บทที่ 3

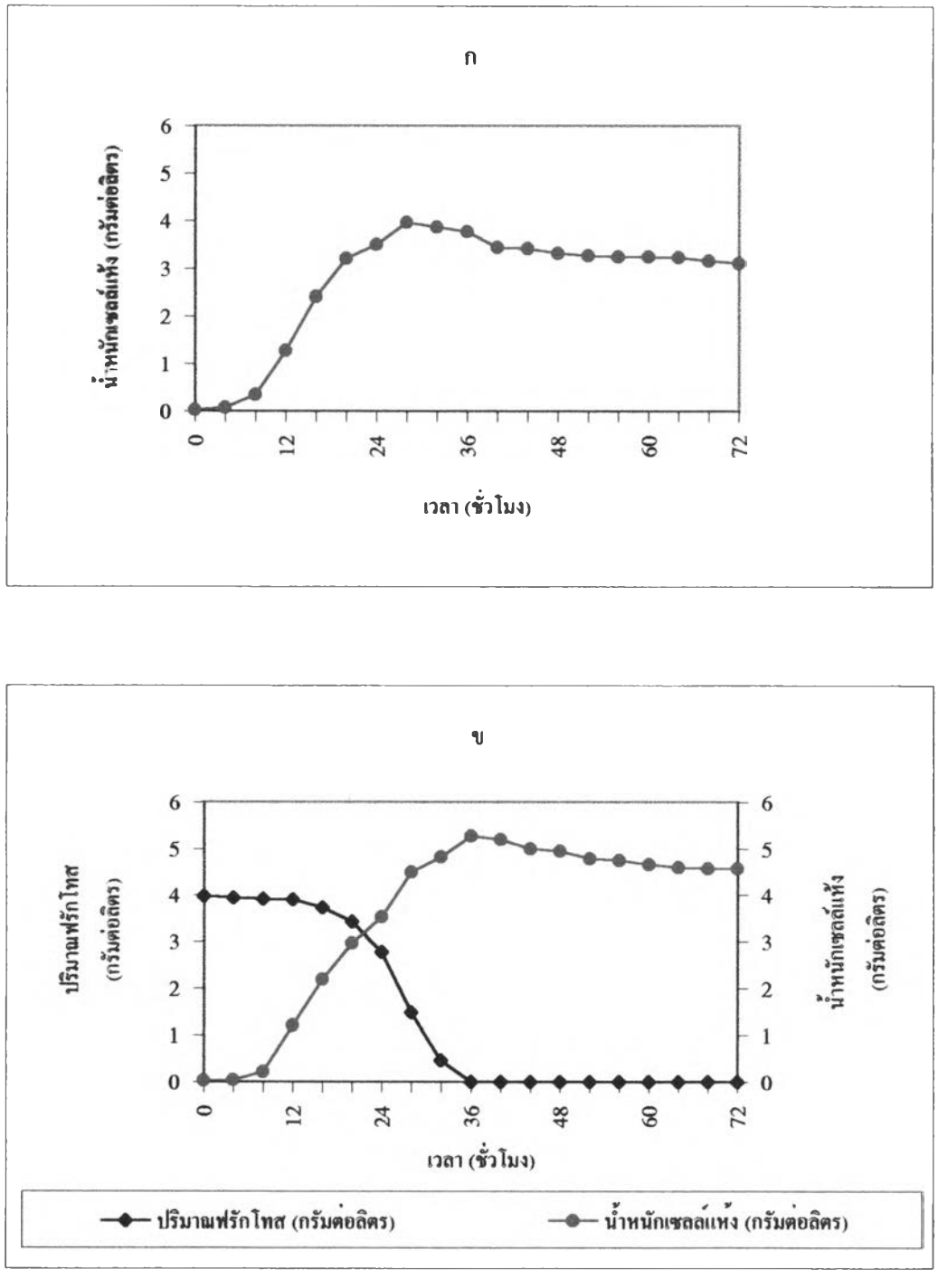
ผลการทดลอง

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อให้มีปริมาณเซลล์มาก และมีประสิทธิภาพในการสร้างพอลิเมอร์

เนื่องจากเมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อยังได้ปริมาณเซลล์ไม่พอเพียงต่อการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในขั้นตอนการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ ซึ่งแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HV ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ กรดวาเลอริก ทำให้เซลล์มีการเติบโตได้น้อย จึงจำเป็นต้องใช้กล้าเชื้อปริมาณมากในขั้นตอนการผลิต ดังนั้นจึงเติมฟรักโทสลงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อมีวัตถุประสงค์ให้ได้ปริมาณเซลล์มากขึ้น นอกจากนั้นได้เติมกรดวาเลอริกลงไปในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อด้วยเพื่อกระตุ้นให้เซลล์พร้อมที่จะนำกรดวาเลอริกไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตเทอร์พอลิเมอร์

3.1.1 รูปแบบการเติบโตของ *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่แปรผันปริมาณฟรักโทสและกรดวาเลอริก

เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.3) โดยให้มีปริมาณฟรักโทสและกรดวาเลอริกรวม 4 กรัมต่อลิตร เพื่อให้เชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนดังกล่าวได้หมดก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตพอลิเมอร์ (MSM) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่ไม่เติมฟรักโทสและกรดวาเลอริก (ชุดควบคุม) ติดตามการเติบโตทุก 4 ชั่วโมง นาน 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 11 และ 12 พบว่าเมื่อมีปริมาณกรดวาเลอริกเพิ่มมากขึ้นจะทำให้เชื้ออยู่ในระยะพักตัว (lag phase) นานขึ้น โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชุดควบคุม เท่ากับ 3.97 กรัมต่อลิตร (ในชั่วโมงที่ 28) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 4 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 5.27 กรัมต่อลิตร (ในชั่วโมงที่ 36) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 3 และกรดวาเลอริก 1 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์สูงสุด 5.36 กรัมต่อลิตร (ในชั่วโมงที่ 40) และเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 2 และวาเลอริก 2 กรัมต่อลิตรได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 5.25 กรัมต่อลิตร (ในชั่วโมงที่ 52) ซึ่งเห็นได้ว่าจากผลการทดลองนี้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุดใกล้เคียงกัน จึงยังไม่ทราบว่าอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชนิดใดเหมาะสม การศึกษาในขั้นต่อไปเพื่อหาอายุกล้าเชื้อจึงศึกษาในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อทั้ง 4 ชนิด

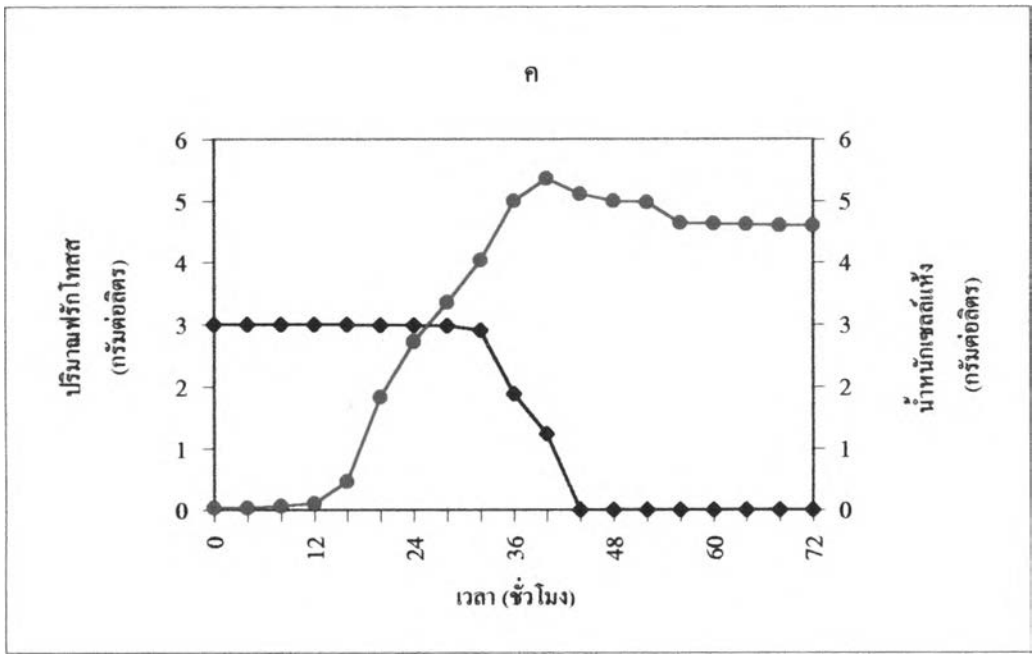


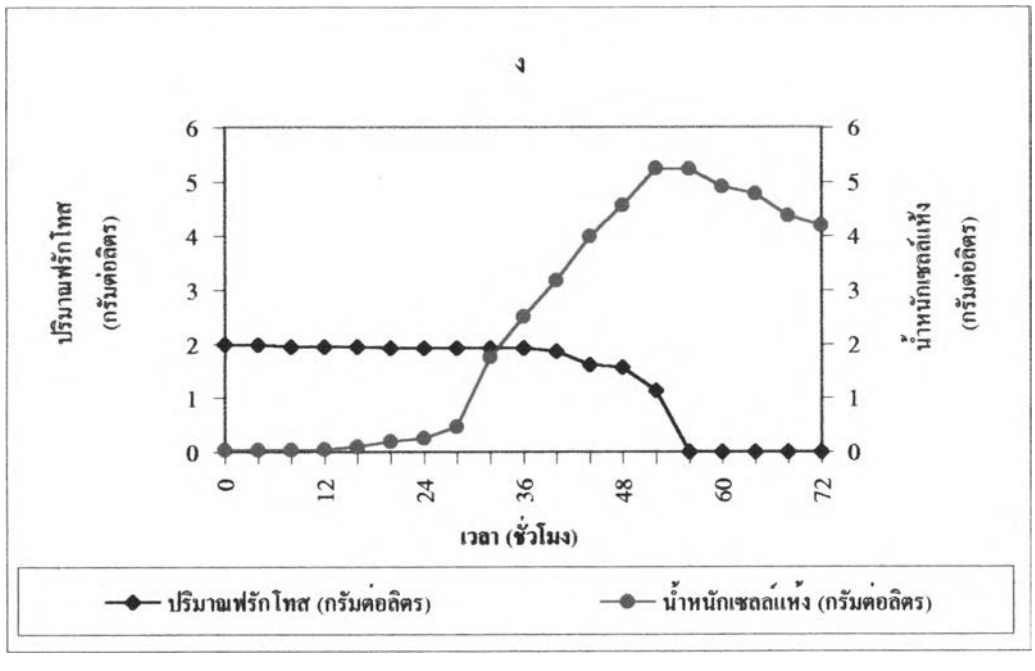
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รูปที่ 11 เปรียบเทียบการเติบโต และปริมาณฟรักโทสที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่แปรผันปริมาณฟรักโทสและกรดควาเลอริก

หมายเหตุ รูป ก หมายถึง อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชุดควบคุม

รูป ข หมายถึง อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 4 กรัมต่อลิตร





รูปที่ 12 เปรียบเทียบการเติบโต และปริมาณฟรักโทสที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp.A-(
ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่แปรผันปริมาณฟรักโทสและกรดวาเลอริก

หมายเหตุ รูป ค หมายถึง อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 3 และกรดวาเลอริก 1 กรัมต่อล
รูป ง หมายถึง อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 2 และกรดวาเลอริก 2 กรัมต่อล

3.1.2 การศึกษาอายุกล้าเชื้อและชนิดของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเมอร์

เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ 4 ชนิดที่ทราบรูปแบบการเติบโตจากข้อ 3.1.1 จึงเลือกกล้าเชื้ออายุต่างๆที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ 4 ชนิด มาเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต (อาหาร MSM) ซึ่งประกอบด้วยปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.3 และฟรักโทส 5 กรัมต่อลิตร (โดยมีรายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก) ดังนี้

ก ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน เลือกอายุกล้าเชื้อ 16 ชั่วโมง (ชุดควบคุม)

ข ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 4 กรัมต่อลิตร เลือกอายุกล้าเชื้อ 16 24 และ 32 ชั่วโมง

ค ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 3 และกรดวาเลอริก 1 กรัมต่อลิตร เลือกอายุกล้าเชื้อ 16 24 32 และ 40 ชั่วโมง

ง ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 2 และกรดวาเลอริก 2 กรัมต่อลิตร เลือกอายุกล้าเชื้อ 16 32 40 และ 48 ชั่วโมง

ติดตามการเติบโตทุก 12 ชั่วโมงนาน 72 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 13 ถึง 16 พบว่า เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 อายุกล้าเชื้อ 16 ชั่วโมงจากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ค) ในอาหาร MSM ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 1.95 กรัมต่อลิตร ผลิต PHA 67.69 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และสามารถใช้ฟรักโทสได้หมดภายใน 36 ชั่วโมง โดย *Alcaligenes* sp. A-04 อายุกล้าเชื้อ 16 ชั่วโมงจากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชุดควบคุม (ก) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 1.96 กรัมต่อลิตร ผลิต PHA 50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในชั่วโมงที่ 36) และสามารถใช้ฟรักโทสหมดภายใน 36 ชั่วโมง ในขณะที่ *Alcaligenes* sp. A-04 อายุกล้าเชื้อ 16 ชั่วโมงจากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ข) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 1.97 กรัมต่อลิตร (ในชั่วโมงที่ 48) ผลิต PHA 66.87 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในชั่วโมงที่ 72) แต่ไม่สามารถใช้ฟรักโทสหมด และ *Alcaligenes* sp. A-04 อายุกล้าเชื้อ 16 ชั่วโมงจากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ง) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 2.02 กรัมต่อลิตร ผลิต PHA 60.89 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในชั่วโมงที่ 48) และใช้ฟรักโทสหมดภายใน 72 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือก *Alcaligenes* sp. A-04 อายุกล้าเชื้อ 16 ชั่วโมง จากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ค) ซึ่งเติมฟรักโทส 3 และกรดวาเลอริก 1 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในขั้นตอนการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ การทดลองขั้นตอนต่อไปจึงเป็นการศึกษาชนิด และปริมาณของแหล่งคาร์บอน ในการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB)

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณ PHA ที่ผลิตคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (และกรัมต่อลิตร) ปริมาณฟรักโทสและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ที่มีอายุกล้าเชื้อต่างๆ จากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อทั้ง 4 ชนิด ในอาหารเพื่อการผลิตพอลิเมอร์ (เลือกปริมาณแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.3 และ ฟรักโทส 5 กรัมต่อลิตร รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชุดควบคุม (ก)

อายุกล้าเชื้อ 16 ชั่วโมง					
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHA %ต่อน.เซลล์แห้ง	PHA (กรัมต่อลิตร)	ฟรักโทสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	$(NH_4)_2SO_4$ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0.05	0	0	4.98	0.29
12	1.08	37.96	0.41	1.98	0
24	1.76	42.05	0.74	0.43	0
36	**1.96**	**50.00**	**0.98**	0	0
48	1.96	45.41	0.89	0	0
60	1.72	44.49	0.80	0	0
72	1.64	43.90	0.71	0	0

ตารางที่ 8 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ข)

อายุกล้าเชื้อ 16 ชั่วโมง					
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHA %ต่อน.น.เซลล์แห้ง	PHA (กรัมต่อลิตร)	ฟรักโทสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	$(NH_4)_2SO_4$ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0.05	0	0	5.06	0.29
12	1.06	40.57	0.43	2.72	0
24	1.78	55.62	0.99	1.35	0
36	1.87	52.94	0.99	0.49	0
48	**1.97**	56.85	1.12	0.17	0
60	1.82	65.38	**1.19**	0.17	0
72	1.66	**66.87**	1.11	0.15	0

อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ข)

อายุกล้าเชื้อ 24 ชั่วโมง					
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHA %ต่อน.น.เซลล์แห้ง	PHA (กรัมต่อลิตร)	ฟรักโทสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	$(NH_4)_2SO_4$ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0.07	0	0	4.99	0.29
12	0.94	28.72	0.27	2.89	0
24	1.55	48.39	0.75	1.01	0
36	1.74	48.28	0.84	0.24	0
48	**1.81**	52.49	0.95	0	0
60	1.79	**62.57**	**1.12**	0	0
72	1.71	45.61	0.78	0	0

ตารางที่ 8 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ข)

อายุกล้าเชื้อ 32 ชั่วโมง					
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHA %ต่อนน.เซลล์แห้ง	PHA (กรัมต่อลิตร)	ฟรักโทสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	$(NH_4)_2SO_4$ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0.07	0	0	4.98	0.28
12	0.88	38.64	0.34	2.83	0
24	1.44	48.61	0.70	1.35	0
36	1.67	54.49	0.91	0.51	0
48	1.77	54.67	0.95	0.32	0
60	**1.78**	**60.67**	**1.08**	0.08	0
72	1.68	60.12	1.01	0.07	0

ตารางที่ 8 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ค)

อายุกล้าเชื้อ 16 ชั่วโมง					
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHA %ต่อนน.เซลล์แห้ง	PHA (กรัมต่อลิตร)	ฟรักโทสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	$(NH_4)_2SO_4$ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0.03	0	0	5.02	0.28
12	0.95	32.63	0.31	1.20	0
24	1.75	54.86	0.96	0.81	0
36	1.87	64.71	1.21	0.08	0
48	**1.95**	**67.69**	**1.32**	0	0
60	1.83	55.19	1.01	0	0
72	1.61	49.07	0.79	0	0

อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ค)

อายุกล้าเชื้อ 24 ชั่วโมง					
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHA %ต่อนน.เซลล์แห้ง	PHA (กรัมต่อลิตร)	ฟรักโทสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	$(NH_4)_2SO_4$ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0.04	0	0	4.98	0.29
12	0.87	33.33	0.29	3.19	0
24	1.48	45.95	0.68	1.56	0
36	1.75	53.14	0.93	0.64	0
48	1.83	49.18	0.90	0.38	0
60	**1.84**	48.91	0.90	0.26	0
72	1.73	**55.49**	**0.96**	0.13	0

ตารางที่ 8 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ค)

อายุกล้าเชื้อ 32 ชั่วโมง					
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHA %ต่อนน.เซลล์แห้ง	PHA กรัมต่อลิตร	ฟรักโทสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	$(NH_4)_2SO_4$ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0.04	0	0	5.00	0.31
12	0.86	20.93	0.18	3.26	0
24	1.40	41.43	0.58	1.97	0
36	1.67	48.50	0.81	1.13	0
48	1.79	46.93	0.84	0.54	0
60	**1.84**	47.83	0.88	0.24	0
72	1.80	**55.00**	**0.99**	0.09	0

อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ค)

อายุกล้าเชื้อ 40 ชั่วโมง					
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHA %ต่อนน.เซลล์แห้ง	PHA (กรัมต่อลิตร)	ฟรักโทสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	$(NH_4)_2SO_4$ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0.06	0	0	5.01	0.29
12	0.95	31.58	0.30	3.06	0
24	1.56	48.08	0.75	1.28	0
36	**1.86**	51.08	0.95	0.49	0
48	1.83	63.93	1.17	0.19	0
60	1.68	**70.83**	**1.19**	0.17	0
72	1.63	54.60	0.89	0.13	0

ตารางที่ 8 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ง)

