บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์แต่ละชนิด ในการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Bacillus* sp. BA-019

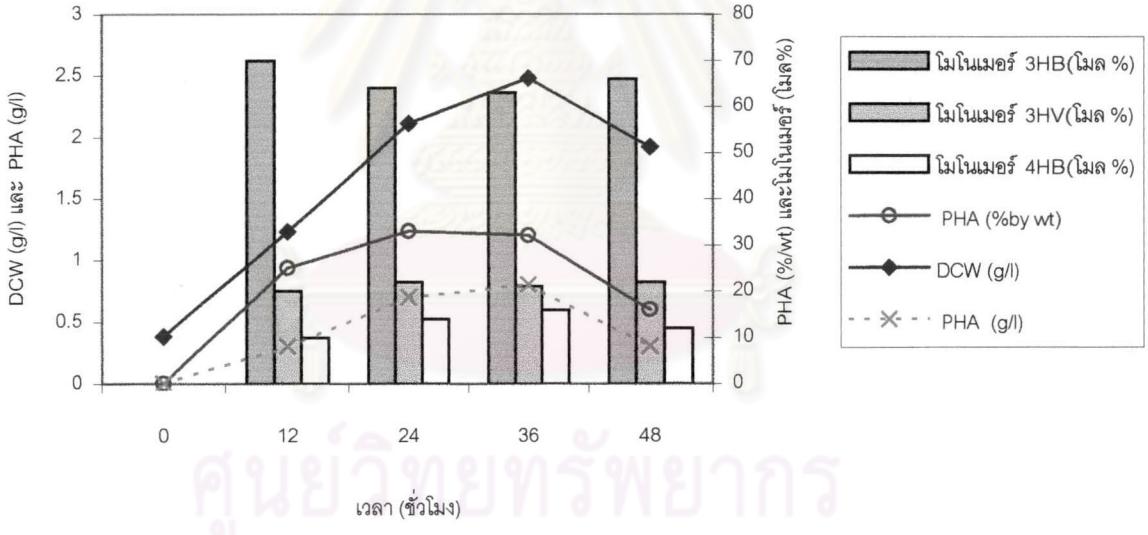
จากรายงานการศึกษาของ Doi และคณะ (1995) พบว่าวิถีการสังเคราะห์ PHA ขึ้นอยู่กับการเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ แล้วโมโนเมอร์แต่ละชนิดจึงพอลิเมอร์ไรซ์เป็นโคพอลิเมอร์หรือเทอร์พอลิเมอร์ สารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ 3HB สังเคราะห์ได้จากกรดบิวทิริก แต่ได้ปริมาณ PHB (เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) น้อยกว่าการใช้ซูโครส เป็นสารตั้งต้น รวมทั้งกรดบิวทิริกเป็นสารตั้งต้นที่มีราคาแพงกว่าซูโครสมาก Dawes และ Senior (1973) ; Oeding และ Schlegel (1973) ได้รายงานวิถีการสังเคราะห์ PHB (ดังรูปที่ 5)ไว้ว่า น้ำตาลหรือ กรดอินทรีย์ อื่นๆ ถูกเมตาบอไลซ์ เป็นอะเซติลโคเอ จากนั้นอะเซติลโคเอ จะถูกออกซิไดซ์เข้าสู่วัฏจักรทีซีเอ หรือเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB ส่วนสารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ 3HV จากการศึกษาของ Doi (1987) พบว่า เกลือโพรพิโอเนต หรือเกลือวาเลอเรตเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตโมโนเมอร์ 3HVได้ การใช้เกลือวาเลอเรตเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตโมโนเมอร์ 3HV โดยเกลือวาเลอเรตถูกเปลี่ยนเป็น 3-ไฮดรอกซีวาเลอริลโคเอ แล้วรวมเป็นพอลิเมอร์โดยผ่านทางวาเลอริลโคเอ ซึ่งพบว่า *Ralstonia eutropha* สังเคราะห์โมโนเมอร์ 3HVจากเกลือวาเลอเรตได้สูงกว่าการใช้เกลือโพรพิโอเนตเป็นสารตั้งต้น ดังที่กล่าวในวิถีการสังเคราะห์ P(3HB-co-3HV) (ดังรูปที่ 7 และ 8) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เกลือวาเลอเรต เป็นสารตั้งต้นสำหรับ 3HV ในการศึกษาเบื้องต้น สำหรับสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 4HB จากการศึกษาของ Doi และ Kunioka (1989) พบว่าเมื่อใช้ 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 1,4- บิวเทนไดออล หรือแกมมา-บิวทิโรแลกโตน อย่างใดอย่างหนึ่ง สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-4HB) จาก *A. eutrophus* และ พบว่าเมื่อใช้ 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต สามารถผลิต P(3HB-co-4HB) ที่มีสัดส่วนของ 4HB สูงสุดถึง 70 - 94 โมลเปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการศึกษาเบื้องต้นในการเลือกชนิดของสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV จึงเลือกใช้ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นสารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ 4HB

4.1.1 สารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง โมโนเมอร์ 3HB ในเทอร์พอลิเมอร์

จากรายงานการศึกษาการผลิต PHB ของ รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) จาก *Bacillus* sp. BA-019 จากน้ำตาลชนิดต่าง ๆ และพบว่าเมื่อใช้ น้ำตาลทราย หรือกากน้ำตาล ได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 47 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และสามารถผลิต P(3HB-co-3HV) เมื่อใช้น้ำตาลทราย หรือ กากน้ำตาลร่วมกับกรดอินทรีย์ รายงานการศึกษาของ สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลทรายเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร และ เกลือวาเลอริกเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Bacillus* sp. BA-019 กล่าวคือ ได้ P(3HB-co-3HV) เท่ากับ 35.18 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เนื่องจากในการทดลองนี้ต้องการศึกษาชนิดของสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง 3HB ในเทอร์พอลิเมอร์ ซึ่งจากผลงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นจึงได้เลือกใช้ ซูโครส น้ำตาลทราย หรือกากน้ำตาล ซึ่งมีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ในการทดลอง โดยเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตโดยเปรียบเทียบชนิดของสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโมโนเมอร์ 3HB เก็บตัวอย่างและนำมาวิเคราะห์ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 3 4 และ 5 และรูปที่ 13 14 และ 15 พบว่า ความสามารถในการสร้าง 3HB นั้น พบว่าเมื่อใช้ กากน้ำตาลได้สัดส่วนของ 3HB สูงที่สุดเท่ากับ 92 – 96 โมลเปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อใช้ ซูโครสและน้ำตาลทราย *Bacillus* sp. BA-019 สามารถในการสร้าง 3HB ได้สัดส่วนใกล้เคียงกัน คือ 64-74 และ 63-70 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาสัดส่วนของ 3HV และ 4HB พบว่าเมื่อใช้ซูโครสและน้ำตาลทรายเป็นสารตั้งต้น ทำให้ได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ทั้งสองชนิดสูงกว่า การใช้กากน้ำตาลซึ่งได้สัดส่วนของโมโนเมอร์ทั้งสองชนิดนี้น้อยกว่ามาก เนื่องจากในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ ดังนั้นจึงได้เลือกใช้น้ำตาลทรายในการทดลองขั้นต่อไปเนื่องจากมีราคาถูกกว่าซูโครส *Bacillus* sp. BA-019 มีการเจริญ การสร้างและสะสมเทอร์พอลิเมอร์ที่ใกล้เคียงกัน กล่าวคือ ในด้านการเจริญของเชื้อ พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด รองลงมาคือซูโครสและน้ำตาลทราย ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน (2.86 2.59 และ 2.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อ) สำหรับการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ พบว่าความเข้มข้นสูงที่สุด ใกล้เคียงกันคือ 0.8 - 0.9 กรัมต่อลิตร แต่พบว่า ได้ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์สูงที่สุด เมื่อใช้ซูโครส กล่าวคือ เท่ากับ 38.83 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนเมื่อใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลทรายได้ปริมาณน้อยกว่า คือ 34.75 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ 33.18 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อพบว่าใกล้เคียงกันโดยลดลงเล็กน้อย

ตารางที่ 3 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็น **ซูโครส** 15 กรัมต่อลิตร เกลือวาเลอเรต 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	เทอร์พอลิเมอร์		โมโนเมอร์ (โมล %)		
			กรัมต่อลิตร	% by wt.	3HB	3HV	4HB
0	0.42	6.75	-	-	-	-	-
12	1.47	6.39	0.5	34.01	72	19	9
24	2.06	6.25	0.7	34.75	70	20	10
36	**2.59**	6.14	**0.9**	**38.83**	**74**	15	11
48	1.88	6.04	0.7	34	64	16	20

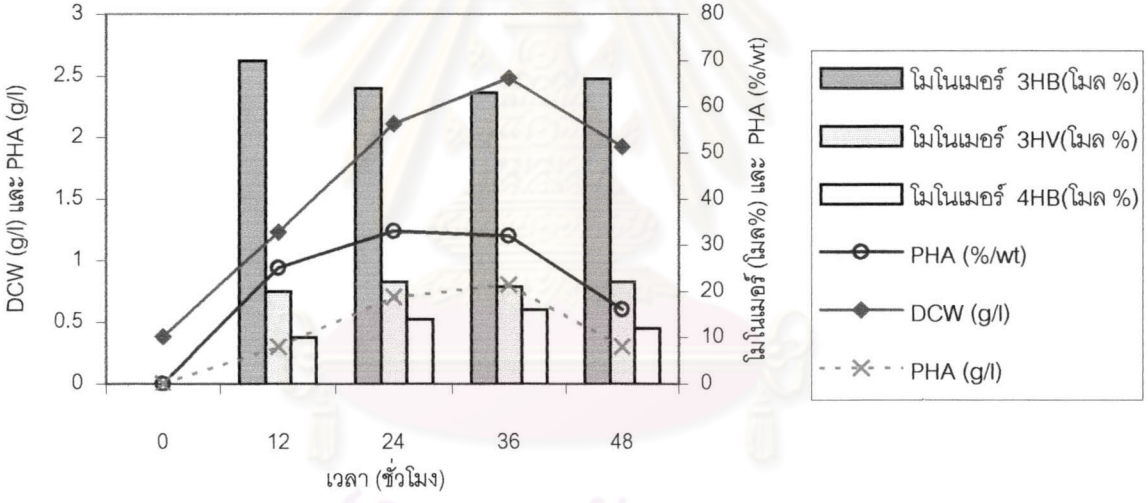


รูปที่ 13 เปรียบเทียบการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น **ซูโครส** 15 กรัมต่อลิตร เกลือวาเลอเรต 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็น **น้ำตาลทราย** 15 กรัมต่อลิตร เกลือวาเลอเรต 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

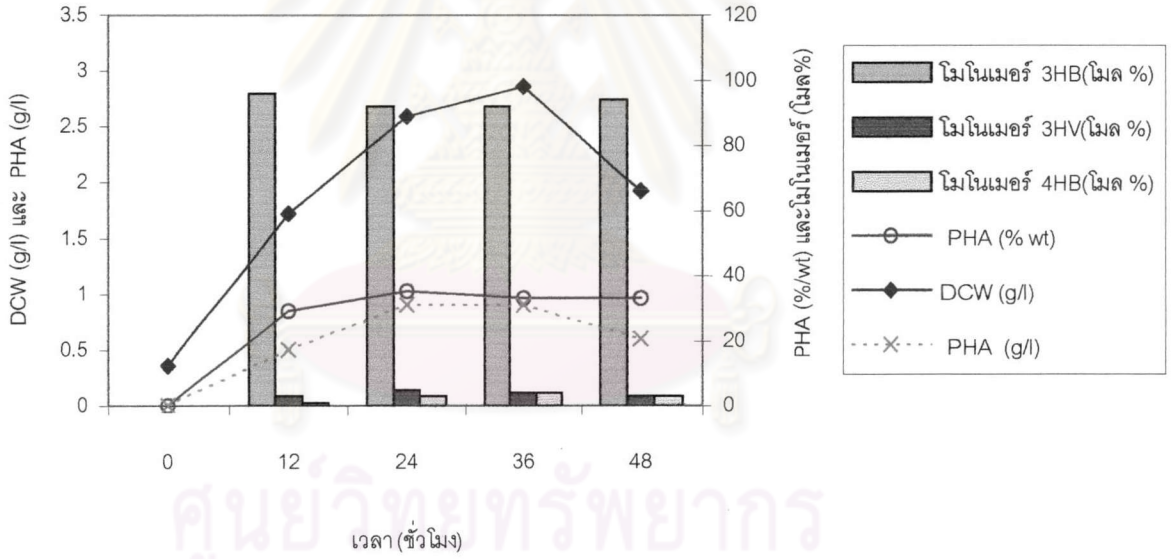
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	เทอร์พอลิเมอร์		โมโนเมอร์ (โมล %)		
			กรัมต่อลิตร	% by wt.	3HB	3HV	4HB
0	0.38	6.77	-	-	-	-	-
12	1.23	6.36	0.3	24.39	**70**	20	10
24	2.11	6.23	0.7	**33.18**	64	22	14
36	**2.48**	6.09	**0.8**	32.26	63	21	16
48	1.92	6.04	0.3	15.63	66	22	12



รูปที่ 14 เปรียบเทียบการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น **น้ำตาลทราย** 15 กรัมต่อลิตร เกลือวาเลอเรต 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 5 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็น **กากน้ำตาล** 15 กรัมต่อลิตร กรดวาเลอริก 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	เทอร์พอลิเมอร์		โมโนเมอร์ (โมล %)		
			กรัมต่อลิตร	% by wt.	3HB	3HV	4HB
0	0.36	6.71	-	-	-	-	-
12	1.72	6.34	0.5	29.07	**96**	3	1
24	2.59	6.22	**0.9**	**34.75**	92	5	3
36	**2.86**	6.14	**0.9**	33.45	92	4	4
48	1.92	6.10	0.6	31.25	94	3	3



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 เปรียบเทียบการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* BA-019 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น **กากน้ำตาล** 15 กรัมต่อลิตร เกลือวาเลอเรต 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

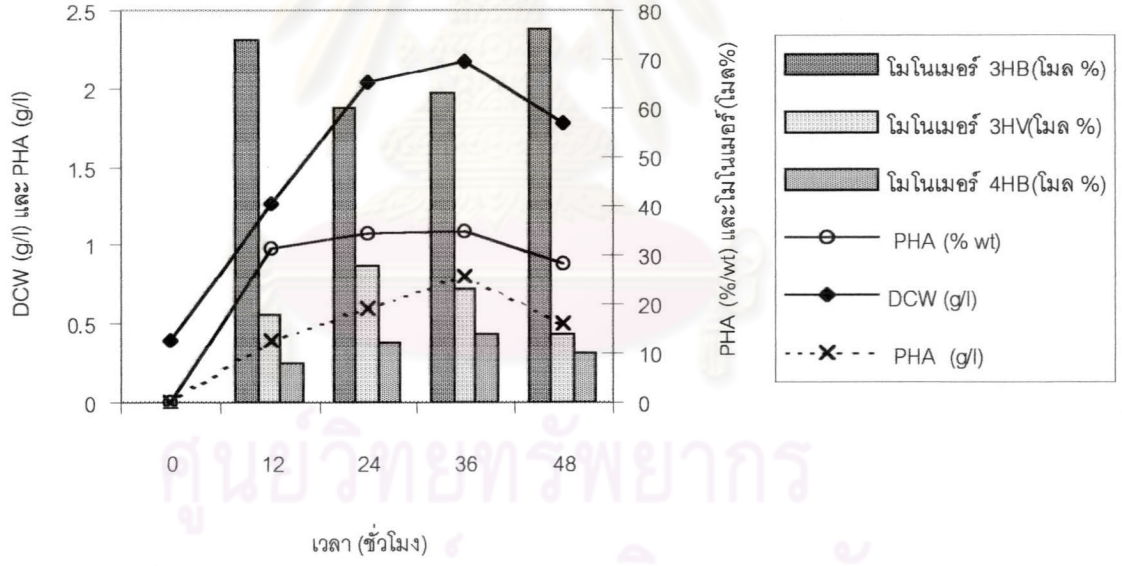
4.1.2 สารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง โมโนเมอร์ 3HV ในเทอร์พอลิเมอร์

ในการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) จาก *Bacillus* sp. BA-019 จากงานวิจัยของ พิสิษฐ์ คงกำเนิด (2540) พบว่า กรดวาเลอริก และ กรดโพรพิโอนิก เป็นสารตั้งต้นสำหรับ 3HV ได้ ในรายงานของ สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) พบว่าเมื่อใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับเกลือวาเลอเรต 5 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้สัดส่วนของ 3HV สูงกว่า การใช้สารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ 3HV เป็นเกลือโพรพิโอเนต เล็กน้อย ในการศึกษานี้ต้องการเลือกชนิดของสารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ 3HV ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ งานวิจัยนี้ใช้ *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันกับงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น จึงเลือกศึกษาเฉพาะ เกลือโพรพิโอเนต และเกลือวาเลอเรต เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HV ร่วมกับน้ำตาลทราย (จากผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาในข้อที่ 4.1.1) และโซเดียม 4-ไฮดรอกซี-บิวทิเรต

เลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเปรียบเทียบชนิดของสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโมโนเมอร์ 3HV เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 6 และ รูปที่ 16 คือผลการใช้เกลือวาเลอเรตเป็นสารตั้งต้นสำหรับ 3HV ส่วน ตารางที่ 7 และ รูปที่ 17 เป็นการผลิตเทอร์พอลิเมอร์โดยใช้เกลือโพรพิโอเนตเป็นสารตั้งต้นสำหรับสร้าง 3HV ผลการทดลองพบว่า การใช้เกลือวาเลอเรตเป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิต โมโนเมอร์ 3HV สามารถให้สัดส่วนสูงกว่าการใช้เกลือโพรพิโอเนตเล็กน้อยคือ 28 โมลเปอร์เซ็นต์ และ 26 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ เมื่อให้อาหารที่มีเกลือโพรพิโอเนตได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า คือ 2.44 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เกลือวาเลอเรตมีการเจริญของเชื้อต่ำกว่าเล็กน้อย คือ 2.18 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตเทอร์พอลิ-เมอร์โดยเกลือโพรพิโอเนตได้ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 31.97 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่เกลือวาเลอเรตให้ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 34.86 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เนื่องจากราคาของเกลือวาเลอเรตสูงกว่าเกลือโพรพิโอเนตถึงสี่เท่าและเกลือวา-เลอเรตยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (พิศิษฐ์ คงกำเนิด ,2540)ในขณะที่ความสามารถในการผลิต โมโนเมอร์ของ 3HV ใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงได้เลือกใช้เกลือโพรพิโอเนต เป็นสารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ 3HV ค่าความเป็นกรด ด่างของน้ำหมักลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ จาก 6.7 ลดลงเป็น 5.87 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 6 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร **เกลือวาเลอเรต** 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	เทอร์พอลิเมอร์		โมโนเมอร์ (โมล %)		
			กรัมต่อลิตร	% by wt.	3HB	3HV	4HB
0	0.39	6.7	-	-	-	-	-
12	1.27	6.26	0.4	31.50	74	18	8
24	2.04	6.12	0.6	34.31	60	**28**	12
36	**2.18**	5.96	**0.8**	**34.86**	63	23	14
48	1.78	5.87	0.5	28.09	76	14	10

