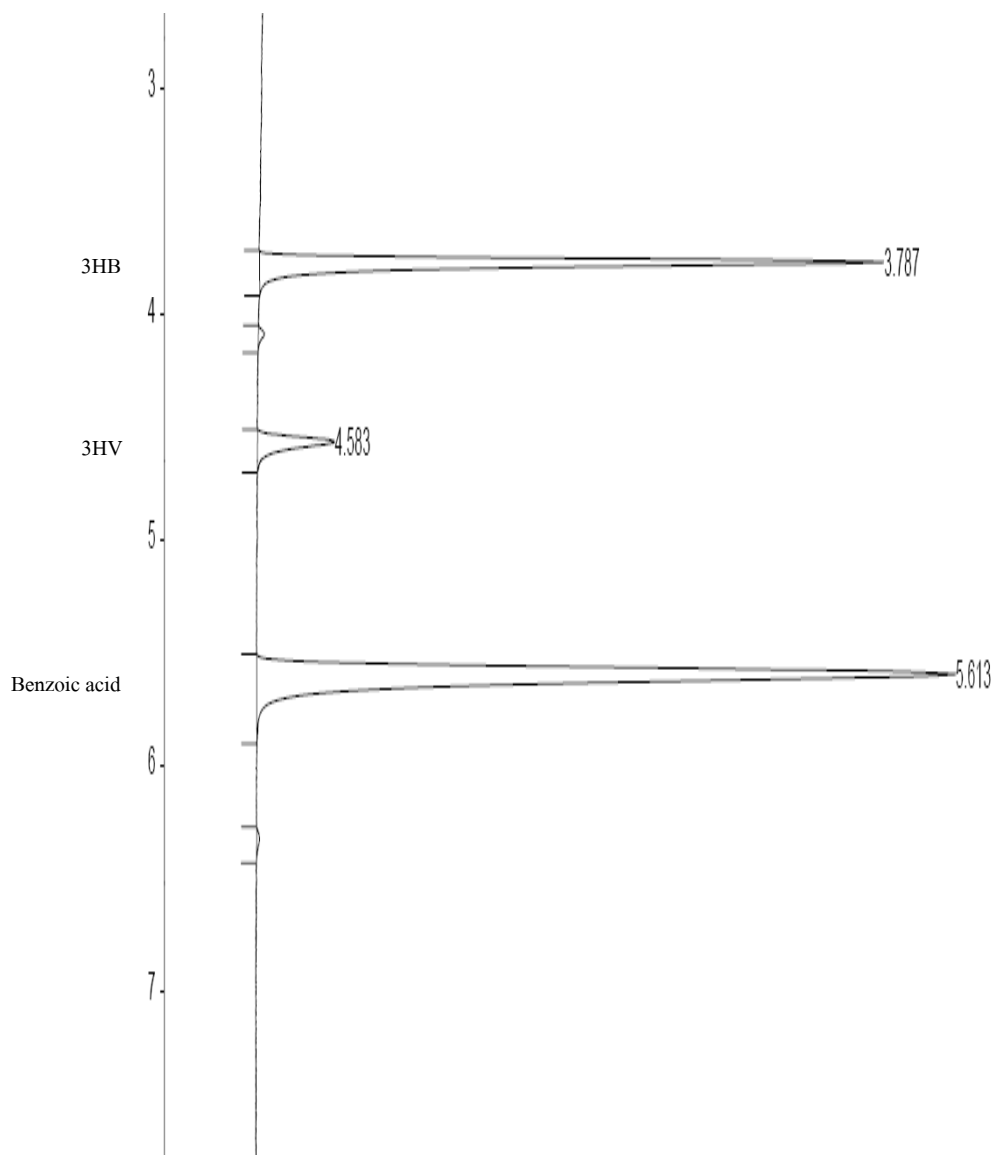


โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต [P(3HB)] ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน

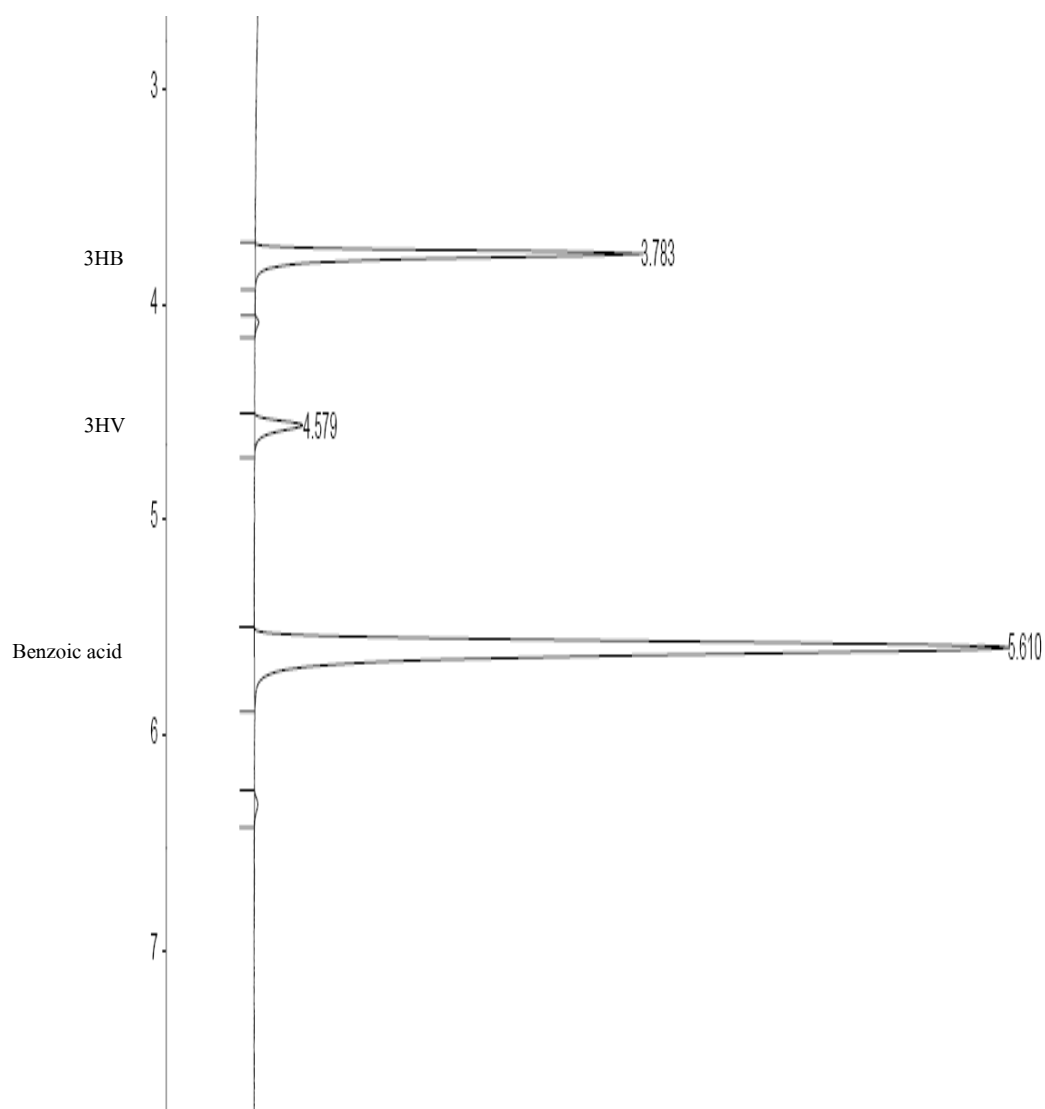


ตัวอย่างโครมาโทแกรมของโพลิเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต [P(3HB)] ซึ่งผลิตได้จาก *Bacillus megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและมียูเรีย 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน (วิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน)

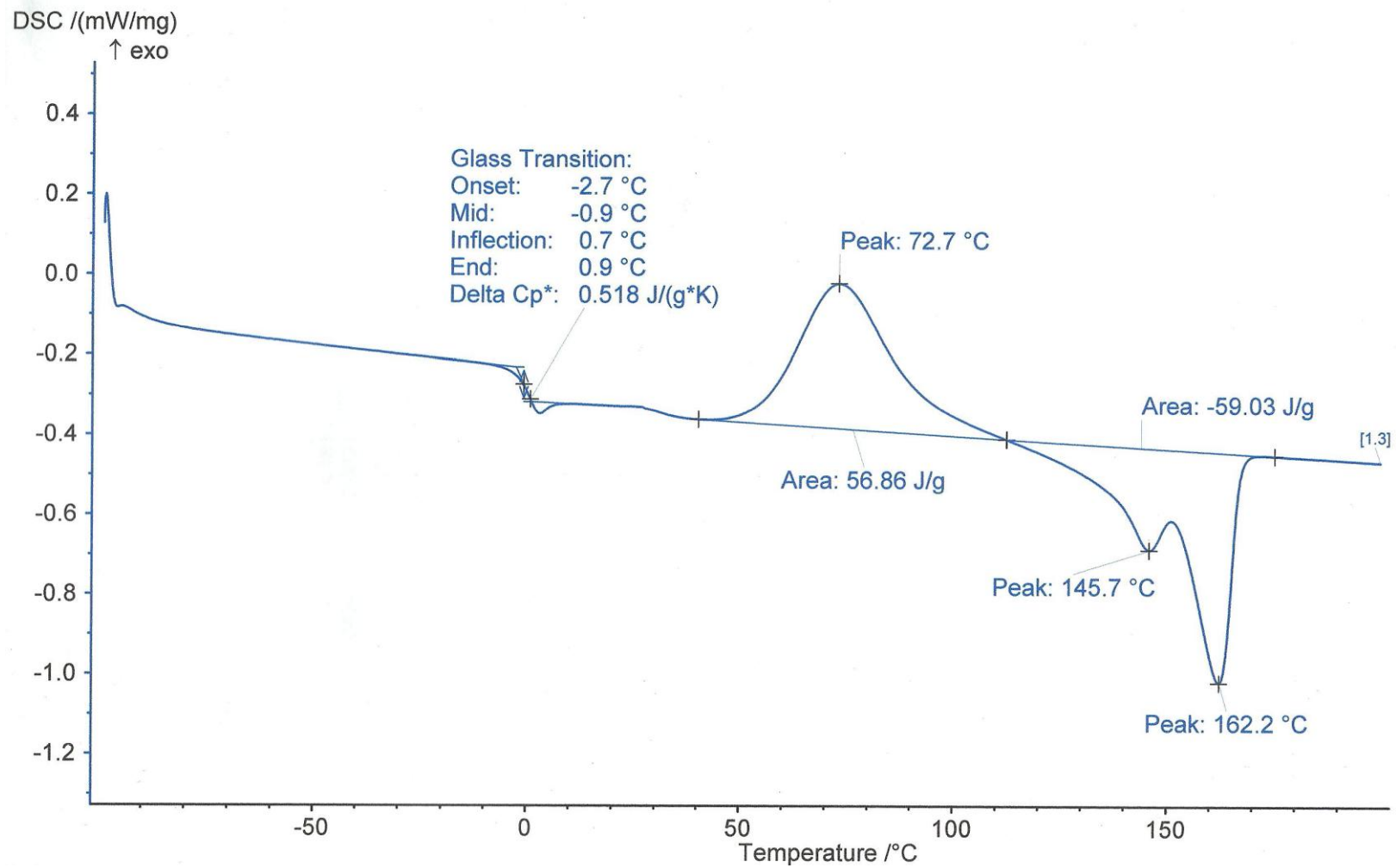
## 3. โครมาโทแกรมวิเคราะห์ปริมาณ PHBV โดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี



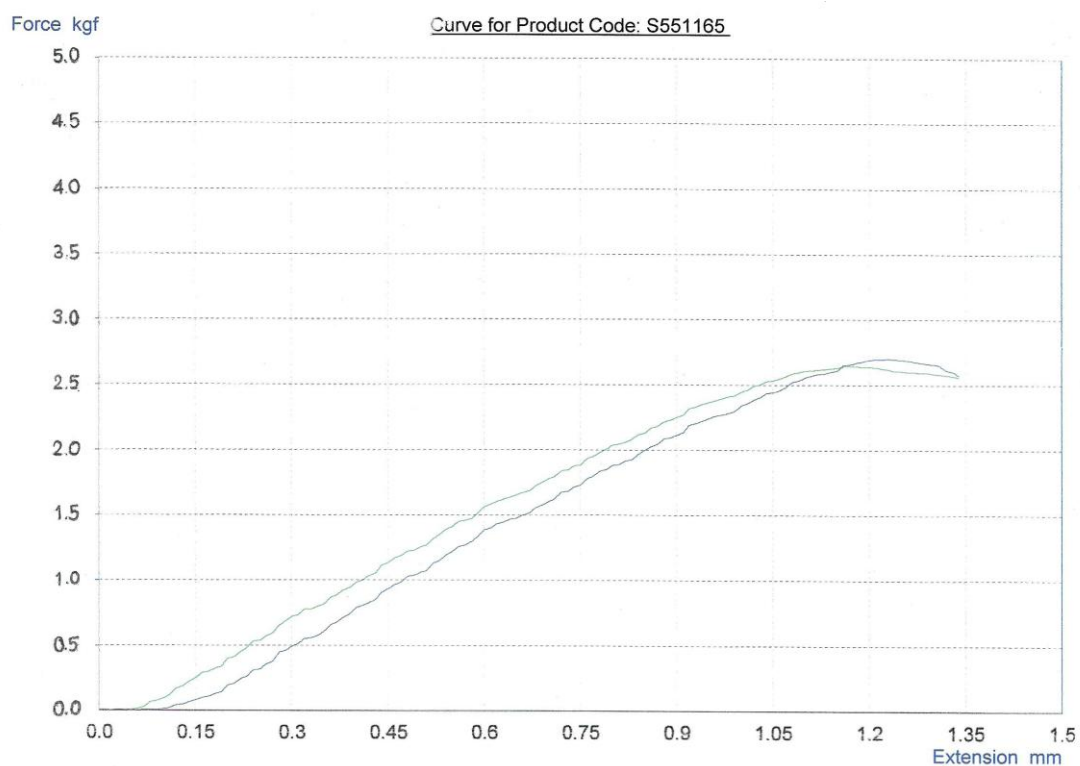
โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-12% 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต [P(3HB-co-12% 3HV)] (วิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน)



ตัวอย่างโครมาโทแกรมของโคพอลิเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (PHBV) ซึ่งผลิตได้จาก *Bacillus megaterium* P-12 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 30.0 กรัมต่อลิตร สัดส่วน C/N เท่ากับ 10:1 และเติมแหล่งคาร์บอนผสมที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 9 กรัมต่อลิตร สัดส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมเป็น 1:0.5 (วิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน)



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลวและอุณหภูมิกลาสรานลิชันของโคพอลิเมอร์ PHBV ที่ผลิตได้จาก *B.megaterium* P-12



ภาพที่ 2 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพด้านความสามารถในการต้านแรงดึง (Tensile strength) ของโคพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก *B.megaterium* P-12

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิยน์นัท เมืองเก่า เกิดวันที่ 15 พฤศจิกายน 2528 ที่จังหวัดกาญจนบุรี สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2551 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตร จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552

ในระหว่างการศึกษาได้เข้าร่วมเสนอผลงานบางส่วนในงาน The 23<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB 2011) จัดโดยมหาวิทยาลัยมหิดล ณ โรงแรมอิมพีเรียล ควีนส์ปาร์ค กรุงเทพฯ ระหว่างวันที่ 1-2 กุมภาพันธ์ 2555 ในหัวข้อ The bioplastic, poly(3-hydroxybutyrate) production by batch cultivation of *Bacillus megaterium* P-12 from sugarcane liquor with different C/N ratio โดยได้รับรางวัล Poster Award Winner ในงานประชุมครั้งนี้ด้วย