อายุกล้าเชื้อ 16 ชั่วโมง					
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHA %ต่อน.น.เซลล์แห้ง	PHA (กรัมต่อลิตร)	ฟรักโทสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	$(NH_4)_2SO_4$ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0.01	0	0	5.01	0.29
12	0.72	34.72	0.25	3.56	0
24	1.66	52.41	0.87	1.28	0
36	1.92	57.81	1.11	0.53	0
48	**2.02**	**60.89**	**1.23**	0.23	0
60	1.90	56.84	1.08	0.17	0
72	1.73	55.49	0.96	0	0

อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ง)

อายุกล้าเชื้อ 32 ชั่วโมง					
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHA %ต่อน.น.เซลล์แห้ง	PHA (กรัมต่อลิตร)	ฟรักโทสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	$(NH_4)_2SO_4$ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0.07	0	0	4.98	0.31
12	1.07	28.04	0.30	2.98	0
24	1.67	39.52	0.66	1.39	0
36	**1.82**	47.80	0.87	0.54	0
48	1.82	47.80	0.87	0.34	0
60	1.79	**58.10**	**1.04**	0.09	0
72	1.74	55.17	0.96	0.02	0

ตารางที่ 8 (ต่อ)

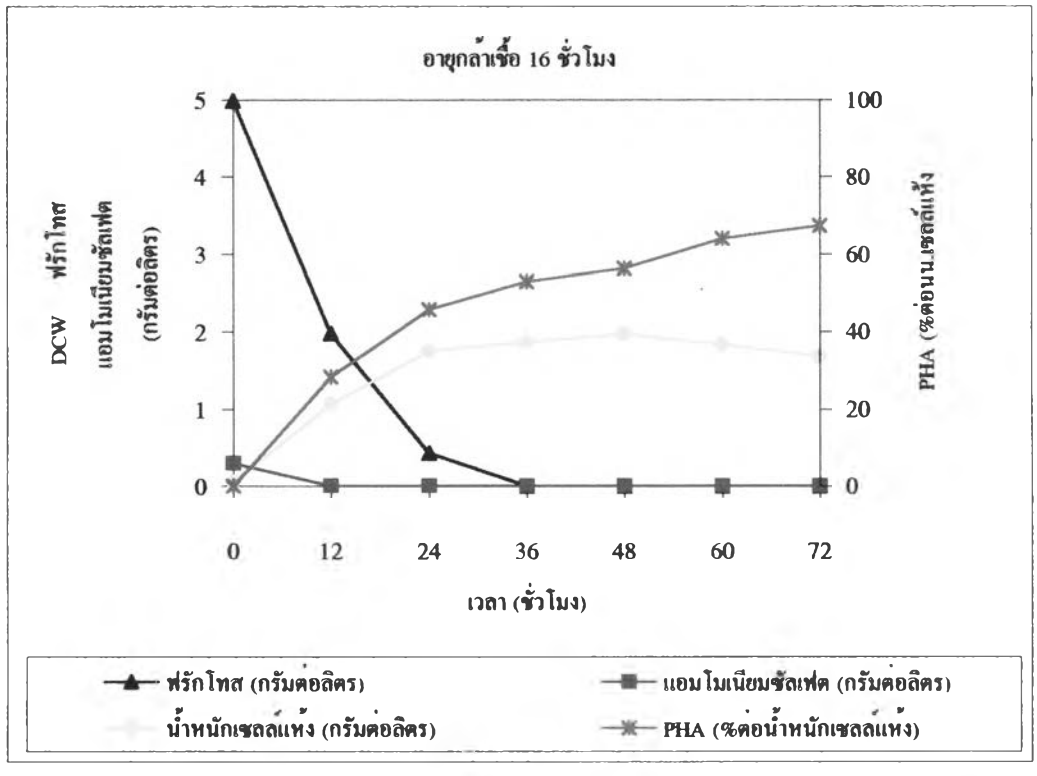
อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ง)

อายุกล้าเชื้อ 40 ชั่วโมง					
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHA %ต่อน.เซลล์แห้ง	PHA (กรัมต่อลิตร)	ฟรักโทสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	$(NH_4)_2SO_4$ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0.08	0	0	4.99	0.30
12	1.05	26.67	0.28	2.89	0
24	1.66	40.36	0.67	1.16	0
36	1.81	38.67	0.70	0.51	0
48	**1.83**	51.91	0.95	0.17	0
60	1.76	**60.80**	**1.07**	0.13	0
72	1.71	55.56	0.95	0.13	0

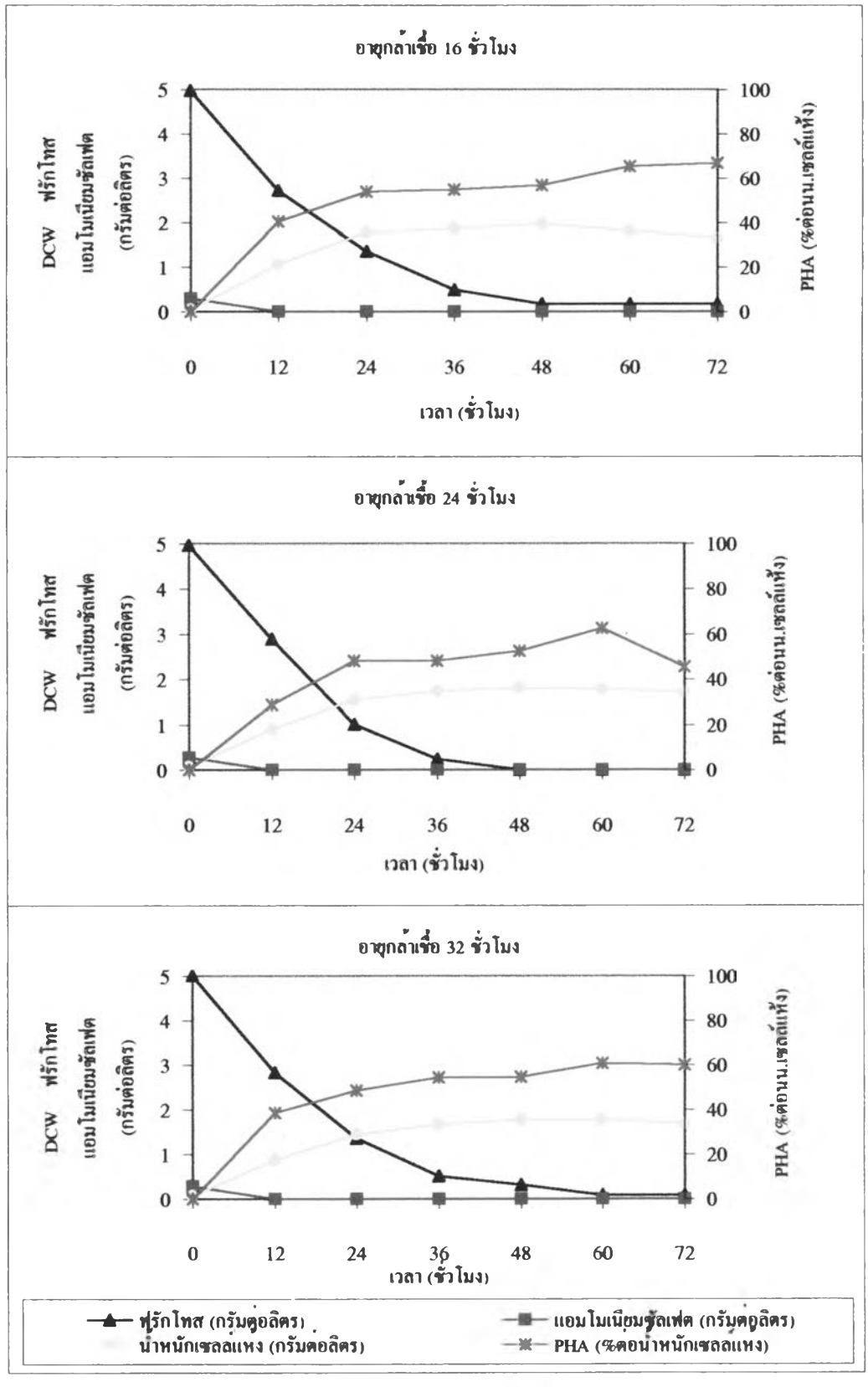
อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ (ง)

อายุกล้าเชื้อ 48 ชั่วโมง					
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHA %ต่อน.เซลล์แห้ง	PHA (กรัมต่อลิตร)	ฟรักโทสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	$(NH_4)_2SO_4$ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)
0	0.09	0	0	5.01	0.31
12	1.09	19.27	0.21	2.82	0
24	1.68	39.29	0.66	1.28	0
36	1.78	38.20	0.68	0.73	0
48	**1.80**	45.00	0.81	0.54	0
60	1.73	56.07	0.97	0.36	0
72	1.70	**59.41**	**1.01**	0.13	0

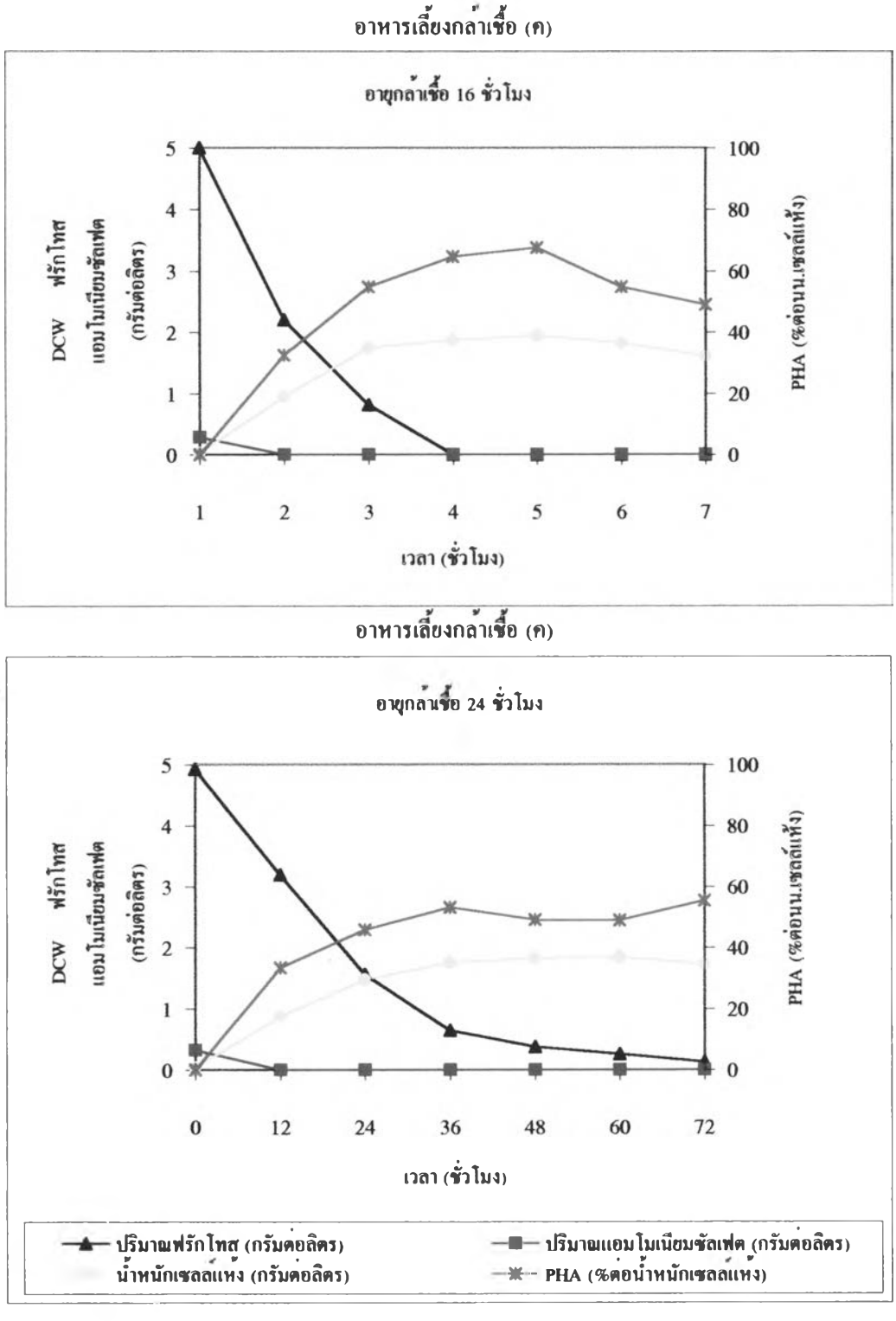
อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชุดควบคุม (ก)



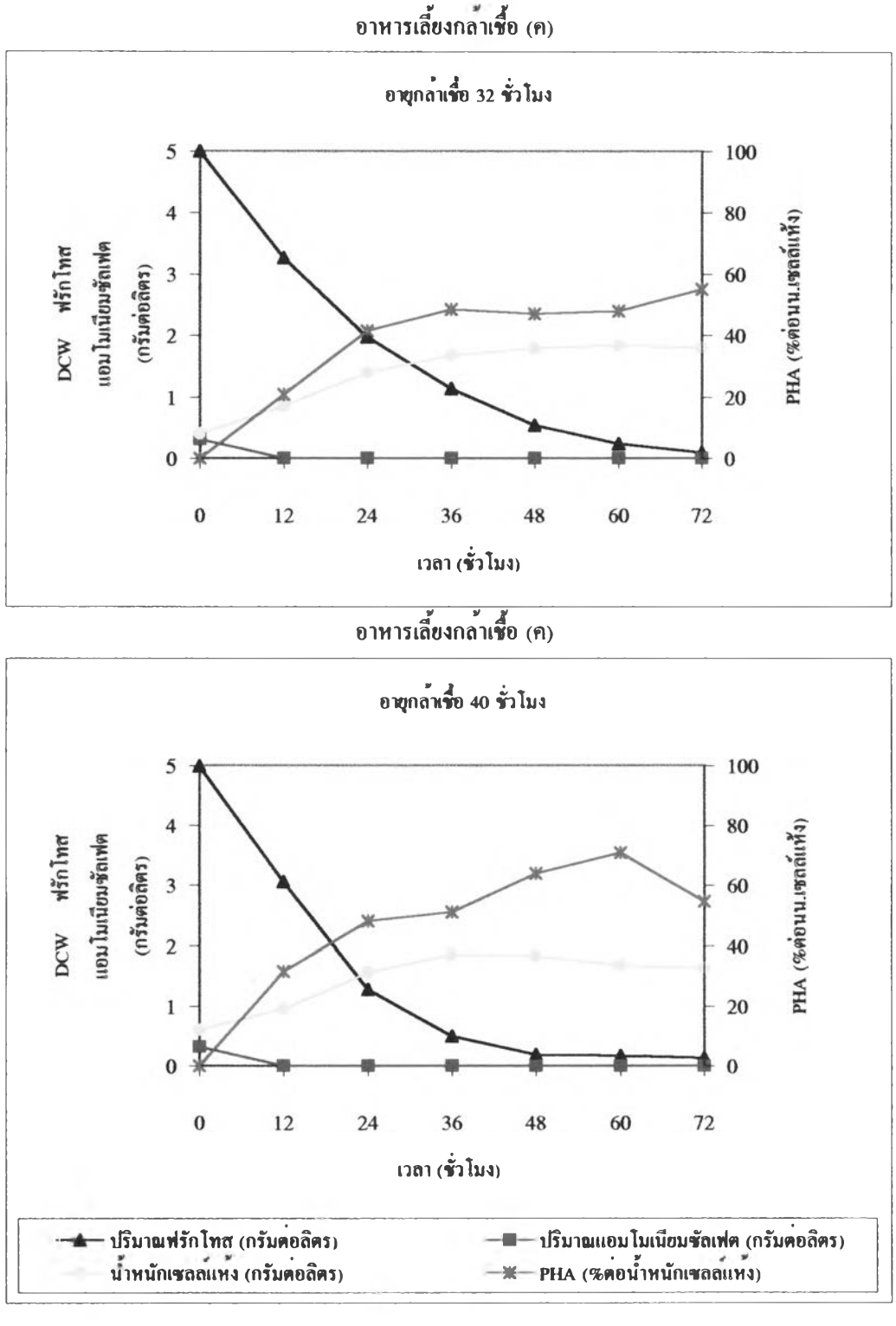
รูปที่ 13 การเติบโต ปริมาณ PHA ฟรักโทส และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 จากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อชุดควบคุม (ก) อายุกล้าเชื้อ 16 ชั่วโมง ในอาหาร MSM



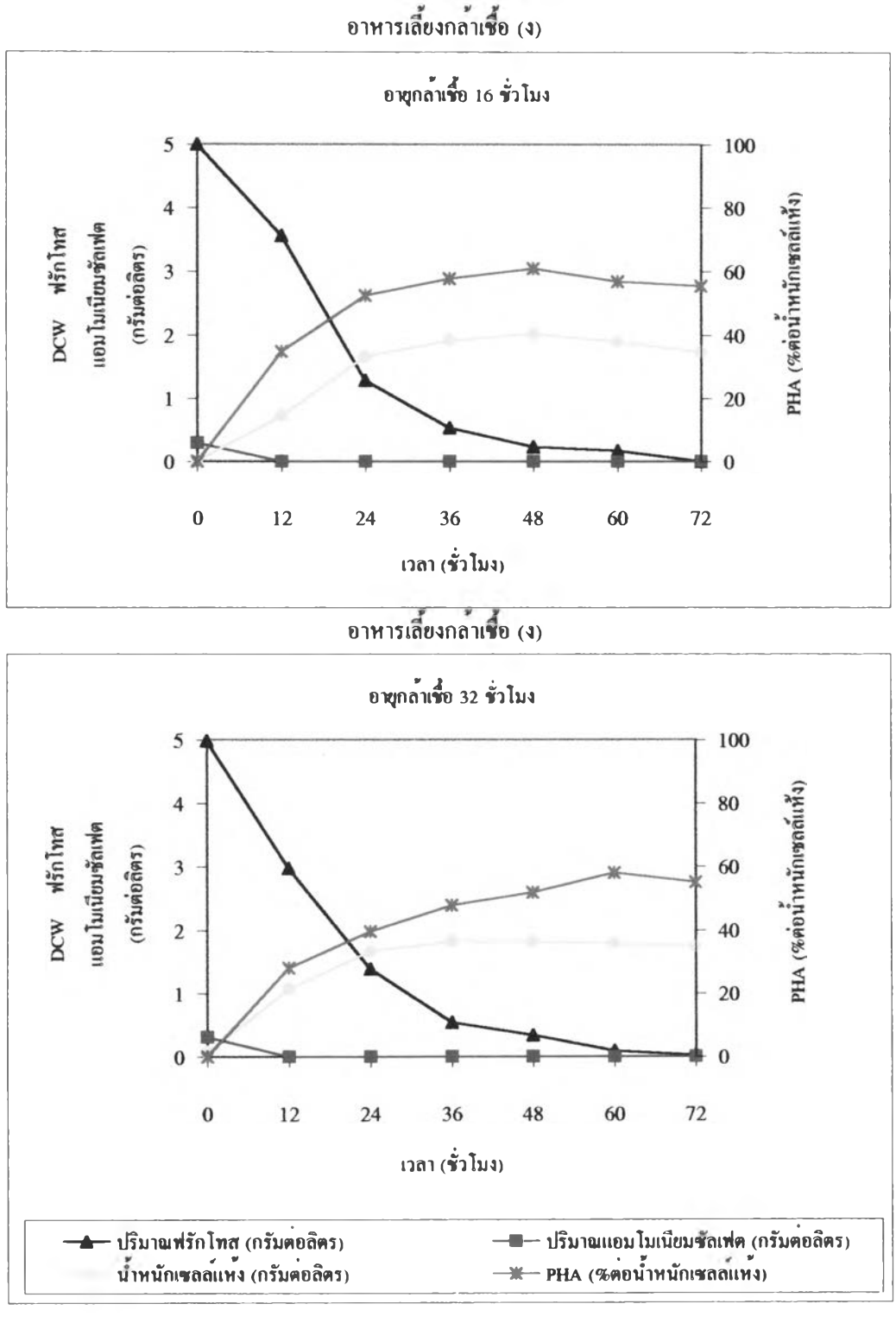
รูปที่ 14 เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณPHA ฟรักโทส และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือเมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 จากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 4 กรัมต่อลิตร (อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ข) อายุกล้าเชื้อ 16 24 และ 32 ชั่วโมง ในอาหาร MSM