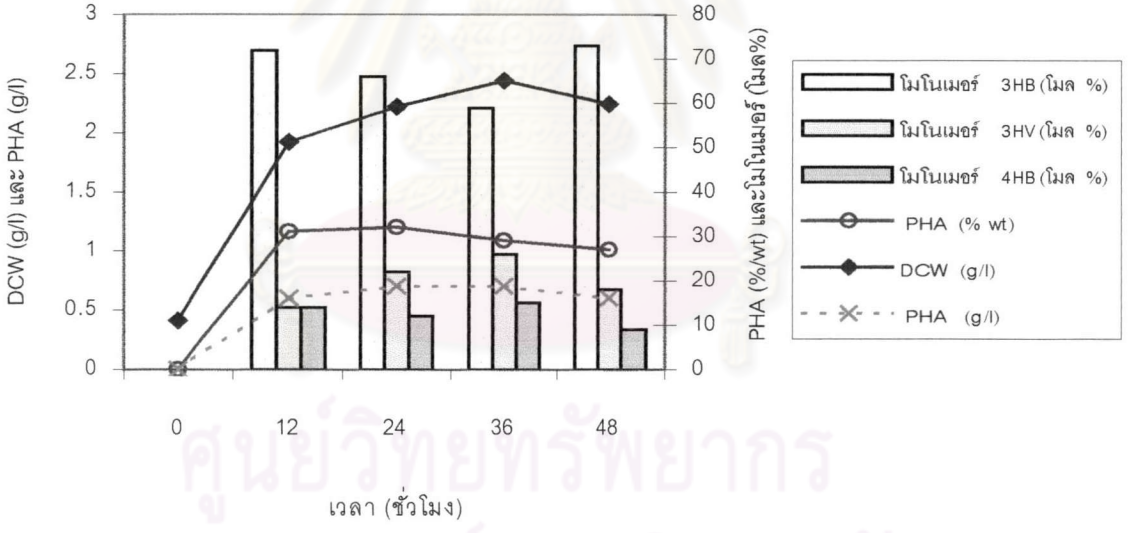


รูปที่ 16 เปรียบเทียบการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* BA-019 โดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร **เกลือวาเลอเรต** 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร **เกลือโพรพิโอเนต** 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	เทอร์พอลิเมอร์		โมโนเมอร์ (โมล %)		
			กรัมต่อลิตร	% by wt.	3HB	3HV	4HB
0	0.41	6.65	-	-	-	-	-
12	1.92	6.20	0.6	31.25	72	14	14
24	2.22	6.06	0.7	31.53	66	22	12
36	**2.44**	5.94	**0.8**	**31.97**	59	**26**	15
48	2.24	5.84	0.6	26.79	73	18	9



รูปที่ 17 เปรียบเทียบการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* BA-019 โดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร **เกลือโพรพิโอเนต** 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์

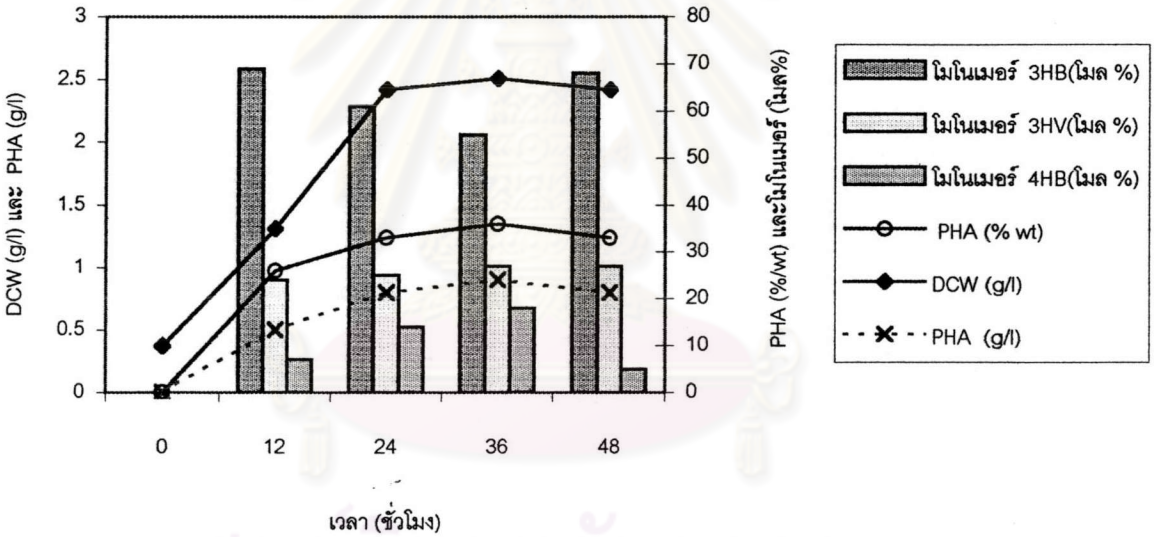
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.3 สารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง โมโนเมอร์ 4HB ในเทอร์พอลิเมอร์

จากรายงานการผลิตโมโนเมอร์ 4HB โดยใช้สารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ โซเดียม 4-ไฮดรอกซี-บิวทิเรตเป็นสารตั้งต้นชนิดแรกที่ถูกนำมาใช้ในรายงานการศึกษาของ Doi (1989) ต่อมา Saito และ Doi (1994) ได้ใช้ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และ 1,4-บิวเทนไดออล สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Comamonas acidovorans* DS-17 ซึ่งพบว่าสามารถผลิตโฮโมพอลิเมอร์ P(4HB)ได้ ในปี 1999, Choi และคณะ ได้ใช้ แกมมา-บิวทิโรแลกโตน ในการผลิตโมโนเมอร์ 4HB และสามารถผลิตโฮโมพอลิเมอร์ P(4HB) ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อ *Hydrogenophaga pseudoflava* แบบสามขั้นตอน สำหรับการวิจัยนี้ได้เลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตโดยเปรียบเทียบชนิดของสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโมโนเมอร์ 4HB ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 18 เป็นผลการใช้โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นสารตั้งต้นสำหรับ 4HB สามารถผลิตโมโนเมอร์ 4HB ได้อยู่ในช่วง 5 – 18 โมลเปอร์เซ็นต์ โดยที่ความเข้มข้นของเทอร์พอลิเมอร์ และ ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ได้สูงที่สุด คือ 0.9 กรัมต่อลิตร และ 35.86 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ นอกจากนี้การเจริญของเชื้อซึ่งวัดจากน้ำหนักเซลล์แห้งจากชุดการทดลองนี้ให้ผลดีกว่าอีกสองชุดการทดลองกล่าวคือ เมื่อใช้ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 2.51 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ 1,4-บิวเทนไดออล ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.33 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ 1,4-บิวเทนไดออล เป็นสารตั้งต้นดังแสดงผลในตารางที่ 9 และรูปที่ 19 พบว่า ความเข้มข้นและปริมาณเทอร์พอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 0.6 กรัมต่อลิตร และ 25.75 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ไม่สามารถสร้างโมโนเมอร์ 4HB ได้ เมื่อใช้ 1,4-บิวเทนไดออลเป็นสารตั้งต้น ทั้งนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ สุดา สุภาชวิน-สวัสดิ์(2542) ซึ่งได้ศึกษาการใช้อัลกอฮอล์หลายชนิดเป็นสารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ชนิดต่าง ๆ สำหรับผลการศึกษาการใช้แกมมา-บิวทิโรแลกโตนเป็นสารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ 4HB ดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 20 นั้น ไม่พบการเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 น้ำหนักเซลล์แห้งลดลง ตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ และมีการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ได้น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดอื่น โดยค่าสูงสุดที่ได้เพียง 11.16 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากความเป็นพิษต่อเซลล์ของแกมมา-บิวทิโรแลกโตน ในการศึกษาขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิต 4HB ส่วนค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำหมักพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก

ตารางที่ 8 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ **โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต** 25 มิลลิโมลาร์

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	เทอร์พอลิเมอร์		โมโนเมอร์ (โมล %)		
			กรัมต่อลิตร	% by wt.	3HB	3HV	4HB
0	0.37	6.94	-	-	-	-	-
12	1.31	6.26	0.5	26.17	69	24	7
24	2.42	6.17	0.8	33.06	61	25	14
36	**2.51**	6.08	**0.9**	**35.86**	55	27	**18**
48	2.42	6.00	0.8	33	68	27	5

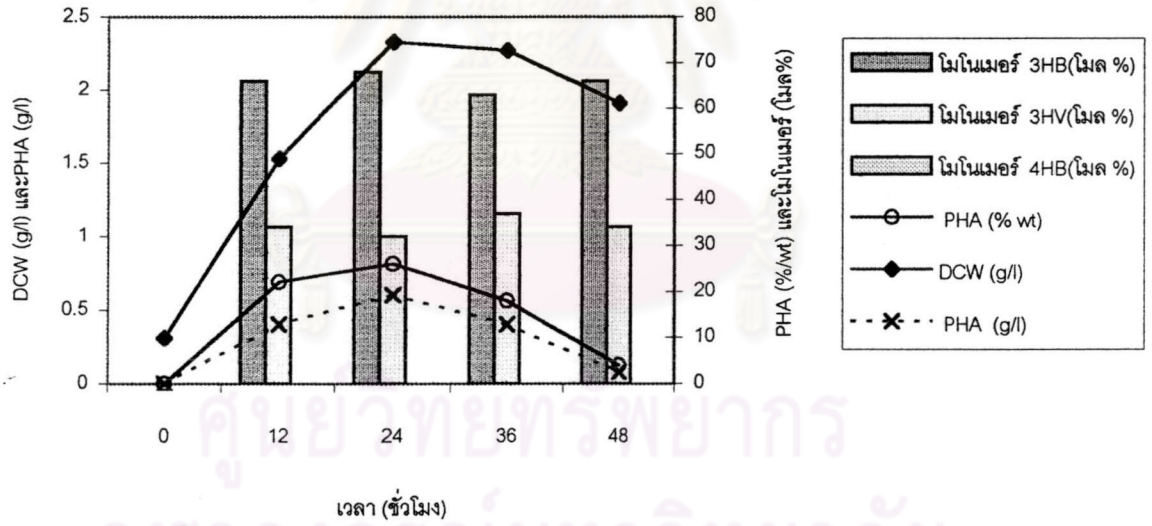


รูปที่ 18 เปรียบเทียบการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ **โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต** 25 มิลลิโมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ **1,4-บิวเทนไดออล** 25 มิลลิโมลาร์

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	เทอร์พอลิเมอร์		โมโนเมอร์ (โมล %)		
			กรัมต่อลิตร	% by wt.	3HB	3HV	4HB
0	0.39	6.93	-	-	-	-	-
12	1.53	6.28	0.4	22.14	66	34	0
24	**2.33**	6.19	**0.6**	**25.75**	68	32	0
36	2.27	6.05	0.4	17.62	63	37	0
48	1.91	6.02	0.08	4.19	66	34	0

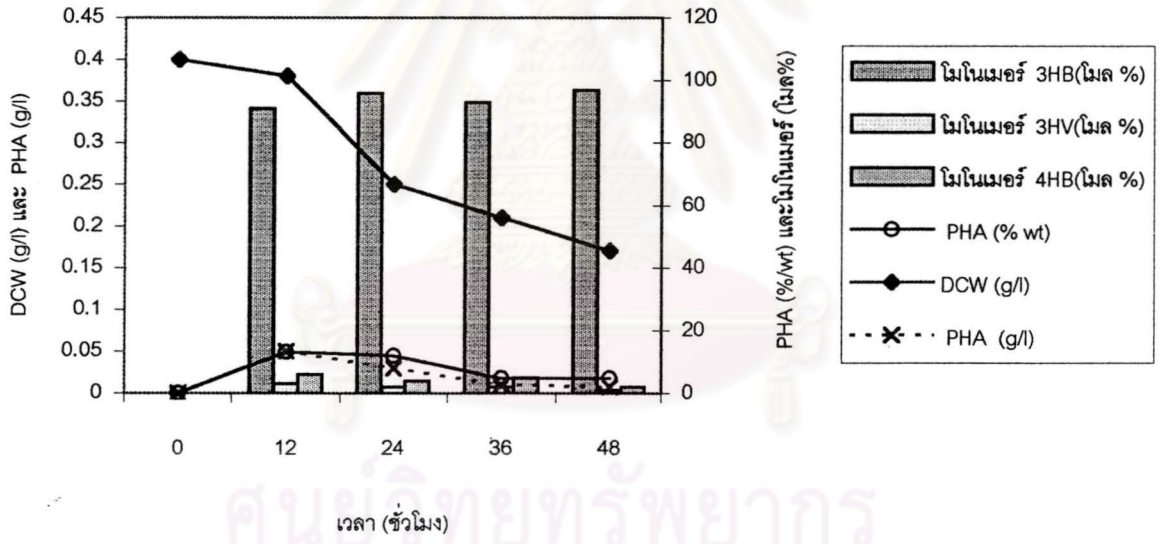


รูปที่ 19 เปรียบเทียบการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้สารตั้งต้นผสมเป็นน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ **1,4-บิวเทนไดออล** 25 มิลลิโมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ **แกมมา-บิวทิโรแลกโตน** 25 มิลลิโมลาร์

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	pH	เทอร์พอลิเมอร์		โมโนเมอร์ (โมล %)		
			กรัมต่อลิตร	% by wt.	3HB	3HV	4HB
0	**0.41**	6.86	-	-	-	-	-
12	0.38	6.60	**0.05**	**11.16**	91	3	**6**
24	0.25	6.61	0.03	7.89	96	2	2
36	0.21	6.54	0.01	4.76	93	2	5
48	0.17	6.41	0.008	4.71	97	1	2



รูปที่ 20 เปรียบเทียบการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ **แกมมา-บิวทิโรแลกโตน** 25 มิลลิโมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ศึกษาสารตั้งต้นแต่ละชนิด โดยแปรความเข้มข้นเพื่อผลิตเทอร์พอลิเมอร์จาก *Bacillus* sp. BA-019 ให้มีสัดส่วนโดยโมลของโมโนเมอร์แต่ละชนิด (3HB 3HV และ 4HB) ต่าง ๆ กัน

จากการรายงานของ Kang และคณะ (1993) ได้ศึกษาการแปรความเข้มข้นของสารตั้งต้นของโมโนเมอร์โดยเลี้ยง *Methylobacterium* sp. KCTC 0048 เพื่อผลิตโคพอลิเมอร์สองชนิด ในการผลิต P(3HB-co-3HV) ใช้ เมทานอล ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร และเกลือโพรพิโอเนต เข้มข้นเท่ากับ 5 – 20 มิลลิโมลาร์ และในการผลิตโคพอลิ-เมอร์ P(3HB-co-4HB) ใช้เมทานอลเข้มข้นเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร และโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เข้มข้นเท่ากับ 5 ถึง 20 มิลลิโมลาร์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 3HV และ 4HB เพิ่มขึ้น ทำให้สัดส่วนของโมโนเมอร์แต่ละชนิดเพิ่มขึ้น สำหรับเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่าสามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนต และโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้สูงกว่างานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น และสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ในปริมาณที่มากกว่าโดยใช้เวลาเลี้ยงเชื้อน้อยกว่า (พิสิษฐ คงกำเนิด,2540) โดยจากรายงานการวิจัยของ สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของสารตั้งต้นทั้งสองชนิดได้แก่ เกลือโพรพิโอเนต และโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ในปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิตโคพอลิ-เมอร์หรือเทียบเป็นหน่วยมิลลิโมลาร์ประมาณเท่ากับ 200 มิลลิโมลาร์ นอกจากผลการแปรความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนต ร่วมกับน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อผลิต P(3HB-co-3HV) พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร กับเกลือโพรพิโอเนตเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร (หรือเทียบเท่าประมาณ 50 มิลลิโมลาร์) *Bacillus* sp. BA-019 สามารถเจริญได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHA สูงที่สุด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้น้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร และแปรความเข้มข้นของ เกลือโพรพิโอเนต และโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ที่ได้จากผลการศึกษาชนิดของสารตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเมอร์ (ผลการทดลองข้อ 4.1.1 4.1.2 และ 4.1.3) ได้แก่ น้ำตาลทราย สำหรับสังเคราะห์ 3HB เกลือโพรพิโอเนต สำหรับสังเคราะห์ 3HV และ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต สำหรับสังเคราะห์ 4HB เพื่อให้ทราบถึงผลของ ชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้นสำหรับการสร้างโมโนเมอร์ 3HB 3HV และ 4HB ที่มีต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์แต่ละชนิดดังกล่าวที่ประกอบในเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 ในการทดลองนี้ได้แปรความเข้มข้นของสารตั้งต้นทั้งสามชนิด ดังนี้

ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย	เท่ากับ 0 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร
ความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนต	เท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิโมลาร์
ความเข้มข้นของโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต	เท่ากับ 15 25 50 75 และ 100 มิลลิโมลาร์

4.2.1 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HB ที่สังเคราะห์โดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อแปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เกลือโพรพิโอเนต และ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