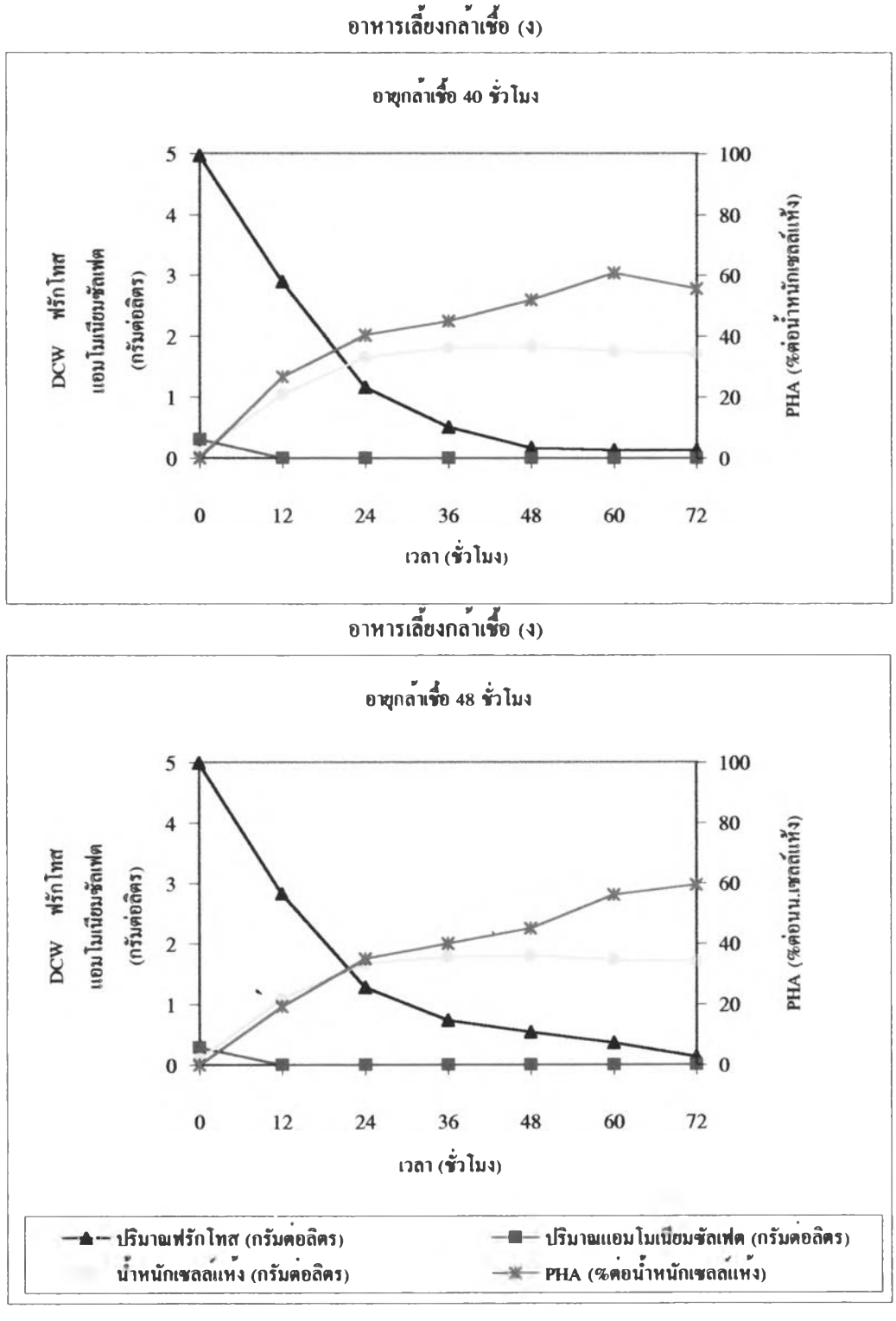
รูปที่ 15 เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณPHA ฟรักโทสและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือเมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 จากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 3 และกรดวาเลอริก 1 กรัมต่อลิตร (อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ค) อายุกล้าเชื้อ 16 24 32 และ 40 ชั่วโมง ในอาหาร MSM



รูปที่ 15 (ต่อ) เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณ PHA ฟรักโทสและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 จากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 3 และกรดวาเลอริก 1 กรัมต่อลิตร (อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ค) อายุกล้าเชื้อ 16 24 32 และ 40 ชั่วโมง ในอาหาร MSM



รูปที่ 16 เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณ PHA ฟรักโทสและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือเมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 จากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 2 และกรดวาเลอริก 2 กรัมต่อลิตร (อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อสูตร ง) อายุกล้าเชื้อ 16 32 40 และ 48 ชั่วโมง ในอาหาร MSM



รูปที่ 16 (ต่อ) เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณ PHA ฟรักโทสและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 จากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 2 และกรดวาเลอริก 2 กรัมต่อลิตร (อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ ง) อายุกล้าเชื้อ 16 32 40 และ48 ชั่วโมง ในอาหาร MSM

3.2 การศึกษาชนิด ปริมาณของแหล่งคาร์บอน และระยะเวลาในการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อผลิตเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) ให้มีสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์แตกต่างกัน

Doi และคณะ (1995) รายงานว่าวิถีการสังเคราะห์ PHA ใน *A.eutrophus* ขึ้นอยู่กับการเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอน โดยแต่ละโมโนเมอร์สามารถรวมเป็นโคพอลิเมอร์หรือเทอร์พอลิเมอร์ได้ จากผลการวิจัยของ อรุณ ชาญชัยเชาววิวัฒน์ (2536) ศึกษาน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ ฟรักโทส กลูโคส และซูโครส พบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถใช้ฟรักโทสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิต PHB โดยช่วงระยะเวลาแรกของการเลี้ยงเชื้อฟรักโทสจะถูกใช้เพื่อการเติบโตจนเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) จึงมีการสร้างและสะสม PHB และ อัญชนา ศุรติขจร (2537) พบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถใช้กรดไขมันในการผลิตโคพอลิเมอร์ โดยใช้กรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HV โมโนเมอร์ และใช้โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 4HB โมโนเมอร์ อัตราส่วนระหว่างปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมคือ 20 ต่อ 0.1 กรัมต่อลิตร เทอร์พอลิเมอร์ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ 3HB 3HV และ 4HB โมโนเมอร์ เมื่อพิจารณาจากวิถีการสังเคราะห์ PHA ที่แสดงในรูปที่ 4 6 และ 7 พบว่าในการสังเคราะห์แต่ละโมโนเมอร์สามารถเลือกใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ซึ่งสำหรับ *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถใช้ฟรักโทสหรือกรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ ในขณะที่แหล่งคาร์บอนสำหรับ 4HB โมโนเมอร์ อัญชนา ศุรติขจร (2537) ได้รายงานว่าใช้โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต แต่แหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HV โมโนเมอร์จะสามารถใช้ได้เพียงชนิดเดียว คือ กรดวาเลอริก ดังนั้นเนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้บางชนิดเป็นกรดทำให้เชื้อมีการเติบโตได้น้อย นอกจากนี้โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาแพง ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง จึงได้ศึกษาเพื่อหาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ และ 4HB โมโนเมอร์ ส่วน 3HV โมโนเมอร์จำเป็นต้องเป็นกรดวาเลอริกเช่นเดิม รวมทั้งศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำหรับการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ให้มีปริมาณของเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ตามที่ต้องการ รวมทั้งสามารถเพิ่มปริมาณมวลชีวภาพทำให้ได้ปริมาณสารผลิตภัณฑ์สูงขึ้น และลดต้นทุนการผลิตอันเนื่องมาจากราคาของแหล่งคาร์บอน

3.2.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับ 3HB โมโนเมอร์

การศึกษาเมื่อไม่เติมแหล่งคาร์บอนเสริมสำหรับ 3HB โมโนเมอร์

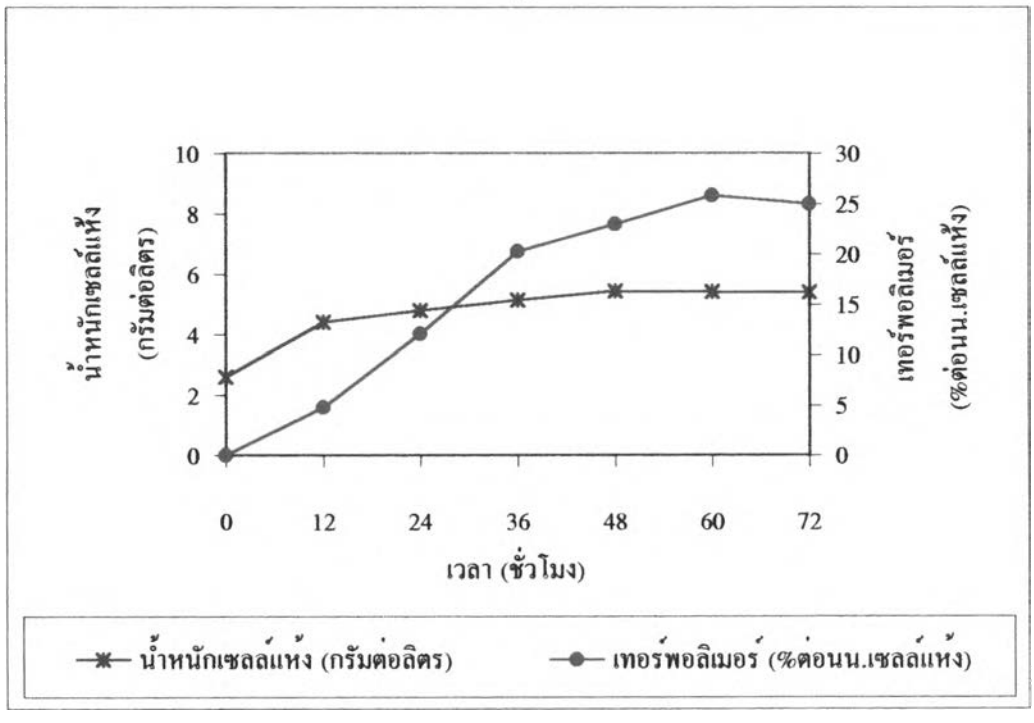
วิถีการสังเคราะห์ 3HB โมโนเมอร์ใน *A.eutrophus* สามารถสังเคราะห์ได้จากแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์โดยตรง เช่น ฟรักโทส กรดบิวทิริก และสามารถสังเคราะห์พร้อมกับโมโนเมอร์ชนิดอื่น จากแหล่งคาร์บอนเดี่ยวได้เป็นโคพอลิเมอร์ที่มี 3HB โมโนเมอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิก หรือ กรดวาเลอริก เป็นแหล่งคาร์บอนจะผลิตได้โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) หรือเมื่อใช้โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นแหล่งคาร์บอนจะผลิตได้โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-4HB) ดังนั้นจึงทดลองไม่เติมแหล่งคาร์บอนเสริมสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ในอาหาร MSM เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้ใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HV โมโนเมอร์ และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 4HB โมโนเมอร์ ซึ่งแหล่งคาร์บอนทั้ง 2 ชนิดนี้ *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถนำไปสังเคราะห์เป็น 3HB โมโนเมอร์ได้ โดยเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 (ตามวิธีการทดลองข้อ 4.3 และข้อ 7) ในอาหาร MSM เติมกรดวาเลอริก 15 และ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 5 กรัมต่อลิตร แต่ไม่เสริมแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ (ฟรักโทสหรือกรดบิวทิริก) ติดตามการเติบโต หาปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ทุก 12 ชั่วโมง นาน 72 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 17

ผลการวิจัยพบว่า ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 5.44 กรัมต่อลิตร (ในชั่วโมงที่ 48) ผลิตเทอร์พอลิเมอร์สูงสุด 25.78 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในชั่วโมงที่ 60 คิดเป็น 1.40 กรัมต่อลิตร) สามารถผลิตเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) ที่มีสัดส่วนของ 3HB โมโนเมอร์ในช่วง 3 ถึง 39 โมลเปอร์เซ็นต์ สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อพบว่าเปลี่ยนเป็นด่างอย่างรวดเร็ว โดยในชั่วโมงที่ 72 มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.65 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นกรด ได้ถูกนำไปใช้สังเคราะห์เป็นองค์ประกอบของเทอร์พอลิเมอร์ จึงทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้น

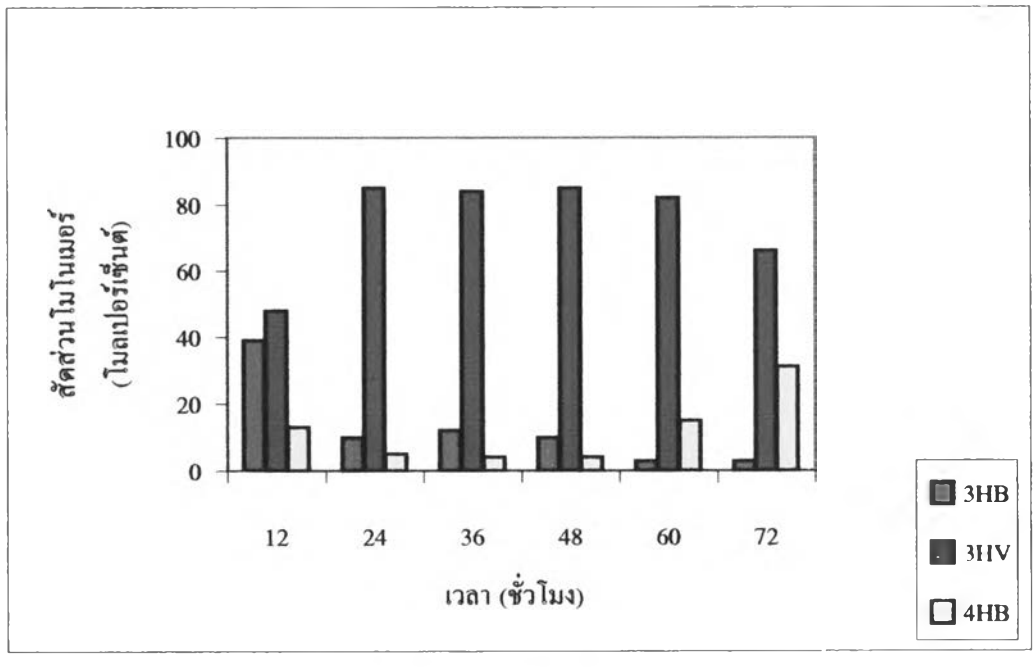
ตารางที่ 9 เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหาร MSM โดยไม่เสริมแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ (แหล่งคาร์บอนคือ กรดวาเลอริก 15 และ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 5 กรัมต่อลิตร)

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์		สัดส่วน(โมลเปอร์เซ็นต์)			pH
		%ต่อ นน.เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV	4HB	
0	2.61	-	-	-	-	-	7.19
12	4.41	4.76	0.21	39	48	13	8.57
24	4.80	12.08	0.58	10	85	5	8.96
36	5.14	20.23	1.04	12	84	4	9.25
48	**5.44**	22.98	1.25	10	85	4	9.53
60	5.43	**25.78**	**1.40**	3	82	15	9.55
72	5.40	25.00	1.35	3	66	31	9.65

(ก)



(ข)



รูปที่ 17 การเติบโต ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ (รูป ก) และสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ (รูป ข) เมื่อไม่เสริมแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์
(แหล่งคาร์บอน คือ กรดวาเลอริก 10 และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 10 กรัมต่อลิตร)

การศึกษาเปรียบเทียบเมื่อเสริมฟรักโทสหรือกรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์

เนื่องจาก *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถใช้ฟรักโทสและกรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอนโดยตรงสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ ดังนั้นจึงศึกษาเพื่อเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอนเสริมที่เหมาะสมสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ระหว่างฟรักโทสกับกรดบิวทิริก

เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อผลิตเทอร์พอลิเมอร์ (ตามวิธีการทดลองข้อ 4.3 และ ข้อ 7) โดยศึกษาเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ใช้ดังนี้ (อัญชนา ศุรติขจร, 2537)

ก อาหาร MSM เติมฟรักโทส 2.5 โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 2.5 และกรดวาเลอริก 10 กรัมต่อลิตร

ข อาหาร MSM เติมกรดบิวทิริก 2.5 โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 2.5 และกรดวาเลอริก 10 กรัมต่อลิตร

ติดตามการเติบโต ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ทุก 12 ชั่วโมง นาน 72 ชั่วโมง ผลการทดลอง (ดังที่ได้แสดงในตารางที่ 10 รูปที่ 18 และ 19) ได้ผลว่า เมื่อใช้ฟรักโทสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ (อาหารสูตร ก) เปรียบเทียบกับกรดบิวทิริก (อาหารสูตร ข) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 5.78 (ในชั่วโมงที่ 48) และ 4.98 กรัมต่อลิตร (ในชั่วโมงที่ 60) ตามลำดับ ผลิตเทอร์พอลิเมอร์สูงสุด 21.51 และ 19.87 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในชั่วโมงที่ 60) ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกัน

ผลจากการทดลองทั้ง 3 ภาวะ จะยังไม่สรุปว่า ภาวะใดที่จะเลือกแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ เนื่องจากในการวิจัยนี้ มีจุดประสงค์ต้องการข้อมูลทั้งในด้านปริมาณของเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของโมโนเมอร์แต่ละชนิด นอกจากนี้การสังเคราะห์ 3HB โมโนเมอร์โดยมีวิถีการสังเคราะห์ต่างกันเนื่องจากใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน อาจมีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของเทอร์พอลิเมอร์ ซึ่งในขั้นตอนนี้ของการศึกษายังไม่สามารถทราบได้ว่าภาวะใดมีความเหมาะสม ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงยังมีการใช้ทั้งฟรักโทส กรดบิวทิริก หรือไม่เสริมแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ เพื่อผลิตแผ่นฟิลม์มาทดสอบสมบัติด้านต่างๆต่อไป (ผลดังแสดงในข้อ 3.4.4)

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมสำหรับ 3HB โมโนเมอร์เป็นฟรักโทสเปรียบเทียบกับกรดบิวทิริก

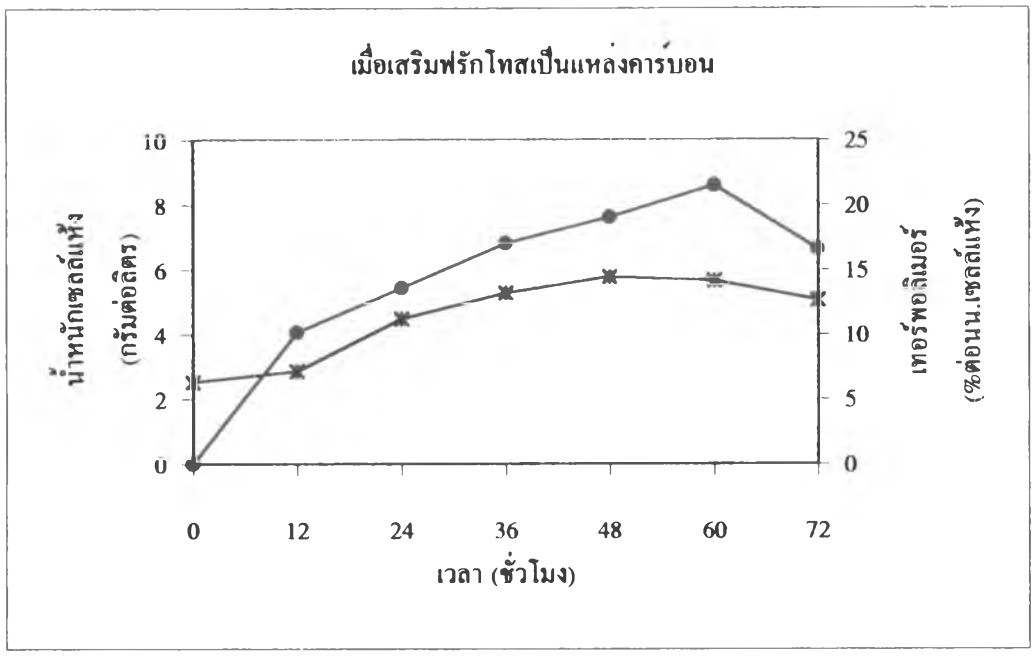
อาหารสูตร ก เมื่อเสริมฟรักโทสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์		สัดส่วน(โมลเปอร์เซ็นต์)			pH
		%ต่อ นน.เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV	4HB	
0	2.53	-	-	-	-	-	7.10
12	2.86	10.14	0.29	51	29	20	8.57
24	4.49	13.59	0.61	35	51	14	8.92
36	5.28	17.05	0.90	28	67	5	9.07
48	**5.78**	19.03	1.10	22	74	6	9.32
60	5.67	**21.51**	**1.22**	22	73	6	9.38
72	5.06	16.60	0.84	23	81	6	9.37

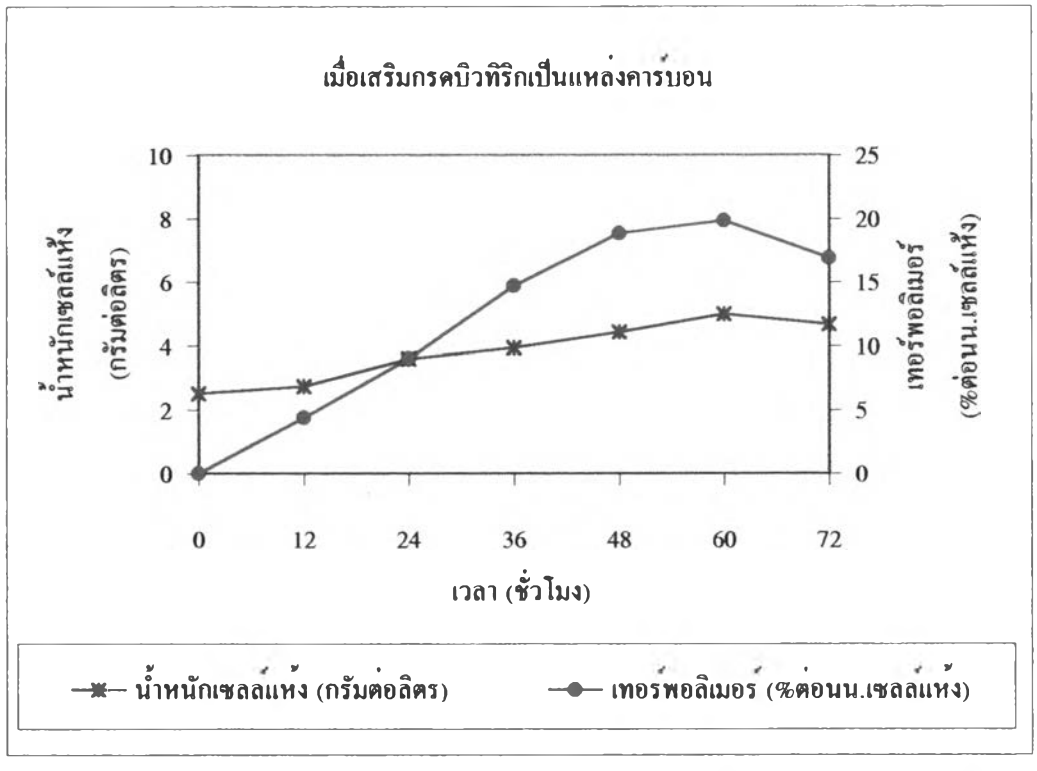
อาหารสูตร ข เมื่อเสริมกรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์		สัดส่วน(โมลเปอร์เซ็นต์)			pH
		%ต่อ นน.เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV	4HB	
0	2.50	-	-	-	-	-	7.08
12	2.73	4.40	0.12	5	71	24	8.51
24	3.58	8.94	0.32	15	67	18	9.98
36	3.94	14.72	0.58	16	68	16	9.15
48	4.41	18.82	0.83	26	60	12	9.36
60	**4.98**	**19.87**	**0.99**	24	64	12	9.45
72	4.67	16.92	0.79	23	63	13	9.53

(ก)

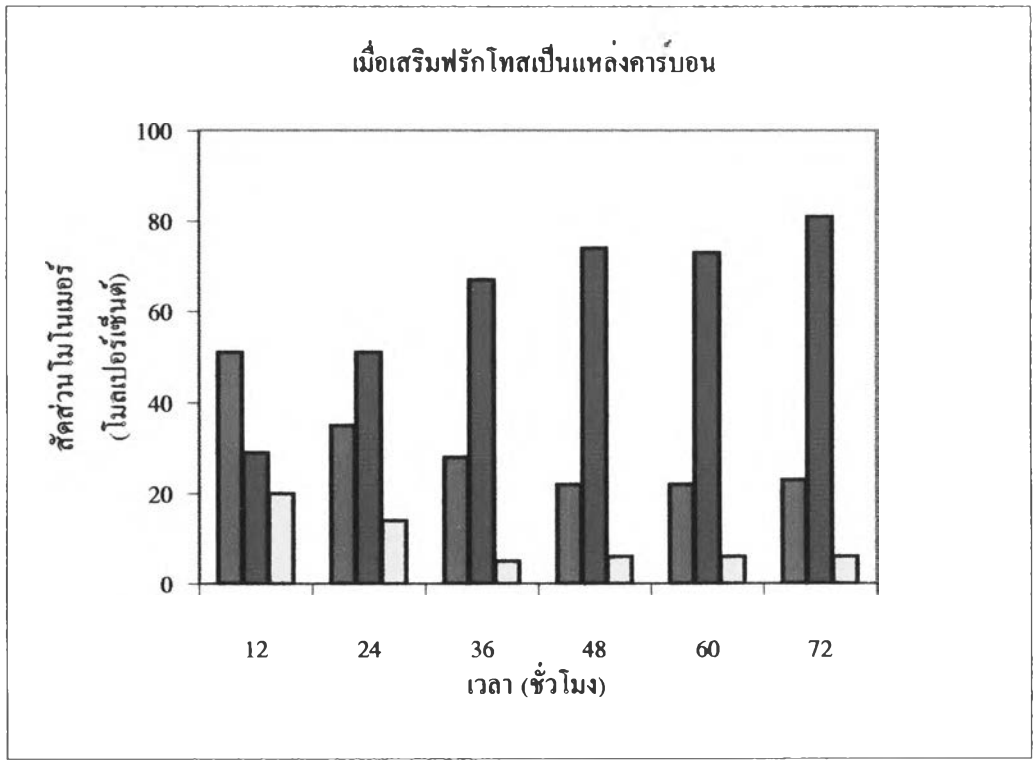


(ข)

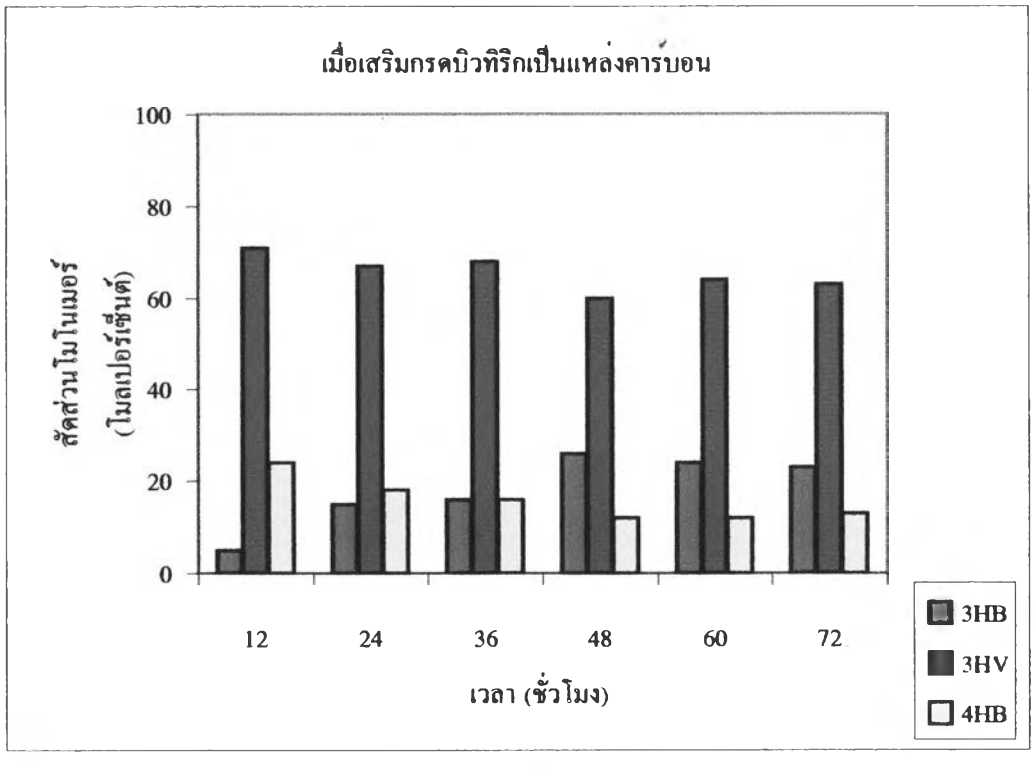


รูปที่ 18 เปรียบเทียบการเติบโต และปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ เมื่อเสริมแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์เป็นฟรักโทส (ก) เปรียบเทียบกับกรดบิวทิริก (ข)

(ก)



(ข)



รูปที่ 19 แสดงสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ เมื่อเสริมแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์เป็นฟรักโทส (ก) เปรียบเทียบกับกรดบิวทิริก (ข)

3.2.2 ศึกษาภาวะการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 ที่มีสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์สูงขึ้น

Kunioka และ Doi (1990) รายงานว่า โคพอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์มากกว่า 40 โมลเปอร์เซ็นต์ จะทำให้มีสมบัติยืดหยุ่นคล้ายยาง (ดังแสดงในตารางที่ 6) และยังมีผลช่วยเพิ่มอัตราการถูกย่อยสลายให้สูงขึ้น จากงานวิจัยของ อัญชนา ศุรติขจร (2537) พบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 มีความสามารถในการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-4HB) ที่มีสัดส่วน 4HB โมโนเมอร์ได้สูงสุด 38 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ที่เติมโซเดียม-4-ไฮดรอกซี-บิวทิเรต 20 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ Doi และคณะ (1992) รายงานว่า เมื่อเลี้ยง *A. eutrophus* ในอาหารเพื่อการผลิตสูตรปรับปรุง (ภาคผนวก ก) ซึ่งเติมแหล่งคาร์บอนสำหรับ 4HB โมโนเมอร์ (กรด 4-ไฮดรอกซีบิวทิริก) 30 กรัมต่อลิตร และเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-4HB) ที่มีสัดส่วน 4HB โมโนเมอร์ในช่วง 70-100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเพื่อผลิตเทอร์พอลิเมอร์ให้มีสัดส่วน 4HB โมโนเมอร์ได้มากกว่า 38 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทำให้เทอร์พอลิเมอร์มีสมบัติที่ดีและสามารถแปรสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์ได้มากขึ้น จึงเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเพื่อการผลิตและภาวะการเลี้ยงเชื้อตามรายงานของ Doi และคณะ (1992) เปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมซึ่งมีชนิดเดียวกันและปริมาณเท่ากัน คือ ฟรักโทส 5 กรดวาเลอริก 5 และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 20 กรัมต่อลิตร ติดตามการเติบโต หาปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร นาน 96 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 20 และ 21

ผลการวิจัยพบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตตามรายงานของ Doi และคณะ (1992) เปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 6.41 กรัมต่อลิตร (ในชั่วโมงที่ 84) และ 5.99 กรัมต่อลิตร (ในชั่วโมงที่ 60) ตามลำดับ ผลิตเทอร์พอลิเมอร์ได้สูงสุด 68.22 และ 35.23 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในชั่วโมงที่ 60) ตามลำดับ โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตตามรายงานของ Doi และคณะ (1992) สามารถผลิตเทอร์พอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์มากขึ้น และสามารถผลิตเทอร์พอลิเมอร์ที่มีสัดส่วน 4HB โมโนเมอร์ตั้งแต่ 46-86 โมลเปอร์เซ็นต์เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 48-96 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM สามารถผลิตเทอร์พอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์ได้สูงสุด 44 โมลเปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 60 สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารตลอดระยะเวลาการเลี้ยงในอาหารทั้ง 2 ชนิดไม่แตกต่างกัน

เนื่องจาก Asenjo และคณะ (1995) รายงานว่าปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตและฟอสเฟตจำกัดในอาหารเพื่อการผลิต จะมีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ ดังนั้นถึงแม้ว่าอาหารเพื่อการผลิตตามรายงานของ Doi และคณะ (1992)

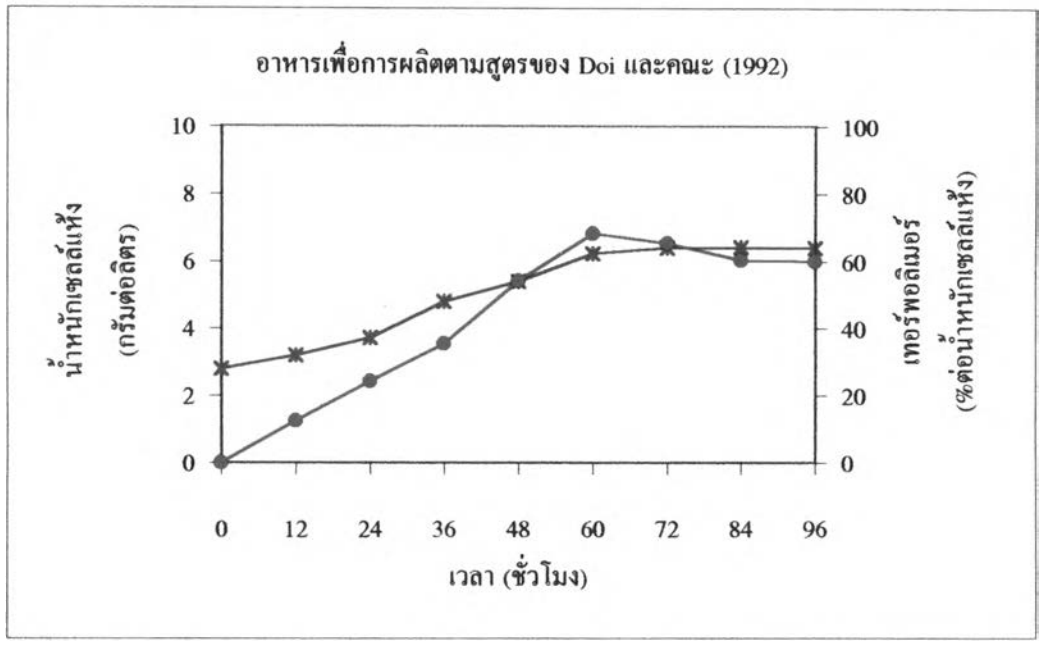
จะสามารถผลิตเทอร์พอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์สูงขึ้นและได้ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM แต่ยังมิได้ศึกษาผลต่อน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล เนื่องจากอาหารทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟตและฟอสเฟตไม่เท่ากัน ดังนั้นการศึกษาขั้นต่อไปจึงผลิตเทอร์พอลิเมอร์โดยเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารทั้ง 2 ชนิด แล้วนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและค่าการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล เพื่อศึกษาชนิดของอาหารเพื่อการผลิตที่เหมาะสมต่อการผลิตเทอร์ลิเมอร์ (ผลดังแสดงในข้อ 3.4.4)

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเพื่อการผลิต ตามรายงานของ Doi และคณะ (1992) เปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM (แหล่งคาร์บอนที่ใช้คือ ฟรักโทส 5 กรดวาเลอริก 5 และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 20 กรัมต่อลิตร)

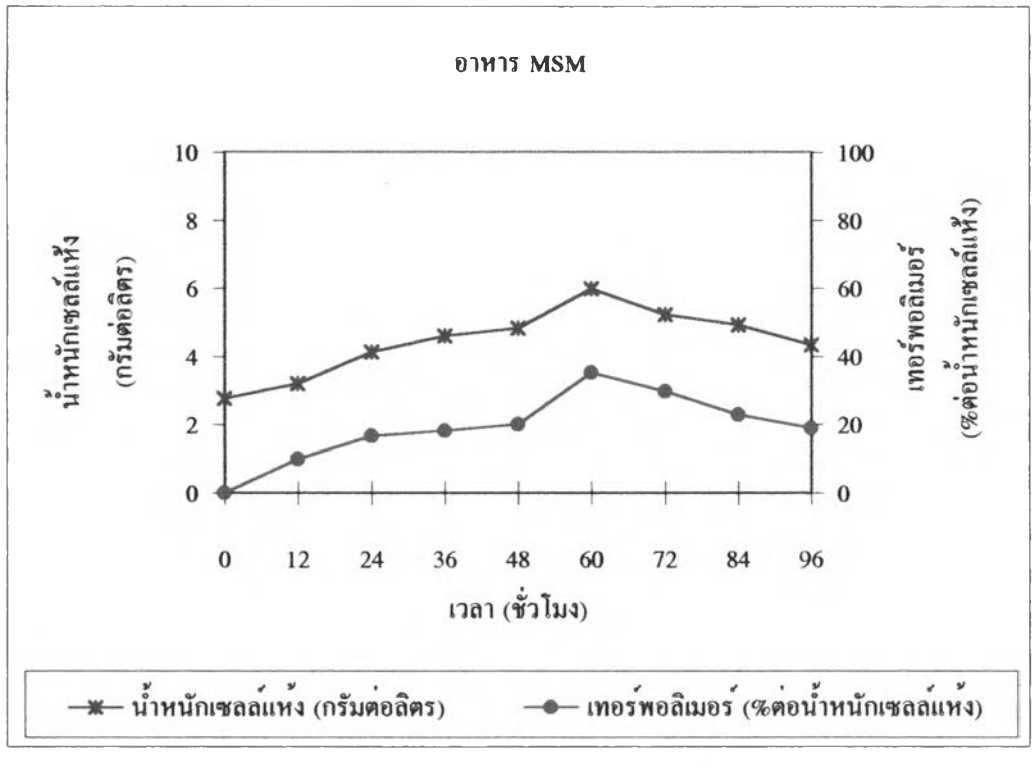
อาหารเพื่อการผลิตตามรายงานของ Doi และคณะ (1992)							
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์		สัดส่วน(โมลเปอร์เซ็นต์)			pH
		%ต่อ นน.เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV	4HB	
0	2.80	-	-	-	-	-	7.12
24	3.71	24.26	0.90	40	30	30	8.04
48	5.40	46.11	2.49	31	23	46	8.77
60	6.23	**68.22**	**4.25**	33	37	36	8.97
72	6.39	62.13	3.97	17	18	65	8.84
84	**6.41**	60.37	3.87	12	12	**71**	8.91
96	6.40	59.84	3.83	5	9	**86**	9.00