จากการศึกษา โดยใช้น้ำตาลทรายเท่ากับ 0 5 10 และ15 กรัมต่อลิตร และแปรความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนต เท่ากับ 25-100 มิลลิโมลาร์ ผสมกับน้ำตาลทรายแต่ละความเข้มข้นในลักษณะเดียวกันกำหนดความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 15 25 50 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ ผสมกับน้ำตาลทรายและเกลือโพรพิโอเนตเข้มข้นที่กล่าวมาข้างต้น จากข้อมูลในตารางที่ 11.ก แสดงถึงสัดส่วนของ โมโนเมอร์ 3HB เมื่อมีการแปรความเข้มข้นของสารตั้งต้นทั้งสามชนิด พบว่าสัดส่วน 3HB สูงที่สุดเท่ากับ 89 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้น้ำตาลทรายเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ร่วมกับเกลือโพรพิโอเนตเข้มข้นเท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์ และโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเข้มข้นเท่ากับ 15 มิลลิโมลาร์ เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลทรายมากขึ้นสัดส่วนของ 3HB มีแนวโน้มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลทรายทั้งนี้เมื่อมีเกลือโพรพิโอเนตเท่ากับ 25-100 มิลลิโมลาร์ จึงกล่าวได้ว่าสัดส่วนของ 3HB ขึ้นอยู่กับ ปริมาณของน้ำตาลทรายที่ใช้เป็นหลัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีน้ำตาลทราย กับชุดที่ไม่มีน้ำตาลทราย พบว่าสัดส่วนของ 3HB ในชุดการทดลองที่มีน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนมีสัดส่วนที่สูงกว่า ชุดที่ไม่มีน้ำตาลทราย อย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และเกลือโพรพิโอเนต ต่อสัดส่วนของ 3HBที่ได้ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และเกลือโพรพิโอเนตที่ใช้เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 15 25 50 75 จนถึง 100 มิลลิโมลาร์ สัดส่วนของ 3HB ที่ได้ส่วนใหญ่มีแนวโน้มลดลง เมื่อความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และเกลือโพรพิโอเนต เพิ่มขึ้น (ความเข้มข้นของน้ำตาลทรายคงที่) ดังตัวอย่าง น้ำตาลทรายเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเข้มข้นเท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์ และแปรผันความเข้มข้นเกลือโพรพิโอเนต เท่ากับ 25 – 100 มิลลิโมลาร์ พบว่าได้สัดส่วนของ 3HB เท่ากับ 78 74 58 และ 53 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หรือเมื่อแปรผันความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 15-100 มิลลิโมลาร์ และกำหนดความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนตเท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์ น้ำตาลทรายเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร ได้สัดส่วนของ 3HB ดังนี้ 84 76 75 54 และ 49 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

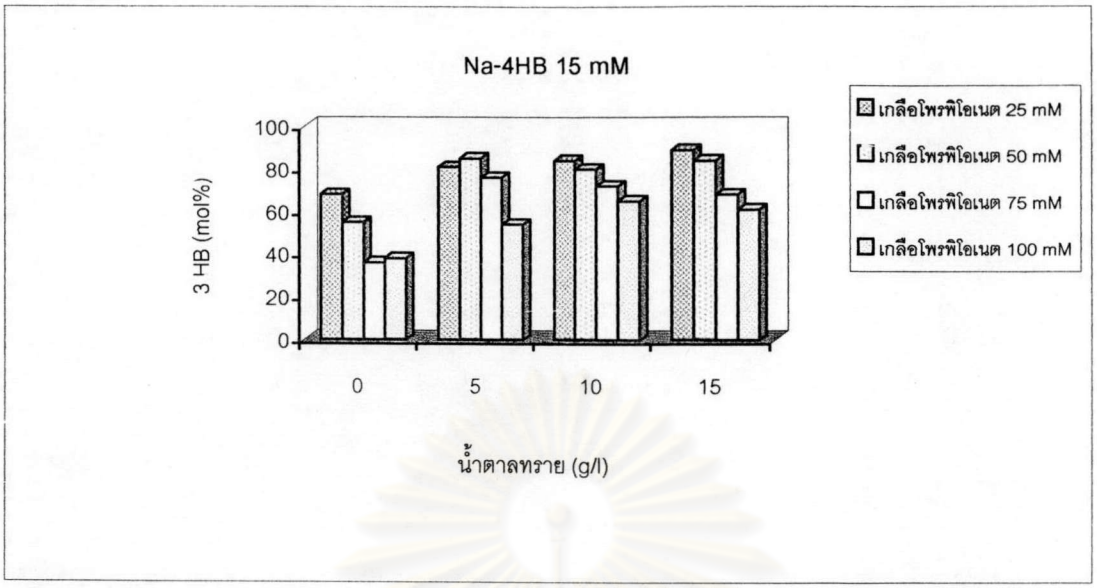
การที่สัดส่วนของ 3HB ทุกค่าที่ได้ไม่แปรโดยตรงตามความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลร่วมที่มีการใช้สารตั้งต้นอีกสองชนิด ได้แก่ เกลือโพรพิโอเนต และ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต จากวิถีการสังเคราะห์ของ 3HB พบว่า โมโนเมอร์ชนิดนี้นอกจากผลิตได้จากสารตั้งต้นโดยตรงคือ น้ำตาลทราย แล้ว ยังพบว่าสามารถถูกสร้างได้จากการเปลี่ยนสารตั้งต้นชนิดอื่นบางชนิด(ดังวิถีการสังเคราะห์รูปที่ 7 และ 10) คือ เกลือโพรพิโอเนต และยังอาจจะสังเคราะห์ได้จาก โซเดียม 4- ไฮดรอกซีบิวทิเรต ด้วย (ซึ่งเป็นผลให้การทดลองชุดที่ไม่มีน้ำตาลทรายซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับ 3HB จึงพบ 3HB อยู่ด้วย) โดยชุดที่มีน้ำตาลทรายนั้น น้ำตาลทรายเปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอแล้วเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ได้เป็น 3HB โดยตรง ได้ดีกว่า สรุปผลการสังเคราะห์ 3HB ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของน้ำตาลทราย เกลือโพรพิโอเนต และโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต แสดงในรูปที่ 21 22 23 24 และ 25 โดยแสดงสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HB เมื่อแปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เกลือโพรพิโอเนต และ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

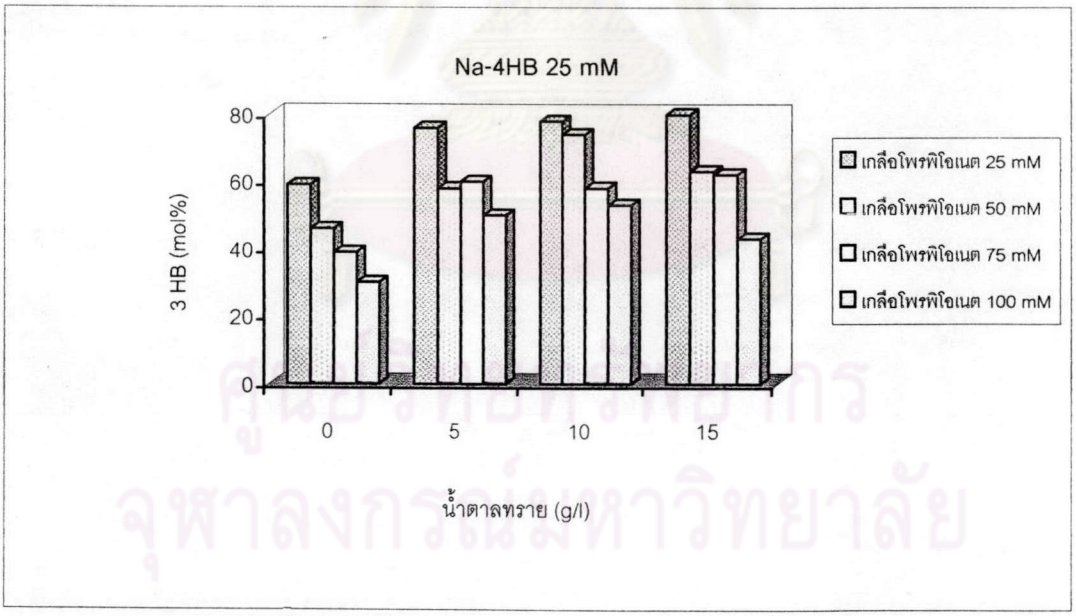
ตารางที่ 11.ก **สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HB** ที่สังเคราะห์โดย *Bacillus* sp. BA-019 **เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย** เกลือโพรพิโอเนต และโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต แตกต่างกัน

		3HB (mol %)																			
	Na-4HB (mM)	15				25				50				75				100			
	เกลือโพรพิโอเนต (mM)	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100
น้ำตาลทราย (g/l)	0	68^{a}	55^{a}	36^{a}	38^{a}	59^{a}	46^{a}	39^{a}	30^{a}	52^{a}	48^{a}	41^{a}	37^{a}	37^{a}	32^{a}	35^{a}	31^{a}	19^{a}	23^{a}	25^{a}	24^{a}
	5	81^{b}	85^{b}	76^{b}	54^{b}	76^{b}	58^{b}	60^{b}	50^{b}	75^{b}	64^{b}	61^{b}	70^{b}	54^{b}	65^{b}	54^{b}	50^{b}	49^{b}	44^{b}	55^{b}	50^{b}
	10	84^{b,c}	80^{b}	72^{b,c}	65^{c}	78^{b}	74^{c}	58^{b}	53^{b}	72^{b}	65^{b}	60^{b}	66^{b,c}	61^{c}	60^{b,c}	53^{b}	53^{b,c}	54^{c}	55^{c}	58^{b}	48^{b,c}
	15	89^{c}	84^{b}	68^{c}	61^{c}	80^{b}	63^{b}	62^{b}	43^{c}	74^{b}	67^{b}	63^{b}	61^{c}	54^{b}	60^{c}	53^{b}	56^{c}	61^{d}	64^{d}	56^{c}	45^{c}

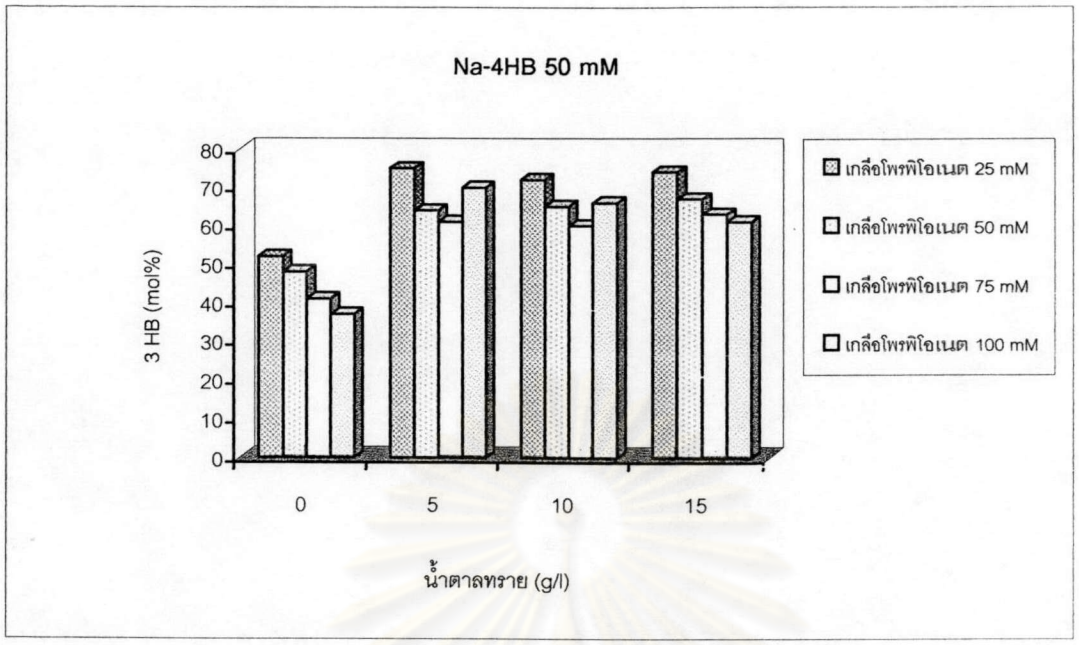
$^{a\ b\ c}$ และ ^{d} คือ ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p \leq 0.05$ (แสดงในภาคผนวก ค) ในแต่ละคอลัมน์



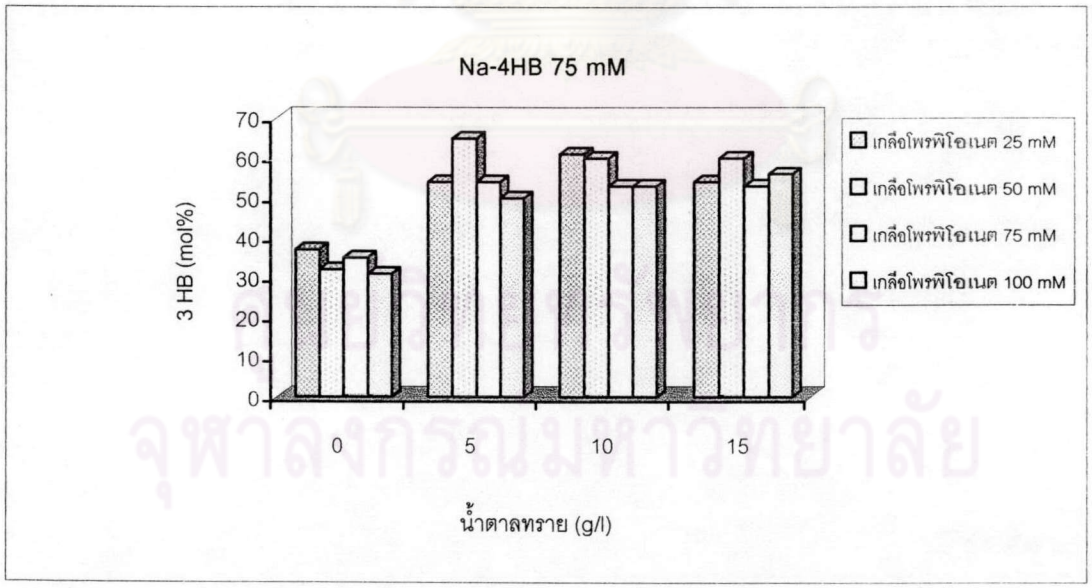
รูปที่ 21 สัดส่วนของ 3HB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้ **โซเดียม 4-ไฮดรอก-ซีบิวทิเรต 15 มิลลิโมลาร์** และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต



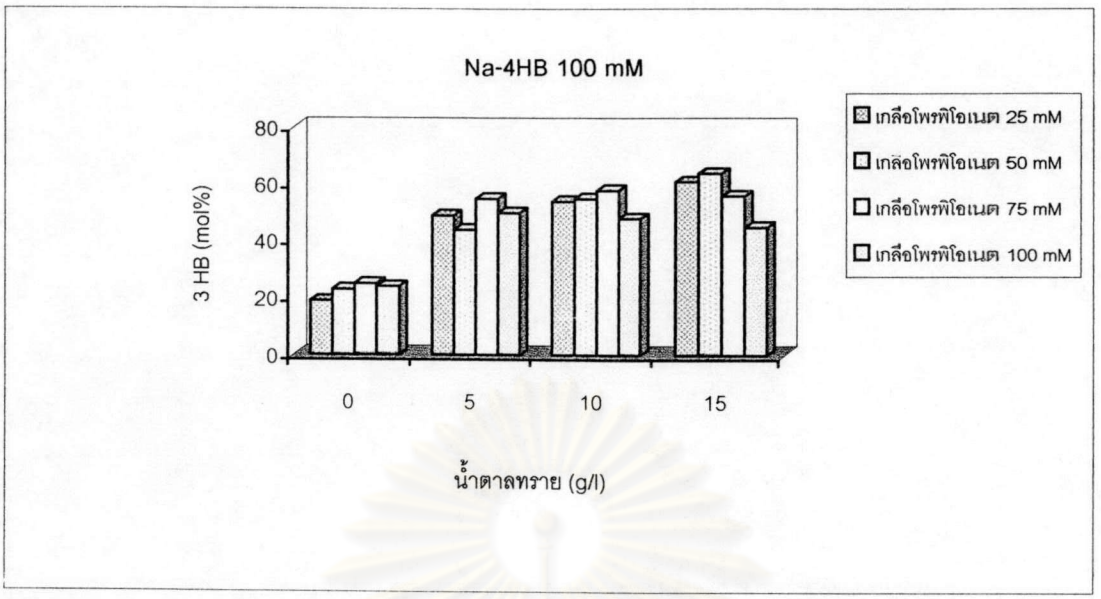
รูปที่ 22 สัดส่วนของ 3HB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้ **โซเดียม 4-ไฮดรอก-ซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์** และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต



รูปที่ 23 สัดส่วนของ 3HB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้ **โซเดียม 4-ไฮดรอก-ซีบิวทิเรต 50 มิลลิโมลาร์** และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต



รูปที่ 24 สัดส่วนของ 3HB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้ **โซเดียม 4-ไฮดรอก-ซีบิวทิเรต 75 มิลลิโมลาร์** และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต



รูปที่ 25 สัดส่วนของ 3HB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้ **โซเดียม 4-ไฮดรอก-ซีบิวทิเรต 100 มิลลิโมลาร์** และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.2 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV ที่สังเคราะห์โดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อแปรความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนต น้ำตาลทราย และ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

จากการศึกษา โดยใช้เกลือโพรพิโอเนต เท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ และแปรความเข้มข้นของน้ำตาลทรายเท่ากับ 0-15 กรัมต่อลิตร ผสมกับเกลือโพรพิโอเนตแต่ละความเข้มข้น ในลักษณะเดียวกันกำหนดความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 15 25 50 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ ผสมกับน้ำตาลทรายและเกลือโพรพิโอเนตเข้มข้นที่กล่าวมาข้างต้น จากข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 11.ข พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนตเพิ่มขึ้นมีผลให้สัดส่วนของ 3HV เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณเกลือโพรพิโอเนตจาก 25 – 100 มิลลิโมลาร์ โดยมีโซเดียม 4-บิวทิเรต เพิ่มจาก 15 – 100 มิลลิโมลาร์ (ไม่มีน้ำตาลทราย) ได้พบว่าสัดส่วนของ 3HV เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนต ดังตัวอย่าง เมื่อมีโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 15 มิลลิโมลาร์ เกลือโพรพิโอเนต เท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ เชื้อ*Bacillus* sp. BA-019 สังเคราะห์ 3HV ได้ เท่ากับ 20 26 42 และ 49 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ชุดการทดลองที่สารตั้งต้นประกอบด้วยน้ำตาลทราย 0 กรัมต่อลิตร โซเดียม4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ เกลือโพรพิโอเนต 100 มิลลิโมลาร์ พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตโมโนเมอร์ 3HV ได้สูงที่สุด คือ 49 โมลเปอร์เซ็นต์