อาหาร MSM							
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์		สัดส่วน(โมลเปอร์เซ็นต์)			pH
		%ต่อ นน.เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV	4HB	
0	2.76	-	-	-	-	-	7.16
24	4.12	16.50	0.68	47	30	23	8.57
48	4.82	19.92	0.96	29	35	36	9.00
60	**5.99**	**35.23**	**2.11**	20	36	**44**	9.03
72	5.23	29.64	1.55	20	41	39	8.92
84	4.92	22.76	1.12	20	42	37	8.99
96	4.34	18.89	0.82	22	41	37	9.02

(ก)

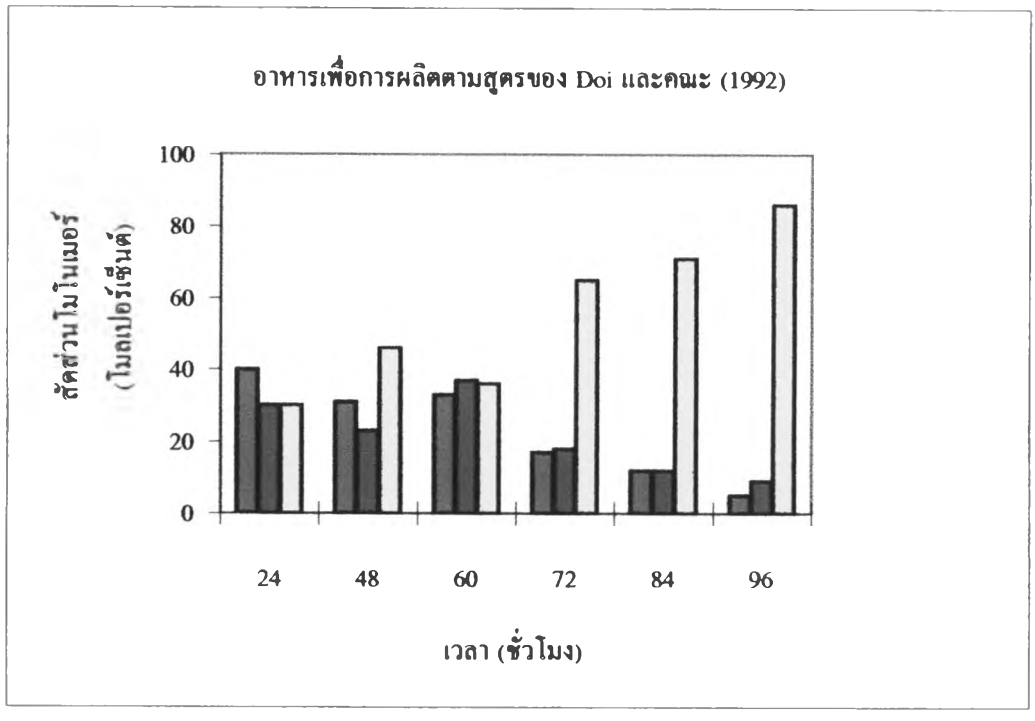


(ข)

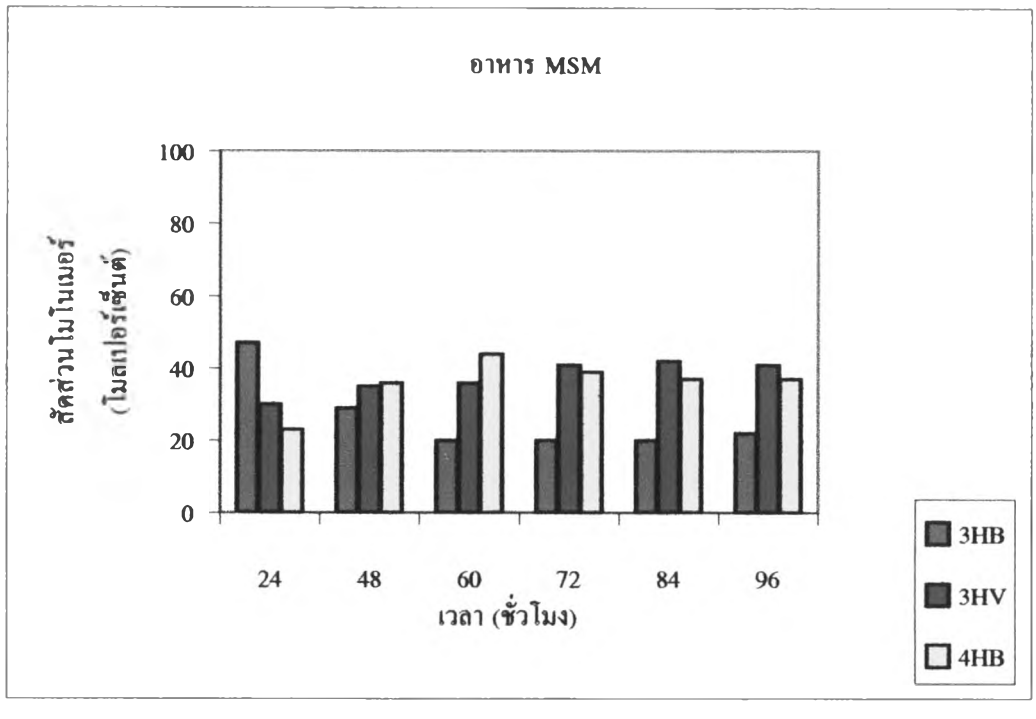


รูปที่ 20 เปรียบเทียบการเติบโต และปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-0 **ในอาหารเพื่อการผลิตตามสูตรของ Doi และคณะ (1992) (ก) กับ อาหาร MSM (ข)**

(ก)



(ข)



รูปที่ 21 แสดงสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเพื่อการผลิตตามสูตรของ Doi และ คณะ (1992) (ก) กับอาหาร MSM (ข)

3.2.3 ศึกษาการใช้ 1,4-บิวเทนไดออลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 4HB โมโนเมอร์ แทนโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เพื่อลดต้นทุนการผลิต

Kunioka และคณะ (1989) รายงานว่า *A.eutrophus* สามารถใช้ 1,4-บิวเทนไดออลซึ่งมีราคาถูกกว่าโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตประมาณ 4 เท่า เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 4HB โมโนเมอร์ (ดังแสดงในรูปที่ 6) ดังนั้นจึงทดลองใช้ 1,4-บิวเทนไดออล เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 4HB โมโนเมอร์ เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการศึกษาในภายหลังจากงานวิจัยการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ที่โมโนเมอร์แต่ละชนิดเป็นองค์ประกอบต่างกันมาทดสอบสมบัติด้านต่างๆ จากผลการทดลองข้อ 3.4.4 สรุปได้ว่าอาหารเพื่อการผลิตตามรายงานของ Doi และคณะ (1992) ไม่เหมาะต่อการนำมาใช้แทนอาหาร MSM เพราะถึงแม้ว่าจะได้ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าและได้สัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์สูงขึ้น แต่เทอร์พอลิเมอร์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่ำกว่า การศึกษาในขั้นนี้จึงศึกษาในอาหาร MSM เพียงชนิดเดียว

โดยเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหาร MSM ซึ่งเติมชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนดังนี้

ก อาหาร MSM เติม 1,4-บิวเทนไดออล 10 กรดวาเลอริก 5 และฟรักโทส 5 กรัมต่อลิตร (ปริมาณของแหล่งคาร์บอนรวม 20 กรัมต่อลิตร เท่ากับ อัญชนา ศุรติขจร, 2537)

ข อาหาร MSM เติม 1,4-บิวเทนไดออล 20 กรดวาเลอริก 5 และฟรักโทส 5 กรัมต่อลิตร (ปริมาณของแหล่งคาร์บอนรวม 30 กรัมต่อลิตร เท่ากับการทดลองข้อ 3.2.2)

ติดตามการเติบโต หาปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร นาน 96 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 12 รูปที่ 22 ถึง 23

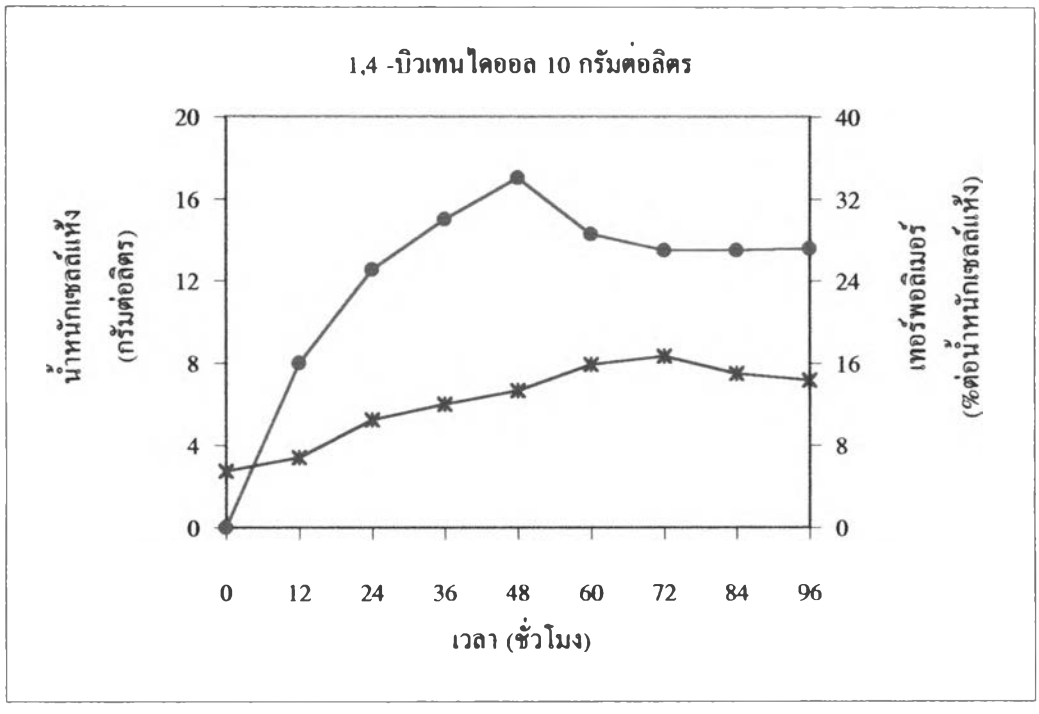
ผลการวิจัยพบว่า *Alcaligenes* sp. A-04 สามารถใช้ 1,4-บิวเทนไดออลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 4HB โมโนเมอร์ โดยเมื่อใช้ 1,4-บิวเทนไดออล 10 กรัมต่อลิตร (สูตร ก) และ 20 กรัมต่อลิตร (สูตร ข) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 8.34 และ 7.94 กรัมต่อลิตร (ในชั่วโมงที่ 72) ตามลำดับ ผลิตเทอร์พอลิเมอร์ได้สูงสุด 34.08 และ 33.77 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในชั่วโมงที่ 48) ตามลำดับ สัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์จะอยู่ในช่วง 50 ถึง 57 โมลเปอร์เซ็นต์ใกล้เคียงกัน ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อนาน 96 ชั่วโมง ยกเว้นในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งจะมีสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์มากกว่า (71 และ 78 โมลเปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อพบว่าไม่แตกต่างกันถึงแม้ในอาหารเพื่อการผลิตประกอบด้วยปริมาณ 1,4-บิวเทนไดออล ต่างกัน

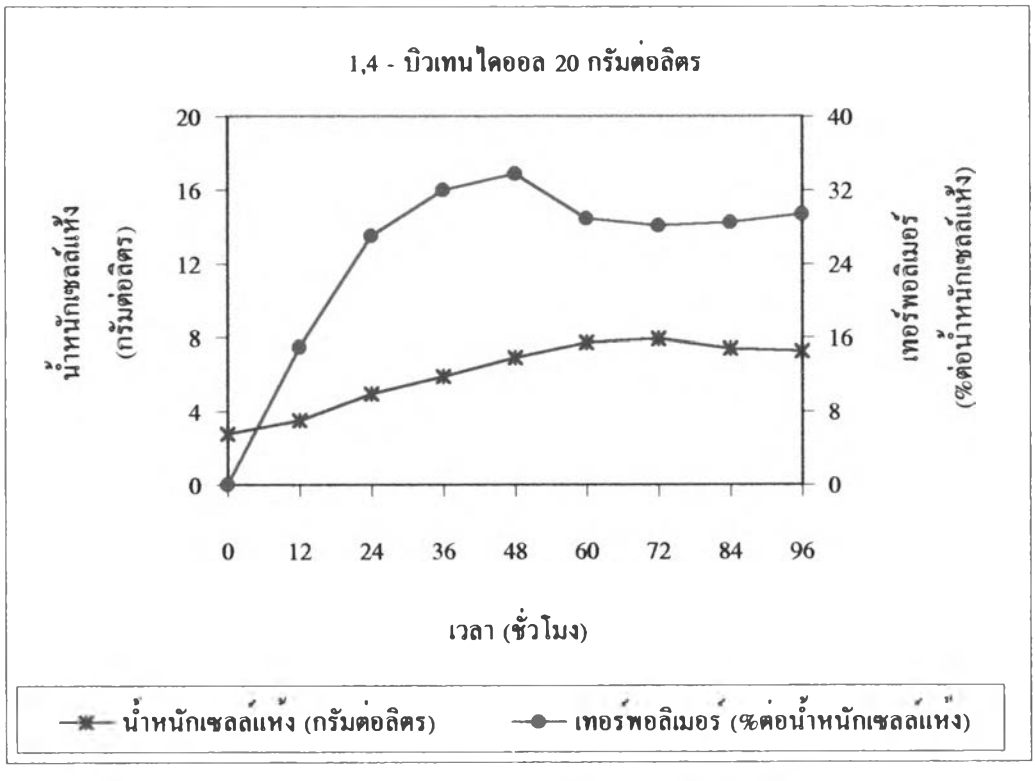
เนื่องจาก 1,4-บิวเทนไดออล เป็นสารที่ก่อให้เกิดการระคายเคืองจากการสัมผัสสาร และได้ทราบข้อมูลภายหลังการทดลองนี้ว่า เป็นพิษต่อไตและระบบประสาทของมนุษย์ (Merk index, 1990) ดังนั้นถึงแม้ว่า 1,4-บิวเทนไดออล จะเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกกว่า แต่ในการนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตนั้น จึงยังต้องมีการพิจารณาถึงความเหมาะสมต่อไป

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบการเติบโต ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร เมื่อใช้ 1,4-บิวเทนไดออล 10 และ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 4HB โมโนเมอร์ แทน โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

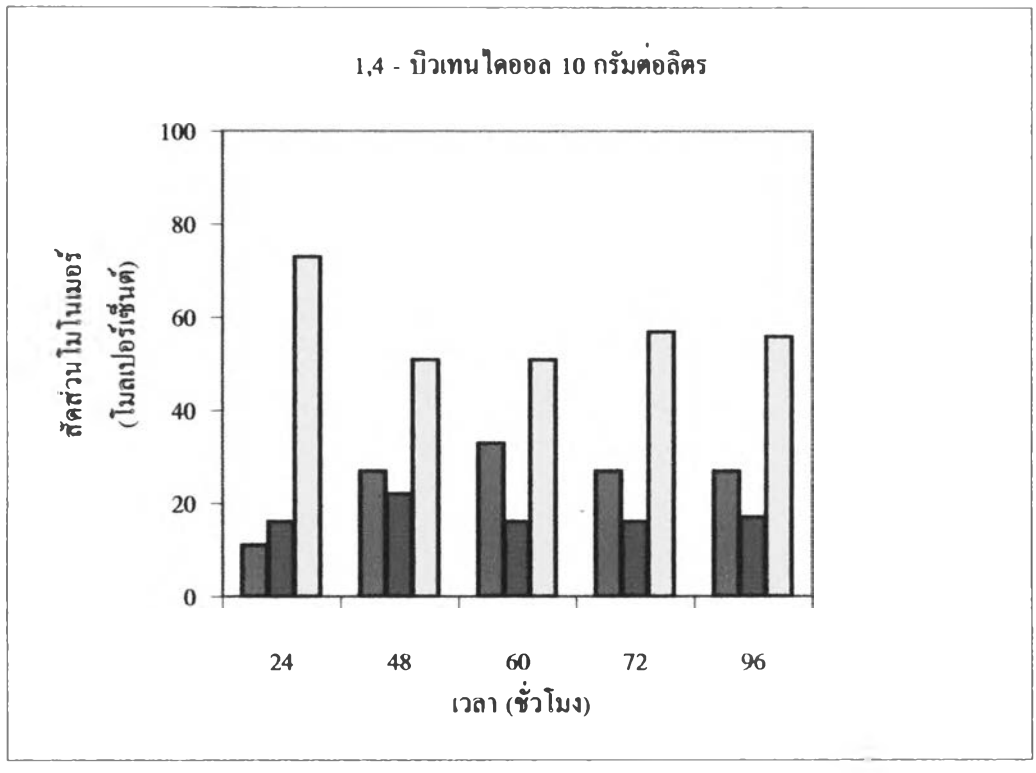
(1,4 - บิวเทนไดออล 10 กรัมต่อลิตร)							
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์		สัดส่วน(โมลเปอร์เซ็นต์)			pH
		%ต่อ นน.เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV	4HB	
0	2.76	-	-	-	-	-	7.11
24	5.26	25.09	1.32	11	16	73	8.35
48	6.66	**34.08**	**2.27**	27	22	51	8.31
60	7.92	28.54	2.26	33	16	51	8.55
72	**8.34**	26.97	2.25	27	16	57	8.92
96	7.18	27.16	1.95	27	17	56	8.34