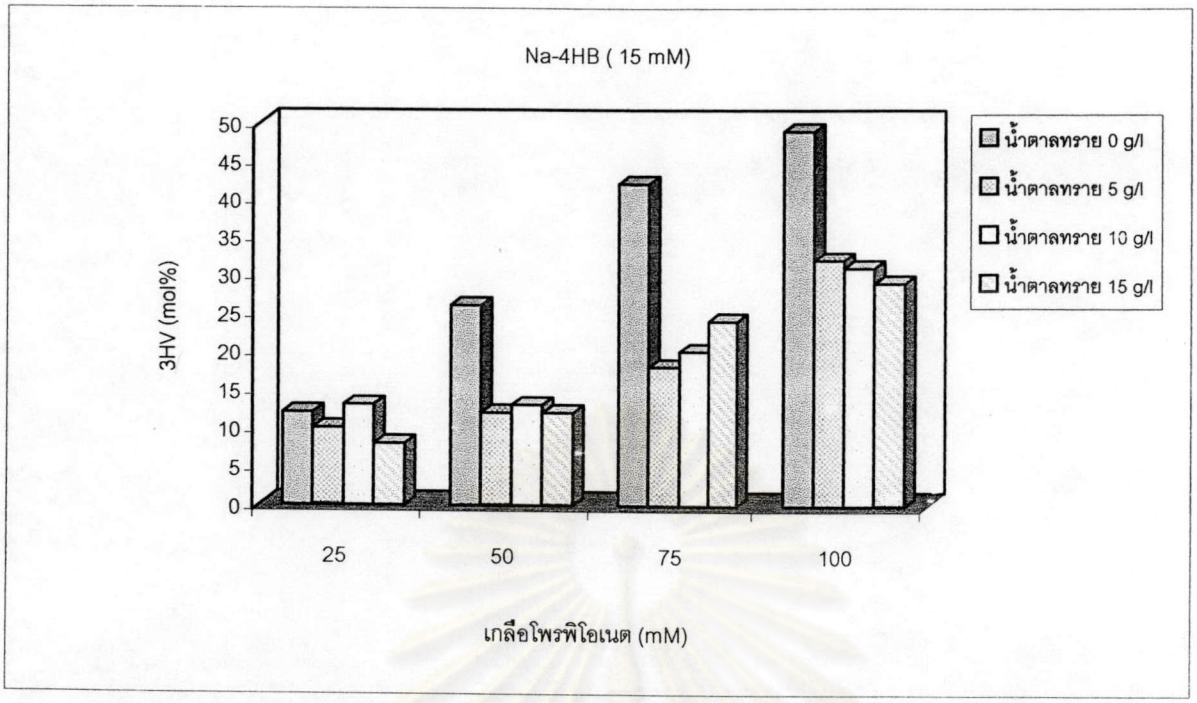
สำหรับการเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เพิ่มขึ้นต่อการสัดส่วน 3HV เมื่อกำหนดความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนต และโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต คงที่ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นจาก 0 - 15 กรัมต่อลิตร โดยส่วนใหญ่สัดส่วนของ 3HV มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 11.ข

การศึกษาผลของความเข้มข้นของ โซเดียม 4- ไฮดรอกซีบิวทิเรต ที่เพิ่มขึ้นต่อสัดส่วนของ 3HV พบว่าเมื่อกำหนดความเข้มข้นของ เกลือโพรพิโอเนต และความเข้มข้นของน้ำตาลทราย คงที่ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ที่เพิ่มขึ้น มีผลให้สัดส่วนของ 3HV ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เพิ่มทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตเทอร์พอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HB และ4HB เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงทำให้สัดส่วน 3HV ลดลง สรุปว่าการสังเคราะห์ 3HV ได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนตเป็นสำคัญ ส่วนการที่มีน้ำตาลทราย และ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นสารตั้งต้นร่วมมีผลต่อสัดส่วนของ 3HV ด้วยเช่นกัน ผลสรุปแสดงในรูปที่ 26 27 28 29 และ 30

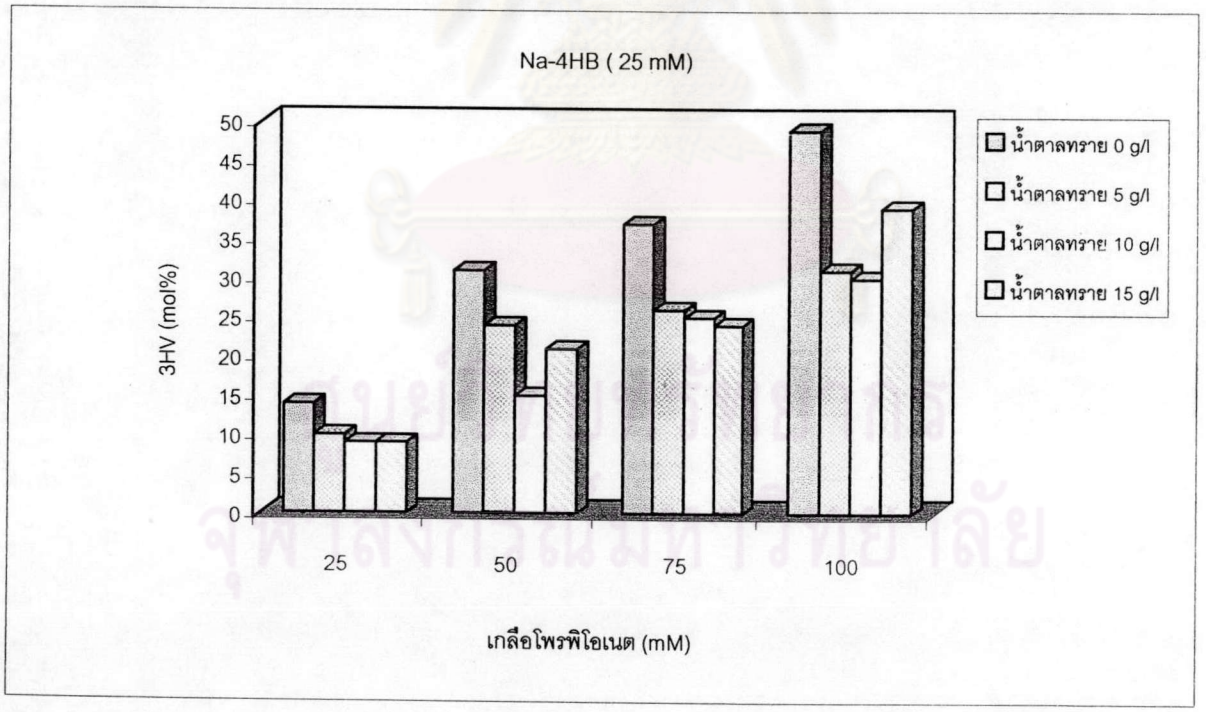
ตารางที่ 11.ข สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV ที่สังเคราะห์โดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ ความเข้มข้นของ **เกลือโพรพิโอเนต** น้ำตาลทราย และโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต แตกต่างกัน

	3HV (mol %)																			
	Na-4HB (mM)	15				25				50				75				100			
	น้ำตาลทราย (g/l)	0	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15
เกลือโพรพิโอเนต (mM)	25	20^{a}	13^{a}	10^{a}	8^{a}	24^{a}	10^{a}	9^{a}	11^{a}	14^{a}	9^{a}	8^{a}	9^{a}	17^{a}	6^{a}	8^{a}	6^{a}	3^{a}	6^{a}	7^{a}	4^{a}
	50	26^{b}	12^{a}	13^{a}	12^{a}	$31^{a,b}$	24^{b}	15^{a}	21^{b}	19^{a}	19^{b}	$17^{b,c}$	16^{b}	24^{b}	20^{b}	$14^{c,d}$	14^{b}	12^{b}	$9^{a,b}$	6^{a}	$8^{a,b}$
	75	42^{c}	18^{b}	20^{b}	$24^{b,c}$	37^{b}	$26^{b,c}$	25^{b}	24^{b}	38^{b}	19^{b}	24^{c}	17^{b}	25^{b}	24^{b}	18^{b}	14^{b}	29^{c}	12^{b}	$11^{a,b}$	11^{b}
	100	49^{d}	32^{c}	31^{c}	29^{c}	49^{c}	31^{c}	30^{c}	39^{c}	42^{b}	20^{b}	24^{c}	24^{c}	33^{c}	$19^{a,b}$	$16^{a,b}$	25^{c}	40^{d}	19^{c}	18^{b}	20^{c}

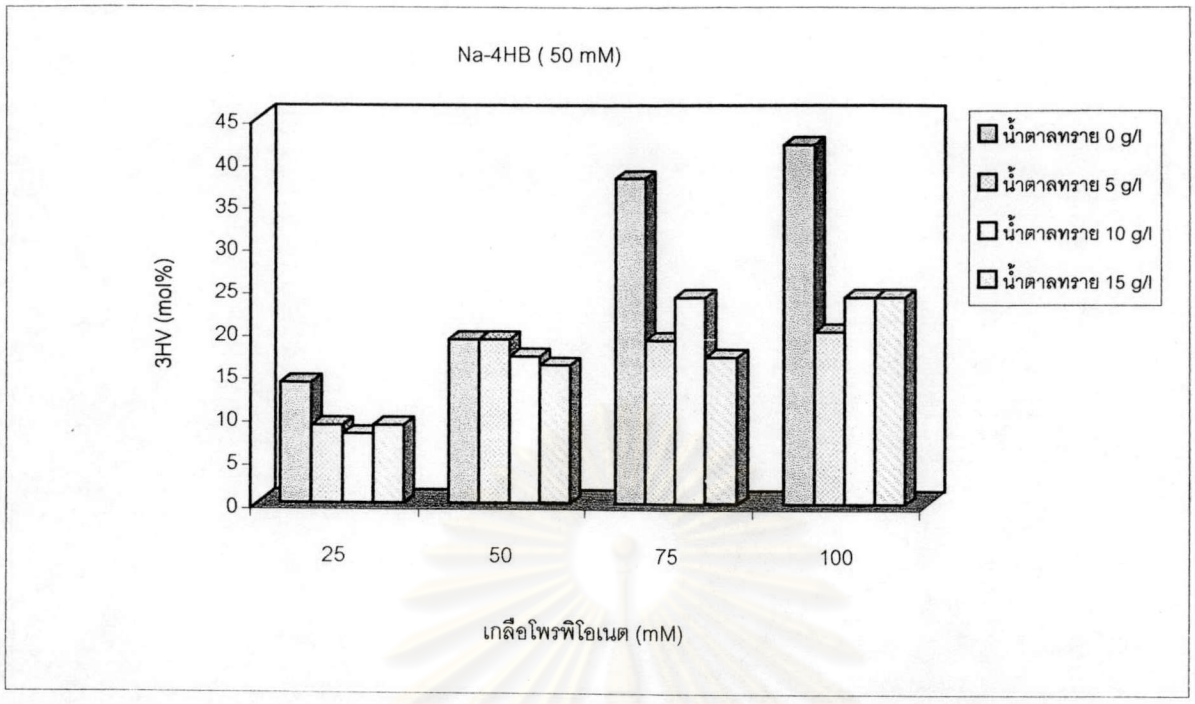
$^{a\ b\ c}$ และ ^{d} คือ ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p \leq 0.05$ (แสดงในภาคผนวก ค) ในแต่ละคอลัมน์



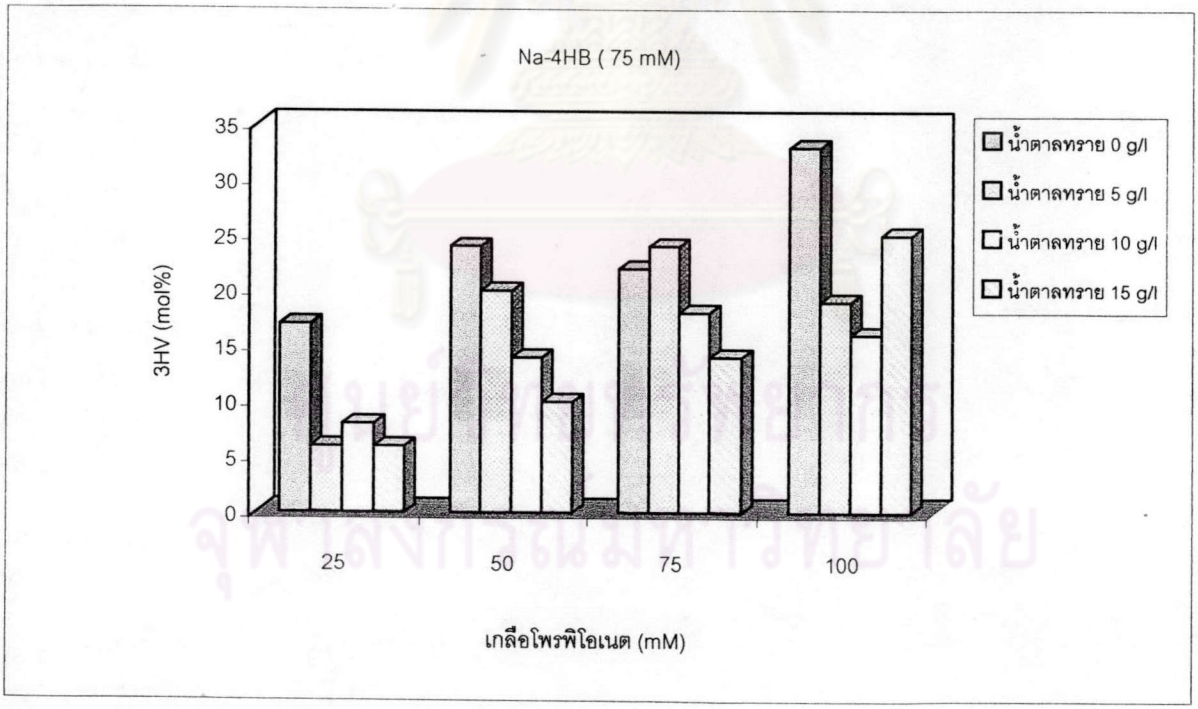
รูปที่ 26 สัดส่วนของ 3HV ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้**โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 15 มิลลิโมลาร์** และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต



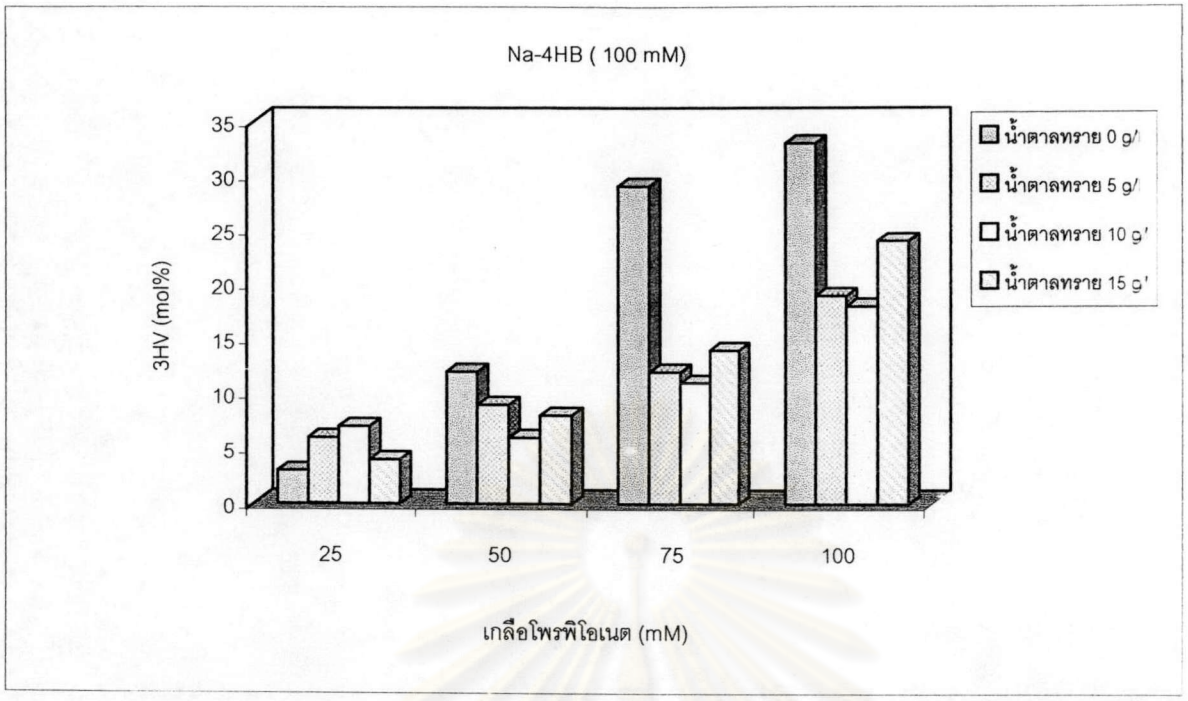
รูปที่ 27 สัดส่วนของ 3HV ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้**โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์** และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต



รูปที่ 28 สัดส่วนของ 3HV ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้**โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 50 มิลลิโมลาร์** และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต



รูปที่ 29 สัดส่วนของ 3HV ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้**โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 75 มิลลิโมลาร์** และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต



รูปที่ 30 สัดส่วนของ 3HV ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้**โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต** 100 มิลลิโมลาร์ และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เกลือโพรพิโอเนต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.3 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 4HB ที่สังเคราะห์โดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อแปรความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต น้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต

จากการศึกษา โดยใช้โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 15 25 50 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ และแปรความเข้มข้นของน้ำตาลทรายเท่ากับ 0-15 กรัมต่อลิตร ผสมกับโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตแต่ละความเข้มข้น ในลักษณะเดียวกันกำหนดความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนต เท่ากับ 25-100 มิลลิโมลาร์ ผสมกับน้ำตาลทรายและโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ความเข้มข้นที่กล่าวมาข้างต้น จากผลการทดลองตามตารางที่ 11.ค เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ต่อความเข้มข้นของน้ำตาล และเกลือโพรพิโอเนตที่คงที่ พบว่าสัดส่วนของ 4HB เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ที่เพิ่มขึ้น ดังตัวอย่าง เปรียบเทียบการแปรความเข้มข้นของ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 15 25 50 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ โดยกำหนดความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของโพรพิโอเนตคงที่เท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์ พบว่าสัดส่วนของ 4HB ได้เท่ากับ 12 17 34 46 และ 78 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งค่าสัดส่วนของ 4HB ที่สังเคราะห์ได้สูงที่สุด คือ 78 โมลเปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 11.ค ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนตที่ค่าอื่น ๆ พบว่า สัดส่วนของ 4HB แปรตามความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเช่นกัน

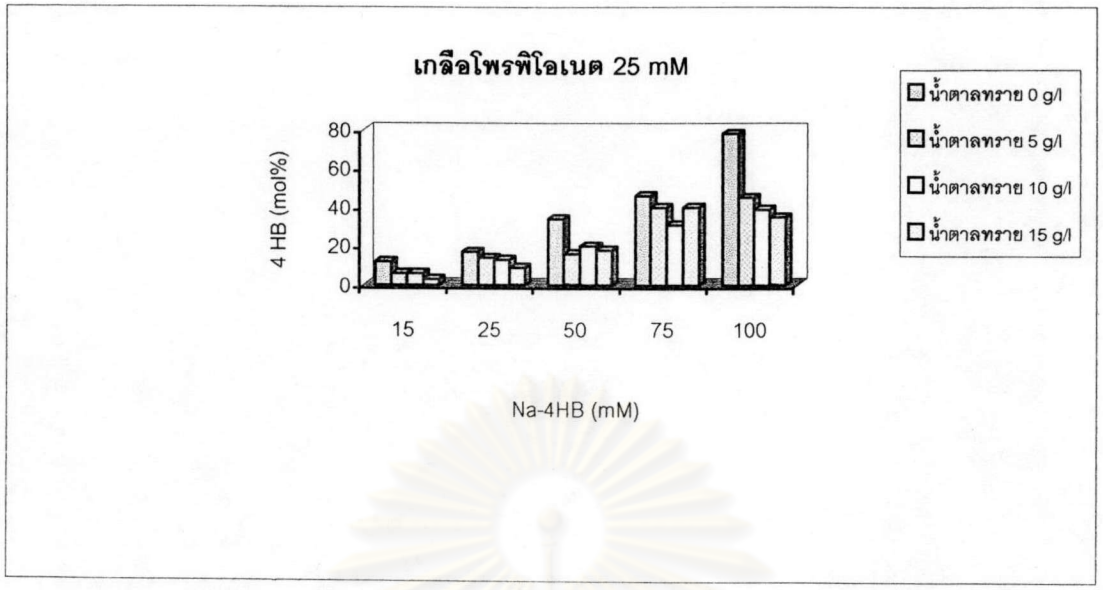
การเปรียบเทียบความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ต่อสัดส่วนของ 4HB คือ เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลทรายต่ำที่สุดคือ 0 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการสะสม 4HB สูงกว่าชุดการทดลองที่มีน้ำตาลทราย ทั้งนี้เนื่องจากในวิถีการสังเคราะห์ 4HB โซเดียม 4- ไฮดรอกซีบิวทิเรต ถูกนำไปเป็นสารตั้งต้นสำหรับ 4HB ได้โดยตรง ซึ่งในชุดการทดลองที่มีน้ำตาลทราย พบว่าการสร้าง 4HB ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่มีแนวโน้มของการสร้าง 4HB ที่ลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลทรายเพิ่มขึ้น (เมื่อกำหนดความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนตที่เท่ากัน)

ส่วนการแปรความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนตที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้สัดส่วนของ 4HB ลดลง ส่วนชุดการทดลองที่มีน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าผลที่ได้มีแนวโน้มเดียวกัน ซึ่งแสดงว่าการที่ความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนตที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการสร้าง4HBเช่นเดียวกัน สรุปว่าการสังเคราะห์ 4HB ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นสำคัญ การมีน้ำตาลทราย และเกลือโพรพิโอเนต ส่งผลร่วมต่อสัดส่วนรวมในเทอร์พอลิเมอร์ สรุปผล การสังเคราะห์ 4HB เมื่อมีการแปรความเข้มข้นของ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 15 - 100 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ น้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต ดังรูปที่ 31 32 33 และ 34

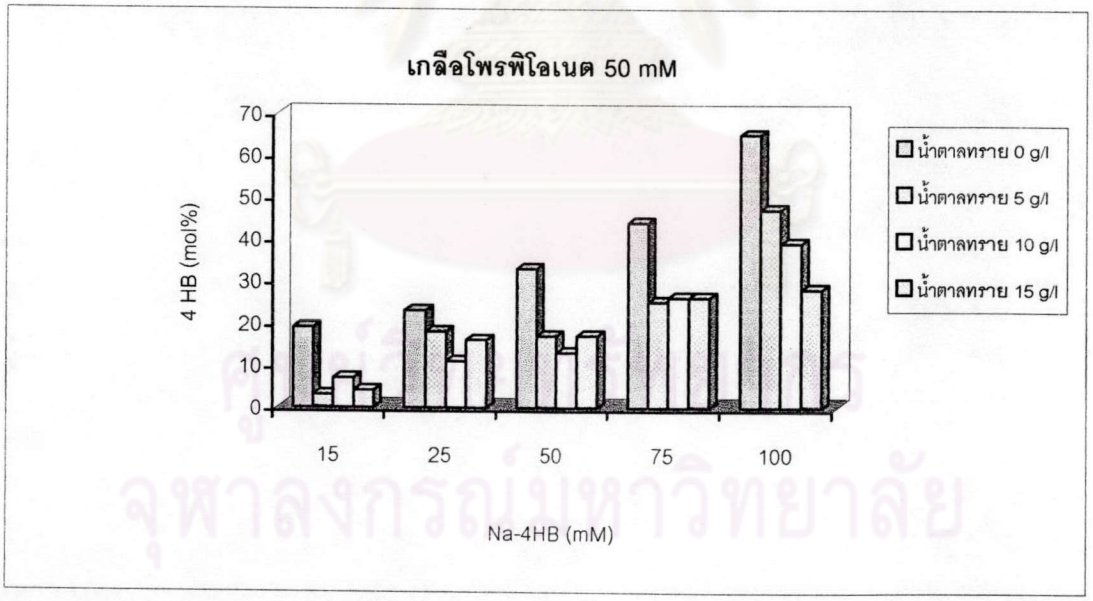
ตารางที่ 11.ค **สัดส่วนโมโนเมอร์ของ 4HB** ที่สังเคราะห์โดย *Bacillus* sp. BA-019 **เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ ความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต** น้ำตาลทราย และเกลือโพรพิโอเนต แตกต่างกัน

		4HB (mol%)															
	เกลือโพรพิโอเนต (mM)	25				50				75				100			
	น้ำตาลทราย (g/l)	0	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15
Na-4HB (mM)	15	12^{a}	6^{a}	6^{a}	3^{a}	19^{a}	3^{a}	7^{a}	4^{a}	22^{a}	6^{a}	8^{a}	8^{a}	13^{a}	$14^{a,b}$	4^{a}	10^{a}
	25	17^{a}	14^{b}	13^{b}	9^{b}	23^{b}	18^{b}	11^{b}	16^{b}	24^{a}	14^{b}	17^{b}	14^{b}	21^{b}	19^{b}	17^{b}	18^{b}
	50	34^{b}	16^{b}	20^{c}	18^{c}	33^{c}	17^{b}	13^{b}	17^{b}	21^{a}	20^{c}	26^{c}	20^{c}	21^{b}	10^{a}	20^{b}	$15^{a,b}$
	75	46^{c}	40^{c}	31^{d}	40^{d}	44^{d}	25^{c}	26^{c}	26^{c}	40^{b}	22^{c}	$29^{c,d}$	33^{d}	36^{c}	31^{c}	31^{c}	28^{c}
	100	78^{d}	45^{c}	39^{e}	35^{d}	65^{e}	47^{d}	39^{d}	28^{c}	46^{b}	33^{d}	31^{d}	33^{d}	36^{c}	31^{c}	34^{c}	35^{d}

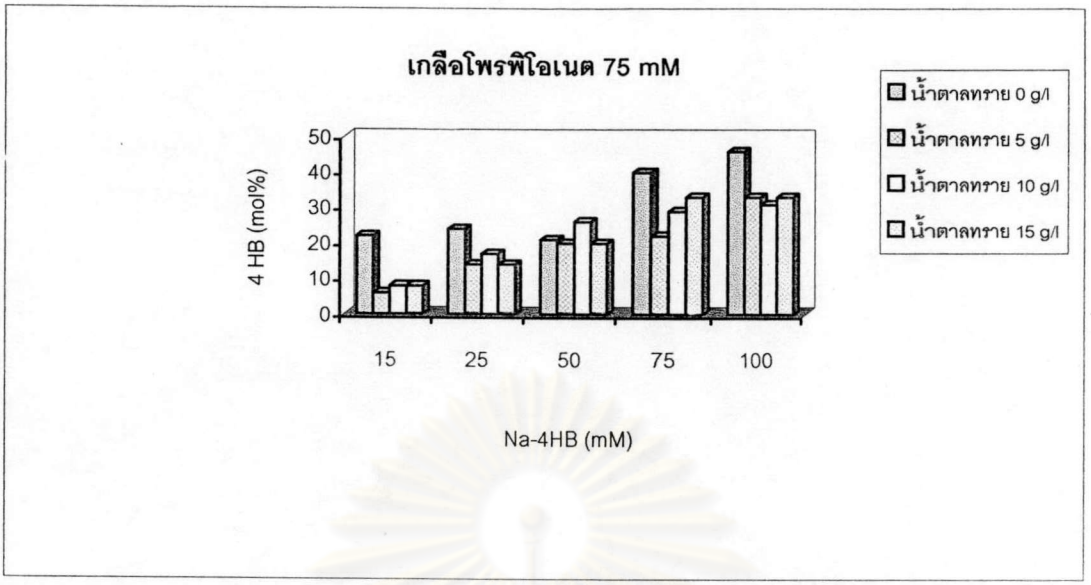
$^{a\ b\ c}$ และ ^{d} คือ ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p \leq 0.05$ (แสดงในภาคผนวก ค) ในแต่ละคอลัมน์



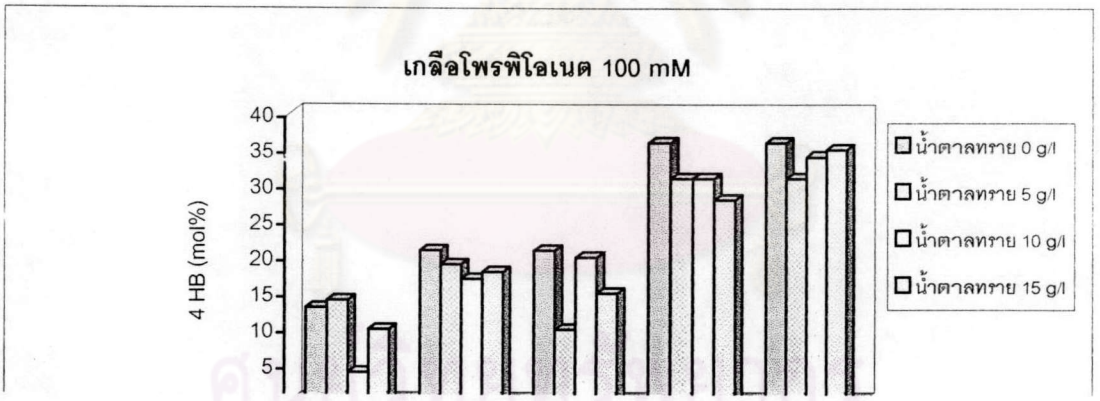
รูปที่ 31 สัดส่วนของ 4HB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้**เกลือโพรพิโอเนต 25 มิลลิโมลาร์** และแปรความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และ น้ำตาลทราย



รูปที่ 32 สัดส่วนของ 4HB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้**เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์** และแปรความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และ น้ำตาลทราย



รูปที่ 34 สัดส่วนของ 4HB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้**เกลือโพรพิโอเนต 75 มิลลิโมลาร์** และแปรความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และ น้ำตาลทราย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.4 การเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และเกลือโพรพิโอเนต ที่แตกต่างกัน

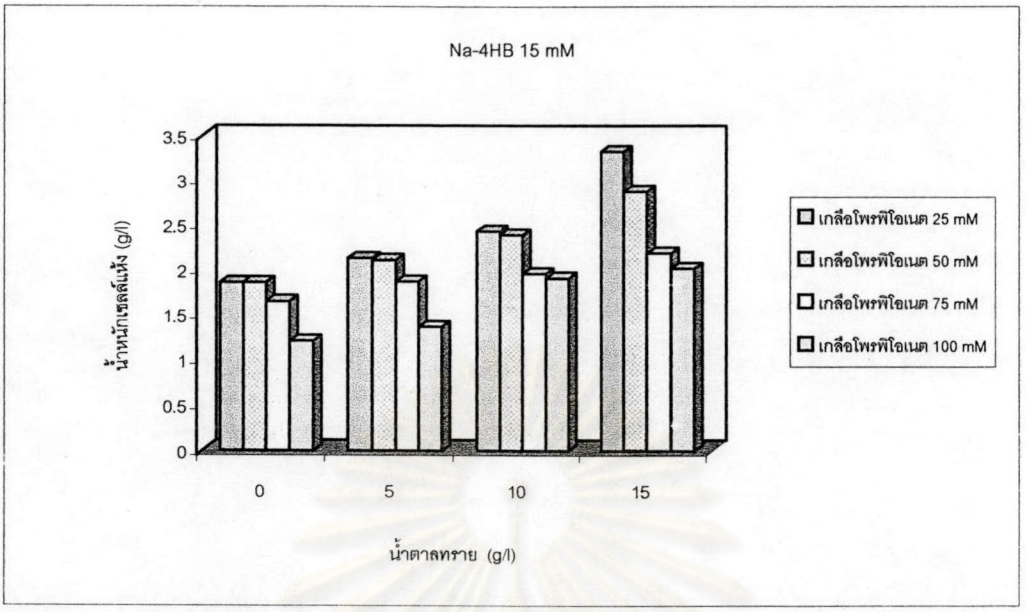
ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12 การแปรความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่ 0 - 15 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลทรายมีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ในเทอร์พอลิเมอร์และความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของน้ำตาลทรายมีผลต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 15 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลทราย ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดในทุกชุดการทดลอง ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้นอีกสองชนิด โดยชุดที่มีเกลือโพรพิโอเนต 25 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียม 4- ไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 15 มิลลิโมลาร์ พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเท่ากับ 3.33 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทรายเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งต่ำกว่าเล็กน้อย คือให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเท่ากับ 2.43 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ได้พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเกลือโพรพิโอเนตเพิ่มขึ้นมีผลทำให้การเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ลดลง ตัวอย่างเช่น โพรพิโอเนตเข้มข้นเท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ น้ำตาลทรายเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร และโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์ พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.32 1.98 1.85 และ 1.78 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงว่าการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 นั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาลทรายซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและแหล่งพลังงานในการเจริญแล้ว การเพิ่มปริมาณของเกลือโพรพิโอเนตซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นสูง(สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ , 2542) ก็มีผลต่อการเจริญด้วย ส่วนความเข้มข้นของโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ไม่มีผลชัดเจนต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 จากการทดลองนี้ สรุปผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อที่มีน้ำตาลทรายเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ 0 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีเกลือโพรพิโอเนตและ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังแสดงรูปที่ 35 36 37 38 และ 39

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

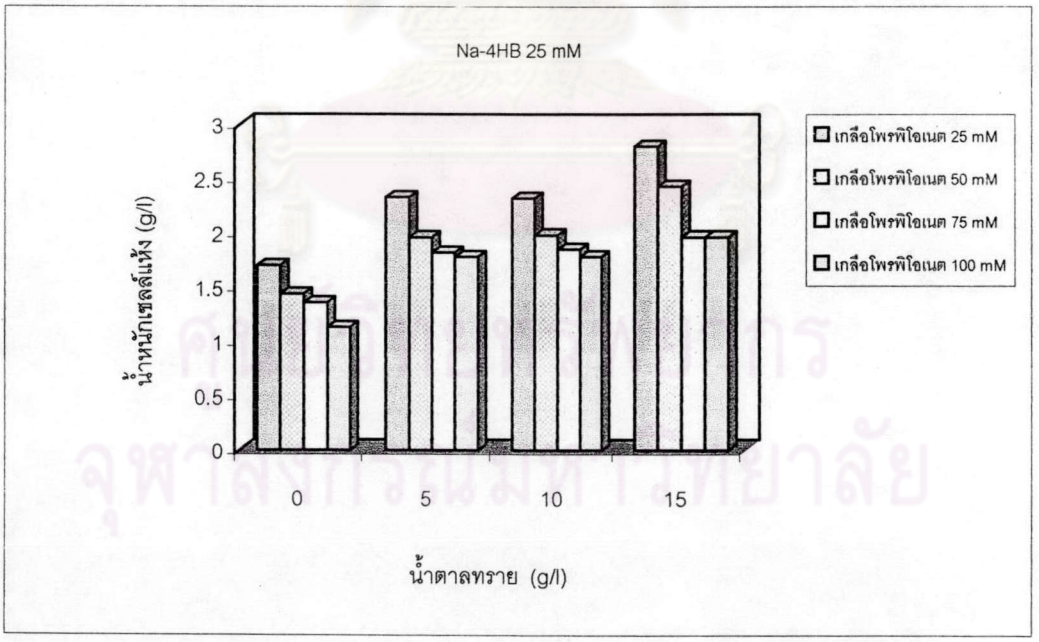
ตารางที่ 12 **การเจริญ** ของ *Bacillus* sp. BA-019 ที่เวลา 36 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เกลือโพรพิโอเนต และโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต แตกต่างกัน

		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)																			
	Na-4HB (mM)	15				25				50				75				100			
	เกลือโพรพิโอเนต (mM)	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100
น้ำตาลทราย (g/l)	0	1.96^{a}	1.86^{a}	1.65^{a}	1.21^{a}	1.70^{a}	1.44^{a}	1.36^{a}	1.13^{a}	1.64^{a}	1.36^{a}	1.31^{a}	1.26^{a}	1.24^{a}	1.29^{a}	1.45^{a}	1.24^{a}	1.62^{a}	1.24^{a}	1.34^{a}	1.28^{a}
	5	2.13^{a,b}	2.11^{a,b}	1.87^{a,b}	1.37^{a}	2.33^{b}	1.96^{b}	1.82^{b}	1.78^{b}	2.06^{b}	1.82^{b}	1.67^{a,b}	1.36^{a}	2.02^{b}	2.04^{b}	1.98^{b}	1.48^{a}	2.07^{b}	2.19^{b}	1.79^{b}	1.33^{a}
	10	2.43^{b}	2.39^{b}	1.96^{a,b}	1.91^{b}	2.32^{b}	1.98^{b}	1.85^{b}	1.78^{b}	2.04^{b}	1.90^{b}	1.89^{b}	1.75^{b}	2.19^{b}	2.17^{b}	2.18^{b,c}	2.01^{b}	2.18^{b}	2.02^{b}	1.87^{b,c}	1.96^{b}
	15	3.33^{c}	2.88^{c}	2.19^{b}	2.02^{b}	2.80^{c}	2.43^{c}	2.25^{c}	1.96^{c}	2.28^{b}	2.26^{b}	1.75^{a,b}	1.68^{b}	2.15^{b}	2.11^{b}	2.44^{c}	1.82^{b}	2.24^{b}	2.15^{b}	2.34^{c}	1.80^{b}