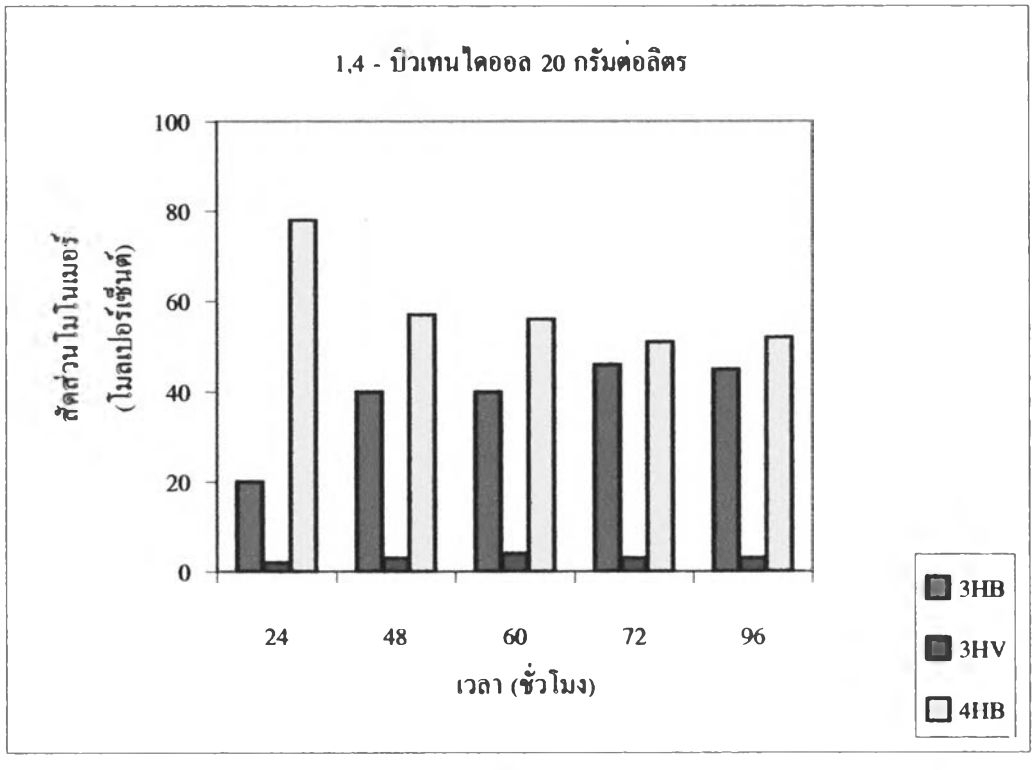
อาหาร MSM (1,4 - บิวเทนไดออล 20 กรัมต่อลิตร)							
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์		สัดส่วน(โมลเปอร์เซ็นต์)			pH
		%ต่อ นน.เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV	4HB	
0	2.79	-	-	-	-	-	7.15
24	4.97	26.96	1.34	20	2	78	8.29
48	6.93	**33.77**	**2.34**	40	3	57	8.45
60	7.72	28.89	2.23	40	4	56	8.67
72	**7.94**	28.09	2.23	46	3	51	8.86
96	7.28	29.53	2.15	45	3	52	8.20





รูปที่ 22 เปรียบเทียบการเติบโต และปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ เมื่อใช้ 1,4-บิวเทนไดออล เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับ 4HB โมโนเมอร์ แทนโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต





รูปที่ 23 แสดงสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ เมื่อใช้ 1,4-บิวเทนไดออลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 4HB โมโนเมอร์แทนโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

3.3 การศึกษาวิธีการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเพื่อการผลิตแบบ 2 ขั้นตอน

Doi (1990) รายงานการปรับปรุงวิธีการเลี้ยง *A.eutrophus* เพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) และ P(3HB-co-4HB) โดยวิธีการเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตแบบ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกโดยการนำกล้าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารและอายุที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.2 มาเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตซึ่งเติมฟรักโทสและแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณที่เหมาะสมต่อการเติบโต เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์เริ่มต้นให้เพียงพอต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ จากนั้นในขั้นตอนที่ 2 เป็นการเติมแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ ดังนั้นจึงศึกษาการผลิตเทอร์พอลิเมอร์โดยวิธีการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหาร MSM แบบ 2 ขั้นตอน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์เริ่มต้นในอาหาร MSM ให้มากพอ จึงไม่ต้องใช้วิธีการรวบรวมเซลล์โดยการปั่น ซึ่งเป็นวิธีที่สิ้นเปลืองอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ และขั้นตอนการปั่นเซลล์แล้วรวบรวมเซลล์โดยวิธีปลอดเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยาก

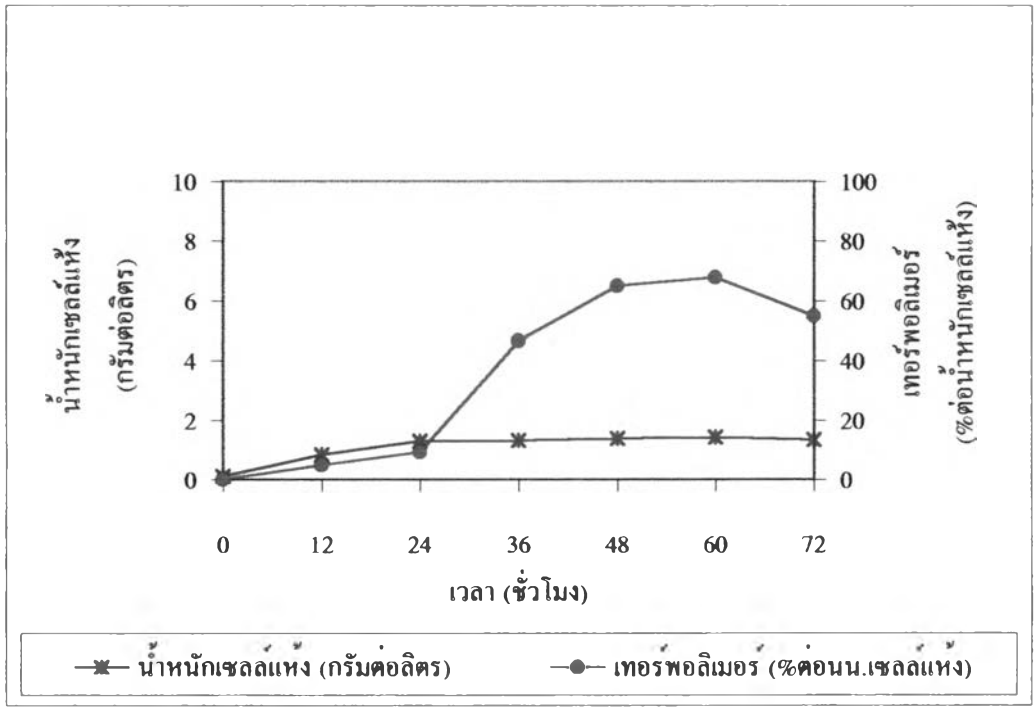
จากผลการทดลองข้อ 3.1.2 (ซึ่งเป็นการเตรียมกล้าเชื้อให้มีปริมาณเซลล์มากและคัดเลือกอายุกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงที่สุด) เลือก Alcaligenes sp. A-04 อายุกล้าเชื้อ 16 ชั่วโมง จากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อเติมฟรักโทส 3 และกรดวาเลอริก 1 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ในอาหาร MSM แบบ 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกนำกล้าเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ดังกล่าว มาเลี้ยงในอาหาร MSM (ตามวิธีการทดลองข้อ 4.3) ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์นาน 36 ชั่วโมง จากนั้นขั้นตอนที่ 2 เติมแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตเทอร์พอลิเมอร์และแอมโมเนียมซัลเฟต (อัตราส่วน 20 ต่อ 0.1 กรัมต่อลิตร) แหล่งคาร์บอนที่เติมคือ กรดวาเลอริก 10 และ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 10 กรัมต่อลิตร ส่วนแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ไม่ต้องเติมเนื่องจากในขั้นตอนแรกของการเพิ่มปริมาณเซลล์ได้เติมฟรักโทส ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์และพบว่าเชื้อมีการสร้างและสะสม PHB บ้างแล้ว นอกจากนี้กรดวาเลอริกและโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตยังสามารถถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB ได้ จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้เท่ากับ 7.00 ด้วยกรดและด่างที่ฆ่าเชื้อแล้ว ติดตามการเติบโต หาปริมาณเทอร์พอลิเมอร์คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง (และกรัมต่อลิตร) สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพื่อการผลิต ทุก 12 ชั่วโมง นาน 72 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 13 และรูปที่ 24 ถึง 25

ผลการวิจัยพบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 1.431 กรัมต่อลิตร ผลิตเทอร์พอลิเมอร์สูงสุด 67.83 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในชั่วโมงที่ 60) สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารก่อนเติมแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตเทอร์พอลิเมอร์ (ในชั่วโมงที่ 36) เท่ากับ 6.35 และปรับค่าความ

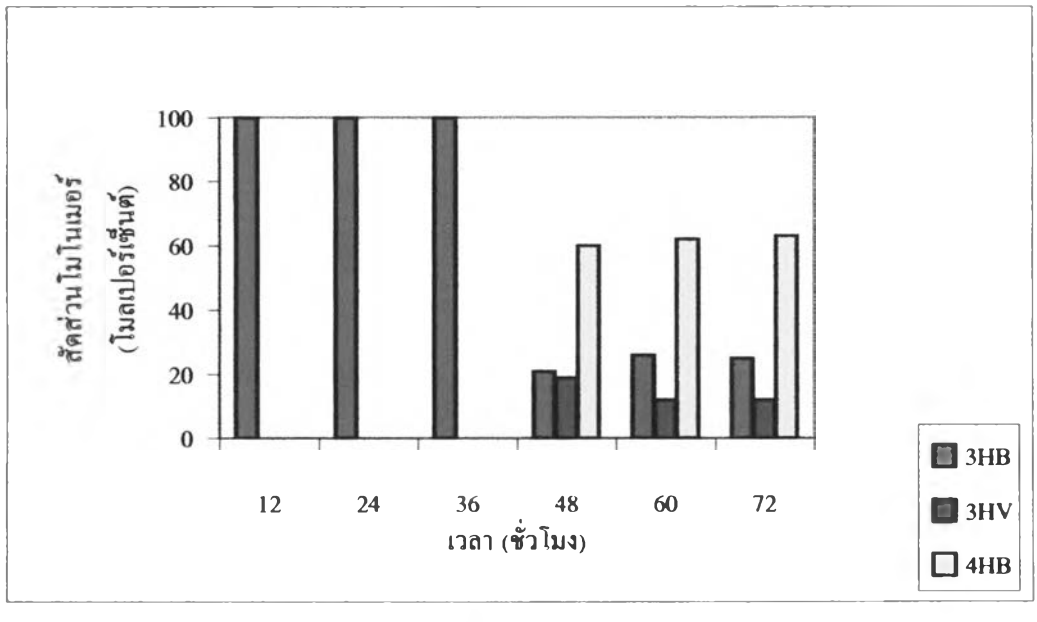
เป็นกรด-ด่างหลังการเติมแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตเทอร์พอลิเมอร์เท่ากับ 6.96 ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อนานขึ้นพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเปลี่ยนเป็นด่างมากขึ้น ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า จากการศึกษาการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อผลิตเทอร์พอลิเมอร์โดยวิธีการเลี้ยงในอาหาร MSM แบบ 2 ขั้นตอน มีผลให้ได้ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์รวมสูงสุดกว่าทุกการทดลอง (67.83 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) แต่น้ำหนักเซลล์แห้งยังไม่สูงพอจำเป็นต้องมีการปรับปรุงให้ได้ปริมาณเซลล์รวมสูงกว่านี้ เพื่อให้ได้ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์คิดเป็นกรัมต่อลิตรสูงขึ้น

ตารางที่ 13 การเติบโต ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp.A-04 ในอาหาร MSM แบบ 2 ขั้นตอน

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์		สัดส่วน(โมลเปอร์เซ็นต์)			pH
		%ต่อ นน.เซลล์แห้ง	กรัมต่อลิตร	3HB	3HV	4HB	
0	0.12	-	-	-	-	-	7.07
12	0.83	4.82	0.04	100	-	-	6.34
24	1.30	9.23	0.12	100	-	-	6.35
36	1.31	46.56	0.61	100	-	-	6.96
48	1.37	64.96	0.89	26	12	62	8.07
60	**1.43**	**67.83**	**0.97**	25	12	63	8.25
72	1.33	54.89	0.73	23	12	65	8.41



รูปที่ 24 การเติบโต และปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหาร MSM แบบ 2 ขั้นตอน



รูปที่ 25 สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหาร MSM แบบ 2 ขั้นตอน

3.4 การศึกษาลักษณะ สมบัติทางกายภาพ และเชิงกลของเทอร์พอลิเมอร์ที่มีโมโนเมอร์แต่ละชนิดเป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน

การนำเทอร์พอลิเมอร์ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ตรงตามวัตถุประสงค์นั้น จำเป็นต้องทราบลักษณะ สมบัติทางกายภาพ เคมี และเชิงกลของเทอร์พอลิเมอร์ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกผลิตเทอร์พอลิเมอร์ให้มีลักษณะ และสมบัติด้านต่างๆตามที่ต้องการ ดังนั้นจึงผลิตเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 ซึ่งแปรสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ตามที่ได้มีงานวิจัยทางด้านโคพอลิเมอร์ถึงความเหมาะสม เพื่อให้เทอร์พอลิเมอร์มีสมบัติที่ดีเหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้งานได้หลายด้าน (เท่าที่ค้นคว้าเอกสารเรื่องสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่เหมาะสมในแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบของเทอร์พอลิเมอร์ ยังไม่พบว่ามีรายงานไว้) โดยกำหนดให้เทอร์พอลิเมอร์มีสัดส่วนของ 3HV โมโนเมอร์ไม่เกิน 40 โมลเปอร์เซ็นต์ และสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์ไม่ต่ำกว่า 40 โมลเปอร์เซ็นต์ เพื่อให้เทอร์พอลิเมอร์มีความใส เหนียว และยืดหยุ่นคล้ายยาง นอกจากนี้ 4HB โมโนเมอร์ยังมีผลต่อการเพิ่มอัตราการถูกย่อยสลาย สำหรับ 3HB โมโนเมอร์นั้นจะช่วยเสริมความแข็งแรง และทำให้มีจุดหลอมเหลวสูงขึ้น แต่เนื่องจาก 3HB โมโนเมอร์สามารถสังเคราะห์ได้ทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม ซึ่งยากแก่การควบคุม สัดส่วนของ 3HB โมโนเมอร์ จึงเป็นสัดส่วนที่มิได้กำหนด แต่เป็นสัดส่วนที่แปรผันตามภาวะที่ทำให้ได้สัดส่วนของ 3HV และ 4HB โมโนเมอร์ที่เป็นหลัก

3.4.1 การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) โดย *Alcaligenes* sp. A-04

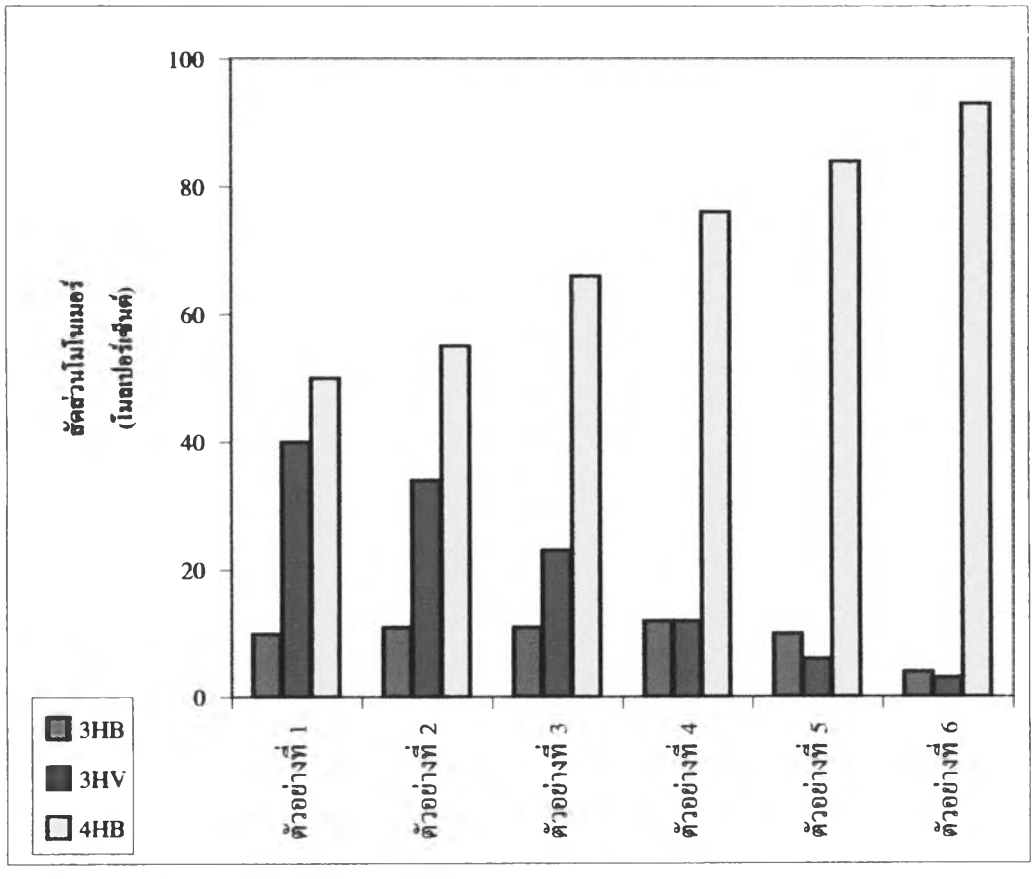
เลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเพื่อการผลิต โดยชนิดของอาหาร ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 14 วิเคราะห์สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 15 และรูปที่ 26 สังเกตได้ว่าถ้ามีปริมาณกรดวาเลอริกสูง จะทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งต่ำ เช่น อาหาร MSM ที่เติมกรดวาเลอริก 10 กรัมต่อลิตร ในสูตรที่ 1 2 และ 4 (ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 3.26 5.15 และ 6.8 ตามลำดับ)

ตารางที่ 14 ภาวะในการผลิตเทอร์พอลิเมอร์โดย *Alcaligenes* sp. A-04 โดยแปรผัน ชนิดของอาหารเพื่อการผลิต ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตและระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้สัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ต่างๆกัน

อาหาร เพื่อการผลิต	แหล่งคาร์บอน (กรัมต่อลิตร)				$(NH_4)_2SO_4$ (กรัมต่อลิตร)	เวลา (ชั่วโมง)
	ฟรักโทส	บิวทิริก	วาเลอริก	4HB(Na)		
1 MSM	-	-	10	10	0.1	60
2 MSM	-	5	10	5	0.1	60
3 MSM	5	-	5	20	0.1	60
4 MSM	5	-	10	5	0.1	60
5 Doi (1992)	5	-	5	20	2	60
6 Doi (1992)	5	-	5	20	2	96

ตารางที่ 15 สัดส่วนของโมโนเมอร์แต่ละชนิด น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหารเพื่อการผลิต (โดยมีชนิดของอาหาร ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตและระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 14)

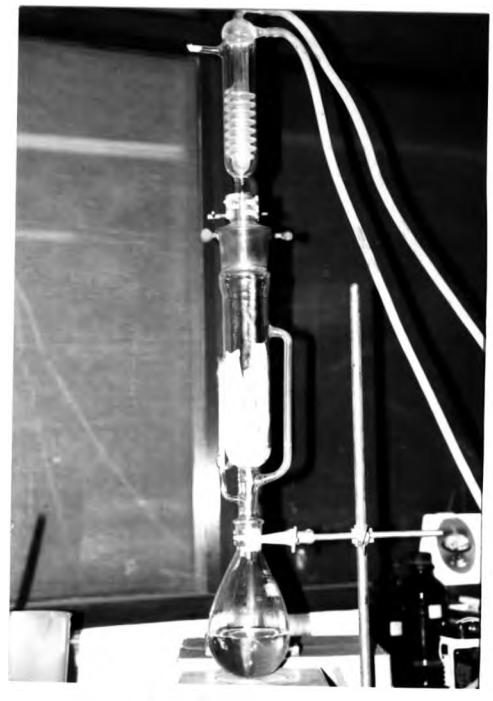
อาหาร	สัดส่วน(โมลเปอร์เซ็นต์)			น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์	
	3HB	3HV	4HB		%ต่อ นน.เซลล์แห้ง	(กรัมต่อลิตร)
1	10	40	50	3.26	26.07	0.85
2	11	34	55	5.15	33.59	1.73
3	11	23	66	7.55	32.05	2.42
4	12	12	76	6.8	33.82	2.3
5	10	6	84	7.02	69.05	4.85
6	4	3	93	9.55	63.36	6.07