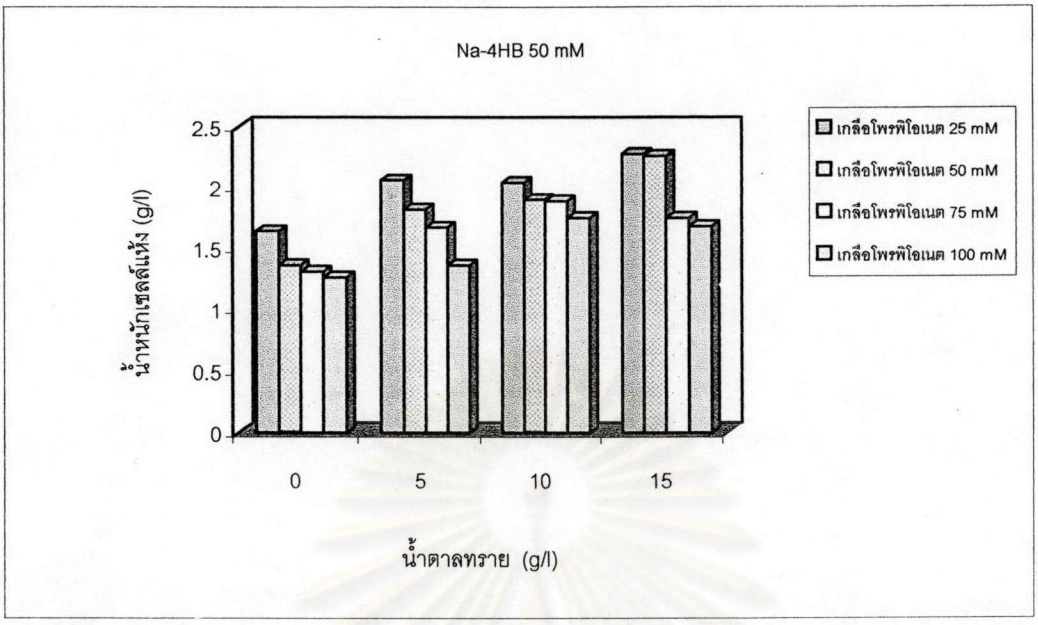
$^{a\ b\ c}$ และ ^{d} คือ ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p \leq 0.05$ (แสดงในภาคผนวก ค) ในแต่ละคอลัมน์



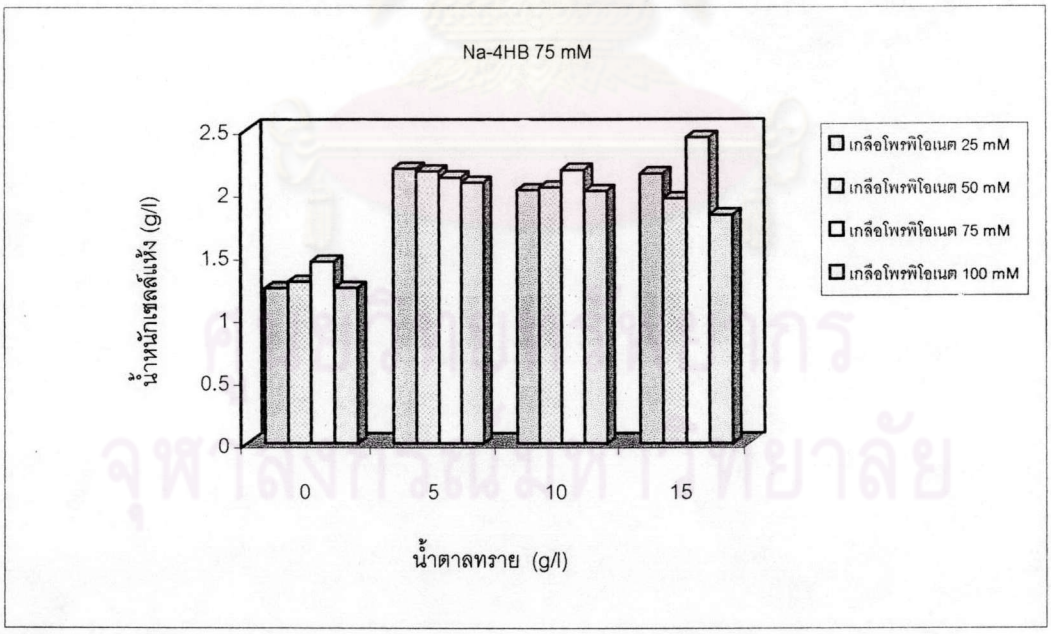
รูปที่ 35 การเจริญของ *Bacillus* sp.BA-019 ที่เวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เกลือโพรพิโอเนต และ**โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 15 มิลลิโมลาร์**



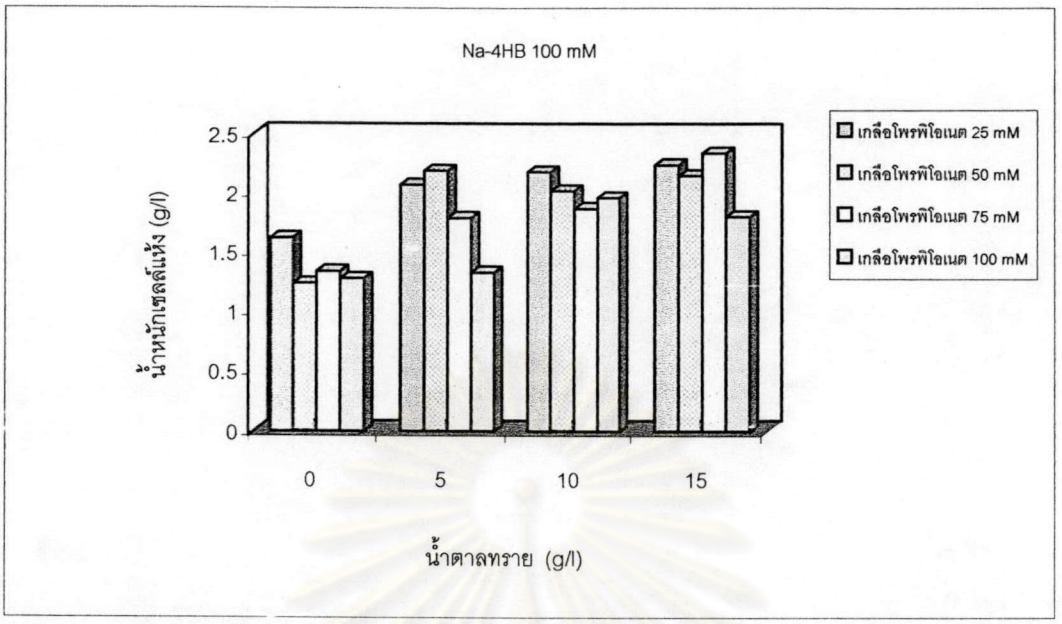
รูปที่ 36 การเจริญของ *Bacillus* sp.BA-019 ที่เวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เกลือโพรพิโอเนต และ**โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์**



รูปที่ 37 การเจริญของ *Bacillus* sp.BA-019 ที่เวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เกลือโพรพิโอเนต และ**โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 50 มิลลิโมลาร์**



รูปที่ 38 การเจริญของ *Bacillus* sp.BA-019 ที่เวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เกลือโพรพิโอเนต และ**โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 75 มิลลิโมลาร์**



รูปที่ 39 การเจริญของ *Bacillus* sp.BA-019 ที่เวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เกลือโพรพิโอเนต และ**โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 100 มิลลิโมลาร์**

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.5 ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เกลือโพรพิโอเนต และ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ที่แตกต่างกัน

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 13 พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่แตกต่างกันมีผลทำให้ความสามารถในการผลิตเทอร์พอลิเมอร์แตกต่างกัน โดยเมื่อน้ำตาลทรายเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 75 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการผลิตเทอร์พอลิเมอร์สูงสุดเท่ากับ 41.02 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าในชุดการทดลองที่น้ำตาลทรายเข้มข้นเท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร มีการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ในปริมาณที่น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทรายเท่ากับ 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร อย่างชัดเจน *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิตเทอร์พอลิเมอร์ได้สูงสุดเพียง 11.76 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชุดการทดลองที่มีน้ำตาลทรายเท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 25 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์ สรุปผลการศึกษาแสดงว่าน้ำตาลทรายมีผลต่อการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) โดยเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019

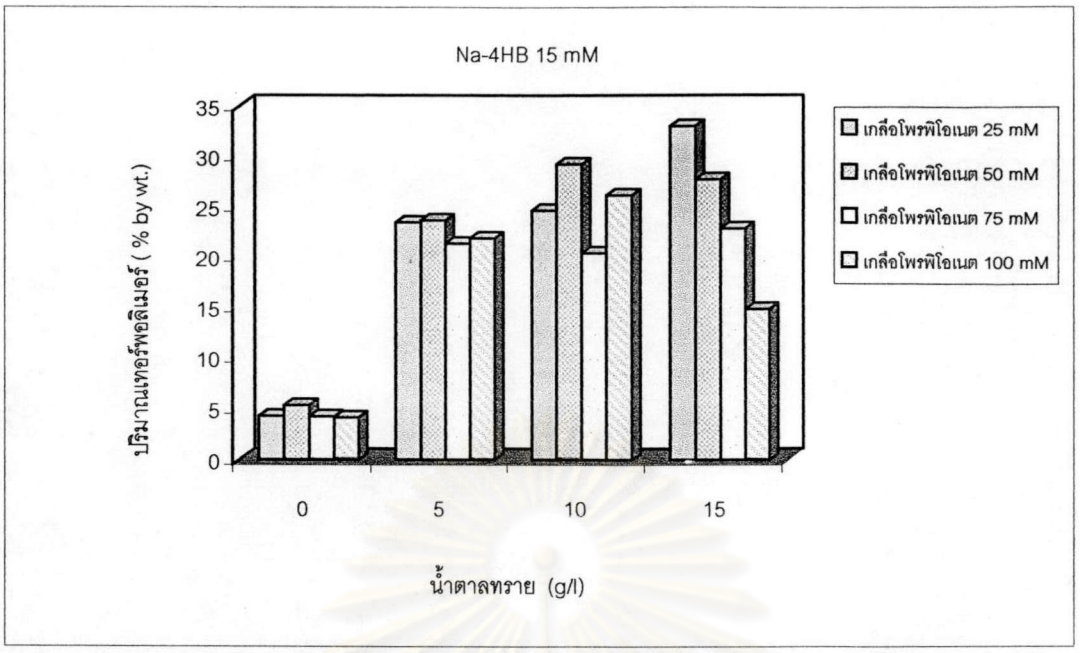
การเพิ่มความเข้มข้นของ เกลือโพรพิโอเนต และ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตมีผลต่อ การผลิตเทอร์พอลิเมอร์น้อยกว่าผลจากความเข้มข้นของน้ำตาลทราย โดยความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเพิ่มหรือลดลงของปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ แสดงผลสรุปการเปรียบเทียบการผลิตเทอร์พอลิเมอร์เมื่อแปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เกลือโพรพิโอเนตและโซเดียม 4- ไฮดรอกซีบิวทิเรต ในรูปที่ 40 41 42 43 และ 44

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

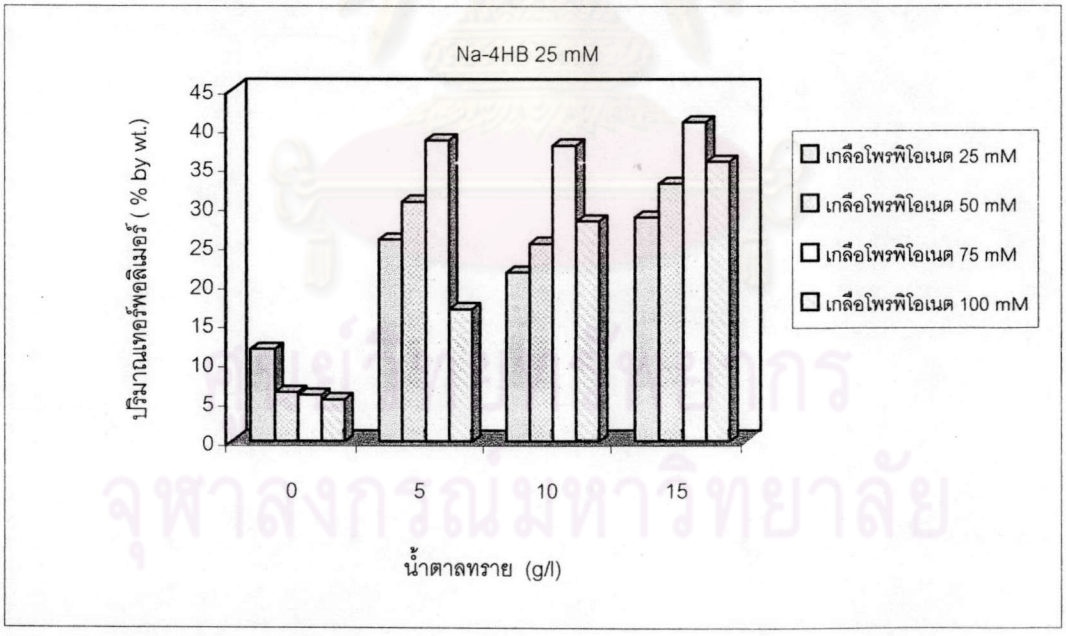
ตารางที่ 13 ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์P(3HB-co-3HV-co-4HB) ที่เวลา 36 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลทราย เกลือโพรพิโอเนต และ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต แตกต่างกัน

		ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)																			
	Na-4HB (mM)	15				25				50				75				100			
	เกลือโพรพิโอเนต (mM)	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	0	4.30^{a}	5.37^{a}	4.24^{a}	4.13^{a}	11.76^{a}	6.25^{a}	5.88^{a}	5.3^{a}	4.87^{a}	7.35^{a}	6.10^{a}	6.34^{a}	7.25^{a}	8.52^{a}	6.20^{a}	6.45^{a}	4.93^{a}	5.92^{a}	7.46^{a}	3.12^{a}
	5	23.47^{b}	23.69^{b}	21.39^{b}	21.89^{b}	22.15^{b}	25.42^{b}	38.46^{b}	16.85^{b}	24.27^{b}	21.97^{b}	29.94^{b}	29.41^{b}	27.39^{b}	23.04^{b}	18.86^{b}	24.03^{b}	31.24^{b}	31.74^{b}	27.41^{b}	30.07^{b}
	10	24.69^{b}	29.28^{b}	20.40^{b}	26.17^{b}	26.25^{b}	31.21^{b,c}	37.83^{b}	28.08^{c}	24.50^{b}	26.31^{b}	29.31^{b}	27.09^{b}	34.65^{b}	34.10^{c}	36.69^{c}	34.82^{c}	32.11^{b}	37.73^{b}	34.25^{c}	40.81^{c}
	15	33.03^{c}	27.77^{b}	22.83^{b}	35.00^{c}	39.20^{c}	32.92^{c}	40.81^{b}	35.71^{d}	35.08^{c}	26.54^{b}	34.28^{b}	29.76^{b}	32.55^{b}	41.02^{d}	36.88^{c}	38.46^{c}	34.06^{b}	35.16^{b}	34.18^{c}	38.11^{c}

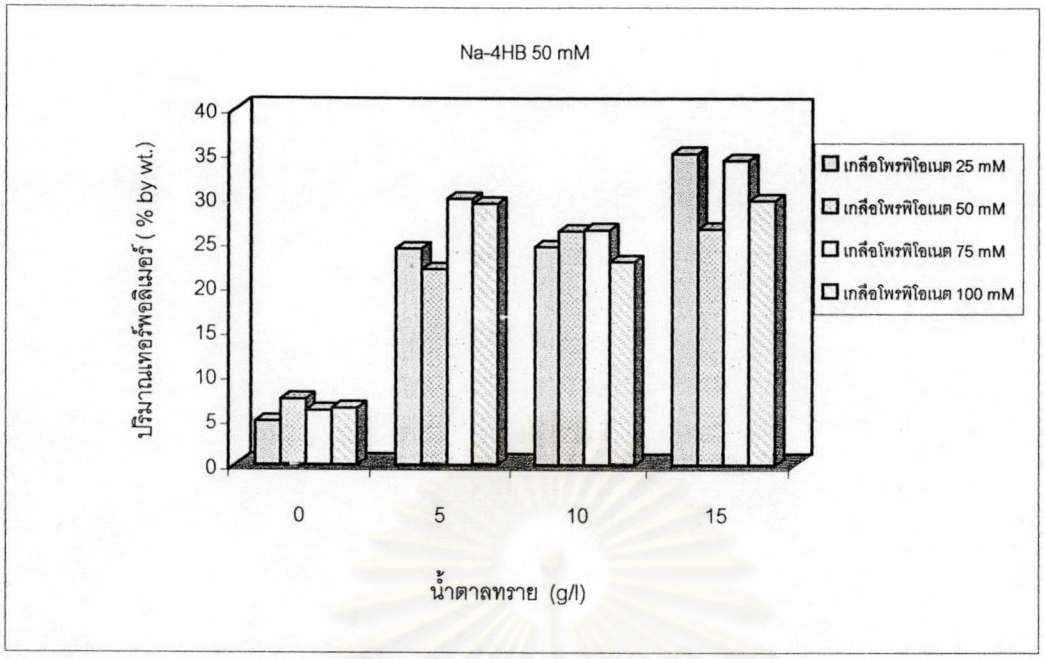
$^{a\ b\ c}$ และ ^{d} คือ ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p \leq 0.05$ (แสดงในภาคผนวก ค) ในแต่ละคอลัมน์



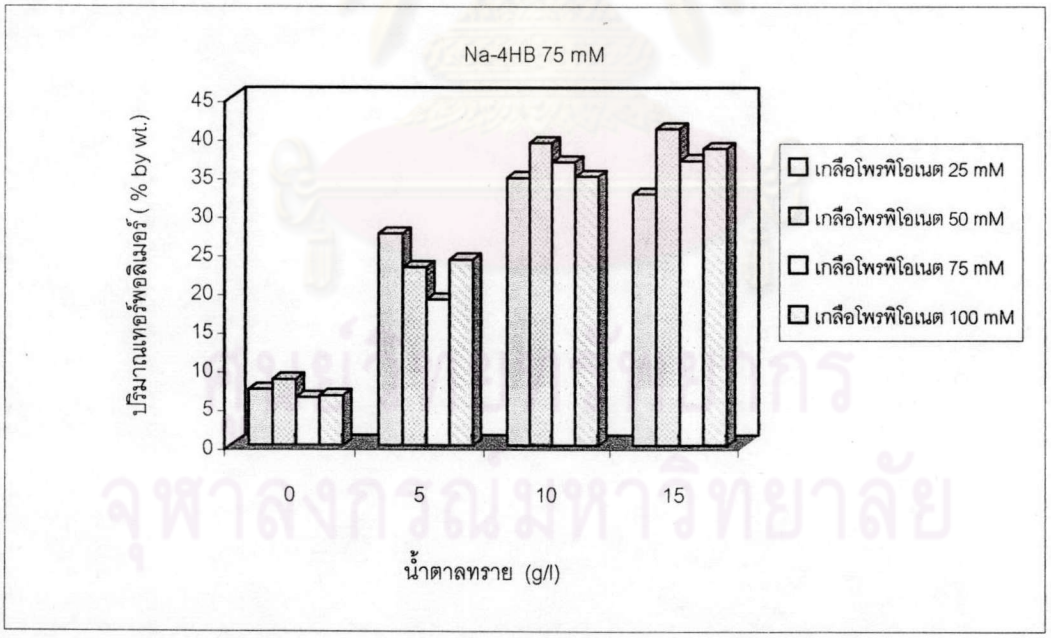
รูปที่ 40 ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อให้ **โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 15 มิลลิโมลาร์** และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต



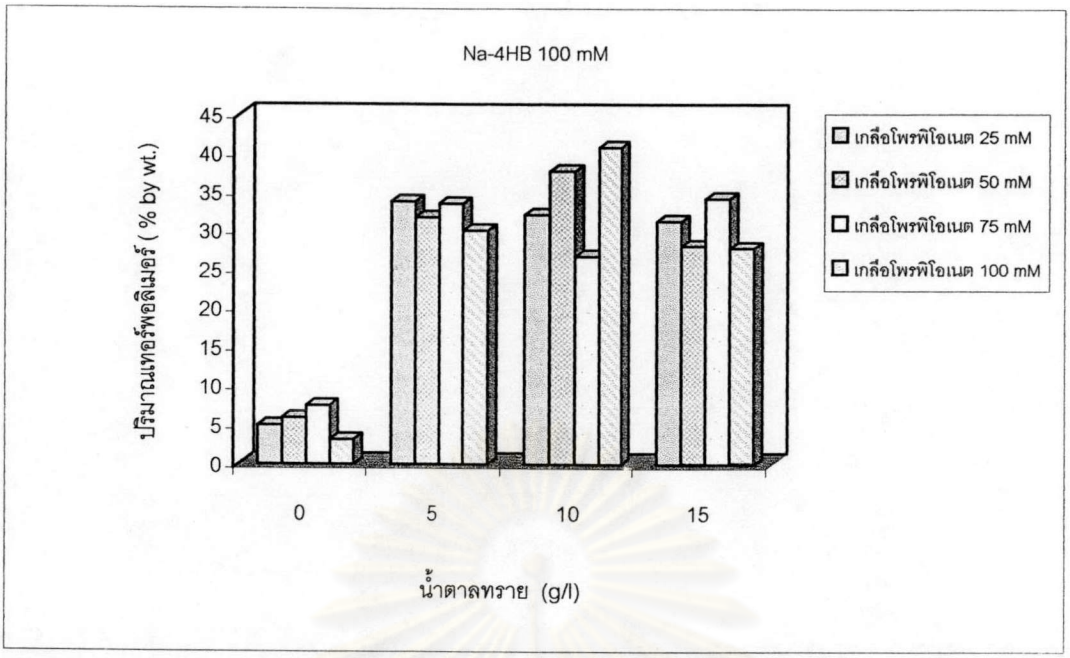
รูปที่ 41 ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019เมื่อให้**โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 25 มิลลิโมลาร์** และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต



รูปที่ 42 ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019เมื่อให้ **โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 50 มิลลิโมลาร์** และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต



รูปที่ 43 ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 **เมื่อให้โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 75 มิลลิโมลาร์** และ แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต



รูปที่ 44 ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 **เมื่อให้โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 100 มิลลิโมลาร์** และ แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลทราย และ เกลือโพรพิโอเนต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ศึกษาการผลิตเทอร์พอลิเมอร์จาก *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แกมมา-บิวทิโรแลกโตนเป็นสารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ 4HB เพื่อลดต้นทุนการผลิต ด้วยการเลี้ยงเชื้อแบบสองขั้นตอน

เนื่องจาก แกมมา-บิวทิโรแลกโตน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ 4HB นั้น มีราคาถูกกว่าโซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ถึง 20 เท่า (sigma ประเทศไทย จำกัด) แต่จากผลการทดลองที่ 4.1.3 พบว่าการใช้แกมมา-บิวทิโรแลกโตนเป็นสารตั้งต้นสำหรับ 4HB ปริมาณพอลิเมอร์ที่ผลิตได้น้อยมาก ซึ่งอาจมีสาเหตุจาก สารนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ดังที่ Kunioka และคณะ รายงานไว้ ในการศึกษาการผลิต โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-4HB) ในปี ค.ศ. 1989 การเลี้ยงเชื้อสองขั้นตอนหมายถึงขั้นตอนแรกเป็นการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ จากนั้นในขั้นตอนที่ 2 เป็นการนำเซลล์ปริมาณมากที่ได้จากขั้นตอนที่หนึ่งมาเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต ผู้วิจัยจึงได้แนวคิดในการเลี้ยงเชื้อแบบ 2 ขั้นตอน เพื่อแก้ปัญหาการเป็นพิษของสารแกมมา-บิวทิโรแลกโตน โดยได้ทำการเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ ที่มีผู้วิจัยมาก่อนโดยเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 (ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกันกับที่ใช้ในงานวิจัยนี้) ได้แก่ 1.70 และ 3.40 กรัมต่อลิตร (พิสิษฐ คงกำเนิด , 2540) สูตรอาหารเพื่อการผลิตประกอบด้วยสารตั้งต้นสำหรับโมโนเมอร์ 3HB คือ น้ำตาลทราย และสารตั้งต้นของ 3HV คือ เกลือโพรพิโอเนต ใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นสองชนิดเท่ากับในผลการทดลองที่ 4.1.3 เพื่อศึกษาการเจริญและความสามารถในการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ จากเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่าการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ด้วยการเลี้ยงเชื้อแบบสองขั้นตอนโดยปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.70 กรัมต่อลิตร ได้สัดส่วนของ 4HB ในการทดลองนี้ใกล้เคียงกับผลจากการทอลองที่ 4.1.3 คือค่าสูงสุดเท่ากับ 4 โมลเปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสามารถใช้ แกมมา-บิวทิโรแลกโตนเป็นสารตั้งต้นของโมโนเมอร์ 4HB ได้ ทั้งนี้การที่สัดส่วนของ 4HB ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าต่ำ และยังลดลงตามเวลาการเลี้ยงเชื้ออีกด้วย อาจเนื่องจากปริมาณเซลล์เริ่มต้นยังไม่มากเพียงพอ เมื่อเพิ่มเซลล์เริ่มต้นให้มากขึ้นเป็นสองเท่าคือ 3.40 กรัมต่อลิตร ผลการทดลอง ดังตารางที่ 15 พบว่าเชื้อมีการเจริญได้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น ได้ค่าสูงสุดเท่ากับ 4.29 กรัมต่อลิตร สัดส่วนของโมโนเมอร์ และ ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์เพิ่มขึ้น ได้สูงสุดเท่ากับ 12 โมลเปอร์เซ็นต์ และ 31.94 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์ ตามลำดับ สรุปการเปรียบเทียบการเจริญ การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ และสัดส่วนโมโนเมอร์ 4HB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.70 และ 3.40 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 44 และ 45

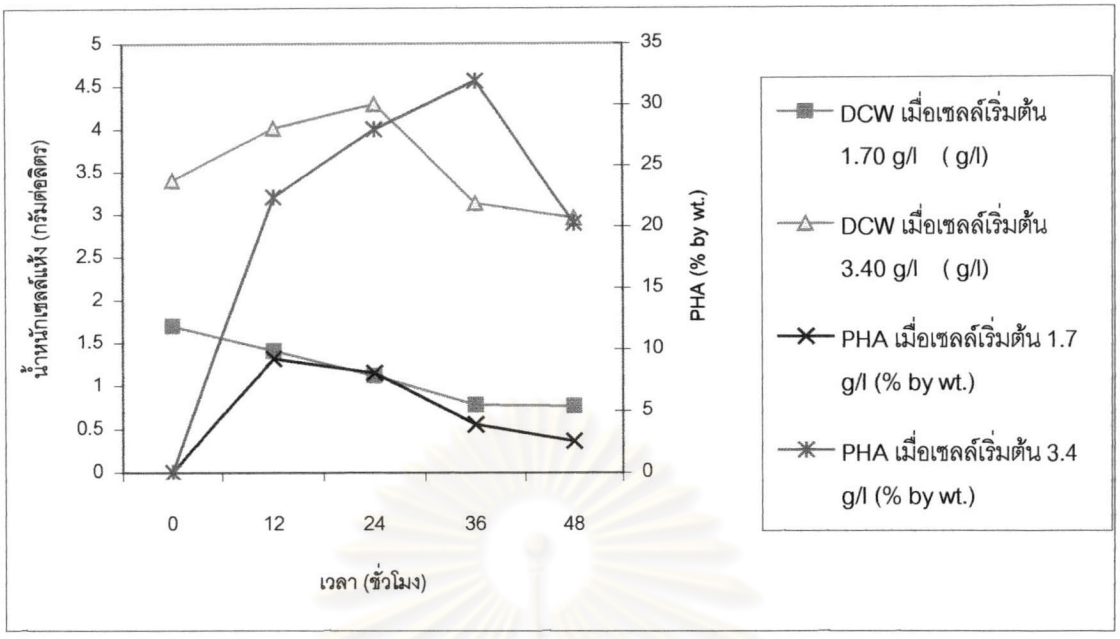
ตารางที่ 14 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.70 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	เทอร์พอลิเมอร์ (% ต่อน้ำหนักแห้ง)	โมโนเมอร์ (โมล %)		
			3HB	3HV	4HB
0	**1.70**	-	-	-	-
12	1.41	**9.21**	94	3	**4**
24	1.12	8.03	94	3	3
36	0.78	3.89	92	4	3
48	0.77	2.56	95	4	1

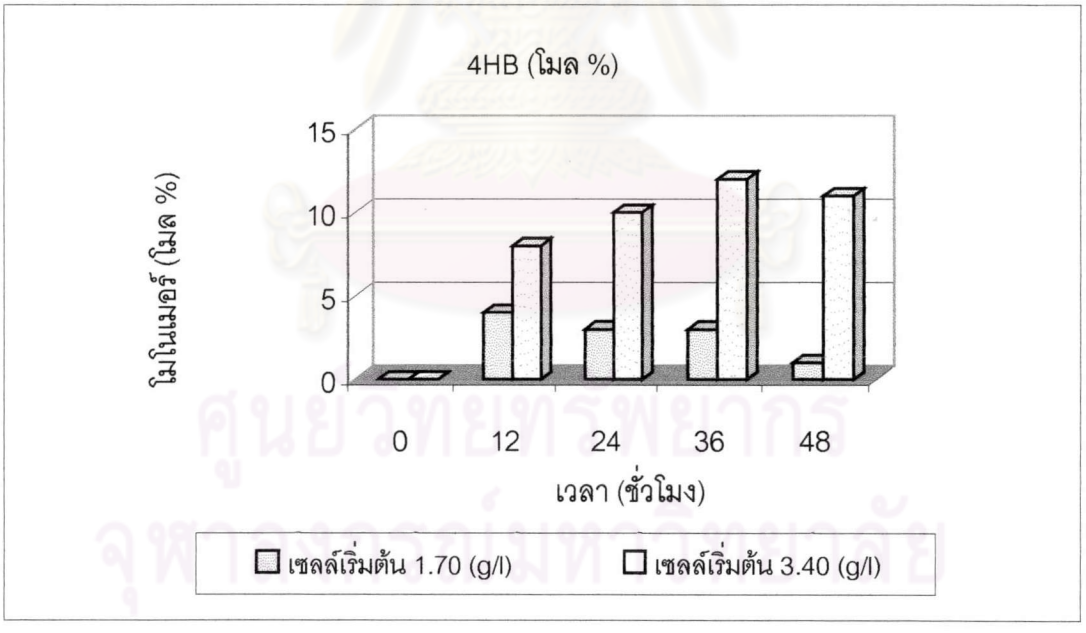
ตารางที่ 15 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์ และการเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 3.40 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	เทอร์พอลิเมอร์ (% ต่อน้ำหนักแห้ง)	โมโนเมอร์ (โมล %)		
			3HB	3HV	4HB
0	3.40	-	-	-	-
12	4.01	22.44	90	2	8
24	**4.29**	27.97	86	4	10
36	3.13	**31.94**	81	7	**12**
48	2.96	20.27	81	8	11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 45 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 และการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ เมื่อใช้**ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.70 และ 3.40 กรัมต่อลิตร**



รูปที่ 46 เปรียบเทียบสัดส่วนของโมโนเมอร์ 4HB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้**ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.70 และ 3.40 กรัมต่อลิตร**

โดยวิธีการเลี้ยงเชื้อแบบสองขั้นตอน ซึ่งมีแกมมา-บิวทิโรแลกโตนเป็นสารตั้งต้นของ 4HB ทำให้ได้สัดส่วนของ 4HB สูงขึ้น ใกล้เคียงกับเมื่อใช้ โซเดียม 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ซึ่งมีราคาสูงกว่าแกมมา-บิวทิโรแลกโตนมาก แต่ในการประยุกต์ใช้งานอาจจะต้องการสัดส่วนของ 4HB สูงกว่านี้ (แต่ไม่เกิน 20 โมลเปอร์เซ็นต์) ดังนั้นจึงเพิ่มความเข้มข้นของแกมมา-บิวทิโรแลกโตนจาก 25 เป็น 50 มิลลิโมลาร์ สูตรอาหารในการทดลองชุดนี้ คือ

ก. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ แกมมา-บิวทิโรแลกโตน 25 มิลลิโมลาร์

ข. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ แกมมา-บิวทิโรแลกโตน 50 มิลลิโมลาร์

เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์ ผลการทดลองในตารางที่ 16 และ 17 เปรียบเทียบการแปรความเข้มข้นของ แกมมา-บิวทิโรแลกโตน เท่ากับ 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ (เกลือโพรพิโอเนตเป็นสารตั้งต้นของ 3HV เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์) พบว่าสัดส่วนของ 4HB เมื่อมีความเข้มข้นของแกมมา-บิวทิโรแลกโตนเพิ่มขึ้นจาก 25 เป็น 50 มิลลิโมลาร์ ทำให้ได้สัดส่วนของ 4HB สูงขึ้นจาก 15 และ 32 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อใช้แกมมา-บิวทิโรแลกโตน 25 มิลลิโมลาร์ พบว่าการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 และปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ สูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้แกมมา-บิวทิโรแลกโตน 50 มิลลิโมลาร์ คือ 3.97 กรัมต่อลิตร และ 33.74 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนสัดส่วนของ 3HV มีค่าใกล้เคียงกัน ผลแสดงการเปรียบเทียบการเจริญ การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ 4HB ดังรูปที่ 47 และ 48 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนโมโนเมอร์ และการเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 ใน**สูตรอาหาร ก.**

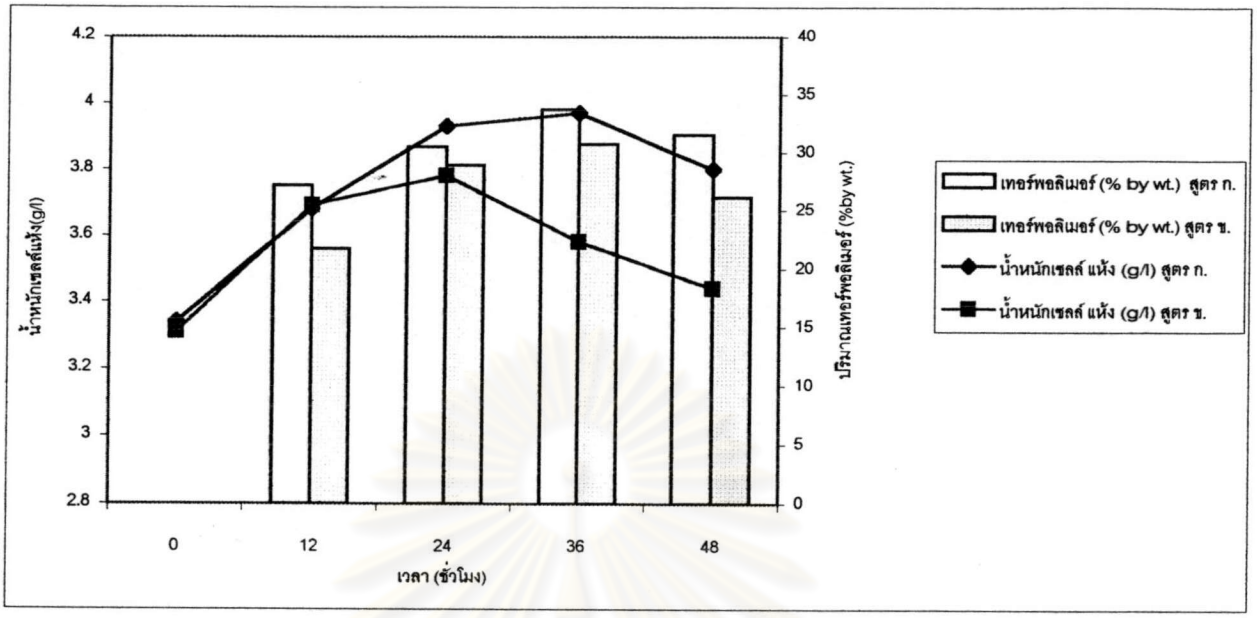
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	เทอร์พอลิเมอร์ (% ต่อน้ำหนักแห้ง)	โมโนเมอร์ (โมล %)		
			3HB	3HV	4HB
0	3.34	-	-	-	-
12	3.68	27.17	83	5	12
24	3.93	30.53	81	8	11
36	**3.97**	**33.74**	77	9	14
48	3.8	31.57	75	**10**	**15**

สูตรอาหาร ก. : น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ แกมมา-บิวทิโรแลกโตน 25 มิลลิโมลาร์

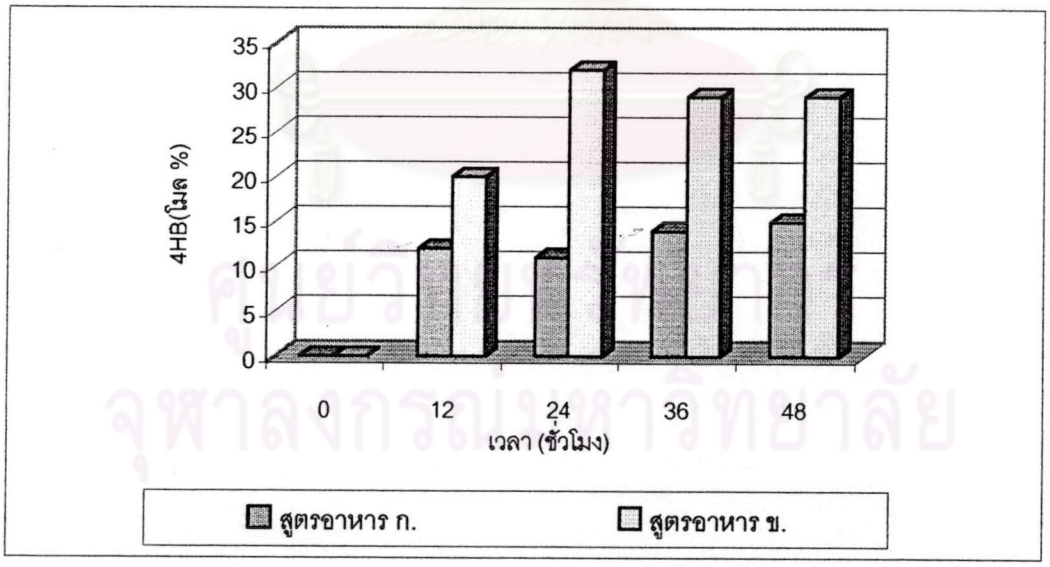
ตารางที่ 17 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนโมโนเมอร์ และการเจริญของ *Bacillus* sp. BA-019 ใน**สูตรอาหาร ข.**