รูปที่ 26 เทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ที่มีสัดส่วนแต่ละโมโนเมอร์แตกต่างกัน เพื่อศึกษาลักษณะ สมบัติทางกายภาพและเชิงกล

3.4.2 การปรับปรุงขั้นตอนการสกัดและการทำให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์

เนื่องจากในงานวิจัยที่ผ่านมาได้ใช้วิธีการสกัด PHA โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ซึ่งเป็นวิธี chemical digestion วิธีหนึ่ง แล้วจึงทำให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนลำดับส่วนในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ อะซิโตน เอทธานอล ไดเอทธิลอีเทอร์ และเมทธานอล ซึ่งทำให้สูญเสียสารผลิตภัณฑ์ไปในแต่ละลำดับขั้นตอนและสิ้นเปลืองสารเคมี นอกจากนี้โซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็นสารเคมีที่มีความรุนแรงสามารถทำลายพันธะของพอลิเมอร์ให้เป็นสายสั้นๆ ซึ่งมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิเมอร์ต่ำลงและมีค่าการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลกว้างขึ้น Brandl และคณะ (1990) รายงานว่าวิธีใช้คลอโรฟอร์มในการสกัด PHA จากเซลล์จุลินทรีย์ สามารถสกัด PHA ที่มี M_w เท่ากับ 1.5×10^6 M_n เท่ากับ 1.1×10^6 และ PDI เท่ากับ 1.4 ในขณะที่วิธีใช้สารละลายโซเดียม-ไฮโปคลอไรท์สกัด PHA ได้ M_w เท่ากับ 0.94×10^6 M_n เท่ากับ 0.37×10^6 PDI เท่ากับ 2.5 ดังนั้นจึงศึกษาวิธีการสกัดและทำให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์โดยใช้ soxhlet apparatus (ดังแสดงในรูปที่ 27 และรูปที่ 28) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ คลอโรฟอร์มสกัดเทอร์พอลิเมอร์ออกจากเซลล์โดยใช้หมุนเวียนในการสกัดได้หลายครั้ง แล้วใช้เฮกเซนในการตกตะกอนเพื่อทำให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ (Doi, 1996) จึงเป็นวิธีที่สามารถลดต้นทุนจากขั้นตอนการทำให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ และเป็นวิธีที่ได้ปริมาณสารผลิตภัณฑ์สุทธิประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณสารผลิตภัณฑ์เริ่มต้นภายในเซลล์



สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชุดเครื่องมือ soxhlet apparatus

1. เซลล์ *Alcaligenes* sp. A-04 ซึ่งถูกทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ

2. บรรจุเซลล์แห้งลงในถุงกระดาษกรอง แล้วใส่ในส่วน extraction สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

รูปที่ 27 การสกัดเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-4HB) ออกจากเซลล์ *Alcaligenes* sp. A-04 โดยการใช้คลอโรฟอร์มหมุนเวียนในการสกัด ด้วยชุด soxhlet apparatus

3. สารละลายเทอร์พอลิเมอร์
ภายหลังการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

4. นำแผ่นฟิลม์มาทำให้บริสุทธิ์
โดยการตกตะกอนด้วยเฮกเซน

5. ตัวอย่างลักษณะของสารเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB)บริสุทธิ์
ซึ่งมีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติกสามารถขึ้นรูปตามแบบของแม่พิมพ์ได้
(ในภาพ คือ ลักษณะของเทอร์พอลิเมอร์จากแม่พิมพ์บีกเกอร์)

รูปที่ 28 ลักษณะของสารผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยเฮกเซน

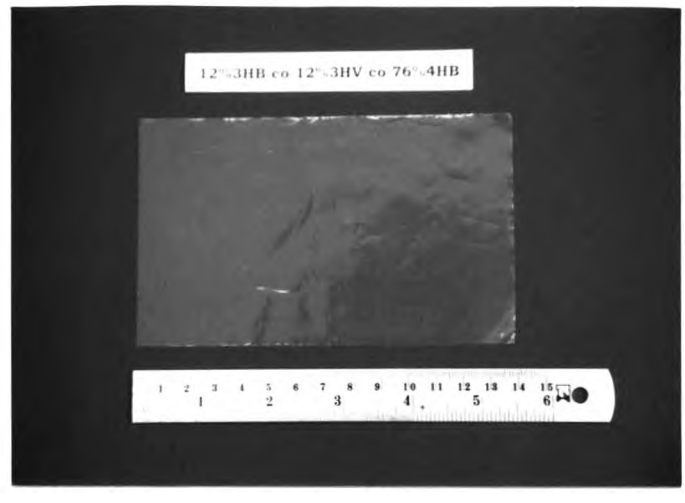
3.4.3 ลักษณะของแผ่นฟิล์มเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ที่มีสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์แตกต่างกัน

เมื่อสกัดและทำให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์แล้ว จึงนำสารเทอร์พอลิเมอร์บริสุทธิ์มาเตรียมเป็นแผ่นฟิล์มโดยวิธี solvent casting (ตามวิธีทดลองในข้อ 14) พบว่าเทอร์พอลิเมอร์สามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกันในคลอโรฟอร์ม เมื่อมีความเข้มข้นของปริมาณเทอร์พอลิเมอร์มากขึ้นจะมีลักษณะเป็นเจลเหนียวและใส ลักษณะแผ่นฟิล์มของเทอร์พอลิเมอร์ภายหลังการขึ้นรูปโดยวิธีนี้ แสดงในรูปที่ 29 พบว่า เทอร์พอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV โมโนเมอร์เท่ากับ 40 โมลเปอร์เซ็นต์ มีลักษณะใส ขึ้นรูปได้ง่าย แผ่นฟิล์มมีความอ่อนตัว สามารถคงรูปได้ดี ลักษณะคล้ายแผ่นใส (transparency film) เมื่อมีสัดส่วนของ 3HV โมโนเมอร์ลดลง (30 ถึง 20 โมลเปอร์เซ็นต์) และมีสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์เพิ่มขึ้น (50 ถึง 70 โมลเปอร์เซ็นต์) พบว่าแผ่นฟิล์มมีลักษณะใสแต่ไม่โปร่งแสงและมีความอ่อนนิ่มมากขึ้น สามารถขึ้นรูปได้ง่าย แผ่นฟิล์มเทอร์พอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 3HV โมโนเมอร์เท่ากับ 12 โมลเปอร์เซ็นต์ และมีสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์เท่ากับ 76 โมลเปอร์เซ็นต์ มีลักษณะที่พิเศษคือ เมื่อขึ้นรูปให้แผ่นฟิล์มมีความหนาน้อยกว่า 0.25 มิลลิเมตรจะมีลักษณะใส อ่อนนิ่ม เหนียว และมีความยืดหยุ่น ลักษณะคล้ายแผ่นฟิล์มถนอมอาหาร แต่เมื่อขึ้นรูปให้มีความหนามากกว่า 0.25 มิลลิเมตร แผ่นฟิล์มจะทึบแสงมากขึ้นมีความเหนียวลดลง และยังคงสามารถขึ้นรูปได้ง่าย สำหรับเทอร์พอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์สูงกว่า 84 โมลเปอร์เซ็นต์ จะมีลักษณะใสแต่ไม่โปร่งแสง มีความอ่อนนิ่มและยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น (มากกว่าแผ่นฟิล์มที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด) เมื่อทดสอบโดยการดึงแผ่นฟิล์มพบว่าจะยืดตัวออกตามแนวแรงการดึงและมีความยืดหยุ่นเล็กน้อย ใช้เวลาในการขึ้นรูปนานมากขึ้น แผ่นฟิล์มทั้งหมดที่ผลิตได้ไม่มีสีหรือกลิ่น สามารถตัดด้วยกรรไกรหรือมีดได้ขอบที่เรียบลักษณะคล้ายถุงพลาสติกชนิดถุงเย็น ซึ่งลักษณะภายนอกดังกล่าวเป็นผลจากความเป็นระเบียบของโครงสร้างของโมเลกุลและความสามารถในการเกิดผลึกของแต่ละโมโนเมอร์ ผลจากการศึกษาลักษณะของแผ่นฟิล์มในการทดลองนี้สรุปได้ว่า เทอร์พอลิเมอร์มีลักษณะคล้ายพลาสติกยืดหยุ่น เพราะมีความเหนียว อ่อนนิ่ม นอกจากนี้บางชนิดยังมีลักษณะคล้ายพลาสติกอิลาสติกเนื่องจากเมื่อออกแรงดึงจะสามารถหดตัวกลับได้เล็กน้อย แต่ลักษณะเหล่านี้ยังไม่เพียงพอสำหรับเป็นข้อมูลในการนำไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นจึงนำแผ่นฟิล์มเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) ที่ผลิตได้ดังกล่าวไปศึกษาสมบัติด้านต่างๆต่อไป

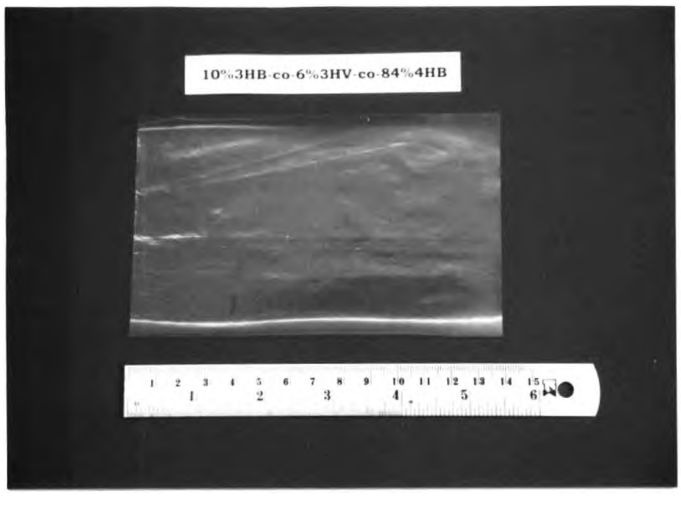
1. P(10%3HB-co-40%3HV-co-50%4HB)

2. P(11%3HB-co-34%3HV-co-55%4HB)

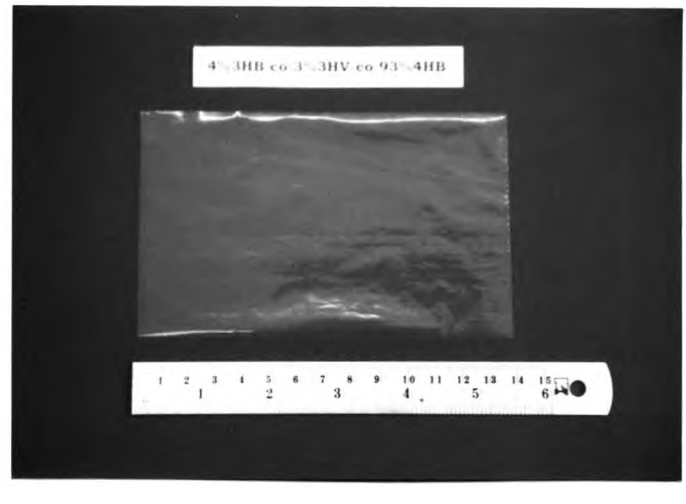
3. P(11%3HB-co-23%3HV-co-66%4HB)



4. P(12%3HB-co-12%3HV-co-76%4HB)



5. P(10%3HB-co-6%3HV-co-84%4HB)



6. P(4%3HB-co-3%3HV-co-93%4HB)

รูปที่ 29 ลักษณะของแผ่นฟิลมเทอรพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์แต่ละชนิดต่างๆกัน

3.4.4 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) อุณหภูมิหลอมเหลว และอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน ของเทอร์พอลิเมอร์

อุณหภูมิหลอมเหลวและอุณหภูมิกลาสทรานซิชันของพอลิเมอร์มีความสำคัญอย่างมากในการนำพอลิเมอร์ไปใช้ประโยชน์รวมทั้งวิธีการขึ้นรูป พอลิเมอร์จะมีอุณหภูมิกลาส-ทรานซิชันต่ำกว่าอุณหภูมิหลอมเหลวเสมอ เมื่อพอลิเมอร์ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน พอลิเมอร์จะมีสมบัติแข็งและเปราะคล้ายแก้ว เมื่อได้รับความร้อนสูงกว่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน พอลิเมอร์จะมีลักษณะยืดหยุ่นคล้ายยาง จนกระทั่งได้รับความร้อนสูงกว่าอุณหภูมิหลอมเหลวจึงเปลี่ยนสถานะเป็นของเหลว ดังนั้นพอลิเมอร์ที่มีอุณหภูมิกลาสทรานซิชันต่ำกว่าอุณหภูมิห้องจึงมีลักษณะอ่อนนิ่ม และยืดหยุ่นคล้ายยาง โดยพอลิเมอร์จะมีสมบัติเป็นยางเมื่อมีอุณหภูมิกลาสทรานซิชันในช่วง - 50 ถึง -75 องศาเซลเซียส เมื่อนำเทอร์พอลิเมอร์ไปวิเคราะห์หาค่าอุณหภูมิหลอมเหลว และอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 15.2 ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 16 พบว่าเมื่อเทอร์พอลิเมอร์มีสัดส่วนของ 4HB เพิ่มขึ้นจะมีค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชันลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kunioka และ Doi (1989) ที่พบว่า 4HB โมโนเมอร์จะมีผลไปลดค่าอุณหภูมิหลอมเหลว และค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชันของโคพอลิเมอร์ ทำให้เมื่อมีสัดส่วน4HB โมโนเมอร์เพิ่มขึ้น P(3HB-co-4HB) จึงมีสมบัติยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ซึ่งสังเกตเพบว่าเมื่อเทอร์พอลิเมอร์มีสัดส่วน 4HB โมโนเมอร์เพิ่มขึ้น แผ่นฟิล์มจะมีสมบัติอ่อนนิ่มมากขึ้นไปจนถึงยืดหยุ่นคล้ายยาง สำหรับค่าอุณหภูมิหลอมเหลวของเทอร์พอลิเมอร์พบว่า เมื่อเทอร์พอลิเมอร์มีสัดส่วนของ 4HB เพิ่มขึ้น อุณหภูมิหลอมเหลวจะลดลง และพบว่า เมื่อเทอร์พอลิเมอร์มีสัดส่วนของ 4HB เท่ากับ 50 โมลเปอร์เซ็นต์อุณหภูมิหลอมเหลวกลับต่ำกว่าเทอร์พอลิเมอร์มีสัดส่วนของ 4HB เท่ากับ 55 โมลเปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเป็นผลจาก 3HV โมโนเมอร์ เนื่องจากมีสัดส่วนระหว่าง 4HB กับ 3HV ไม่แตกต่างอย่างชัดเจน และ Doi (1990) รายงานว่าพอลิเมอร์จะมีอุณหภูมิหลอมเหลวต่ำสุดเท่ากับ 75 องศาเซลเซียส เมื่อมีสัดส่วนของ 3HV โมโนเมอร์เท่ากับ 40 โมลเปอร์เซ็นต์ งานวิจัยนี้พบว่าเทอร์พอลิเมอร์มีอุณหภูมิหลอมเหลวต่ำสุดประมาณ 54 องศาเซลเซียส เมื่อมีสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์มากกว่า 84 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Kunioka (1989) รายงานว่า P(3HB-co-4HB) ที่มีสัดส่วน 4HB โมโนเมอร์มากกว่า 60 โมลเปอร์เซ็นต์จะมีอุณหภูมิหลอมเหลวประมาณ 50 องศา-เซลเซียส

ตารางที่ 16 ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว และอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน ของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์แตกต่างกัน

สัดส่วน(โมลเปอร์เซ็นต์)			อุณหภูมิหลอมเหลว	อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน
3HB	3HV	4HB	(°c)	(°c)
10	40	50	87.6	-13.7
11	34	55	**99.9**	-15.9
11	23	66	91.8	-17.7
12	12	76	87.3	-21.1
10	6	84	54.3	-47.1
4	3	93	54.8	**-51.6**

น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมโลกุลของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Alcaligenes* sp. A-04

ผลจากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล ด้วยเครื่อง GPC (ตามวิธีการทดลองในข้อ 15.1) ดังแสดงในตารางที่ 17 พบว่า สามารถผลิตเทอร์พอลิเมอร์ได้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยสูงสุด คือ P(10%3HB-co-40%3HV-co-40%4HB) $M_w = 1.1 \times 10^6$ $M_n = 9.67 \times 10^5$ และมีค่า PDI = 1.13 (ซึ่งแสดงว่าขนาดโมเลกุลของสายพอลิเมอร์มีความใกล้เคียงกัน) เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหาร MSM ซึ่งเติมแหล่งคาร์บอนเป็น กรดวาเลอริก 10 และ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 10 กรัมต่อลิตร โดยไม่เสริมแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์

การศึกษาผลของชนิดแหล่งคาร์บอนเสริมสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ต่อน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของเทอร์พอลิเมอร์ พบว่าเมื่อเสริมฟรักโทสหรือกรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยใกล้เคียงกัน ($M_w = 5.51 \times 10^5$ และ 5.98×10^5 ตามลำดับ) แต่ได้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่ำกว่าเมื่อไม่เสริมแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไม่ต้องเสริมแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ในการผลิตเมอร์พอลิเมอร์ เพราะภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เสริมแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ ได้ปริมาณเทอร์พอลิเมอร์สูงกว่าแต่มี 3HB โมโนเมอร์ประกอบอยู่น้อยกว่า (โดยสัดส่วนของ 3HB โมโนเมอร์ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อด้วย) ซึ่งการไม่เสริมแหล่งคาร์บอนสำหรับ 3HB โมโนเมอร์ นอกจากมีข้อดีทำให้เทอร์พอลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยสูงขึ้น ยังสามารถลดชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตอีกด้วย ซึ่งการแปรสัดส่วนของแหล่งคาร์บอน 2 ชนิดเพื่อผลิตเทอร์พอลิเมอร์ให้มีสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ต่างๆกันสามารถทำได้ง่ายกว่าการแปรสัดส่วนจากแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด

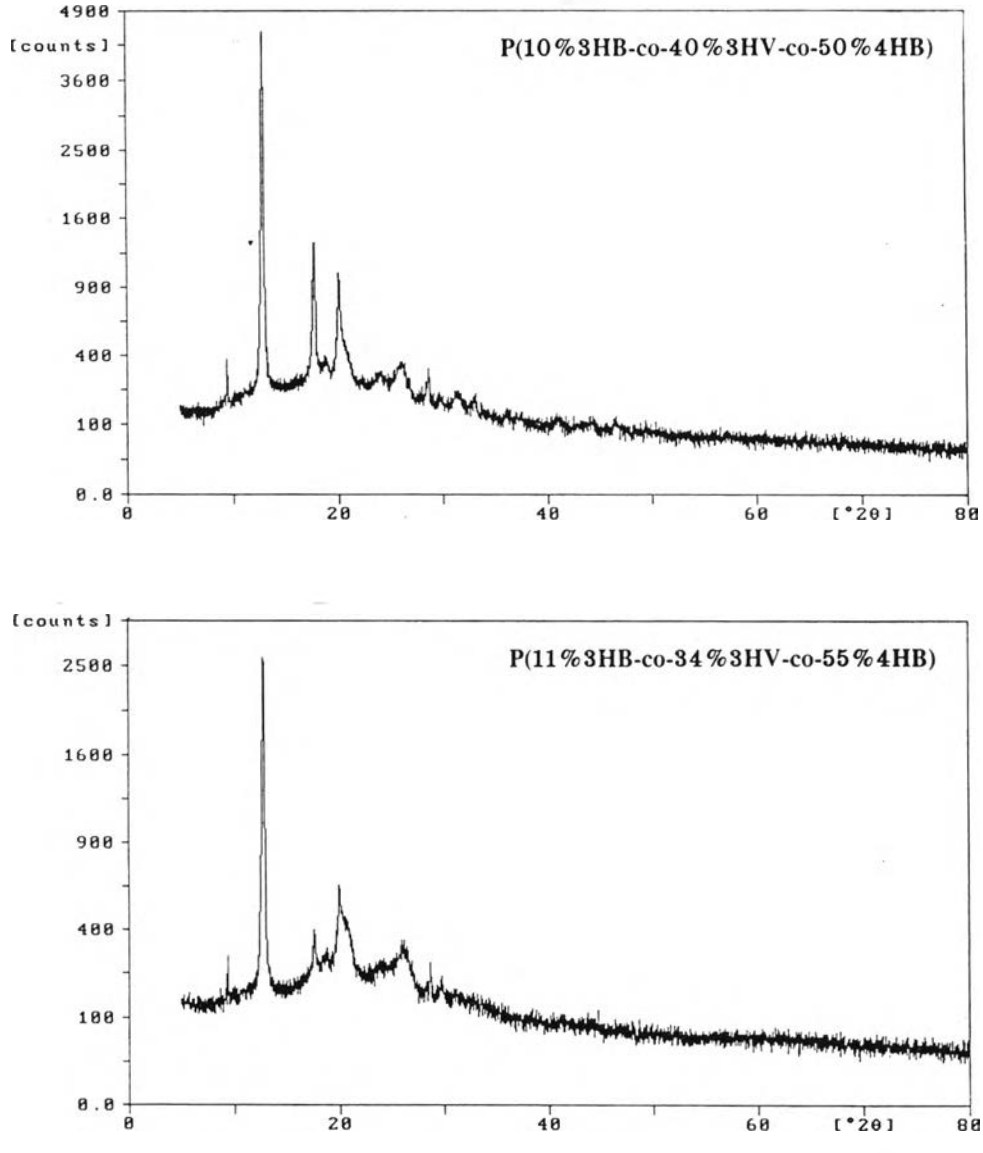
ผลจากการหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของเทอร์พอลิเมอร์ที่ผลิตโดยการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. A-04 ในอาหาร MSM เปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตตามรายงานของ Doi และคณะ (1992) พบว่าอาหาร MSM ได้เทอร์พอลิเมอร์ที่มี M_w มากกว่า (1.10×10^6 5.98×10^5 6.62×10^5 และ 5.51×10^5 ตามลำดับ) อาหารเพื่อการผลิตตามรายงานของ Doi และคณะ (1992) (4.15×10^5 และ 1.77×10^5) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอาหารเพื่อการผลิตตามรายงานของ Doi และคณะ (1992) ไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นอาหารเพื่อการผลิตเทอร์พอลิเมอร์แทนอาหาร MSM เพราะทำให้เทอร์พอลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยต่ำ

ตารางที่ 19 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์แตกต่างกัน

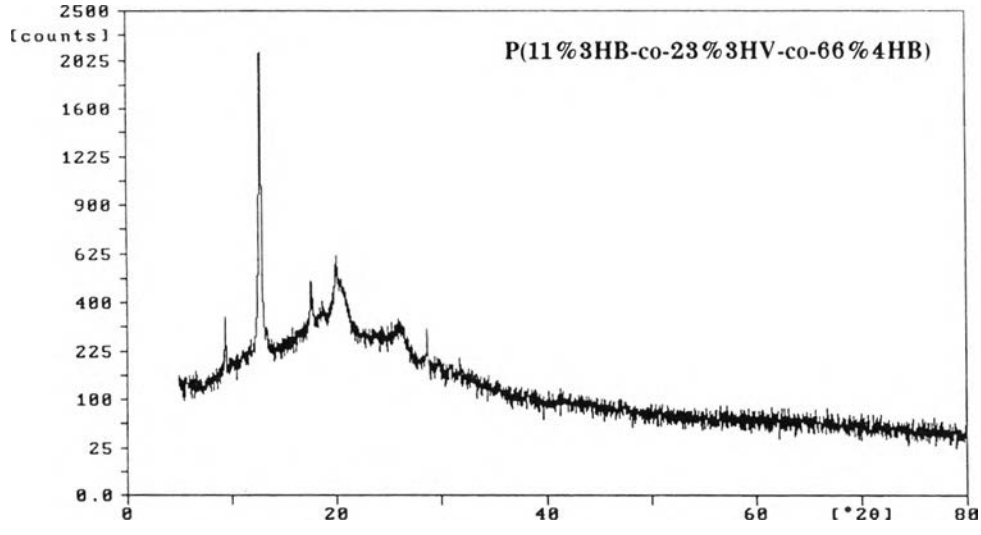
อาหารเพื่อการผลิต	สัดส่วน (โมลเปอร์เซ็นต์)			น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย		PDI
	3HB	3HV	4HB	M_w	M_n	
MSM	10	40	50	**1.10×10^{6}**	**9.67×10^{5}**	**1.13**
MSM	11	34	55	5.98×10^{5}	2.99×10^{5}	2.00
MSM	11	23	66	6.62×10^{5}	1.90×10^{5}	3.46
MSM	12	12	76	5.51×10^{5}	1.73×10^{5}	3.18
Doi (1992)	10	6	84	1.77×10^{5}	6.27×10^{4}	2.82
Doi (1992)	4	3	93	4.15×10^{5}	1.33×10^{5}	3.11

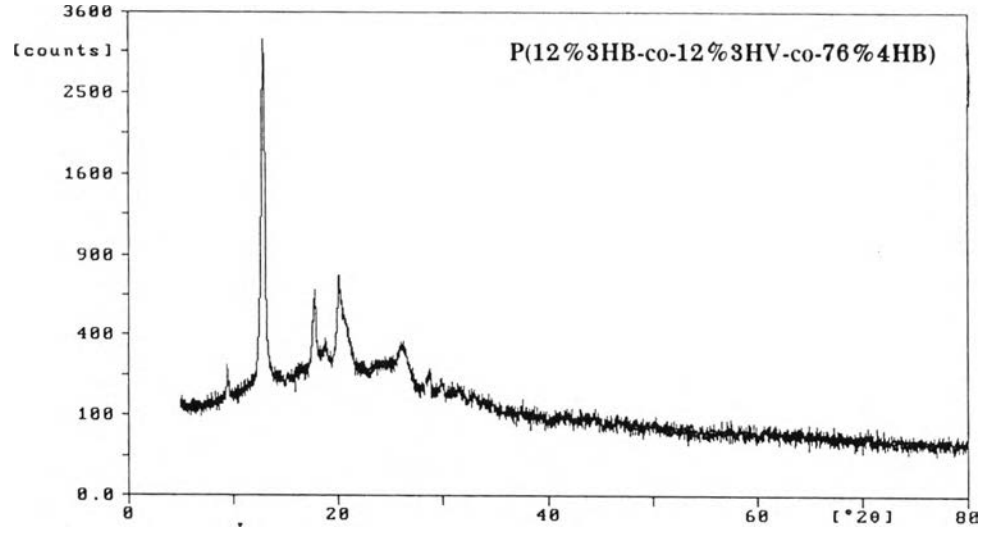
การศึกษาเปรียบเทียบระดับความเป็นผลึก ของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ที่มีสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ต่างกัน

เมื่อนำแผ่นฟิล์มเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) ที่ผลิตได้ ไปศึกษาเปรียบเทียบระดับความเป็นผลึกโดยวิธี XRD ตามวิธีการทดลองในข้อ 15.4 ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 30 พบว่าเทอร์พอลิเมอร์ P(10%3HB-co-40%3HV-co-50%4HB) มีความเป็นผลึกมากกว่าเทอร์พอลิเมอร์ชนิดอื่น

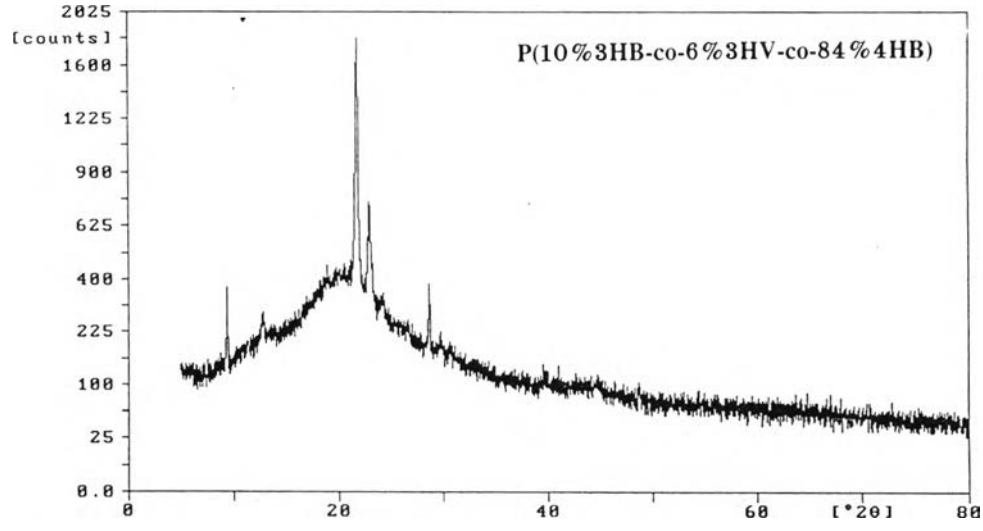


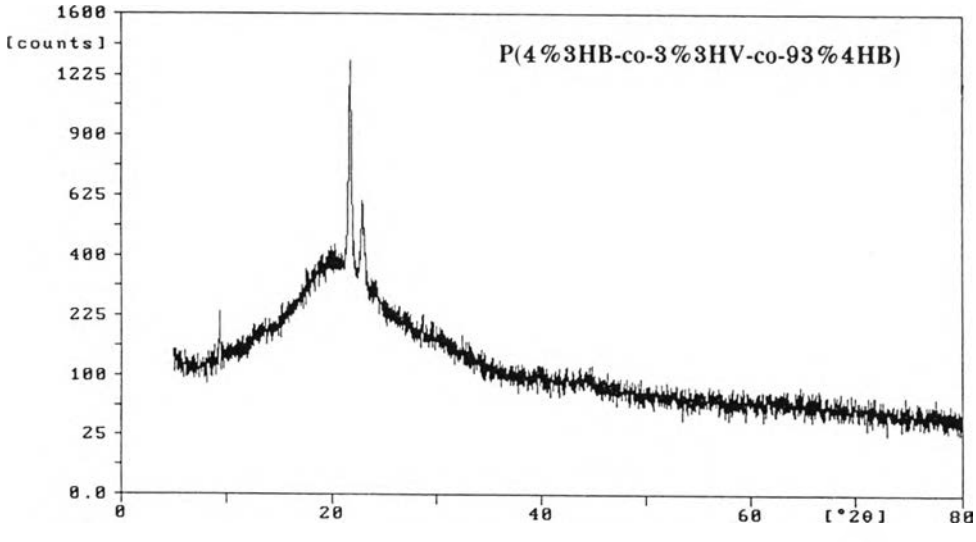
รูปที่ 30 เปรียบเทียบโครมาโตแกรมแสดงระดับความเป็นผลึกของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี XRD





รูปที่ 30 (ต่อ) เปรียบเทียบโครมาโตแกรมแสดงระดับความเป็นผลึกของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอร์แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี XRD





รูปที่ 30 (ต่อ) เปรียบเทียบโครมาโตแกรมแสดงระดับความเป็นผลึกของเทอรพอลิเมอร P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ที่มีสัดส่วนของโมโนเมอรแตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี XRD

3.4.5 การศึกษาสมบัติเชิงกลของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก *Alcaligenes* sp. A-04 ที่มีสัดส่วนโมโนเมอร์แตกต่างกัน

เมื่อเตรียมแผ่นฟิล์มเทอร์พอลิเมอร์และนำไปทดสอบสมบัติเชิงกลด้วยเครื่อง Instron testing machine ตามวิธีการทดลองข้อ 15.3 (ASTM D882-91) เปรียบเทียบกับพลาสติกจากปิโตรเคมี ได้แก่ ถุงร้อนชนิดขุ่นและใส ถุงเย็นชนิด LDPE และถุงหูหิ้วชนิดเสื่อมสภาพได้ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ดังแสดงในตารางที่ 18 ค่าที่ทดสอบได้แก่ ความเหนียว (toughness, MPa) ระยะยืดของแผ่นฟิล์มเมื่อถูกดึงจนขาดซึ่งคำนวณในรูปเปอร์เซ็นต์ของระยะที่ยืดออกเทียบกับระยะเดิม (%Elongation at max load) ค่าการต้านแรงดึงสูงสุดก่อนแผ่นฟิล์มขาด (stress at max load หรือ tensile strength, MPa) ซึ่งเป็นค่าแรงต่อพื้นที่หน้าตัดของแผ่นฟิล์ม และ ค่า Young's Modulus (MPa) เป็นดัชนีที่ใช้บอกถึงความแข็งและเปราะของวัสดุ ผลการทดสอบพบว่า เทอร์พอลิเมอร์เมื่อมีสัดส่วน 4HB โมโนเมอร์เพิ่มขึ้นจะทำให้แผ่นฟิล์มมีความเหนียวเพิ่มขึ้น โดยค่าดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับ %Elongation at max load คือ เมื่อมีความเหนียวเพิ่มขึ้นแผ่นฟิล์มจะมีระยะถูกยืดได้ยาวเพิ่มขึ้น ซึ่งเทอร์พอลิเมอร์ที่มีสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์มากที่สุดในการทดสอบนี้คือ P(4%3HB-co-3%3HV-co-93%4HB) มีความเหนียวมากที่สุด เท่ากับ 33.066 MPa สามารถถูกยืดได้ยาวกว่าระยะเดิม 429.921 เปอร์เซ็นต์ (คิดเป็นประมาณ 5 เท่าของความยาวเดิม) และเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกจากปิโตรเคมีพบว่ามีความเหนียวมากกว่าถุงเย็นชนิด LDPE สามารถถูกยืดได้ยาวกว่า ถุงเย็นชนิด LDPE ถุงหูหิ้วชนิดสามารถเสื่อมสภาพได้ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และใกล้เคียงกับถุงร้อนชนิดขุ่น มีค่าการต้านแรงดึงสูงสุดก่อนขาด และค่า Young's Modulus ใกล้เคียงกับถุงเย็นชนิด LDPE นอกจากนี้แผ่นฟิล์มเทอร์พอลิเมอร์ชนิดนี้เมื่อถูกดึงจะสามารถหดตัวกลับได้เล็กน้อยคล้ายยาง ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบสมบัติเชิงกลโดยรวมแล้วพบว่า P(4%3HB-co-3%3HV-co-93%4HB) มีสมบัติเชิงกลใกล้เคียงถุงเย็นชนิด LDPE มากที่สุด ในกลุ่มของเทอร์พอลิเมอร์ของการทดสอบนี้พบว่า P(11%3HB-co-34%3HV-co55%4HB) มีความแข็งและเปราะสูงที่สุด จึงมีระยะยืดสั้นที่สุด แต่มีความเหนียวมากกว่า P(10%3HB-co-40%3HV-co-50%4HB) ทั้งนี้เนื่องจากมีสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์มากกว่า นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นว่าค่าการต้านแรงดึงสูงสุดก่อนขาดไม่แปรผันตามสัดส่วนของโมโนเมอร์ชนิดใด อาจเป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับสัดส่วนของโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิด ซึ่งในการศึกษานี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นเพราะเหตุใด อย่างไรก็ตามผลการทดสอบนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในกลุ่มของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) ที่แปรผันให้มีสัดส่วนของ 3HV โมโนเมอร์ตั้งแต่ 40 โมลเปอร์เซ็นต์ลดลงจนถึง 3 โมลเปอร์เซ็นต์ และมีสัดส่วนของ 4HB โมโนเมอร์ ตั้งแต่ 50 โมลเปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้นจนถึง 93 โมลเปอร์เซ็นต์

โดยค่าดังกล่าวมีการกระจายค่อนข้างเป็นระเบียบครอบคลุมสัดส่วนในช่วงที่ต้องการศึกษา และจากการทบทวนเอกสารรายงานเกี่ยวกับสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ ที่เป็นองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ และเทอร์พอลิเมอร์ ยังไม่พบว่ามีการแปรผันให้พอลิเมอร์มีสัดส่วนตามโมลเปอร์เซ็นต์ของ 3HV และ 4HB โมโนเมอร์ ดังนั้นข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาผลของสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ที่มีต่อสมบัติเชิงกลของพอลิเมอร์ทำให้ได้ข้อมูลที่กว้างขึ้น เพื่อให้สามารถปรับปรุงสมบัติของไบโอพอลิเมอร์ให้มีสมบัติที่ดีพอต่อการนำไปใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีได้ตรงตามวัตถุประสงค์ และเนื่องจากเป็นการยากที่จะทำให้ไบโอพอลิเมอร์มีสมบัติทุกประการดีเท่าเทียมกับพลาสติกจากปิโตรเคมี เพราะไบโอพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์จากจุลินทรีย์ มิได้เป็นการสังเคราะห์โดยตรงจากวัตถุดิบดังเช่นพลาสติกจากปิโตรเคมี ดังนั้นจึงต้องนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ไปใช้เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการนำไบโอพอลิเมอร์ไปใช้ประโยชน์ต่อไป ซึ่งเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co4HB) ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04 โดยแปรผันให้มีสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์ต่างๆกัน ในการศึกษานี้พบว่ามีสมบัติใกล้เคียงพลาสติกยืดหยุ่นไปจนถึงพลาสติกอิลาสติก

ตารางที่ 18 สมบัติเชิงกลของเทอร์พอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV-co-4HB) จาก Alcalegenes sp. A-04 ที่มีสัดส่วนของแต่ละโมโนเมอร์แตกต่างกัน เปรียบเทียบกับพลาสติกจากปิโตรเคมี ซึ่งทำการทดสอบในสภาวะเดียวกัน

สัดส่วนของโมโนเมอร์			Toughness (MPa)	%Elongation at Max.Load	Stress at Max.Load (MPa)	Young's Modulus (MPa)
3HB	3HV	4HB				
10	40	50	0.218	3.717	8.579	502.636
11	34	55	0.264	3.201	10.098	**618.016**
11	23	66	0.323	5.044	8.698	392.490
12	12	76	0.390	8.544	4.045	141.937
10	6	84	19.462	300.129	9.030	118.030
4	3	93	**33.066**	**429.921**	**13.729**	127.277
ถุงร้อนชนิดใส			61.692	576.106	18.859	638.964
ถุงร้อนชนิดขุ่น			63.832	435.071	26.697	589.849
ถุงเย็นชนิด LDPE			15.380	155.535	13.027	125.949
ถุงหูหิ้ว UV degradable			60.000	383.738	24.049	673.993