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	เทอร์พอลิเมอร์ (% ต่อน้ำหนักแห้ง)	โมโนเมอร์ (โมล %)		
			3HB	3HV	4HB
0	3.31	-	-	-	-
12	3.69	21.68	75	5	20
24	**3.78**	28.91	60	8	**32**
36	3.58	**30.72**	57	**14**	29
48	3.44	26.16	58	13	29

สูตรอาหาร ข. : น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร เกลือโพรพิโอเนต 50 มิลลิโมลาร์ แกมมา-บิวทิโรแลกโตน 50 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 47 เปรียบเทียบการเจริญ และการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเลี้ยงใน **อาหารสูตร ก. และ ข.**



รูปที่ 48 เปรียบเทียบสัดส่วนของ4HB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเลี้ยงใน **อาหารสูตร ก. และ ข.**

4.4 การศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพและเชิงกลของเทอร์พอลิเมอร์บางชนิดที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งมีโมโนเมอร์แต่ละชนิดเป็นองค์ประกอบในสัดส่วนต่าง ๆ กัน

การนำเทอร์พอลิเมอร์ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ตรงตามวัตถุประสงค์นั้น ขึ้นอยู่กับลักษณะสมบัติทางกายภาพและเชิงกลของเทอร์พอลิเมอร์ เพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกผลิตเทอร์พอลิเมอร์ให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ ลักษณะสมบัติของพอลิเมอร์แต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ การแปรสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ตามที่ได้รายงานในผลการทดลองข้อ 4.2 แสดงให้เห็นว่า การเลือกสารตั้งต้นสำหรับนำมาใช้ในการผลิตเทอร์พอลิเมอร์นั้นสามารถทำให้ผลิตเทอร์พอลิ-เมอร์ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์แต่ละชนิดเป็นองค์ประกอบได้แตกต่างกัน Doi (1990) พบว่า โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) ที่มีสัดส่วนของ 3HV ที่เหมาะสมคือ ไม่มากกว่า 37 โมลเปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก เมื่อโคพอลิเมอร์ที่สัดส่วนของ 3HV สูงกว่า 40 โมลเปอร์เซ็นต์ ทำให้จุดหลอมเหลวลดลงและต่ำที่สุดที่ 75 องศาเซลเซียส ซึ่งมีผลให้พอลิเมอร์ที่ได้ไม่ทนความร้อนและเสียรูปได้ง่ายจึงมีความจำกัดในการนำมาประยุกต์ใช้ จากรายงานการผลิต P(3HB-co-3HV) หรือ PHBV ที่ใช้ในทางการค้าเช่น Biopol (บริษัท monsato) มีสัดส่วนของ 3HV ไม่เกิน 24 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งจัดเป็นช่วงสัดส่วนที่เหมาะสม ในการใช้งานเป็นส่วนใหญ่ ส่วนสัดส่วนของ 4HB จากรายงานของ Doi และคณะ ในปี 1990 พบว่าเมื่อสัดส่วนของ 4HB ในโคพอลิเมอร์มากขึ้น อัตราการย่อยสลายของพอลิเมอร์นั้นมากขึ้น โดย P(3HB-co-27%4HB) มีอัตราการย่อยสลายมากกว่า P(3HB-co-17%4HB) P(3HB-co-10%4HB) P(3HB-co-45%3HV) แต่ถ้าเทอร์พอลิเมอร์มีสัดส่วนของ 4HB สูงมากเกินไปจะทำให้อายุการใช้งานของพอลิเมอร์สั้นลง นอกจากนี้ จากรายงานของ Nakamura (1992) พบว่าเมื่อสัดส่วนของ 4HB ในองค์ประกอบของโคพอลิเมอร์ มากกว่า 20 โมลเปอร์เซ็นต์ มีผลให้อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน และอุณหภูมิหลอมเหลวลดลงอย่างรวดเร็ว และต่ำที่สุดเท่ากับ –46 และ 51 องศาเซลเซียส (เมื่อสัดส่วนของ 4HB สูงสำหรับ 3HB โมโนเมอร์นั้นจะช่วยเสริมความแข็งแรง และทำให้มีจุดหลอมเหลวสูงขึ้น ดังนั้นการวิจัยนี้จึงศึกษาชนิดและปริมาณของสารตั้งต้นที่มีผลให้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV และ 4HB ไม่สูงมากนัก โดยองค์ประกอบหลักจะเป็น 3HB ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น จากผลการทดลองในข้อ 4.3 พบว่า ชนิดและปริมาณของสารตั้งต้นทั้ง 3 ชนิดมีผลต่อเทอร์พอลิเมอร์ทั้งในด้านสัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณเทอร์พอลิเมอร์

4.4.1 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) บางชนิดที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์แตกต่างกัน จาก *Bacillus* sp. BA-019

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงอาหารเหลวสำหรับการผลิตพอลิเมอร์ (Mineral Salt Medium) ที่ปรับปรุงโดย สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา ดังนี้

สูตรที่ 1 น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร โพรพิโอนิก 25 มิลลิโมลาร์ Na-4HB 25 มิลลิโมลาร์

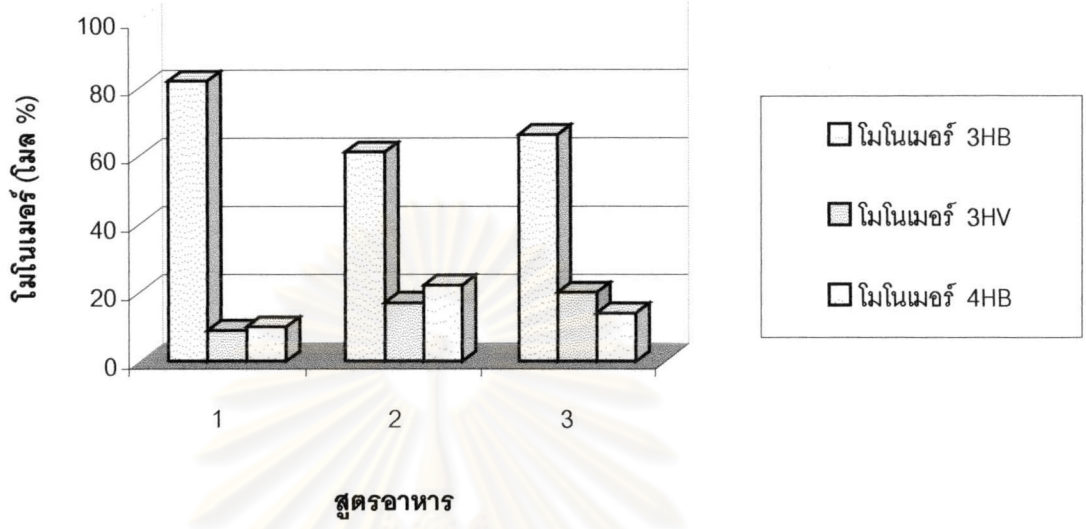
สูตรที่ 2 น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร โพรพิโอนิก 50 มิลลิโมลาร์ Na-4HB 75 มิลลิโมลาร์

สูตรที่ 3 น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร โพรพิโอนิก 75 มิลลิโมลาร์ Na-4HB 50 มิลลิโมลาร์

ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 18 และ รูปที่ 49

ตารางที่ 18 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ และการเจริญ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตทั้งสามสูตร

อาหาร สูตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	เทอร์พอลิเมอร์ (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	โมโนเมอร์ (โมล %)		
			3HB	3HV	4HB
1	2.46	33	81	9	10
2	2.27	35	61	17	22
3	2.08	29	66	20	14



รูปที่ 49 สัดส่วนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019

จากผลการศึกษาการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ในอาหารทั้งสามสูตร ดังแสดงในตารางที่ 18 และรูปที่ 49 พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิตเทอร์พอลิเมอร์ซึ่งมีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HB สูงกว่า โมโน-เมอร์อีก 2 ชนิด โดยค่าสัดส่วน 3HB ที่ได้เท่ากับ 81 61 และ 66 โมลเปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตรที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ ซึ่งมีสัดส่วนของ 3HB ในพอลิเมอร์สูงกว่า โมโนเมอร์ชนิดอื่น เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์ 3HB ได้โดยตรง และง่ายกว่า เมื่อใช้สารตั้งต้นประเภทน้ำตาล สำหรับสัดส่วนของ 3HV ในเทอร์พอลิเมอร์ที่ผลิตได้ พบว่า สัดส่วนของ 3HV เพิ่มขึ้น ตามลำดับ เท่ากับ 9 17 และ 20 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้อาหารสูตรที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วนองค์ประกอบของ 4HB ในเทอร์พอลิเมอร์ พบว่าได้สัดส่วนที่มีค่าแตกต่างกันตามต้องการ เช่นเดียวกับ 3HB และ 3HV กล่าวคือ ได้สัดส่วน 4HB เท่ากับ 10 22 และ 14 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้สรุปได้ว่าเทอร์พอลิเมอร์ที่ผลิตในการทดลองนี้มีองค์ประกอบของโมโนเมอร์แต่ละชนิดในสัดส่วนที่แตกต่างกันและอยู่ในช่วงที่เหมาะสมตามต้องการ

4.4.2 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและเชิงกลของเทอร์พอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019

อุณหภูมิหลอมเหลว และอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน ของเทอร์พอลิเมอร์

อุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) และอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (Tg) ของพอลิเมอร์มีความสำคัญอย่างมากในการนำพอลิเมอร์ไปใช้ประโยชน์รวมทั้งวิธีการขึ้นรูป พอลิเมอร์จะมีค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน ต่ำกว่าค่าอุณหภูมิหลอมเหลวเสมอ เมื่อพอลิเมอร์อยู่ในอุณหภูมิกว่าค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน พอลิเมอร์มีสมบัติแข็งและเปราะคล้ายแก้ว แต่เมื่อได้รับความร้อนที่ค่าอุณหภูมิหลอมเหลวสูงกว่าค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน พอลิเมอร์มีลักษณะเปลี่ยนไป คือ ยืดหยุ่นคล้ายยาง จนกระทั่ง ได้รับความร้อนสูงกว่า ค่าอุณหภูมิหลอมเหลวจึงเปลี่ยนสถานะเป็นของเหลว ดังนั้นเทอร์พอลิเมอร์ที่มีค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชันต่ำกว่าอุณหภูมิห้องจึงมีลักษณะอ่อนนิ่ม และยืดหยุ่นคล้ายยาง โดยพอลิเมอร์มีสมบัติเป็นยางเมื่อมีค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชันในช่วง –50 ถึง –75 องศาเซลเซียส (เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตร์) จากรายงานของ Kunioka และ Doi ในปี 1989 และ รายงานของ Doi ในปี 1990 ที่พบว่าทั้งโมโนเมอร์ 4HB และ 3HV มีผลต่อการลดลงของอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน และอุณหภูมิหลอมเหลว โดยเมื่อโมโนเมอร์ 4HB และ 3HV เพิ่มขึ้นอุณหภูมิกลาสทรานซิชันและอุณหภูมิหลอมเหลวลดลง ทำให้เมื่อมีสัดส่วนโมโนเมอร์ 4HB และ 3HV เพิ่มขึ้น P(3HB-co-4HB) และ P(3HB-co-3HV) จึงมีสมบัติยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น เมื่อนำแผ่นฟิล์มเทอร์พอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. BA-019 ทั้ง 3 ชนิด ไปวิเคราะห์หาค่าอุณหภูมิหลอมเหลว และค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชันตามวิธีการทดลองในข้อที่ 2.13 ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 19 แผ่นเทอร์พอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 4HB และ 3HV สูง มีค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชันต่ำกว่า(ประมาณ –13 องศาเซลเซียส) แผ่นพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 4HB และ 3HV น้อยกว่า (ประมาณ –10 องศาเซลเซียส) ส่วนค่าอุณหภูมิหลอมเหลว ซึ่งขึ้นอยู่กับสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของเทอร์พอลิเมอร์ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ โฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) ซึ่งมีค่าอุณหภูมิหลอมเหลวสูง (เท่ากับ 180 องศาเซลเซียส) และการที่มีโมโนเมอร์ 3HV และ 4HB เป็นองค์ประกอบ ทำให้ค่าอุณหภูมิหลอมเหลวลดลง กล่าวคือ แผ่นฟิล์มตัวอย่างแรกซึ่งมี 3HB เป็นองค์ประกอบอยู่มากกว่า อีกสองตัวอย่าง พบว่าวิเคราะห์ได้ ค่าอุณหภูมิหลอมเหลวสูงกว่าอีกสองตัวอย่าง เท่ากับ 150.9 องศาเซลเซียส 143.7 องศาเซลเซียส และ 142.8 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ตารางที่ 19 ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว และอุณหภูมิกลาสทรานซิชันของเทอร์พอลิเมอร์ที่มี สัดส่วนของโมโนเมอร์แตกต่างกัน

สัดส่วน (โมลเปอร์เซ็นต์)			อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (Tg)	อุณหภูมิหลอมเหลว (Tm)
3HB	3HV	4HB	(^{0}C)	(^{0}C)
81	9	10	-10.7	150.9
61	17	22	-12.9	143.7
66	20	14	-12.6	142.8

ค่าความทนแรงดึง เปอร์เซ็นต์การยืดตัว และค่า Young's Modulus

ทำการเตรียมแผ่นฟิล์มเทอร์พอลิเมอร์ตามวิธีการทดลองที่ 2.13 เพื่อนำไปทดสอบสมบัติเชิงกลด้วยเครื่องทดสอบความทนแรงดึง (tensile testing machine) โดยชิ้นทดสอบจะถูกยึดไว้ระหว่างหัวจับทั้งสองโดยหัวจับตัวหนึ่งอยู่กับที่ และอีกตัวหนึ่งจะเคลื่อนที่ขึ้นลงได้ ค่าที่ได้จากการทดสอบ ได้แก่ ระยะยืดของแผ่นฟิล์มเมื่อถูกดึงจนขาดซึ่งคำนวณในรูปเปอร์เซ็นต์การยืดตัว (%Elongation to break) ค่าความทนแรงดึง (tensile strength, MPa) ซึ่งเป็นค่าแรงต่อพื้นที่หน้าตัดของแผ่นฟิล์ม และ ค่า Young's Modulus (MPa) เป็นดัชนีที่ใช้บอกถึงความแข็งและเปราะของวัสดุ (เสาวรจน์ ช่วยจุลจิตร์) จากรายงานการทดสอบตัวอย่างในงานวิจัยนี้แสดงในตารางที่ 22 ดังนี้

ตารางที่ 20 แสดงสมบัติเชิงกลของเทอร์พอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนต่าง ๆ กัน

สัดส่วน (โมลเปอร์เซ็นต์)			Young's modulus	Tensile strength	Elongation to break
3HB	3HV	4HB	(MPa)	(MPa)	(%)
81	9	10	403.5	10.37	2.57
61	17	22	245.35	21.37	8.71
66	20	14	368.75	11.58	3.14

ผลการศึกษาสมบัติของเทอร์พอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019 พบว่าเทอร์พอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 4HB ที่เพิ่มขึ้นทำให้แผ่นฟิล์มมีความเหนียวเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงด้วยค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัว กล่าวคือ เทอร์พอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 4HB สูงที่สุดเท่ากับ 22 โมลเปอร์เซ็นต์ในแผ่นฟิล์ม นำมาทำการทดสอบพบว่าค่า เปอร์เซ็นต์การยืดตัว มากที่สุดเท่ากับ 8.71 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแผ่นฟิล์มที่มีสัดส่วนของ 4HB เป็นองค์ประกอบในแผ่นฟิล์มต่ำกว่า เท่ากับ 2.57 เปอร์เซ็นต์ และ 3.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน ผลการวิเคราะห์ค่าความทนแรงดึง พบว่าแผ่นฟิล์มที่มี 4HB สูงที่สุด (22 โมลเปอร์เซ็นต์) วิเคราะห์ได้ค่าความทนแรงดึง สูงที่สุดเท่ากับ 21.37 MPa ส่วนแผ่นฟิล์มที่มี 4HB ต่ำกว่า (10 และ 14 โมลเปอร์เซ็นต์) มีค่าความทนแรงดึงต่ำกว่า (10.37 และ 11.58 MPa ตามลำดับ) ทั้งนี้นอกจากสัดส่วนโมโนเมอร์ 4HB แล้ว สัดส่วนของ 3HV ก็ส่งผลต่อค่าความทนแรงดึงและเปอร์เซ็นต์การยืดตัว ในทำนองเดียวกัน

ส่วนค่า Young's modulus ของโฮโมพอลิเมอร์ P(3HB) พบว่ามีค่าสูงถึง 3500 MPa ซึ่งทำให้สมบัติของโฮโมพอลิเมอร์ชนิดนี้ มีทั้งความแข็ง และ เปราะ และเมื่อพิจารณาแผ่นฟิล์มที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์มากที่สุด ในการศึกษานี้ คือ 81 โมลเปอร์เซ็นต์ พบว่าค่า Young's modulus สูงที่สุดเท่ากับ 403.5 MPa ส่วนแผ่นฟิล์มที่มีสัดส่วนของ 3HB เป็นองค์ประกอบในแผ่นฟิล์มต่ำกว่า (66 และ 61 โมลเปอร์เซ็นต์) ผลการวิเคราะห์ค่า Young's modulus ต่ำกว่า เท่ากับ 368.75 และ 245.35 MPa ตามลำดับ แสดงว่าการที่เทอร์พอลิเมอร์มีองค์ประกอบของโมโนเมอร์ 3HV และ 4HB มากขึ้นทำให้แผ่นฟิล์มมีความยืดหยุ่น อ่อนนิ่ม และใสมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 50 ทั้งนี้สมบัติเชิงกลและสมบัติทางกายภาพ นี้ไม่สามารถระบุความสัมพันธ์กับโมโนเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งได้อย่างชัดเจน ซึ่งอาจจะเป็นเพราะสัมพันธ์กับสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่สามชนิดร่วมกันซึ่งในการศึกษานี้ไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นเพราะเหตุใด เนื่องจากปัจจุบันงานวิจัยทางด้านสัดส่วนของเทอร์พอลิเมอร์และสมบัติทางกายภาพของเทอร์พอลิเมอร์ยังมีน้อยมาก ดังนั้นการศึกษาสมบัติทางกายภาพในงานวิจัยนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 50 ลักษณะของแผ่นฟิล์มเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์แต่ละชนิดต่าง ๆ กัน ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019

รูปที่ 50 (ต่อ) ลักษณะของแผ่นฟิล์มเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ แต่ละชนิดต่าง ๆ กัน ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. BA-019

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย