การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) จากน้ำอ้อยโดย *Bacillus megaterium* BA-019

นางสาวศริญญา แก้วประดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTIC POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) FROM SUGAR CANE LIQUOR BY *Bacillus megaterium* BA-019

Miss Sarinya Kaewpradub

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) จากน้ำอ้อยโดย *Bacillus megaterium* BA-019
โดย	นางสาวศริญญา แก้วประดับ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศริญญา แก้วประดับ : การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) จากน้ำอ้อยโดย *Bacillus megaterium* BA-019. (PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTIC POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) FROM SUGAR CANE LIQUOR BY *Bacillus megaterium* BA-019) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. ส่งศรี กุลปรีชา, 104 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต P(3HB) เพื่อเพิ่มผลผลิตของ P(3HB) โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย ได้แก่ น้ำอ้อย ศึกษาความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารจำเป็นบางชนิดที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ซึ่งเป็นการเจริญในภาวะที่ไม่สมดุล ศึกษาการจำกัดความเข้มข้นของ ไนโตรเจนในรูปของยูเรีย ความเข้มข้นของแมกนีเซียมในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตและผลร่วมระหว่างโพแทสเซียมและฟอสเฟตในรูปของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เพื่อกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เพิ่มมากขึ้น ผลการวิจัยพบว่า *B.megaterium* BA-019 สามารถเจริญพร้อมกับการผลิต P(3HB) ได้ดีโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการศึกษาพบว่า *B.megaterium* BA-019 สามารถเจริญและผลิต P(3HB) ได้ดีในภาวะการเจริญ ดังนี้ แหล่งคาร์บอน คือ น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน คือ ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร และไม่ต้องมีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.21 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.62 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 50.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ศึกษาการผลิต P(3HB) ในถังหมักโดย *B. megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าไปเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อผลิต P(3HB) ในถังหมักโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 9.61 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 42.52 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 6 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.51 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง พบว่าปริมาณ P(3HB) สูงสุดที่ผลิตได้ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในขวดเขย่า แต่ความหนาแน่นของเซลล์และอัตราการผลิต P(3HB) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักสูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ศริญญา แก้วประดับ

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ส กุลปรีชา

ปีการศึกษา 2553

4972608423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORDS : *Bacillus megaterium* BA-019/ POLY(3-HYDROXYBUTYRATE)/ SUGAR CANE LIQUOR

SARINYA KAEWPRADUB : PRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTIC POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) FROM SUGAR CANE LIQUOR BY *Bacillus megaterium* BA-019). THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Ph.D., 104 pp.

This research aimed to study the factors that affected P(3HB) production by *Bacillus megaterium* BA-019 in order to increase the production yield of P(3HB) using sugarcane liquor which is inexpensive and locally available. The effects of initial concentration of sugarcane liquor and certain nutrients limitation (unbalanced growth condition) on cell growth as well as P(3HB) biosynthesis and accumulation were investigated. Limited amount of some components in the fermentation medium including nitrogen (urea), magnesium ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) and a cooperation effect of potassium and phosphate (KH_2PO_4) was investigated. The results showed that *B. megaterium* BA-019 could grow and produce relatively high P(3HB) simultaneously when sugarcane liquor and urea were used as the carbon and nitrogen sources, respectively. An optimal fermentation medium yielding high P(3HB) production from *B. megaterium* BA-019 consisted of 30 g/l of total sugar in sugarcane liquor as a carbon substrate , 0.8 g/l of urea as a nitrogen substrate and 2.0 g/l of KH_2PO_4 with no requirement of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ addition. Under this condition, the maximum cell density of 9.21 g/l and P(3HB) concentration of 4.62 g/l (50.12% by DCW) were achieved at 12 h of cultivation. At the same time, the highest productivity of 0.38 g/l-h was also reached. Moreover, fermentation in 5 L fermenter was carried out using the same fermentation medium containing sugarcane liquor. The maximum cell density of 9.61 g/l and P(3HB) concentration of 3.07 g/l (42.52 % by DCW) were reached at 6 h of cultivation as well as the highest productivity of 0.51 g/l-h. This results implied that the content of P(3HB) production in 5 L fermenter was lower than in shaken flask but cell density and P(3HB) productivity were higher than that of shaken flask cultivation.

Department Microbiology Student's signature Sarinya Kaewpradub

Field of Study Industrial Microbiology Advisor's signature S Kulpreecha

Academic Year 2010

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยาพนธ์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำแก่ข้าพเจ้า ทำให้สามารถทำงานวิจัยได้สำเร็จ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และรองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ดียิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ณัฏฐา ทองจุล อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง และอาจารย์ ดร. กฤษณา ศิรเลิศมุกุล ที่กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือ

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆในห้องวิจัย 462 ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและค่อยให้กำลังใจกันในการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาคจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนพี่ๆ และน้องๆที่ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้า ซึ่งเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดที่ค่อยสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฒ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ท

บทที่

1. บทนำ..... 1

1.1 มูลเหตุจูงใจในการวิจัย..... 2

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

2. ปริทัศน์วรรณกรรม..... 4

2.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ..... 4

2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (polyhydroxyalkanoate)..... 5

2.3 โครงสร้างของ PHA..... 6

2.4 การจัดจำแนกชนิดของ PHA..... 7

2.5 พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-β -hydroxybutyrate) 7

2.6 โครงสร้างและคุณสมบัติของ P(3HB) 11

2.7 วิถีการสังเคราะห์ P(3HB)..... 14

2.8 หน้าที่ของ P(3HB)..... 16

2.9 แนวทางการนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์..... 17

2.10 การผลิต P(3HB) จากจุลินทรีย์โดยการใช้แหล่งคาร์บอนมากเกินพอและ
จำกัดสารอาหารบางชนิด..... 19

2.11 แหล่งคาร์บอน..... 21

2.12 กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย..... 24

2.13 ประโยชน์จากอ้อย..... 27

บทที่ หน้า

2.14 แหล่งไนโตรเจน..... 28
2.15 กระบวนการหมักแบบ batch 29
2.16 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์..... 30
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย..... 31
3.1 วัสดุอุปกรณ์..... 31
3.2 เคมีภัณฑ์..... 32
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 33
3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา..... 33
3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ..... 33
3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์..... 35
3.3.4 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล (balanced growth condition)..... 35
3.3.5 ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารแต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB)..... 36
3.3.6 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.5.2 มาเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 37
3.4 วิธีวิเคราะห์..... 38
3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง..... 38
3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด..... 38
3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณยูเรีย..... 38
3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography: GC)..... 39
3.4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำอ้อยด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)..... 39
4. ผลการทดลอง..... 40
4.1 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต..... 40
4.2 การผลิต P(3HB) จาก Bacillus megaterium BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล 42

บทที่ หน้า

4.3 ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารแต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB)…….. 45
4.3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต P(3HB)……... 45
4.3.2 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจน……... 50
4.3.3 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียม…….. 60
4.3.4 การศึกษาผลร่วมของการจำกัดโพแทสเซียมและฟอสเฟต…… 65
4.4 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร……... 74
4.4.1 การผลิต P(3HB) จากน้ำอ้อย……. 74
4.4.2 การผลิต P(3HB) จากกากน้ำตาล…….. 74
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง…… 79
5.1 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต……... 79
5.2 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล……..…… 80
5.3 ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารแต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB)…….. 81
5.3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต P(3HB)……... 81
5.3.2 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจน……... 82
5.3.3 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียม..... 83
5.3.4 การศึกษาผลร่วมของการจำกัดโพแทสเซียมและฟอสเฟต..... 84
5.4 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร……... 85
5.4.1 การผลิต P(3HB) จากน้ำอ้อย……. 85
5.4.2 การผลิต P(3HB) จากกากน้ำตาล…….. 85
รายการอ้างอิง ……..... 89
ภาคผนวก…… 95
ภาคผนวก ก การเตรียมวัตถุดิบและสารที่ใช้ในการวิจัย……... 96
ภาคผนวก ข สูตรคำนวณ…….. 98
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน…… 99

หน้า

ภาคผนวก ง โครมาโทแกรม..... 102
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 104

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างและสะสม PHA ……..	9
2.2	สมบัติการละลายของ P(3HB)……	12
2.3	สมบัติทางกายภาพและความร้อนของ P(3HB) เทียบกับพอลิพรอพิลีน…….	13
2.4	องค์ประกอบของน้ำอ้อย……	23
4.1	การเติบโตของ *B. megaterium* BA-019ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ……..	41
4.2	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)……	44
4.3	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 34 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)……	46
4.4	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 45 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)……	47
4.5	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 57 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)……	48
4.6	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมยูเรีย (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)……	52
4.7	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)……...	53

ตารางที่ หน้า

4.8 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร(แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)……... 54

4.9 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.6 กรัมต่อลิตร(แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)……... 55

4.10 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)……... 56

4.11 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร(แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)……... 57

4.12 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.2 กรัมต่อลิตร(แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)…… 58

4.13 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)……... 61

4.14 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)……... 62

ตารางที่ หน้า

4.15 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)..... 63

4.16 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)..... 66

4.17 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)..... 67

4.18 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)..... 68

4.19 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)..... 69

4.20 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)..... 70

4.21 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)..... 71

ตารางที่ หน้า

4.22 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)..... 72

4.23 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 76

4.24 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 77

4.25 ค่าอัตราการผลิต เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยและกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 78

5.1 เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) โดยใช้จุลินทรีย์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน... 88

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	เซลล์ที่ย้อมด้วยสีไนล์บลู เอ (ก) และสีซูดานแบลค บี (ข)……..	5
2.2	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHA ……...	6
2.3	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ P(3HB)……	8
2.4	ภาพตัดของเซลล์ *Halomonas boliviensis* จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดง P(3HB) แกรนูลภายในเซลล์ (ก) และส่วนประกอบของ P(3HB) แกรนูล (ข)……	8
2.5	โครงสร้างผลึกของ P(3HB)……	11
2.6	วิถีการสังเคราะห์ P(3HB)……...	15
2.7	วิถีการสังเคราะห์ P(3HB) โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ……	16
2.8	กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ (ก) และน้ำตาลรีไฟน์ (ข)……...	26
3.1	*Bacillus megaterium* BA-019 เมื่อย้อมสีแกรม กำลังขยาย 1,000 เท่า……	33
3.2	*Bacillus megaterium* BA-019 เมื่อย้อมสีซูดาน แบลค บี กำลังขยาย 1,000 เท่า…….	33
4.1	การเติบโตของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ…….....	41
4.2	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)……..	44
4.3	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 34 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)……	46
4.4	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 45 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)……	47
4.5	ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 57 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)……..	48

รูปที่ หน้า

4.6 ความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร..... 49

4.7 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมยูเรีย (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)..... 52

4.8 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร(แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)..... 53

4.9 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร(แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)..... 54

4.10 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.6 กรัมต่อลิตร(แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)..... 55

4.11 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)..... 56

4.12 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)..... 57

รูปที่ หน้า

4.13 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.2 กรัมต่อลิตร(แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)…….. 58

4.14 ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมยูเรีย……... 59

4.15 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)…… 61

4.16 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)…… 62

4.17 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)…… 63

4.18 ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 0.2 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต…… 64

4.19 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)……... 66

4.20 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)…… 67

รูปที่ หน้า

4.21 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)..... 68

4.22 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)..... 69

4.23 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)..... 70

4.24 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)..... 71

4.25 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)..... 72

4.26 ความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต... 73

4.27 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 76

รูปที่ หน้า

4.28 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 77

4.29 ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณ P(3HB) และค่าอัตราการผลิตสูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยและกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 78

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ตัวย่อ	คำอธิบาย
DCW	น้ำหนักเซลล์แห้ง
g/l	กรัมต่อลิตร
g/l-h	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
h	ชั่วโมง
PHB / P(3HB)	พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)
P(3HB) conc.	ความเข้มข้นของ P(3HB)
P(3HB) prod.	อัตราการผลิต P(3HB)
% DCW	เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
μ	อัตราการเติบโตจำพาะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในชีวิตประจำวัน สำหรับการนำมาใช้เพื่อเป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์ทดแทนแก้วและกระดาษ เนื่องด้วยคุณสมบัติที่ดีกว่าของวัสดุพลาสติก พลาสติกสังเคราะห์เป็นวัสดุที่มีน้ำหนักเบา มีความคงทนแข็งแรง มีสีสันสวยงาม และเป็นวัสดุที่สามารถปรับแต่งให้มีลักษณะพิเศษตามต้องการได้ ในขณะที่ความนิยมในการนำพลาสติกมาใช้งานต่างๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ก็ยิ่งทำให้ขยะพลาสติกเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งบรรจุภัณฑ์พลาสติกที่มีอายุการใช้งานสั้นและมีปริมาณการใช้อยู่เป็นจำนวนมากในสังคมเมือง เช่น ถุงพลาสติก ฟิล์มห่ออาหาร และกล่องโฟมอาหารเหล่านี้ เป็นต้น พลาสติกสังเคราะห์ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งอยู่ในรูปของพอลิพรอพิลีน (polypropylene) หรือ PP พอลิเอทิลีน (polyethylene) หรือ PE และพอลิไวนิลคลอไรด์ (polyvinylchloride) หรือ PVC พลาสติกสังเคราะห์เหล่านี้ก่อให้เกิดปัญหาของการเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากชุมชน และส่งผลกระทบโดยตรงต่อสิ่งแวดล้อมอย่างรุนแรง และเนื่องจากพลาสติกที่ใช้แล้วเหล่านี้มีการปนเปื้อนจากการใช้งานค่อนข้างมากจึงไม่ค่อยนิยมที่จะนำไปหมุนเวียนเพื่อแปรรูปนำกลับมาใช้งานใหม่ อีกทั้งการกำจัดพลาสติกสังเคราะห์กระทำได้ยาก และจุลินทรีย์ในธรรมชาติไม่สามารถย่อยสลายได้ง่าย ดังนั้นเพื่อลดปัญหาของพลาสติกสังเคราะห์ที่เป็นมลพิษในสิ่งแวดล้อม จึงมีความสำคัญในการศึกษาวิจัยเพื่อผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ เช่น พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate, PHA) พอลิแลคติกแอซิด (polylactic, PLA) อลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyester) พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) รวมถึงโคพอลิเมอร์และอนุพันธ์ผสมของพอลิเมอร์เหล่านี้ (Chen and Wu, 2005) เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกที่ย่อยสลายไม่ได้

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ P(3HB) เป็นพอลิเอสเทอร์ที่สร้างและสะสมขึ้นภายในเซลล์จุลินทรีย์หลายชนิดเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน การกระตุ้นให้จุลินทรีย์มีการสังเคราะห์ P(3HB) ทำได้โดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ภายใต้ภาวะการเจริญที่ไม่สมดุล (unbalanced growth condition) ได้แก่ ภายใต้ภาวะที่จำกัดหรือขาดแคลนของสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือ แร่ธาตุ แต่มีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอ (Chen และ Wu, 2005; Pandian และคณะ, 2010; Keshavarz และ Roy, 2010) P(3HB) ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นถูกเก็บไว้ในแกรนูลภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ โดยจำนวนและขนาดของแกรนูลในแต่ละเซลล์ จะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ พลาสติกชนิดนี้ถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์โดยธรรมชาติ (biodegradable plastics) และจากการย่อยสลายจะให้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก (Evans และSikdar, 1990; Luengo และคณะ, 2003)

มูลเหตุจูงใจในการวิจัย

P(3HB) เป็นพลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์โดยธรรมชาติ สารที่ได้จากการย่อยสลาย ได้แก่ น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดคาร์บอกซิลิก ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม P(3HB) มีสมบัติทางเคมี กายภาพ และเชิงกลที่ใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี (Lee, 1996) ทำให้ P(3HB) ได้รับความสนใจที่จะนำมาผลิตเป็นพลาสติกเพื่อใช้ทดแทนพลาสติกที่ใช้กันในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังมีสมบัติที่เข้ากันได้กับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก และสามารถนำไปผสมกับพอลิเมอร์อื่นๆเพื่อให้มีสมบัติตามต้องการได้ ดังนั้นจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ทั้งในด้านการแพทย์และเภสัชกรรม ได้แก่ การนำมาใช้เป็นวัสดุทางศัลยกรรม เช่น หลอดเลือดเทียม กระดูกเทียม เข็ม ไหมเย็บแผล แคปซูลบรรจุยา เป็นต้น หรืออาจนำ P(3HB) มาประยุกต์ใช้ในงานด้านเกษตรกรรม เช่น เป็นวัสดุทำแคปซูลบรรจุยาฆ่าแมลง ปุ๋ย และฮอร์โมนพืช ใช้ทำแหจับปลาสำหรับใช้ในน้ำทะเลและสามารถใช้เป็นวัสดุคลุมดินในการเพาะเลี้ยงต้นกล้าได้เป็นต้น นอกจากนี้สามารถนำ P(3HB) มาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์หรืออุปกรณ์ใช้สอยอื่นๆ ได้แก่ ขวดแชมพู บรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุอาหารประเภทถุง ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป แผ่นฟิล์มถนอมอาหาร หรืออาจใช้ทำเป็นวัสดุที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง เช่น ผ้าอ้อม ผ้าอนามัย ด้ามมีดโกน เป็นต้น (Braunegg และคณะ, 1998; Steinbuchel และ Fuchtenbusch, 1998) แต่ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งของการประยุกต์ใช้ P(3HB) คือ ต้นทุนในการผลิตยังสูงกว่าพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการผลิต P(3HB) ให้มีประสิทธิภาพและมีราคาถูกลงขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น พัฒนาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ ปรับปรุงกระบวนการหมักและวิธีสกัดแยกผลิตภัณฑ์ รวมทั้งการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก (Choi และ Lee, 1999) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB) เพื่อทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลง เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกมากในประเทศไทยและเป็นพืชที่สามารถตัดและเก็บเกี่ยวได้หลายครั้ง โดยในกระบวนการการผลิตน้ำตาลทรายจะใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบหลักและมีน้ำอ้อยเกิดขึ้นหลายขั้นตอน ซึ่งในน้ำอ้อยจะประกอบไปด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส รวมทั้งวิตามิน และธาตุอาหารเป็นจำนวนมาก (มิตรผลวิจัย, 2551)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาการผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยการจำกัดแหล่งไนโตรเจนและธาตุอาหารที่สำคัญบางชนิด โดยมีแหล่งคาร์บอนซึ่งได้แก่น้ำอ้อยมากเกินพอ เพื่อกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เพิ่มมากขึ้น

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล (balanced growth condition)

2. ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารแต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB)

3. ผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้จากข้อ 2 มาเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถใช้วัตถุดิบราคาถูกในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตให้ได้ผลผลิตสูง โดย *Bacillus megaterium* BA-019 ซึ่งส่งผลให้ราคาต้นทุนการผลิตลดต่ำลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หมายถึง พลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยการย่อยที่มีผลมาจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ สาหร่าย เป็นต้น โดยพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพนี้ สามารถจัดเป็นกลุ่มได้ 3 ชนิด คือ

1. พลาสติกที่ถูกสลายตัวโดยแสงอัลตราไวโอเลต (UV degradable plastic) เนื่องจากพลาสติกชนิดนี้มีหมู่คาร์บอนิล (C=O) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีความไวสูงต่อแสง UV ทำให้เกิดการแตกตัวในสายโซ่ของพอลิเมอร์ พลาสติกจะกรอบและแตกได้ หรือมีการเติมสารที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (photoactivate) เช่น เหล็ก และทองแดง เป็นต้น เพื่อเร่งการทำลายสายพอลิเมอร์เมื่อได้รับแสง UV (Reddy และคณะ, 2003)

2. พลาสติกที่ย่อยสลายได้บางส่วน เช่น พอลิเอทิลีน (polyethylene) พอลิพรอพิลีน (polypropylene) และพอลิสไตรีน (polystyrene) โดยพลาสติกประเภทนี้เป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่ใส่สารเติมแต่งทางธรรมชาติบางชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด แป้ง และเซลลูโลส เป็นต้น เมื่ออนุภาคของแป้งถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ พลาสติกจะอ่อนตัวลง มีความพรุนและมีพื้นที่ผิวมากขึ้นช่วยในการทำลายร่างแหของพลาสติก (Reddy และคณะ, 2003)

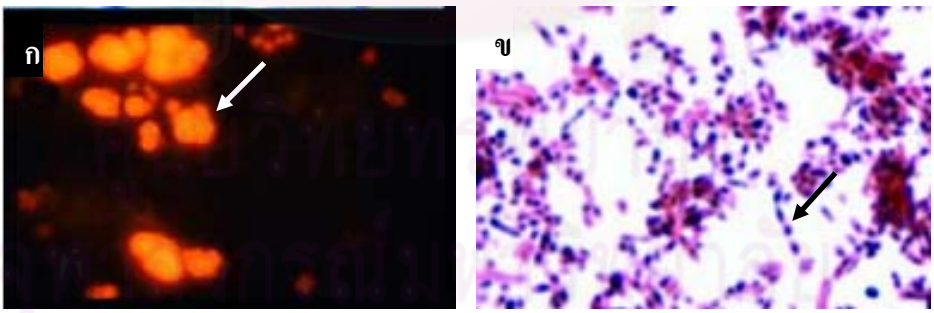
3. พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์ ได้แก่ พลาสติกชนิดเทอร์โมพอลิเอสเทอร์ (biodegradable thermoplastic) ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ เทอร์โมพอลิเอสเทอร์นี้ถูกสร้างและสะสมได้ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด และจัดอยู่ในกลุ่มสารที่เรียกว่า พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (polyhydroxyalkanoates) หรือ PHA ซึ่ง PHA นี้มีคุณสมบัติของเทอร์โมพลาสติก คือ สามารถนำมาขึ้นรูปและทำให้เป็นฟิล์ม แผ่น ไฟเบอร์ได้ และพลาสติกกลุ่มนี้สามารถถูกย่อยสลายโดยสมบูรณ์ในธรรมชาติ (Evans และ Sikdar, 1990 ; Brandl และคณะ, 1990 ; Reddy และคณะ, 2003)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (polyhydroxyalkanoate)

PHA เป็นพอลิเอสเทอร์ที่สร้างและสะสมโดยจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้น เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนให้แก่เซลล์ โดย PHA ถูกสังเคราะห์และสะสมในแกรนูล (granule) ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ เพื่อทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารในภาวะที่แหล่งคาร์บอนมากเกินพอขณะที่สารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือ trace element อื่นๆ เช่น แมกนีเซียม แคลเซียม เหล็ก เป็นต้น อยู่ในภาวะที่จำกัดหรือขาดแคลน (Anderson และ Dawes, 1990; Shrivastav และคณะ, 2010) โดยจำนวนและขนาดของแกรนูลในแต่ละเซลล์ จะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ พลาสติกกลุ่มนี้สามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ดีพอลิเมอเรส (depolymerase) และเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) และจากการย่อยสลายจะให้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก (Evans และSikdar, 1990)

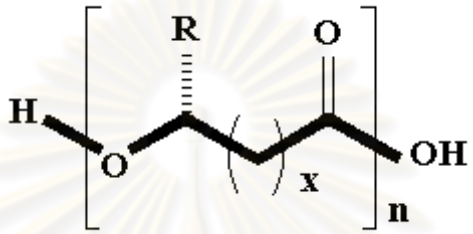
PHA ชนิดแรกที่ถูกค้นพบ คือ พอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต(polyhydroxybutyrate) หรือ P(3HB) พบในเซลล์ของจุลินทรีย์ *Bacillus megaterium* โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสชื่อ Lemoigne (Braunegg, 1998; Zinn, 2001) ซึ่ง P(3HB) ที่ถูกสร้างและสะสมขึ้นนี้ พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ (sporulation) เพราะมีการสะสมของก้อนไขมัน (lipid inclusion) ในช่วงที่มีการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) ของแบคทีเรีย สำหรับการตรวจหา PHA ในเซลล์ของ จุลินทรีย์เบื้องต้นใช้เทคนิค fat stain ซึ่งเป็นการย้อมสีสารประเภทไขมันที่สะสมอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียโดยใช้เทคนิคการย้อมด้วยสีไนล์บลู เอ (Nile Blue A) หรือสีซูดานแบลค บี (Sudan black B) (รูปที่ 2.1) (López-Cortés และคณะ,2008)



รูปที่ 2.1 เซลล์ที่ย้อมด้วยสีไนล์บลู เอ (ก) และสีซูดานแบลค บี (ข) (López-Cortés และคณะ,2008)

2.3 โครงสร้างของ PHA

PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (liner polyester) ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกันโดยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวที่หนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์ตัวที่สองตรงตำแหน่งบีต้า-คาร์บอน ซึ่งเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) ที่แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration และการเชื่อมต่อกันของโมโนเมอร์เป็นแบบหัวต่อหาง (isotactic) เช่นเดียวกับพอลิพรอพิลีน (Brandl และคณะ, 1990)



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHA (Brandl และคณะ, 1990)

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

2.4 การจัดจำแนกชนิดของ PHA

1. การจัดจำแนกชนิดตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยโมโนเมอร์ (Keshavarz และ Roy, 2010) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1.1 short-chain-length (SCL) PHAs คือ พอลีเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 3-5 อะตอม เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) เป็นต้น

1.2. medium-chain-length (MCL) PHAs คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 6-14 อะตอม เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) เป็นต้น

1.3 long- chain-length (LCL) PHAs คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมมากกว่า 14 อะตอม

2. การจัดจำแนกชนิดโดยแบ่งตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์ PHA แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.1 โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน ตัวอย่างเช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB)

2.2 เฮทเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ดังนี้

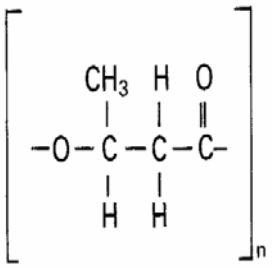
- โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) หรือ P(3HB - co - 3HV) พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB - co - 4HB) เป็นต้น

- เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ P(3HB-co-3HV-co-4HB) เป็นต้น

2.5 พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-β-hydroxybutyrate)

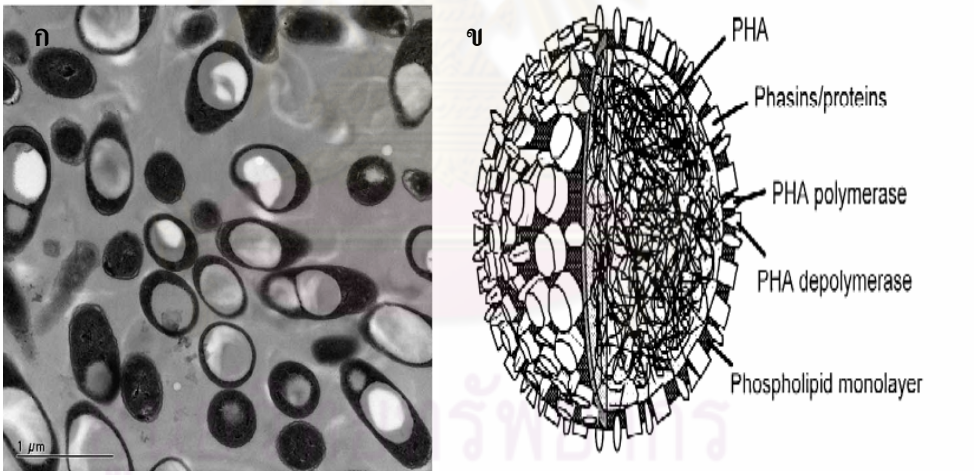
พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือที่มีชื่อย่อเรียกว่า P(3HB) จัดเป็นพอลิเมอร์ประเภทอะลิฟาทิกพอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyester) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม PHA (polyhydroxyalkanoate)

P(3HB) จัดเป็น homopolymer ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ 3-hydroxybutyric acid (หมู่คาร์บอนิล ออกซิเจน และหมู่เมทิล) ต่อกันเป็นสายด้วยพันธะเอสเทอร์ โดยจำนวนโมโนเมอร์ที่ประกอบกันเป็นสาย P(3HB) มีประมาณ 23,000-25,000 ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 3 (Byrom, 1987)



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ P(3HB) (Byrom, 1987)

P(3HB) มีคุณสมบัติทางกายภาพเช่นเดียวกันกับเทอร์โมพลาสติก จึงสามารถนำมาทำเป็นฟิล์มห่อของ ไฟเบอร์หรือนำมาหลอมเป็นภาชนะต่าง ๆ ได้ และจากการศึกษาพบว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ไว้ได้ภายในเซลล์มีหลายชนิด (ตารางที่ 2.1) โดย P(3HB) จะถูกสร้างและสะสมอยู่ภายในแกรนูล (granule) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.5 ไมโครเมตร และมีเมมเบรนที่ประกอบด้วยไลปิดและโปรตีนหุ้มอยู่โดยรอบ หนาประมาณ 2 นาโนเมตร ดังรูปที่ 2.4 (Quillaguamán และคณะ, 2006; Zinn และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.4 ภาพตัดของเซลล์ *Halomonas boliviensis* จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดง P(3HB) แกรนูลภายในเซลล์ (ก) (Quillaguamán และคณะ, 2006) และส่วนประกอบของ P(3HB) แกรนูล (ข) (Zinn และคณะ, 2001)

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างและสะสม PHA (Brandl และคณะ, 1990)

การจำแนกสายพันธุ์โดย Bergey's Manual	จีนัส	ปริมาณ PHA สูงสุด (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	แหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต PHA
Group 1 Phototrophic bacteria	*Chloroflexus*	<1	yeast extract /glycylglycine
	Chromatium	20	acetate
	Ectothiorhodospira	ND	NS
	Lamprocystis	ND	NS
	Rhodobacter	80	acetate
	Rhodospirium	47	acetate
	Thiocapsa	ND	NS
	Thiocystis	ND	NS
	Thiodictyon	ND	NS
	Thiopedia	ND	NS
	Thiosphaera	ND	acetone/CO_2
Group 2 Gliding bacteria	*Beggiatia*	57	acetate
	Leptothrix	67	pyruvate
	Sphacrotilus	45	glucose/peptone
Group 3 Sheathed bacteria	*Caulbacter*	36	glucose/glutamate
	Azospirillum	75	malate
Group 4 Budding and/or curved bacteria	*Oceanospirillum*	ND	NS
	Spirillum	40	lactate
	Alcaligenes	96	fructose
	Azotobacter	73	glucose
	Beijerinckia	38	glucose
	Derxia	26	glucose
	Methylobacterium	47	methanol
	Methylosinus	25	methanol
	Pseudomonas	67	methanol
	Rhizobium	57	methanol
	Xanthobacter	ND	NS
	Zoogloea	ND	yeast extract/casamino

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การจำแนกสายพันธุ์โดย Bergey's Manual	จีนัส	ปริมาณ PHA สูงสุด (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	แหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต PHA
Group 8 Gram-negative facultative anaerobic rods	*Chromobacterium*	37	glucose/peptone
	Escherichia	ND	tryptone/yeast extract
	Haemophilus	ND	yeastextract/glucose
	Photobacterium	ND	brain heart infusion
	Vibrio	ND	NS
Group 9 Gram-negative anaerobic bacteria	*Syntrophomonas*	30	gluconate
Group 10 Gram- negative cocci and cocibacilli	*Acinetobacter*	<1	glucose
	Lampropedia	ND	NS
	Moraxella	ND	NS
	Paracoccus	ND	NS
Group 12 Gram- negative chemolithotrophic	*Nitrobacter*	ND	NS
	Nitrococcus	ND	NS
	Thiobacillus	ND	Glucose
Group 13 Archaebacteria	*Halobacterium*	38	glucose
Group 14 Gram-possitive cocci	*Micrococcus*	28	peptone/tryptone
Group 15 Endospore-forming rods and cocci	*Bacillus*	25	glucose
	Clostridium	13	trptone/peptone/glucose
Group 17 Actinomycetes	*Mycoplana*	ND	methanol
	Nocardia	14	butane
	Streptomyces	4	glucose
Cyanobacteria	*Aphanothece*	<1	NS
	Chlorogloea	10	acetate, CO_2
	Gamphosphaeria	ND	ND
	Microcoleus	<1	ND
	Microcystis	ND	ND
	Spirulina	6	CO_2

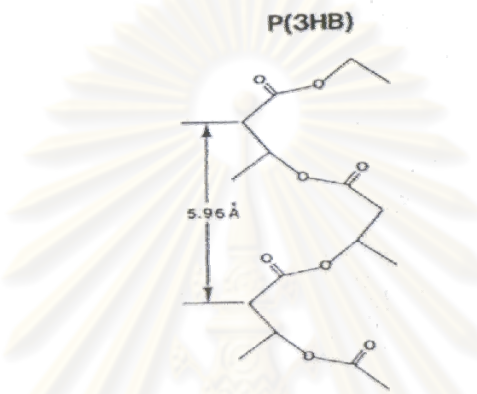
หมายเหตุ ND = ปริมาณ PHA สูงสุดไม่ได้ทำการวิเคราะห์ NS = แหล่งคาร์บอนไม่จำเพาะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 โครงสร้างและคุณสมบัติของ P(3HB)

1. โครงสร้างผลึก(crystal structure)

Cornibert และ Marchessault (1972) (อ้างถึงใน Doi, 1990) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างผลึกของ P(3HB) โดยใช้เทคนิค X-ray diffraction พบว่าโครงรูป (conformation) ของโมเลกุล P(3HB) เป็นแบบอัดตัวแน่นและแบบเกลียวเวียนขวา (right-handed helix) และมีหน่วยซ้ำ (fiber repeat) เท่ากับ 0.596 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างผลึกของ P(3HB) (Doi, 1990)

2. สมบัติทางกายภาพและความร้อน (physical และ thermal property)

P(3HB) เป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟอร์มไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรแอซีเทต เป็นต้น แต่ P(3HB) ไม่สามารถละลายได้ในสารละลายมีขั้ว ตัวอย่างเช่น น้ำ เมทานอล เอทานอล (ตารางที่ 2.2) สำหรับความหนาแน่นของ P(3HB) จะอยู่ในช่วงระหว่าง 1.171-1.260 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดย P(3HB) ที่มีความหนาแน่นต่ำจะมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน แต่ถ้าหากมีความหนาแน่นสูงจะสามารถตกผลึกได้ ส่วนจุดหลอมเหลวจะแปรผันระหว่าง 157-188 องศาเซลเซียส โดยเมื่อผลึกเย็นลงอย่างช้าๆ หลังจากการหลอมเหลวจะได้เป็นสเฟียรูไลต์ (spherulites) ขนาดใหญ่ ทำให้ P(3HB) มีสถานะเป็นของแข็งคล้ายแก้ว(glass state) ที่อุณหภูมิกลาสทรานสิชัน(glass transition) ประมาณ 4 องศาเซลเซียส และหากตกตะกอน P(3HB) ด้วยสารละลายเจือจางจะได้ผลึกเป็นชั้นบางๆซึ่งความหนาแน่นของชั้นผลึกจะขึ้นกับอุณหภูมิในการเกิดผลึก (crystallization temperature) และน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าค่า Young' s modulus และค่าความทนแรงดึง(tensile strength) ของ P(3HB) จะมีความใกล้เคียงกับพอลิโพรพิลีน ซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.2 สมบัติการละลายของ P(3HB) (Lafferty และคณะ, 1988)

ละลายได้ดีมาก	ละลายได้ดี	ละลายไม่ได้
คลอโรฟอร์ม	ไดโอเซน	น้ำ
ไดคลอโรฟอร์ม	ออกทานอล	เมทานอล
ไดคลอโรอะซิเตต	โทลูอีน	เอทานอล
ทรีโอลีน	พิริดีน	1-โพรพานอล
เอทิลีนคาร์บอเนต		2-โพรพานอล
โพรพิลีนคาร์บอเนต		กรดเกลือแร่เจือจาง
ทรีฟลูโอโรเอทานอล		อัลคาไลน์ไฮเปอร์คลอไรด์
แอซิติกแอนไฮไดรด์		ไดเอทิลอีเทอร์
โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล		เอทิลีนอะซิเตต
ไดเมธิลฟอร์มามีน		เอทิลเมธิลคีโตน
เอทิลอะซิโตอะซิเตต		เททราไฮโดรฟูราน
ได –, ไตร-, เททรา- ,คลอโรอีเทน		เอทิลโฟร์มีเอต
กรดอะซิติก		บิวทิลอะซิเตต
แอลกอฮอล์(คาร์บอนมากกว่า 3 อะตอม)		เฮกเซน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 สมบัติทางกายภาพและความร้อนของ P(3HB) เทียบกับพอลิพรอพิลีน (Doi, 1990)

คุณสมบัติ	PP	P(3HB)
จุดหลอมเหลว (° C)	171 – 186	171 – 182
ความสามารถเป็นผลึก (%) (crystallinity)	65 – 70	65 – 80
ความหนาแน่น (g/cm^3)	0.94 – 0.95	1.23 – 1.25
น้ำหนักโมเลกุล ($x\ 10^5$)	2.2 – 7	1 – 8
การกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution)	5 – 12	2.2 – 3
ความแข็ง (GPa) (flexural modulus)	1.7	3.5 – 4
ความสามารถในการต้านแรงดึง (MPa) (tensile strength)	39	40
ความสามารถในการขยายตัว (%) (extension to break)	400	6-8
ความทนทานต่อแสงอุลตราไวโอเลต (UV resistance)	ไม่ดี	ดี
ความทนทานต่อตัวทำละลาย (solvent resistance)	ดี	ไม่ดี
ความสามารถให้ออกซิเจนผ่าน ($cm^3\ m^{-2}\ atm^{-1}\ d^{-1}$) (oxygen permeablility)	1700	45

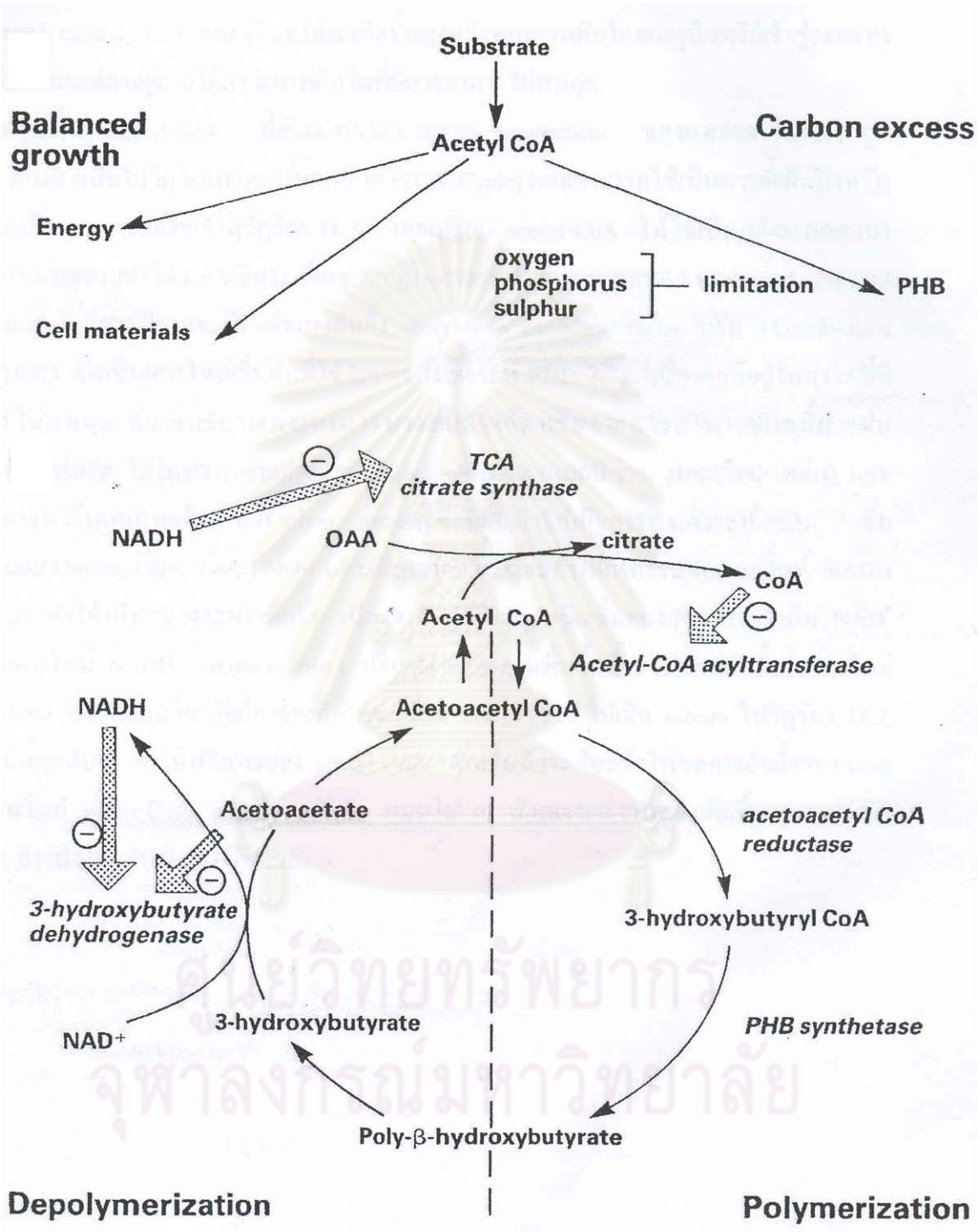
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7 วิถีการสังเคราะห์ P(3HB)

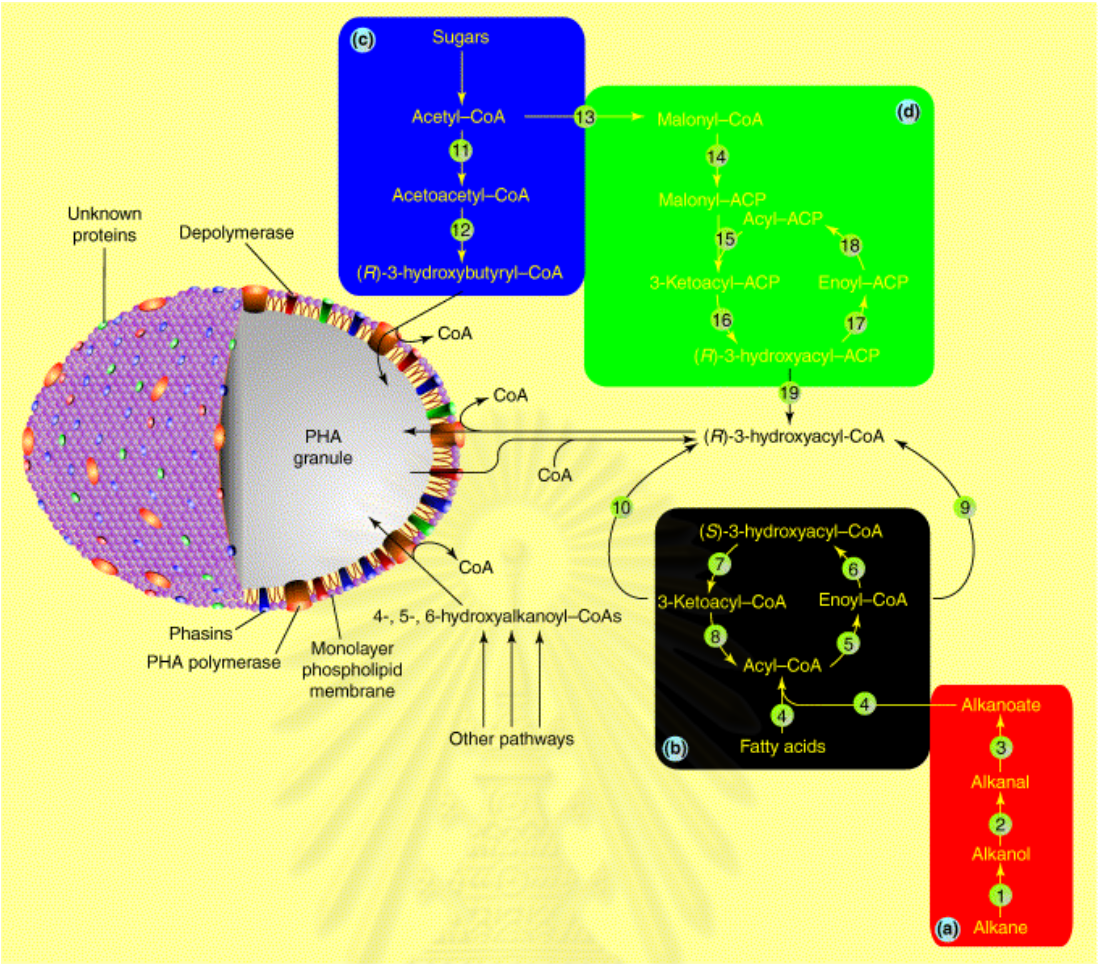
ในการผลิต P(3HB) ของจุลินทรีย์นั้น มีวิถีการสังเคราะห์ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.6 และรูปที่ 2.7 (Byrom, 1987; Luengo และคณะ, 2003) โดยจะมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์แอซีทิลโคเอแอซีทิลทรานเฟอเรส (acetyl-CoA acetyltransferase) หรือเอนไซม์ 3-คีโตไทโอเลส (3-ketothiolase) เอนไซม์แอซีโตแอซีทิลโคเอรีดักเทส (acetoacetyl-CoA reductase) และเอนไซม์ PHB ซินเทส (PHB synthase)

โดยทั่วไปแล้วพบว่าการสังเคราะห์และการสะสม P(3HB) ของจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นสูงหลังจากการเติบโตของจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงตัว (stationary phase) และจุลินทรีย์จะต้องอยู่ภายใต้ภาวะการเติบโตที่มีสารอาหารไม่สมดุล โดยจากรูป Acetyl-CoA ที่เกิดจากกระบวนการ metabolism ของแหล่งคาร์บอนจะถูก metabolite เป็นสารอื่นในวัฏจักรกรดคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) และสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ P(3HB) เซลล์จะเข้าสู่วัฏจักร TCA โดยเปลี่ยน acetyl-CoA ให้ได้เป็นพลังงานออกมาเพื่อใช้การเจริญรวมทั้งได้ CoA อิสระ เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะที่มีอาหารสมดุล แต่ถ้าปริมาณ CoA อิสระมีมากจะมีผลไปยับยั้งการทำงานของacetyl-CoA acetyltransferase หรือ 3-ketothiolase ซึ่งเป็นเอนไซม์เริ่มต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ P(3HB) แต่เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล คือ มีปริมาณสารอาหารบางชนิดจำกัดหรือขาดสารอาหารชนิดนั้น เช่น ออกซิเจน ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน ซัลเฟอร์หรือ trace elements (เช่น แมกนีเซียม แคลเซียม เหล็ก) แต่มีแหล่งอาหารคาร์บอนมากเกินพอ จะมีผลทำให้เกิดการสังเคราะห์ P(3HB) ขึ้น และสืบเนื่องจากภาวะนี้จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์NADH oxidase ลดลง ทำให้ปริมาณ NADH เพิ่มขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ NADH ไปเป็น NAD+ ที่ต้องอาศัยเอนไซม์ NADH oxidase ลดลง ปริมาณ NADH ที่เพิ่มขึ้นนี้จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ citrate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน acetyl-CoA ไปเป็น citrate ในวัฏจักร TCA โดยเมื่อเอนไซม์นี้ถูกยับยั้ง ทำให้ปริมาณของ acetyl-CoAเพิ่มขึ้นถึงระดับที่ทำให้ผลการยับยั้งของ CoA อิสระต่อเอนไซม์ acetyl-CoA acetyltransferase หรือ 3-ketothiolase หมดไป การสังเคราะห์ P(3HB) จึงเกิดขึ้นได้ (Senior และคณะ, 1972 อ้างถึงในส่งศรี กุลปรีชา, 2536)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.6 วิถีการสังเคราะห์ P(3HB) (Byrom, 1987)



รูปที่ 2.7 วิถีการสังเคราะห์ P(3HB) โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (Luengo และคณะ, 2003)

2.8 หน้าที่ของ P(3HB)

1. เป็นแหล่งพลังงานหรือแหล่งคาร์บอน (Dawes และ Senior, 1973; Doi, 1990; Braunegg และคณะ, 1998)

จุลินทรีย์จะใช้ P(3HB) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในภาวะขาดแคลนสารอาหารเพื่อความอยู่รอด Macrae และWikenson (1958) กล่าวว่า *Bacillus megaterium* ที่มีปริมาณ P(3HB) สูงจะช่วยชะลอการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) และการตายเนื่องจากขาดไนโตรเจน ต่อมา Sierra และ Gibbons (1962) ศึกษาบทบาทของ P(3HB) ต่อการหายใจและการอยู่รอดของ *Micrococcus halodenitrificans* ซึ่งผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการอยู่รอดมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณ P(3HB) นอกจากนี้ Stokes และParson(1968) ยังได้พบว่า *Sphaerotilus discophorus* ที่มีปริมาณ P(3HB) สะสมอยู่มากจะอยู่รอดได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่มี P(3HB) หรือมีปริมาณน้อย เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Tal และ Oken (1985) ที่พบว่าเซลล์ *Azospirillum brasilense* ที่มีปริมาณ P(3HB) สูง จะ มีความสามารถในการอยู่รอดได้ดีกว่าเซลล์ที่มี P(3HB) ต่ำ

2. การสร้างสปอร์ (sporulation) และการสร้างซีสต์ (encystment)(Dawes และSenior,1973)

P(3HB) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์และการสร้างซีสต์ Juniและ Heym (1956) พบว่า *Bacillus cereus* สายพันธุ์ T นำ P(3HB) ไปใช้ในการสร้างสปอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่าพีเอชสูง ต่อมา Kominok และ Halvorson (1965) รายงานว่า *B. cereus* สร้างและสะสม P(3HB) โดยใช้กรดอะซีติกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณ P(3HB) สูงสุดจะอยู่ในช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) หลังจากนั้นปริมาณ P(3HB) จะลดลงเนื่องจากการสร้างสปอร์ และยังได้ศึกษาเมแทบอลิซึมของ P(3HB) และอะซิโตอิน(acetonin) ในเชื้อชนิดเดียวกันนี้พบว่าการสังเคราะห์ P(3HB) จะเริ่มต้นขึ้นหลังจากเชื้อหยุดเจริญเติบโตและสามารถสะสม P(3HB) ได้สูงสุดก่อนเกิดการสร้างสปอร์ เพราะในระหว่างกระบวนการสร้างสปอร์ P(3HB) จะถูกย่อยสลาย นอกจากนี้ Stevenson และ Socolofsky (1996) ได้พบว่าการสะสม P(3HB) โดย *Azotobacter vinelandii* จะเกิดขึ้นในระยะการเจริญเติบโตที่ไม่สมดุล โดยเซลล์จะใช้แหล่งคาร์บอนภายนอกเพื่อใช้ในการสร้างซีสต์ได้เร็วกว่าการตรึงไนโตรเจน

3. เป็นแหล่งอิเล็กตรอน (electron sink)

Jackson และDawes (1976) รายงานว่า *Azotobacter beijerinckii* จะมี activity ของ NADH oxidase ต่ำลงเมื่อมีการจำกัดปริมาณออกซิเจน แต่อัตราส่วน NADH/NAD ภายในเซลล์จะเพิ่มขึ้นทันทีเมื่อออกซิเจนหมดไป แสดงให้เห็นว่าในภาวะที่การจำกัดปริมาณออกซิเจนและมีอิเล็กตรอนมากเกินพอ เซลล์จะเกิดการทำลายอิเล็กตรอนที่มากเกินพอโดยนำไปใช้ในปฏิกิริยารีดักชันแทนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ดังนั้นกรณีที่ออกซิเจนจำกัดจึงทำให้เกิดการสร้าง P(3HB) ขึ้น

2.9 แนวทางการนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ (Lee, 1996; Steinbuchel, 1998; Anderson และ Dawes, 1990)

1. การประยุกต์ใช้ในทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม (Chen และ Wu, 2005)

- วัสดุสิ้นเปลืองในงานด้านศัลยกรรม เช่น ใช้ทำหลอดเลือดเทียม เข็มเย็บแผล ไหมเย็บแผล ผ้าซับเลือด และผ้าสมานแผล เป็นต้น

- วัสดุเพื่อการบำบัดและรักษาโรค ได้แก่ แคปซูลบรรจุยาหรือวัคซีนที่ต้องการให้ตัวยาค่อยๆถูกปล่อยออกมาในปริมาณน้อยๆ เป็นเวลานาน หรือใช้ทำเป็นกระดูกเทียมโดยอาศัยสมบัติการเป็น piezoelectric ของ PHA ซึ่งคล้ายกับสมบัติที่มีในกระดูกธรรมชาติ จึงใช้เป็นแผ่นยึดกระดูกซึ่งจะมีผลต่อการสร้างกระดูกขึ้นมาทดแทน

- ด้านทันตกรรม จะนำ PHA มาใช้เป็นวัสดุตัวนำที่ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นใหม่ในโรคด้านปริทันต์(periodontitis)

-ใช้ PHA เป็นสารตั้งต้นในการผลิต R-(-)-3-hydroxybutyric acids ซึ่งสารนี้เป็นส่วนประกอบสำคัญที่พบในเลือดโดยปกติ มีความเข้มข้นระหว่าง 0.3- และ 1.3 มิลลิโมลาร์ (Zinn และคณะ.2001) โดยสาร R-(-)-3-hydroxybutyric acids สามารถใช้เป็น chiral building blocks สำหรับสังเคราะห์สารเคมีบริสุทธิ์ เช่น ยาปฏิชีวนะ วิตามิน และฟีโรโมน (pheromone) (Mandison และ Huisman, 1999; Luengo และคณะ, 2003)

2. การประยุกต์ใช้ในทางด้านเกษตรกรรมและปศุสัตว์

- ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยารักษาโรคและวัคซีนต่างๆในสัตว์เลี้ยง เช่น วัคซีนป้องกันโรคระบาด ยาถ่ายพยาธิ และบรรจุยาประเภทที่มีกลไกลการออกฤทธิ์นาน และสามารถกำจัดเมื่อเลิกใช้โดยทิ้งลงใต้ทะเลได้เนื่องจากสามารถย่อยสลายอย่างรวดเร็ว

- ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุปุ๋ย ฮอร์โมน growth factors ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช แคปซูลจะค่อยๆสลายทีละน้อยโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินพร้อมกับสารที่บรรจุข้างในถูกปล่อยออกมาให้สารดังกล่าวคงอยู่ในดินหรือตำแหน่งที่ต้องการใช้งานได้เป็นเวลานาน จึงเป็นการช่วยประหยัดเวลา แรงงาน และลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้ยังใช้เป็นพลาสติกคลุมดินรักษาความชื้น ซึ่งเมื่อหมดเวลาการใช้งานจะค่อย ๆ ถูกสลายไปโดยธรรมชาติ (Lee, 1996)

-ใช้ทำแหจับปลา สำหรับใช้ในน้ำทะเลได้เป็นเวลานาน และสามารถกำจัดเมื่อเลิกใช้ได้โดยทิ้งลงใต้ทะเล (ค่าความถ่วงจำเพาะ 1.25) เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว (Brandl และคณะ,1990)

3. การประยุกต์ใช้เป็นวัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์ หรือส่วนประกอบของอุปกรณ์บางประเภท

- ใช้ผลิตขวดแชมพูที่ประกอบด้วยส่วนฝาที่ต้องการความแข็งแรงและปิดได้ดี

- ใช้ทำบรรจุภัณฑ์บรรจุอาหารประเภทถุง ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป แผ่นฟิล์มถนอมอาหาร

- ใช้ทำหมวกนิรภัยสำหรับจักรยาน รวมทั้งใช้ทำวัสดุที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง เช่น ผ้าอ้อม ผ้าอนามัย ด้ามมีดโกน เป็นต้น

- ใช้ทำวัสดุอื่นๆ เช่น ที่วางลูกกอล์ฟ กาวที่ละลายด้วยความร้อน สารเคลือบผิว แผ่นฟิล์ม บัตรเครดิต วัสดุเส้นใย (โดยถ้าผสม P(3HB) ลงในเส้นใยฝ้าย จะช่วยให้สมบัติในการรับความร้อนและคายความร้อนของเส้นใยช้าลงและเพิ่มความแข็งแรงให้กับเส้นใย เป็นต้น (Lee, 1996; Madison และ Huisman, 1999; Luengo และคณะ, 2003)

ในปี 2010 มีการใช้ PHA ในการทำบรรจุภัณฑ์ใส่เครื่องสำอางซึ่งมีชื่อการค้าว่า Mirel™ bioplastics เป็นการใช้ทดแทน (replace) พอลิพรอพิลีน ซึ่งเป็นการเสนอแนวทางทำให้ขยะที่จะนำไปกำจัดโดยการฝังกลบ (landfills) ลดลง โดยอายุการใช้งานของ Mirel™ bioplastics ขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของบรรจุภัณฑ์ที่ผลิตขึ้น

2.10 การผลิต P(3HB) จากจุลินทรีย์โดยการใช้แหล่งคาร์บอนมากเกินพอและจำกัดสารอาหารบางชนิด

มีการวิจัยการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยจุลินทรีย์หลายชนิด โดยในปี 1982 Wakisaka และคณะ พบว่า *Bacillus thuringiensis* สร้าง P(3HB) เมื่อมีความเข้มข้นของโปแตสเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ และแอมโมเนียมซัลเฟตกระตุ้นให้เกิดการสร้างแกรนูล P(3HB) เพิ่มมากขึ้นในสายพันธุ์ 290-1 ต่อมา Chen และคณะ (1991) รายงานผล การศึกษาการผลิต PHA ใน *Bacillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้ *B. megatarium* DSM90 *B. laterosporus* DSM335 *B. subtilis* DSM10 *B. sphaericus* DSM20 *B. cereus* DSM31 *B. amyloliquifaciens* DSM7 *B. licheniformis* DSM394 *B. macerans* DSM2892 *B. circulans* DSM1529 *B. thuringiensis* DSM 2046 *B. mycoides* DSM2048 ใช้วิธีการเพาะเลี้ยง 2 ขั้นตอน โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ขั้นตอนแรกให้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆเติบโตในในอาหารที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วของเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที บ่มเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์แห้งมาล้างด้วยน้ำ จากนั้นนำเซลล์ที่ล้างแล้วถ่ายลงในอาหารที่ขาดไนโตรเจน เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์พอลิเอสเทอร์ เมื่อจุลินทรีย์เติบโตในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ สายพันธุ์ต่าง ๆ สามารถสังเคราะห์ P(3HB) ได้ในปริมาณเล็กน้อย ซึ่งปริมาณ P(3HB) ภายในเซลล์ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนี้อยู่ในช่วง 5-20 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เมื่อควบคุมการหมักให้อยู่ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอและจำกัดปริมาณไนโตรเจน แบคทีเรียสามารถผลิตพอลิเมอร์ได้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมอะซีเตตและ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรตลงไปมีผลให้การสังเคราะห์ P(3HB) เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารที่เติมเพิ่มลงไปทำให้ปริมาณของอะเซติลโค-เอ และ 3-ไฮดรอกซีบิทิริลโค-เอภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น

รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต P(3HB) ได้จากดินจำนวน 30 สายพันธุ์ คัดเลือกได้สายพันธุ์ BA-019 ซึ่งสามารถผลิต P(3HB) ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่น และสามารถจำแนกชนิดเป็น *Bacillus* sp. เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Bacillus* sp. ที่แยกได้ใหม่นี้สามารถใช้น้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB) ได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่น และเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM โดยใช้กากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถผลิต P(3HB) ได้ 31.84 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (1 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน

Gouda และคณะ (2001) รายงานผล การศึกษาการผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* ในระดับขวดเขย่า โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ ฟรุกโตส กูลโคส ไซโลส แล็คโทส ซูโครส มอลโตส โซเดียมกลูโคเนต และกากน้ำตาล เพื่อที่จะคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพและราคาถูก พบว่ามอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของเซลล์ ดีที่สุดสำหรับการผลิต P(3HB) (45.6 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) รองมาคือ กากน้ำตาล (44.6 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) กากน้ำตาลสามารถผลิต P(3HB) ได้ในปริมาณสูงใกล้เคียงกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกทำให้ลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการหมักระดับอุตสาหกรรม รวม ทั้งกากน้ำตาลประกอบด้วย trace element และวิตามิน เช่น thiamine, riboflavin, pyridoxine และ niacinamide สำหรับใช้เป็นแหล่งของ growth factor และเมื่อศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1-5 เปอร์เซนต์ที่เติมลงในอาหารสำหรับการผลิต พบว่ากากน้ำตาลความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีที่สุดและกากน้ำตาล 2 เปอร์เซนต์เชื้อสามารถผลิต P(3HB) ได้มากที่สุด คือ 46.3 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ แต่พบว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลมากขึ้น ทำให้มีการผลิต P(3HB) ลดลง เช่นเดียวกันกับผลการทดลองเปรียบเทียบการจำกัดปริมาณไนโตรเจน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับการผลิตที่มีความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพด 0.5-7 เปอร์เซนต์ พบว่าน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์เชื้อสามารถผลิต P(3HB) ได้มากที่สุดเท่ากับ 49.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดมีผลทำให้ความสามารถในการผลิต P(3HB) ลดลง

Quillaguamán และคณะ(2006) ได้คัดแยกเชื้อ *Halomonas boliviensis* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มชอบความเค็มปานกลาง (moderate halophile) จากดินเค็มในประเทศ Bolivia พบว่าเชื้อสามารถสะสม P(3HB) ได้เมื่อเจริญในภาวะที่มีสารอาหารจำกัดและมีปริมาณคาร์บอนมากเกินจำเป็น ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญ ขนาดของเซลล์ และปริมาณของ P(3HB) จากผลการศึกษาพบว่าสามารถผลิต P(3HB) ได้เท่ากับ 54 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 4.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยมีกรดบิวทิริคและโซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อเลี้ยงเชื้อภายใต้การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 โดยให้อัตราการกวนที่ 700 รอบต่อนาทีในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 88 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

Jiang และคณะ (2008) รายงานว่า *Pseudomonas fluorescens* A2a5 สามารถใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) เพิ่มขึ้น ขณะที่น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำอ้อยและปริมาณโมโนโซเดียมกลูตาเมตลดลง เนื่องจากถูกนำไปใช้ในการสร้างเป็นองค์ประกอบของเซลล์และใช้ในการสะสม P(3HB)

โดยจากการทดลองเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซสเซียส พบว่าได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 32 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 22 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 96 ชั่วโมง และค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงซึ่งจัดว่า *P. fluorescens* A2a5 สามารถสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณมากเมื่อเทียบกับ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์อื่นๆที่สามารถสะสม P(3HB) ได้เพียง 1-2 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการศึกษานี้ Jiang และคณะจึงสรุปว่า *P. fluorescens* A2a5 สามารถผลิต P(3HB) ได้ในปริมาณสูงในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ โดยนำน้ำอ้อยมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักเนื่องจากมีข้อดีคือมีราคาถูกและหาได้ง่าย จึงช่วยลดต้นทุนในการผลิต P(3HB) ได้

Kulpreecha และคณะ(2009) ศึกษาการผลิต P(3HB) เพื่อเพิ่มการผลิต P(3HB) และเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์โดย *Bacillus megaterium* BA-019 ใช้กากน้ำตาลและยูเรียซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อโดยวิธี fed-batch เพื่อให้ได้ทั้งความหนาแน่นของเซลล์และอัตราการผลิต P(3HB) สูงขึ้น จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 แบบ fed-batch ที่มีการควบคุมการป้อนสารอาหารด้วยวิธี pH-stat พบว่าเมื่อใช้สารอาหารป้อนเข้าที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุให้ผลการเติบโตของเซลล์อย่างรวดเร็วและมีการผลิต P(3HB) เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยผลการศึกษาพบว่าดีกว่าการใช้สารอาหารป้อนเข้าที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน หรือใช้แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว พบว่าการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมลในสารป้อนเข้า มีผลให้เพิ่มการผลิต P(3HB) และความหนาแน่นของเซลล์ โดยให้ความเข้มข้นของเซลล์ปริมาณสูงขึ้นมาก โดยได้เท่ากับ 72.57 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณของ P(3HB) เท่ากับ 30.52 กรัมต่อลิตรคิดเป็นปริมาณเท่ากับ 42 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีอัตราการผลิต P(3HB) สูงขึ้นเป็น 1.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.11 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสร้างเซลล์ สำหรับแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่

-น้ำมันพืช เช่น น้ำมันมะกอก น้ำมันข้าวโพด น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น ซึ่งการใส่น้ำมันพืชในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจมีจุดประสงค์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเฉพาะเป็นแหล่งของกรดโอลิอิก กรดลิโนลิอิกและกรดลิโนลินิก หรืออาจใช้เพื่อให้ทำหน้าที่เป็นสารกำจัดฟองก็ได้

-กากถั่วเหลือง (soy bean meal) นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ด้วย เนื่องจากมีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบในปริมาณสูง

-กากน้ำตาล (Molasses) โดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 2 ชนิดตามแหล่งที่มา คือ กากน้ำตาลอ้อย (sugar cane molasses) และกากน้ำตาลบีท (beat molasses) ซึ่งการจะเลือกใช้กากน้ำตาลชนิดใดเป็นวัตถุดิบนั้น ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศของแต่ละประเทศ

กากน้ำตาล (Solaiman และคณะ, 2006) เป็นแหล่งคาร์บอนที่นิยมนำมาใช้ในการผลิต P(3HB) เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่มีปริมาณมาก หาได้ง่ายและมีราคาถูก นอกจากนั้นยังมีการนำหางนม (Koller และคณะ, 2008) ข้าวสาลี (Van-Thuoc และคณะ, 2008) รำข้าว (Huang และคณะ, 2006) แป้ง (Quillaguáman และคณะ, 2005 ; Halami, 2008) กากตะกอนของน้ำเสีย (Yan และคณะ, 2006) และน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันมะกอก (Pozo และคณะ, 2002 ; Ribera และคณะ, 2001) มาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อลดต้นทุนในการผลิต P(3HB)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลือกใช้แหล่งคาร์บอน

- ผลผลิตที่ต้องการ การเลือกใช้ชนิดของแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก อาจพิจารณาจากผลผลิตหลักที่ต้องการ โดยเฉพาะในกรณีที่ผลผลิตนั้นเกิดจากการสลายตัวของแหล่งคาร์บอนโดยตรง

-ราคา กระบวนการหมักโดยส่วนใหญ่ต้นทุนการผลิตหลักคือค่าวัตถุดิบที่ใช้เป็นสับสเตรต ดังนั้นราคาของผลผลิตที่ได้จึงขึ้นกับราคาของแหล่งคาร์บอน จึงควรเลือกใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก

-ความบริสุทธิ์ กระบวนการผลิตสารบางประเภท วัตถุดิบที่ใช้ผลิตต้องไม่มีการเจือปนไอออนของโลหะหนัก จึงควรเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น น้ำตาลบริสุทธิ์

-กฎหมาย เช่น ประเทศในกลุ่มตลาดร่วมยุโรป จะมีการส่งเสริมการใช้น้ำตาลหรือกากน้ำตาลจากหัวบีท โดยมีการควบคุมราคาต่ำสุดของน้ำตาลบีทและควบคุมปริมาณการนำเข้าน้ำตาลหรือกากน้ำตาลอ้อยอย่างเข้มงวด รวมทั้งมีการควบคุมราคาไม่ให้แข่งขันกับน้ำตาลบีทได้

-วิธีการสเตอริไลส์อาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการสเตอริไลส์อาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความร้อนภายใต้ความดันสูงจะมีผลต่อแหล่งคาร์บอน เช่น ถ้าใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ควรสเตอริไลส์น้ำตาลแยกจากส่วนประกอบอื่นๆ เพราะที่พีเอชเป็นกลางและอุณหภูมิสูงน้ำตาลจะทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนได้เป็นสารประกอบไนโตรเจน ทำให้อาหารมีสีน้ำตาลเข้มและอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้บางส่วนหรือหากใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนมักจะมีปัญหาเมื่อใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อเนื่องจากแป้งจะเกิดเป็นเจลทำให้มีความหนืดสูง

สำหรับงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB) เพื่อทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลง เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกมากในประเทศไทยและเป็นพืชที่สามารถตัดและเก็บเกี่ยวได้หลายครั้ง โดยในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจะใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบหลักและมีน้ำอ้อยเกิดขึ้นหลายขั้นตอน ซึ่งในน้ำอ้อยจะประกอบไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์อยู่หลายชนิด เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส รวมทั้งวิตามินและธาตุอาหารเป็นจำนวนมาก (ตารางที่ 2.4) จึงสามารถนำมาใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้ การใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตสารผลิตภัณฑ์ มีข้อดีคือ น้ำอ้อยมีความบริสุทธิ์สูง การเตรียมก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก (pretreatment) มีเพียงเล็กน้อย ที่สำคัญคือเป็นส่วนที่ได้จากต้นกระบวนการของการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งจัดว่าเป็นการประหยัดพลังงาน (energy saving) ถ้าเปรียบเทียบกับน้ำตาลทราย (รูปที่ 2.8) และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ การแยกและทำบริสุทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ทำได้ง่าย ใช้ขั้นตอนน้อย เนื่องจากไม่มีสี รวมทั้งการบำบัดของเหลือทิ้งจากน้ำหมัก (effluent treatment) ก็ทำได้ง่ายและสะดวก

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของน้ำอ้อย (มิตรผลวิจัย, 2551)

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

2.12 กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย

น้ำตาลทรายดิบเป็นน้ำตาลที่มีผลึกเป็นสีน้ำตาลเข้ม มีความชื้นสูงเนื่องจากผลึกถูกห่อหุ้มไปด้วยกากน้ำตาลที่มีความบริสุทธ์ต่ำเป็นจำนวนมาก ไม่ผ่านกรรมวิธีการฟอกสี

น้ำตาลทรายขาวมีลักษณะเป็นผลึกขาว มีโพลาไรเซชัน ประมาณ 99 องศาเซลเซียส ปกติผลิตจากอ้อยโดยตรงสำหรับโรงงานที่มีลูกหีบ กระบวนการผลิตในระยะเริ่มต้นจะเหมือนน้ำตาลทรายดิบ จะเริ่มแตกต่างกันตั้งแต่กระบวนการทำน้ำอ้อยให้ใส

1. การขนถ่าย (cane transportation and unloading) หลังจากผ่านกระบวนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำอ้อย หรือค่า C.C.S. แล้ว อ้อยจะถูกลำเลียงมายังลานพักอ้อย (cane yard) เพื่อทำการชั่งบันทึกน้ำหนักอ้อย ในการปล่อยให้อ้อยหล่นลงบนสะพานอ้อย (cane carrier) โดยอาศัยเครื่องมือช่วยลาก เพื่อเตรียมพร้อมเข้าสู่เครื่องมือชนิดต่างๆ

2. การเตรียมอ้อยก่อนเข้าลุกหีบ (cane preparation) คือ การทำให้ลำอ้อยกลายเป็นชิ้นละเอียดก่อนป้อนเข้าลูกหีบ โดยอาศัยเครื่องฉีก (shredder) ฉีกย่อยอ้อยให้เป็นฝอยละเอียด โดยอาศัยการตีของแท่งค้อนที่เหวี่ยงตัวหมุนลงมา

3. การบดอ้อย (cane milling) อ้อยจะถูกลำเลียงไปโดยสะพานป้อนอ้อย เข้าสู่ลูกหีบชุดที่1 น้ำอ้อยที่สกัดได้ เรียกว่า น้ำอ้อยที่สกัดได้ขั้นแรกซึ่งเป็นน้ำอ้อยแท้ จากนั้นอ้อยจะถูกพ่นด้วยน้ำแล้วนำเข้าลูกหีบชุดต่อไป ทำให้ได้น้ำอ้อยสกัดขั้นที่ 2 ส่วนผสมของน้ำอ้อยทั้งสองส่วนนี้เรียกว่า น้ำอ้อยรวม (mixed juice) ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้น้ำอ้อยรวมในการผลิต P(3HB)

4. ขั้นตอนการทำน้ำอ้อยใส (clarification) ขั้นตอนนี้จะแยกสิ่งสกปรกออกจากน้ำอ้อยโดยการตกตะกอน เช่น

กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ จะใช้วิธีที่เรียกว่า defecation method โดยนำน้ำอ้อยรวมเข้าหม้ออุ่นน้ำอ้อยเมื่ออุณหภูมิถึง 55 องศาเซลเซียส จึงเติมปูนขาวลงไปจนกระทั่งมีค่าความเป็นกรดด่าง ประมาณ 7.0-7.2 ระยะเวลาผสมไม่ควรเกิน 3 นาที จากนั้นนำเข้าหม้ออุ่นให้น้ำอ้อยมีอุณหภูมิ 102-105 องศาเซลเซียส และผสมกับสารรวมตะกอน (flocculant) สิ่งสกปรกที่ตกตะกอนลงมาเรียกว่า ตะกอนตม (mud) ซึ่งมีประมาณร้อยละ 25 ของน้ำอ้อยใส

กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายขาว จะทำน้ำอ้อยบริสุทธิ์โดยเพิ่มกรรมวิธีฟอกสีน้ำอ้อย เช่น การใช้ระบบซัลฟิเทชัน (sulphitation) ฟอกสีน้ำอ้อยด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์และระบบคาร์บอเนชัน (carbonation) ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งทั้งสองระบบนี้ยังคงต้องใช้น้ำปูนขาวและความร้อนในการทำน้ำอ้อยบริสุทธิ์ ส่วนการแยกตะกอนออกทำให้น้ำอ้อยใสนั้น ระบบซัลฟิเทชันยังคงต้องใช้ถังพักใส เช่นเดียวกับการผลิตน้ำตาลทรายดิบ แต่ระบบคาร์บอเนชันจะใช้เครื่องกรองแบบมีผ้ากรอง

5. ขั้นตอนการทำน้ำอ้อยให้เป็นน้ำเชื่อม (evaporation) น้ำอ้อยที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามระบบดังกล่าวข้างต้น จะถูกส่งเข้าชุดหม้อต้ม หม้อต้มที่ใช้อาจเป็นระบบ 4-6 ชุด หม้อต้มระเหย

เหล่านี้ตั้งเรียงเป็นแถวติดต่อกันโดยใช้ความร้อนจากไอน้ำ สำหรับใบแรกใช้ความร้อนถึง 128 องศาเซลเซียส ไอน้ำที่เกิดขึ้นในหม้อต้มใบแรกจะถูกนำไปใช้ต้มระเหยน้ำอ้อยในหม้อต้มใบที่สอง และไอน้ำจากหม้อต้มใบที่สองจะถูกนำไปใช้ในหม้อต้มใบที่สามเช่นกัน การทำงานของหม้อต้มระเหยจะต่อเนื่องกันจนน้ำเชื่อมมีความเข้มข้น 65 บริกซ์ ภายใต้ภาวะสูญญากาศ

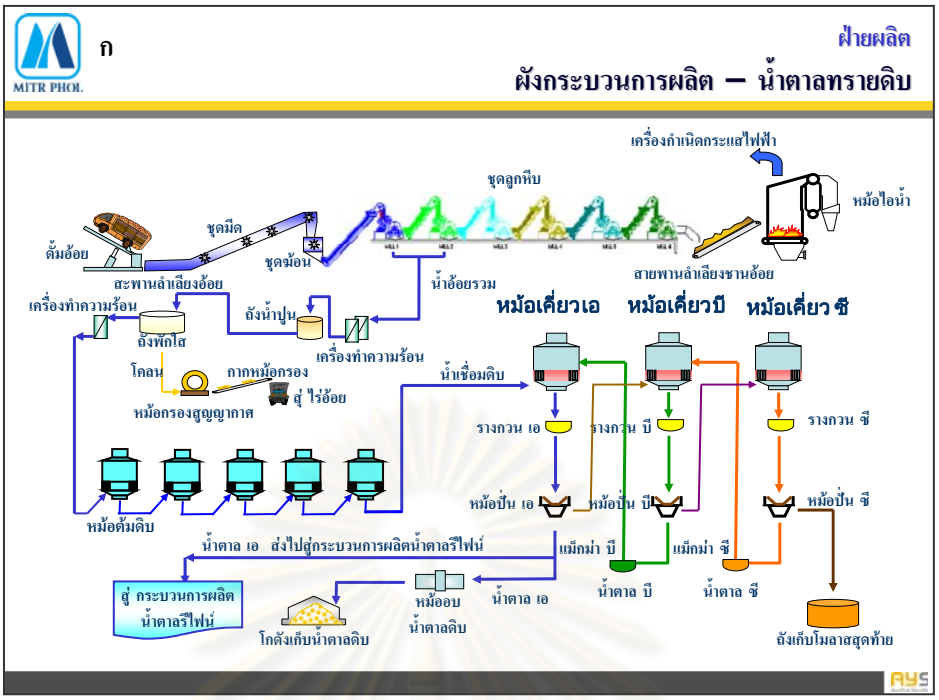
6. ขั้นตอนการต้มเคี่ยวน้ำเชื่อม (boiling) น้ำเชื่อมจากถังพักน้ำเชื่อมจะถูกนำไปต้มเคี่ยวซึ่งใช้ความร้อนต่ำภายใต้สูญญากาศ (vacuum pan) ความร้อนที่ใช้ประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส สูญญากาศประมาณ 26-28 นิ้วของปรอท น้ำเชื่อมจะถูกเคี่ยวจนมีความเข้มข้นมากขึ้น จนกระทั่งเกิดผลึก (crystalline mass) เมื่อน้ำเชื่อมอยู่ในลักษณะที่เต็มไปด้วยผลึกน้ำตาล เรียกว่า แมสซิควิท

7. ขั้นตอนการเลี้ยงผลึกน้ำตาลทรายในถังพักผลึก (crystallization in crystallizer) เนื่องจากแมสซิควิทที่ปล่อยออกมาจากหม้อเคี่ยว ประกอบด้วยผลึกน้ำตาลทรายและน้ำเลี้ยงผลึก (mother liquor) การเลี้ยงผลึกน้ำตาลทำได้ 2 วิธีคือ

การเคี่ยวให้เกิดผลึกน้ำตาลขึ้นเองจะต้องเคี่ยวจนกระทั่งความเข้มข้นของน้ำเชื่อมเพิ่มถึงภาวะเหนือจุดอิ่มตัวและลดความเข้มข้นลงโดยเติมน้ำหรือน้ำเชื่อม เลี้ยงผลึกน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้โตถึงขนาดที่ต้องการ อย่างไรก็ตามการลี้ยงผลึกโดยวิธีนี้ ในปัจจุบันไม่นิยมเนื่องจากการควบคุมปริมาณขนาดและความสม่ำเสมอของผลึกน้ำตาลทำได้ยาก

วิธีกระตุ้นให้เกิดแกนผลึกเฉียบพลัน (shock seeding) โดยเคี่ยวน้ำเชื่อมให้มีความเข้มข้นระดับหนึ่งตามกำหนด แล้วเติมผงเชื้อน้ำตาลซึ่งได้จากการบดน้ำตาลทรายขาวที่อบแห้งละเอียดขนาด 0.03 มิลลิเมตร ลงไปในหม้อเคี่ยว หลังจากนั้น 2-3 นาที ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงถึงระดับหนึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาการกระตุ้นอย่างเฉียบพลัน (shock) น้ำตาลที่ละลายในน้ำเชื่อมจะแยกตัวออกมาเป็นแกนผลึกอย่างต่อเนื่องมากมาย เมื่อแกนผลึกมีมากพอแล้ว หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำเชื่อมเข้าหม้อเคี่ยวระดับหนึ่งจนความเข้มข้นลดลงถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะในการเลี้ยงแกนผลึกเพื่อให้มีขนาดโตตามต้องการ

วิธีเติมผงเชื้อน้ำตาลตามจำนวนจริง (true seeding) โดยบดน้ำตาลทรายขาวที่อบแห้งแล้วผสมกับแอลกอฮอล์แล้วเติมลงในน้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นถึงระดับที่กำหนด ปิดไอน้ำที่เข้าหม้อเคี่ยวจนกระทั่งผงเชื้อน้ำตาลกระจายตัวทั่วน้ำเชื่อม แล้วจึงเปิดไอน้ำเคี่ยวต่อประมาณ 15-30 นาที เติมน้ำเชื่อมเข้าไปอย่างต่อเนื่อง เลี้ยงผลึกที่เกิดขึ้นให้มีขนาดตามต้องการ



รูปที่ 2.8 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ (ก) และน้ำตาลรีไฟน์ (ข) (มิตรผลวิจัย, 2551)

2.13 ประโยชน์จากอ้อย

1. การใช้ประโยชน์โดยตรง

1.1 ใช้เป็นอาหารมนุษย์ ส่วนของลำต้นที่เก็บน้ำตาลสามารถนำมาเป็นอาหารของมนุษย์ได้หรือบีบเอาน้ำอ้อยเพื่อบริโภคโดยตรง นอกจากนี้ยังใช้ลำต้นประกอบอาหารหรือนำมาใช้เป็นยารักษาโรค

1.2 ใช้เป็นอาหารสัตว์ ใบ ยอด และส่วนของลำต้นที่ยังอ่อนใช้เป็นอาหารสัตว์ แต่ถ้าต้องการให้ ได้ผลดีควรใช้วิธีหมักก่อนให้สัตว์กิน

1.3 ใช้เป็นเชื้อเพลิง ในอนาคตเมื่อเชื้อเพลิงที่ให้จากไม้หายาก อาจนำใบอ้อยแห้ง (trash) มาใช้เป็นแหล่งของพลังงานและเชื้อเพลิงที่สำคัญได้ เพราะใบอ้อยแห้งให้พลังงานค่อนข้างสูงมาก

1.4 ใช้เป็นวัตถุคลุมดินหรือบำรุงดิน ใบอ้อยแห้งเมื่อใช้คลุมดินจะช่วยรักษาความชื้น ป้องกันวัชพืช และเป็นอาหารของจุลินทรีย์ต่างๆ ซึ่งจุลินทรีย์บางพวกสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ทำให้ไนโตรเจนในดินเพิ่มขึ้น สำหรับรากและเหง้าของอ้อยที่อยู่ในดินเมื่อเน่าเปื่อยผุพังก็จะเป็นปุ๋ยแก่ดิน

2. การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม

ประโยชน์ที่สำคัญของอ้อยก็คือ เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมน้ำตาล ในทางเคมี น้ำตาลส่วนใหญ่ที่ได้จากอ้อยเป็นน้ำตาลซูโครส นอกจากนั้นก็มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรักโทสอยู่ด้วย ซึ่งทั้งสองชนิดนี้รวมเรียกว่าน้ำตาลอินเวิร์ต (invert sugar) โดยในทางการค้าน้ำตาลจากอ้อยมีชื่อเรียกต่างๆ กัน ตามความบริสุทธิ์และกรรมวิธีในการผลิต เช่น น้ำตาลแดงหรือน้ำตาลทรายแดง (brown sugar, gur, jaggery, muscovado) น้ำตาลดิบหรือน้ำตาลทรายดิบ (raw sugar) น้ำตาลทรายขาว (white sugar หรือ plantation white sugar) น้ำตาลทรายบริสุทธิ์ หรือน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (refined sugar)

ในการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยโดยตรงนั้นมีผลพลอยได้ (by-products) เกิดขึ้นหลายอย่าง ที่สำคัญได้แก่ ชานอ้อย กากตะกอน (filter mud, filter cake) และกากน้ำตาล (molasses) ทั้งน้ำตาลและผลพลอยได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง

2.14 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์

แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่

- แอมโมเนีย อาจใช้ในรูปแก๊สหรือสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้นร้อยละ 25 การใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนจะต้องระวังในการเก็บรักษา เนื่องจากแอมโมเนียระเหยง่าย จึงต้องเก็บในภาชนะบรรจุที่ป้องกันการระเหยและทนต่อการกัดกร่อนได้

- ไนเตรตและเกลือแอมโมเนียม โดยเกลือแอมโมเนียมที่มีราคาถูกที่สุด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรียก็ได้ โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน จุลินทรีย์บางชนิดโดยเฉพาะมิวแตนท์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตกรดอะมิโน จะเจริญได้เฉพาะในอาหารที่มีกรดอะมิโนชนิดที่มันต้องการอยู่ด้วยเท่านั้น แต่เนื่องจากกรดอะมิโนบริสุทธิ์มีราคาแพง ดังนั้นจึงนิยมใช้กรดอะมิโนจากสารประกอบเชิงซ้อน เช่น การผลิตไลซีน จะใช้ soya bean hydrolysate เป็นแหล่งเมทไธโอนีนและทรีโอนีน เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีวัตถุดิบอื่น ๆ ที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่

- น้ำแช่ข้าวโพด ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง ฟาร์มามีเดีย Distiller's soluble, casein hydrolysate, fish meal, yeast extract เป็นต้น

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจน

- ชนิดของจุลินทรีย์
- ราคาของแหล่งไนโตรเจน
- ประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิต

นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้วแหล่งไนโตรเจนก็มีผลต่อราคาการผลิต P(3HB) เช่นกัน โดยแหล่งไนโตรเจนที่นิยมนำมาใช้ในการผลิต P(3HB) ได้แก่ NH_4Cl $(NH_4)_2SO_4$ NH_4NO_3 $(NH_4)_3PO_4$ โมโนโซเดียมกลูตาเมต และยูเรีย (Groom และคณะ, 1998; Quillaguamán และคณะ, 2008) โดยแหล่งไนโตรเจนที่กล่าวมาพบว่ายูเรียมีราคาถูกที่สุด Loo และ Sudesh (2007) รายงานว่านอกจากยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับการผลิต P(3HB) เนื่องจากมีราคาถูกและยังส่งเสริมการสร้าง P(3HB) ดังนั้นถ้าสามารถหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต P(3HB) โดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ จะทำให้ราคาการผลิตลดลงได้

2.15 กระบวนการหมักแบบ batch

กระบวนการหมักแบบ batch เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เติบโตในระบบปิด ซึ่งส่วนใหญ่ทำในขวดเขย่าหรือถังหมักที่มีสารอาหารเหมาะสมต่อการเติบโต และเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม กระบวนการหมักแบบนี้ไม่มีการเติมสารอาหาร เซลล์จะเติบโตจนกระทั่งองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นหมดไป หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เนื่องจากสะสมสารพิษหรือ pH เปลี่ยนแปลง เป็นต้น การเติบโตของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ batch แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้

1. ระยะฟักตัว (lag phase) ระยะนี้เริ่มต้นเมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะที่เซลล์ยังไม่มีการเติบโต เนื่องจากเป็นระยะที่จุลินทรีย์กำลังปรับตัว เพื่อให้สามารถเติบโตได้ในสิ่งแวดล้อมใหม่ ระยะนี้จะใช้เวลานานเท่าใดขึ้นกับลักษณะการเติบโตของกล้าเชื้อ ในอุตสาหกรรมต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต

2. ระยะการเติบโตแบบทวีคูณ (log หรือ exponential phase) เป็นระยะที่เซลล์มีการเติบโตเพิ่มขึ้นตามลำดับจนกระทั่งคงที่ ระยะนี้เซลล์มีอัตราการเติบโตแบบทวีคูณ

3. ระยะการเติบโตคงที่ (stationary phase) เมื่อสิ้นสุดระยะการเติบโตแบบทวีคูณ อัตราการเติบโตจะลดลงจนกระทั่งเป็นศูนย์ ระยะนี้ความหนาแน่นของเซลล์ค่อนข้างคงที่ และไม่มีการเติบโตของเซลล์ ซึ่งถึงแม้ว่าเซลล์จะมีการเติบโต แต่อัตราการเติบโตเท่ากับอัตราการตาย การที่เซลล์หยุดการเติบโตเนื่องจากสารอาหารจำเป็นหมดไป การสะสมสารพิษ หรือสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลง เช่น ค่า pH เซลล์ที่ดำรงชีพได้ระยะนี้ เนื่องจากเหตุผลหลายประการ คือ ภายในเซลล์มีพอลิเมอร์บางประเภทสะสมอยู่ ซึ่งเซลล์สามารถนำมาใช้เป็นซับสเตรทได้ หรือมีการพัฒนารูปแบบเซลล์ให้ทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น การสร้างสปอร์

4. ระยะการเติบโตแบบลดลง (decline หรือ death phase) เป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการตายมากกว่าอัตราการเติบโต (Scragg, 1991; Snape และคณะ, 1995; Asenjo และ Merchuk, 1995)

การเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะ log phase สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

เซลล์ที่สะสม = เซลล์เติบโต-เซลล์ออก-เซลล์ตาย

$$dX/dt = \mu X - (F/V)X - aX \qquad (1)$$

เมื่อเซลล์ไม่ถูกนำออกจากระบบ และ a น้อยกว่า μ มาก เขียนสมการ (1) ใหม่ได้

$$dX/dt = \mu X \qquad (2)$$

เมื่อ X = ความเข้มข้นมวลชีวภาพ (g/l)

t = เวลา (h)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) (h^{-1})

F = อัตราการป้อนอาหารเข้า (l/h)

V = ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (l)

a = อัตราการตายจำเพาะ (h^{-1})

เมื่ออินทิเกรตสมการ (2) จะได้

$$X_t = X_o e^{\mu t} \qquad (3)$$

เมื่อ X_o = ความเข้มข้นมวลชีวภาพเริ่มต้น (g/l)

X_t = ความเข้มข้นมวลชีวภาพหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ ณ เวลา t ชั่วโมง (g/l)

e = ฐานของ natural logarithm

0Bเมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (3) จะได้

$$\mu = [\ln (X_t/X_o)]/t \qquad (4)$$

อัตราการผลิต (productivity) ของกระบวนการหมักแบบ batch แสดงค่าในเทอมของกรัมผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นต่อหน่วยปริมาตรต่อหน่วยเวลา หรือ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.16 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. ระดับขวดเขย่า (shake flask)

การเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าเป็นการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวเพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และสามารถทราบผลของตัวแปรในการศึกษาโดยใช้เวลาสั้น การศึกษาทำได้สะดวก ไม่ยุ่งยาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อย ตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ทำให้สามารถหาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ได้ในการทดลองระดับนี้

2. ระดับถังหมักห้องปฏิบัติการ (lab scale fermenter)

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการเป็นการเลี้ยงเชื้อโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ เพิ่มปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และอื่นๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการผลิต (production process) ที่ต้องการ ข้อได้เปรียบของการเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมักมีหลายประการ ได้แก่ สามารถให้อากาศ (ออกซิเจน) แก่ระบบได้มากกว่าระดับขวดเขย่า เนื่องจากมีการให้อากาศและการกวน ซึ่งมีผลให้มีการผสม (mixing) ได้ดีระหว่างเซลล์ สารอาหาร และออกซิเจน ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญได้ดี สามารถควบคุมภาวะในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้มากกว่าการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า เช่น ค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิตลอดการเลี้ยงเชื้อ ค่าออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen) ทราบการเปลี่ยนแปลงของค่าตัวแปรเหล่านี้ได้ตลอดการศึกษาโดยมีการบันทึกโดยเครื่องอัตโนมัติ สามารถเติมสารอาหารระหว่างการเลี้ยงเชื้อ (fed-batch และ continuous cultivation) ทำให้การเลี้ยงเชื้อได้นานขึ้น โดยไม่ต้องเริ่มต้นใหม่ แต่ส่งผลให้ได้ผลผลิตมากขึ้น รวมทั้งหลีกเลี่ยงการยับยั้งการเจริญจากความเข้มข้นของสารเริ่มต้น (feed back inhibition)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟฟี (gas chromatography) รุ่น 3400CX ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.2 แคปพิลลารี คอลัมน์ (capillary column) ชนิด CP-WAX 52 CB เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม.ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3 เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen generator) รุ่น 9200 ของบริษัท Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychotherm incubator shaker) รุ่น G27 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.5 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S ของบริษัท Sartorious ประเทศเยอรมณี

3.1.6 เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P ของบริษัท Sartorious ประเทศเยอรมณี

3.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P ของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น

3.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่น Centrikon T-42Kของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น

3.1.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (VIS spectrophotometer) รุ่น Novaspec II ของบริษัท Pharmacia Biotech ประเทศอังกฤษ และหลอดใส่ตัวอย่าง (cuvette)

3.1.10 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 2000 ของบริษัท Cyberscan ประเทศสิงคโปร์

3.1.11 ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124ของบริษัท ISSCO ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.12 ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL-60 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมณี

3.1.13 ตู้อบแห้ง (dryer oven) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมณี

3.1.14 หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy ประเทศญี่ปุ่น

3.1.15 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมณี

3.1.16 ไมโครปิเปตและทิปขนาด 100 200 1,000 และ 5,000 มล.

3.1.17 ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร ของบริษัท B.E. Marubishi ประเทศญี่ปุ่น

3.2 เคมีภัณฑ์

3.2.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4)

3.2.2 กรดซิตริก ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)

3.2.3 กรดบอริก (H_3BO_3)

3.2.4 กรดเบนโซอิก ($C_7H_6O_2$)

3.2.5 คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$)

3.2.6 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

3.2.7 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)

3.2.8 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)

3.2.9 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.2.10 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.2.11 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.2.12 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl)

3.2.13 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

3.2.14 นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)

3.2.15 น้ำตาลทราย

3.2.16 น้ำอ้อย

3.2.17 แบคโตทริปโตส (Bacto tryptose)

3.2.18 ผงวุ้น

3.2.19 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

3.2.20 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

3.2.21 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.2.22 เมทานอล (CH_3OH)

3.2.23 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.2.24 แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 6H_2O$)

3.2.25 ยูเรีย (N_2H_6CO)

3.2.26 สารมาตราฐานพอลีเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

3.2.27 สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)

3.2.28 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

3.2.29 เอนไซม์อินเวอร์เทส

3.2.30 เอนไซม์ยูรีเอส

3.2.31 แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$]

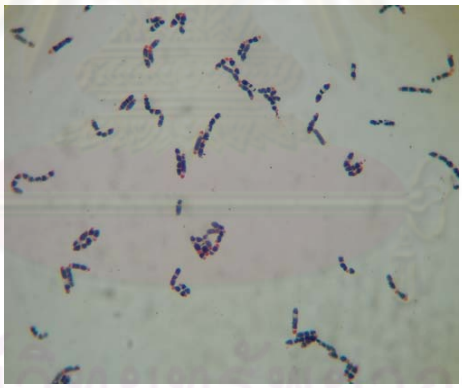
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Bacillus megaterium* BA-019 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการโดยรัตนศิริ มุทิตากุล (2538) และจัดจำแนกสปีชีส์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA โดยกุสุมา กมลจรัสโสภา (2547)

รูปที่ 3.1 *Bacillus megaterium* BA-019 เมื่อย้อมสีแกรม กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 3.2 *Bacillus megaterium* BA-019 เมื่อย้อมสีซูดาน แบลค บี กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.2.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

beef extract	3	กรัม
bacto tryptose	5	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

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

yeast extract	10	กรัม
bacto tryptose	10	กรัม
beef extract	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
น้ำตาลทราย	10	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.2.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการสร้างและสะสม P(3HB) คือ อาหาร MSM (Mineral salt medium) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

น้ำอ้อยที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar)	20	กรัม
ยูเรีย	0.8	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
กรดซิตริก	0.75	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร

แยกละลายเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตและสารละลาย trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับ pH เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนของสารละลายน้ำตาลแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

สารละลาย trace element ใน 1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.30	กรัม
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.20	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต	0.60	กรัม
กรดบอริก	0.60	กรัม

แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์	0.08	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.50	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	0.05	กรัม
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.02	กรัม

3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.3.3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

เขี่ยแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.4 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล (balanced growth condition)

3.3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเป็นกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 3.3.3.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียงใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 %) เพื่อทำให้เป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.4

3.3.4.2 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต

ถ่ายหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.4.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (OD_{600}= 0.4) ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ)

3.3.4.3 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้

3.3.5 ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารแต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB)

3.3.5.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต P(3HB)

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกันโดยใช้ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้

3.3.5.2 การศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารจำเป็นบางชนิดต่อการผลิต P(3HB)

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยมีการจำกัดธาตุอาหารบางชนิด ได้แก่

ก. จำกัดปริมาณไนโตรเจน โดยใช้ยูเรียความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 และ 1.2 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณคาร์บอนที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM)

ข. จำกัดปริมาณแมกนีเซียม โดยใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้น 0 0.1 และ 0.2 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากข้อ 3.3.5.2 (ก) ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม

ค. ผลร่วมระหว่างโพแทสเซียมและฟอสเฟต โดยใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 2.0 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยใช้ปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากข้อ 3.3.5.2 (ก) และใช้ปริมาณแมกนีเซียมที่ได้จากข้อ 3.3.5.2 (ข) ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม

เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้

3.3.6 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้จากข้อ 3.3.5.2 มาเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.3.6.1 การผลิต P(3HB) จากน้ำอ้อย

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงกล้าเชื้อให้ได้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 3 ลิตร โดยเลือกภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) จากข้อ 3.3.5.2 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ตลอดการเลี้ยงเชื้อ โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ตามลำดับ(อติพล บุญเรืองถาวร, 2543) เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ และคำนวณหาค่าอัตราการผลิต (productivity)

3.3.6.2 การผลิต P(3HB) จากกากน้ำตาล

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.3.6.1 แต่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำอ้อย เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ และคำนวณหาค่าอัตราการผลิต (productivity) เปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้ในข้อ 3.3.6.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 วิธีวิเคราะห์

3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ โดยการเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์อบแห้ง คำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) ในหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอินเวอร์เทส 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธีของ Bernfeld (1955) โดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid, DNSA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในอ่างน้ำเย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำตาลซูโครส และค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณยูเรีย

ตามวิธีของ Kemper (1974) นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุตามความเหมาะสมปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ยูเรียเอส (urease) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย EDTA 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลไนโตรพัสไซด์ 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรด์ 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ในน้ำกลั่นปลอดประจุเป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวณหาปริมาณยูเรีย (หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณยูเรีย และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography : GC)

ตามวิธีของ Comeau และ คณะ (1988) โดยการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ชั่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียวเติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 3 (3 % acidified methanol) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารละลายมาตรฐานภายในความเข้มข้นเท่ากับปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 5 นาที และนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ไปสกัดแยกกรดและกากเซลล์ตามวิธีข้างต้นอีกครั้ง ถ่ายชั้นคลอโรฟอร์มใส่หลอดฝาเกลียวสำหรับวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟฟี แล้ววิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธี GC ภายใต้ภาวะ ดังนี้

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

3.4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำอ้อยด้วยเครื่อง ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

นำน้ำอ้อยมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำส่วนที่กรองได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคส ฟรักโตสและซูโครส โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีก (peak area) ของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด โดยวิเคราะห์ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: Phenomenax Spherisorb NH_2LCD
ชนิดของดีเทคเตอร์	: Refractive Index Detector
flow rate	: 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: 90% อะซีโตไนไตรล์ในน้ำ (ปริมาตรต่อปริมาตร)
ปริมาตรที่ฉีด	: 5 ไมโครลิตร

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต

Keshavarz และ Roy (2010) พบว่า การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ที่เหมาะสมนั้นควรเป็นกระบวนการต่อเนื่อง (serial process) ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกจุลินทรีย์จะมีการเจริญในแหล่งคาร์บอนที่ทำให้มีการผลิตเซลล์ปริมาณมาก ส่วนในขั้นตอนที่สองมีการเติมสารอาหารเพื่อใช้ในการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เซลล์ปริมาณมากที่ได้ในขั้นตอนแรกก็จะใช้สารอาหารนั้น เพื่อนำไปสังเคราะห์และสะสม P(3HB)

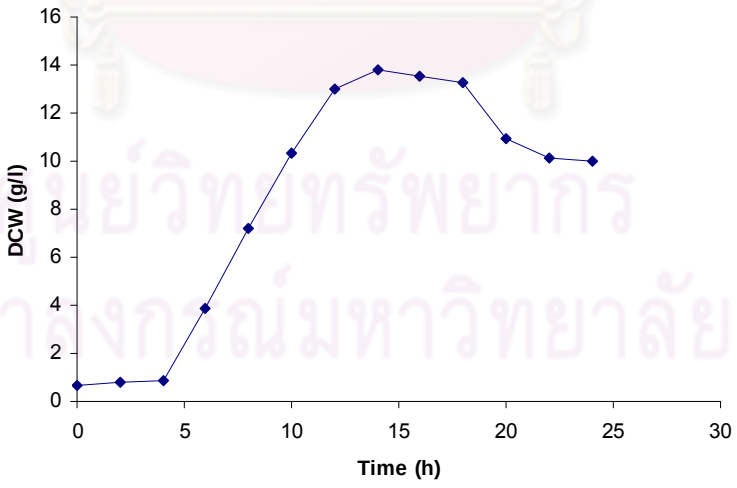
สุกฤตยา วีระนนท์ (2539) เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 เพื่อเพิ่มการผลิต P(3HB) โดยในขั้นตอนแรกเป็นการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มากในอาหารสูตรอุดม (Rich medium) แล้วจึงถ่ายเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) (อาหาร MSM) ทำให้ปริมาณ P(3HB) เพิ่มขึ้น

ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.4.2 จากนั้นติดตามการเจริญเติบโตของ *B.megaterium* BA-019 โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาหาความหนาแน่นของเซลล์และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 พบว่าเซลล์มีการเติบโตจนถึงชั่วโมงที่ 14 จากนั้นปริมาณเซลล์ค่อนข้างคงที่และลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง โดยมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 13.82 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 14 เมื่อคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ(μ) พบว่ากล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมงให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.759 ต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมง นำไปใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 การเติบโตของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

time (h)	DCW (g/l)	μ (h^{-1})
0	0.65	-
2	0.79	0.098
4	0.85	0.037
6	3.88	0.759
8	7.21	0.310
10	10.33	0.180
12	12.98	0.114
14	13.82	0.031
16	13.51	-0.011
18	13.25	-0.010
20	10.95	-0.095
22	10.12	-0.039
24	9.98	-0.007



รูปที่ 4.1 การเติบโตของ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ

4.2 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล

รัตนศิริ มุทิตากุล(2538) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต P(3HB) ได้จากแหล่งธรรมชาติจำนวน 30 สายพันธุ์ คัดเลือกได้สายพันธุ์ BA-019 ซึ่งสามารถผลิต P(3HB) ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่นและสามารถจำแนกชนิดเป็น *Bacillus* sp. เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Bacillus* sp. ที่แยกได้ใหม่นี้สามารถใช้น้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB) ได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่น และเมื่อเลี้ยงในอาหาร MSM โดยใช้กากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถผลิต P(3HB) ได้ 31.84 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (1 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน

อติพล บุญเรืองถาวร(2543) ได้ศึกษาการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์และการผลิต P(3HB) โดยศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (แหล่งคาร์บอน,แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ) และภาวะการเลี้ยงเชื้อ พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิต P(3HB) ได้ดี โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรียซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลทรายที่มีปริมาณน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร กากน้ำตาลให้ผลการเติบโตของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) ดีกว่าน้ำตาลทรายเท่ากับ 2.5 และ 4.0 เท่าตามลำดับ พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถใช้ยูเรียเพื่อการเติบโตของเซลล์และการผลิต P(3HB) ได้ดีกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจที่จะใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB) เพื่อทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลง เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกมากในประเทศไทยและเป็นพืชที่สามารถตัดและเก็บเกี่ยวได้หลายครั้ง โดยในกระบวนการการผลิตน้ำตาลทรายจะใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบหลักและมีน้ำอ้อยเกิดขึ้นหลายขั้นตอน ซึ่งในน้ำอ้อยจะประกอบไปด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส (วิเคราะห์โดย HPLC) รวมทั้งวิตามิน และธาตุอาหารเป็นจำนวนมาก (มิตรผลวิจัย, 2551) ส่วนแหล่งไนโตรเจนเลือกใช้ยูเรีย เนื่องจากมีราคาถูกและให้ผลผลิตดีกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (อติพล บุญเรืองถาวร, 2543)

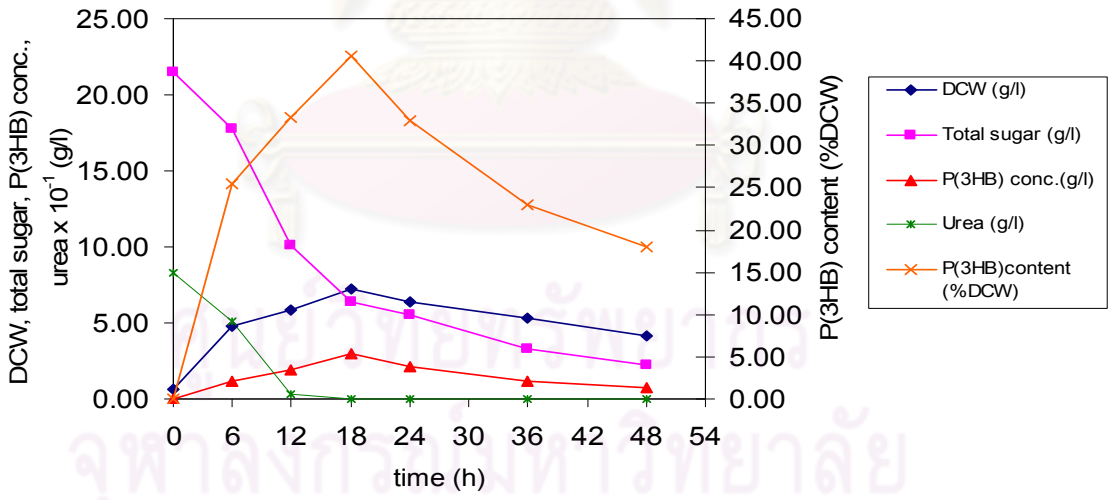
งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ปริมาณน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร (เทียบเท่ากับการใช้กากน้ำตาล) เพื่อศึกษาการผลิต P(3HB) ในภาวะการเจริญที่สมดุล จากผลการวิจัยการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้

ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2 พบว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตรเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 7.23 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 2.94 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 40.69 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 18 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	21.52±0.34	0.83±0.06	0.64±0.03	0.00	0.00
6	17.78±0.27	0.51±0.05	4.74±0.05	1.20±0.04	25.41±0.24
12	10.12±0.12	0.03±0.00	5.83±0.05	1.94±0.04	33.23±0.26
18	6.43±0.09	0.00±0.00	**7.23±0.05**	**2.94±0.04**	**40.69±0.35**
24	5.54±0.11	0.00±0.00	6.38±0.04	2.10±0.04	32.87±0.24
36	3.32±0.05	0.00±0.00	5.32±0.06	1.22±0.04	23.02±0.23
48	2.37±0.07	0.00±0.00	4.17±0.03	0.75±0.03	17.95±0.22



รูปที่ 4.2 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

4.3 ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารแต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB)

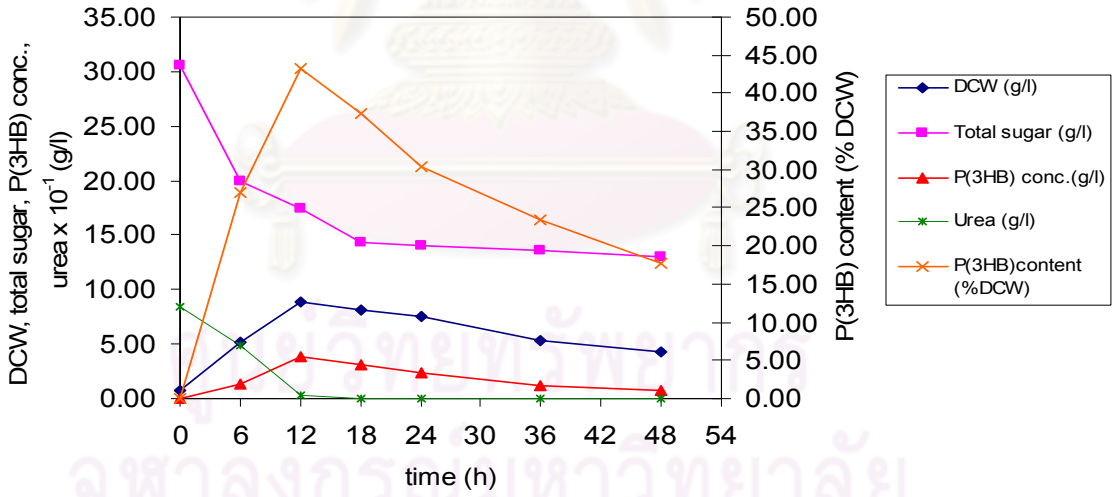
4.3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต P(3HB)

Bosco และ Chiampo (2010) รายงานว่า การผลิต P(3HB) ให้ได้ประสิทธิภาพและมีราคาถูกลงขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก ปรับปรุงกระบวนการหมัก วิธีการ recovery และขั้นตอนการทำสารให้บริสุทธิ์ รวมถึงการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณสูง

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกันโดยใช้ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.3-4.5 และรูปที่ 4.3-4.5 พบว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตรเชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสมP(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 8.92 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.85 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 43.16 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อโดยได้ผลดีกว่าภาวะการเจริญที่สมดุล และเมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเพิ่มขึ้นเป็น 40 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นแต่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ลดลง โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 11.09 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.78 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 34.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ 12 ชั่วโมง (40 กรัมต่อลิตร) และได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 13.31 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 1.56 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 11.70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ 18 ชั่วโมง (50 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ (รูปที่ 4.6) ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 30 กรัมต่อลิตรใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.3 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 34 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

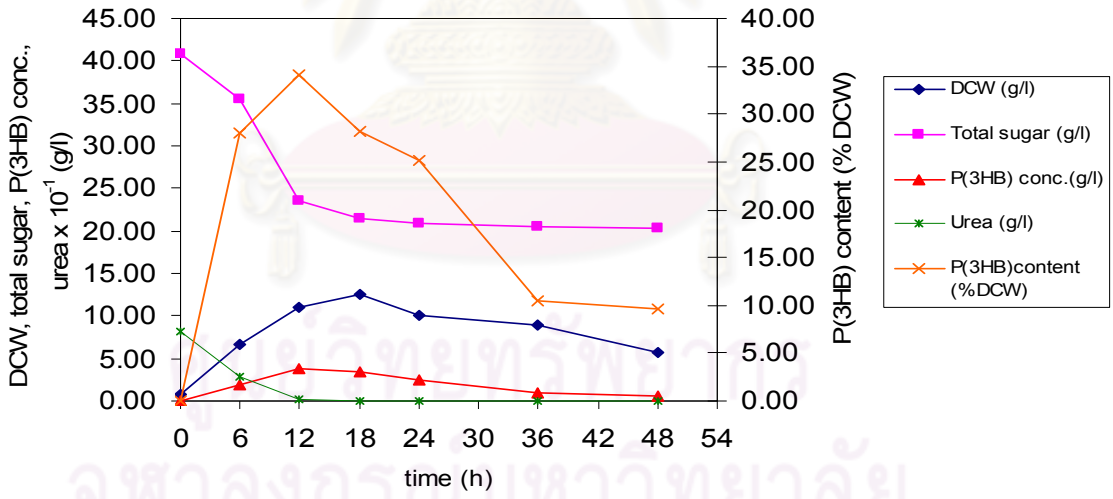
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.59±0.38	0.84±0.05	0.68±0.03	0.00	0.00
6	19.90±0.27	0.49±0.05	5.12±0.05	1.38±0.03	26.95±0.21
12	17.45±0.25	0.03±0.00	**8.92±0.04**	**3.85±0.02**	**43.16±0.39**
18	14.39±0.24	0.00±0.00	8.09±0.06	3.03±0.04	37.43±0.34
24	13.99±0.24	0.00±0.00	7.59±0.07	2.31±0.04	30.39±0.30
36	13.63±0.22	0.00±0.00	5.29±0.06	1.13±0.03	23.38±0.21
48	12.95±0.18	0.00±0.00	4.26±0.05	0.76±0.03	17.80±0.22



รูปที่ 4.3 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 34 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 45 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

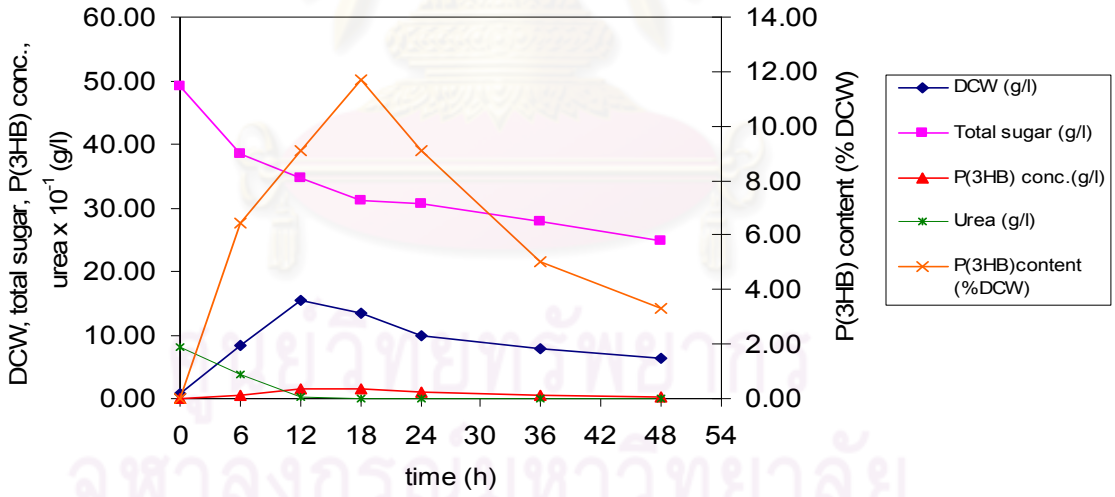
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	40.85±0.45	0.82±0.07	0.69±0.03	0.00	0.00
6	35.56±0.36	0.29±0.05	6.61±0.04	1.85±0.03	27.94±0.23
12	23.62±0.33	0.01±0.00	11.09±0.04	**3.78±0.04**	**34.12±0.34**
18	21.44±0.29	0.00±0.00	**12.44±0.07**	3.50±0.04	28.15±0.22
24	20.98±0.23	0.00±0.00	10.12±0.04	2.55±0.04	25.16±0.24
36	20.60±0.23	0.00±0.00	8.90±0.04	0.92±0.03	10.38±0.18
48	20.33±0.25	0.00±0.00	5.70±0.04	0.55±0.03	9.62±0.16



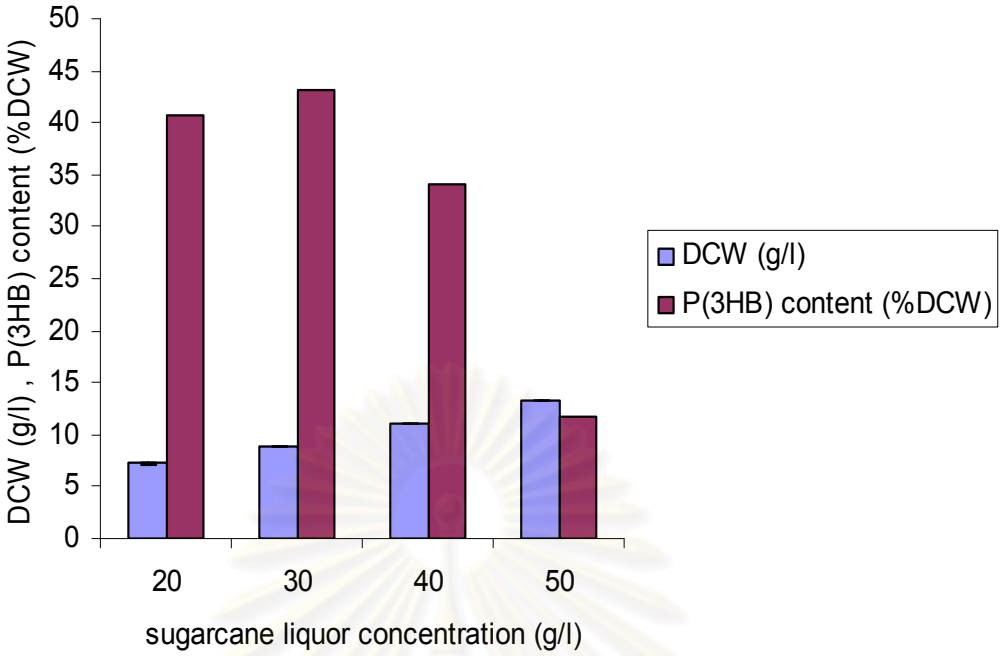
รูปที่ 4.4 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 45 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 57 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	48.99±0.47	0.82±0.06	0.75±0.04	0.00	0.00
6	38.58±0.38	0.39±0.03	8.25±0.04	0.53±0.04	6.42±0.11
12	34.60±0.33	0.03±0.00	**15.48±0.03**	1.41±0.04	9.10±0.22
18	31.23±0.33	0.00±0.00	13.31±0.04	**1.56±0.03**	**11.70±0.26**
24	30.62±0.29	0.00±0.00	9.89±0.03	0.90±0.04	9.08±0.21
36	27.86±0.27	0.00±0.00	7.79±0.04	0.39±0.04	5.04±0.18
48	24.70±0.25	0.00±0.00	6.23±0.05	0.21±0.03	3.30±0.15



รูปที่ 4.5 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 57 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน)



รูปที่ 4.6 ความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.2 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจน

Pandian และคณะ(2010) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตของ P(3HB) โดยการกระตุ้นให้เซลล์ของแบคทีเรียสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้เพิ่มขึ้น โดยการให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ และจำกัดธาตุอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียมหรือโพแทสเซียม

Suzuki และคณะ(1986) รายงานว่า ชนิดของเกลือแอมโมเนียมไม่มีผลต่อการผลิต P(3HB) โดยปริมาณที่ได้มีค่าไม่แตกต่างกันมาก โดยใช้เชื้อ *Pseudomonas* sp. K ซึ่งเลี้ยงในระดับขวดเขย่าและใช้เกลือแอมโมเนียมทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) โซเดียมแอมโมเนียมโมโนไฮโดรฟอสเฟตเตตระไฮเดรต ($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$) แอมโมเนียมไดไฮโดรฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$) แอมโมเนียมไฮโดรคาร์บอเนต (NH_4HCO_3) ไดแอมโมเนียมไดไฮโดรฟอสเฟต [$(NH_4)_2HPO_4$] แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) และศึกษาถึงผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ในเชื้อเดียวกันโดยเลี้ยงแบบ fed-batch พบว่าการจำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.0 มิลลิกัมกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) โดยได้ปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 52 เป็น 57 เปอร์เซ็นต่อน้ำหนักแห้ง

Daniel และคณะ(1992) รายงานว่า การจำกัดปริมาณแอมโมเนียมมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ในเชื้อ *Pseudomonas* 135 ในการเลี้ยงแบบ fed-batch โดยได้ปริมาณ P(3HB) เพิ่มขึ้นจาก 37 เป็นเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต่อน้ำหนักแห้ง และศึกษาผลของชนิดเกลือแอมโมเนียมได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไฮโดรคาร์บอเนต (NH_4HCO_3) และแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) ต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ในเชื้อเดียวกัน พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) ไม่แตกต่างกัน

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) รายงานว่า การศึกษาการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ในเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ในการเลี้ยงระดับขวดเขย่า พบว่า การจำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) โดยได้ปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 19.20 เป็น 46.98 เปอร์เซ็นต่อน้ำหนักแห้ง

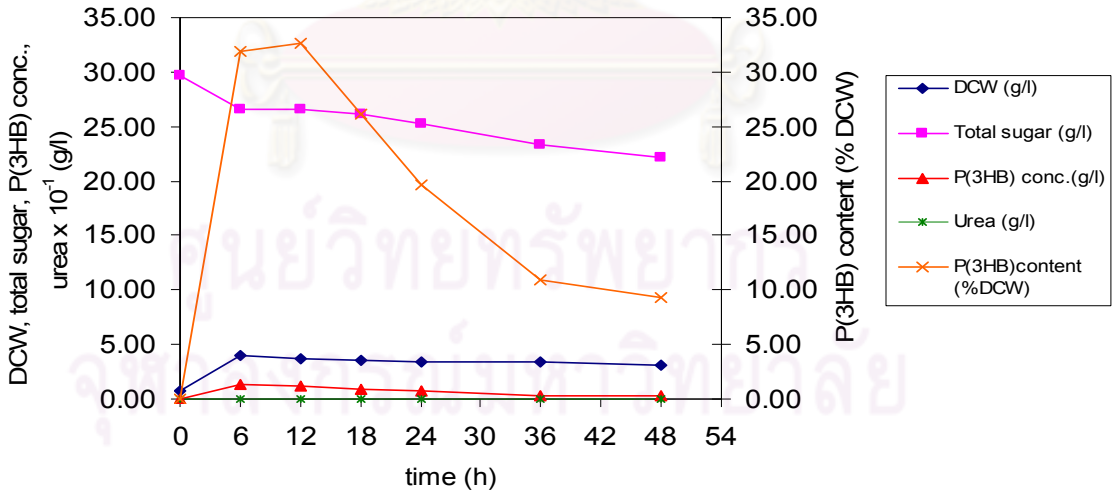
ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในรูปของยูเรียในอาหาร MSM ที่มีผลต่อการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมยูเรีย (N-free medium) โดยใช้ปริมาณคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้างต้น คือ 30 กรัมต่อลิตรส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.6-4.12 และรูปที่ 4.7-4.13 พบว่าเมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตรเชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 8.88 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.87 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 43.25 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้นลดลง คือ 0.6 0. 4 0.2 และไม่มีการเติมยูเรีย พบว่าทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลงอย่างชัดเจน โดยได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 32.63 38.06 38.71 และ 41.11 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้น 1.0 และ 1.2 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) ใกล้เคียงกัน คือ เท่ากับ 39.01 และ 38.91 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 4.14) ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกใช้ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตรในการทดลองขั้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมยูเรีย (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

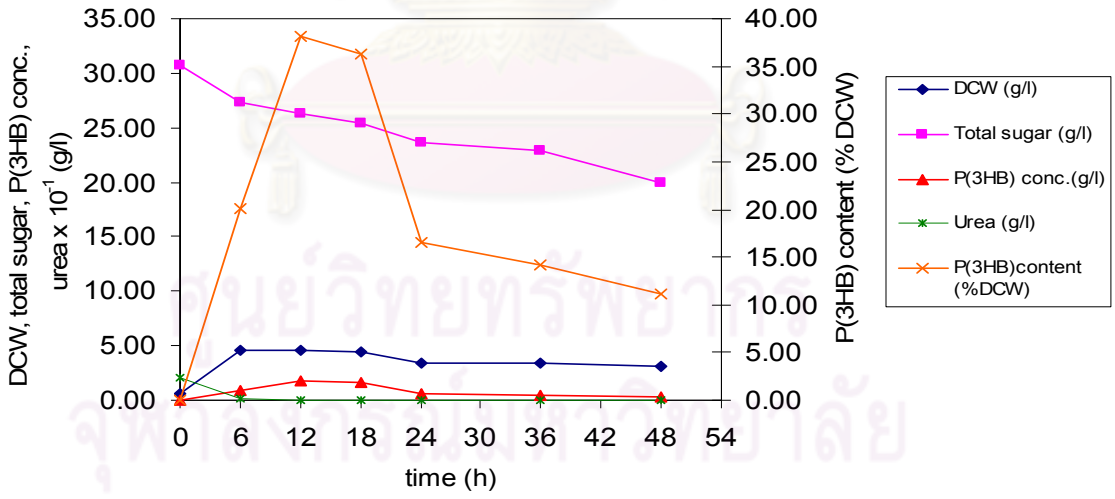
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	29.66±0.33	0.00±0.00	0.71±0.03	0.00	0.00
6	26.60±0.32	0.00±0.00	4.04±0.03	1.29±0.04	31.83±0.30
12	26.56±0.35	0.00±0.00	**3.62±0.04**	**1.18±0.03**	**32.63±0.26**
18	26.16±0.34	0.00±0.00	3.50±0.04	0.92±0.03	26.17±0.24
24	25.29±0.29	0.00±0.00	3.42±0.04	0.67±0.03	19.60±0.22
36	23.29±0.33	0.00±0.00	3.33±0.03	0.36±0.03	10.95±0.17
48	22.20±0.36	0.00±0.00	3.13±0.04	0.29±0.03	9.27±0.14



รูปที่ 4.7 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมยูเรีย (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.7 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

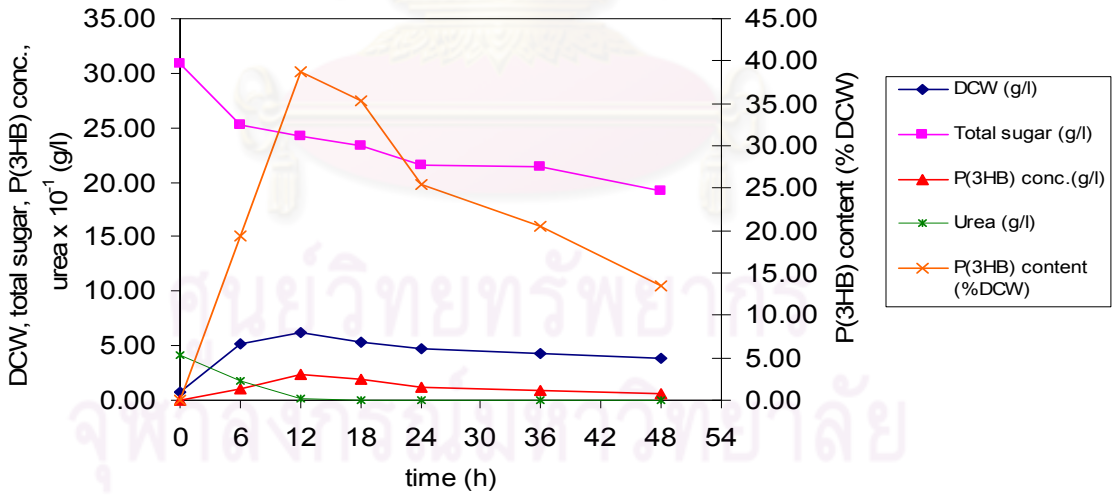
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.68±0.37	0.21±0.03	0.65±0.04	0.00	0.00
6	27.37±0.33	0.01±0.00	4.51±0.04	0.90±0.04	20.06±0.18
12	26.36±0.29	0.00±0.00	**4.64±0.03**	**1.77±0.03**	**38.06±0.38**
18	25.43±0.30	0.00±0.00	4.37±0.04	1.58±0.04	36.25±0.27
24	23.62±0.27	0.00±0.00	3.46±0.04	0.57±0.03	16.55±0.22
36	22.96±0.27	0.00±0.00	3.36±0.04	0.48±0.03	14.16±0.17
48	19.87±0.22	0.00±0.00	3.06±0.03	0.34±0.03	11.15±0.16



รูปที่ 4.8 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.8 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

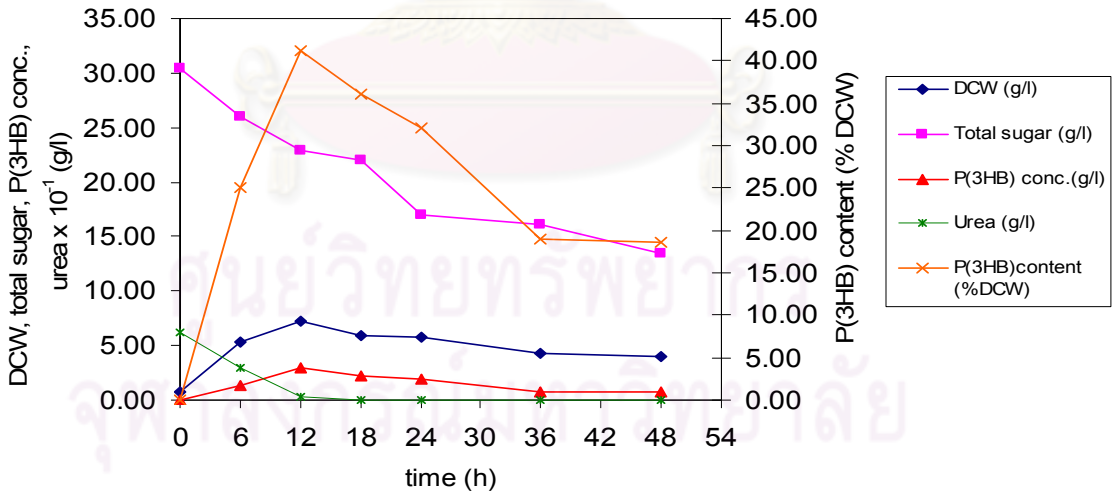
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.91±0.41	0.41±0.05	0.69±0.03	0.00	0.00
6	25.19±0.32	0.18±0.02	5.14±0.03	0.99±0.03	19.30±0.23
12	24.24±0.29	0.02±0.00	**6.24±0.04**	**2.42±0.03**	**38.71±0.31**
18	23.40±0.30	0.00±0.00	5.26±0.04	1.86±0.03	35.39±0.32
24	21.63±0.27	0.00±0.00	4.67±0.03	1.19±0.04	25.44±0.24
36	21.41±0.26	0.00±0.00	4.22±0.04	0.86±0.03	20.42±0.23
48	19.20±0.22	0.00±0.00	3.83±0.04	0.52±0.04	13.46±0.17



รูปที่ 4.9 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.9 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.6 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

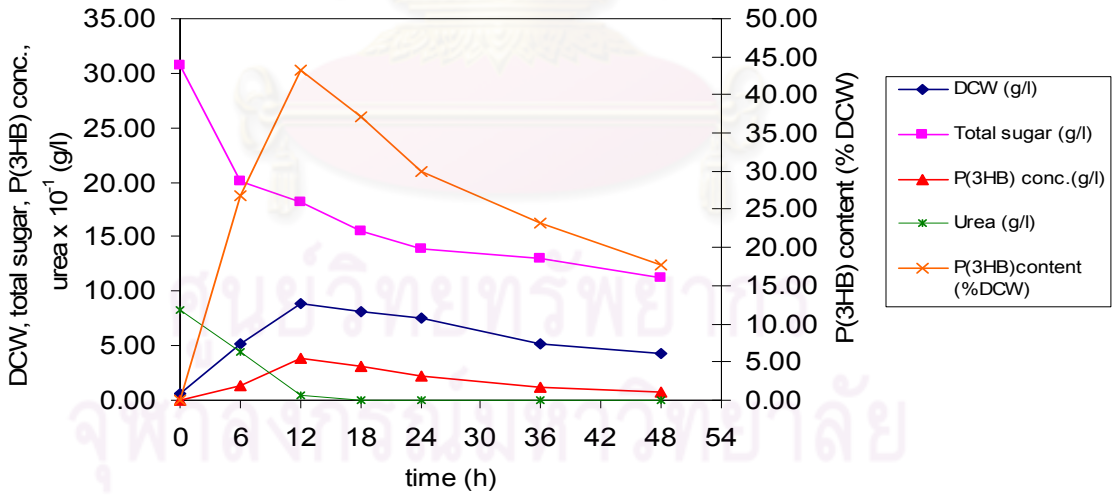
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.46±0.33	0.62±0.05	0.73±0.03	0.00	0.00
6	26.05±0.31	0.29±0.03	5.25±0.04	1.31±0.03	24.99±0.25
12	22.87±0.29	0.03±0.00	**7.17±0.04**	**2.95±0.04**	**41.11±0.46**
18	22.03±0.25	0.00±0.00	5.97±0.04	2.16±0.03	36.10±0.33
24	17.00±0.22	0.00±0.00	5.69±0.03	1.85±0.03	32.10±0.26
36	16.11±0.19	0.00±0.00	4.29±0.04	0.81±0.04	19.00±0.21
48	13.47±0.15	0.00±0.00	3.94±0.04	0.74±0.03	18.69±0.19



รูปที่ 4.10 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.6 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.10 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

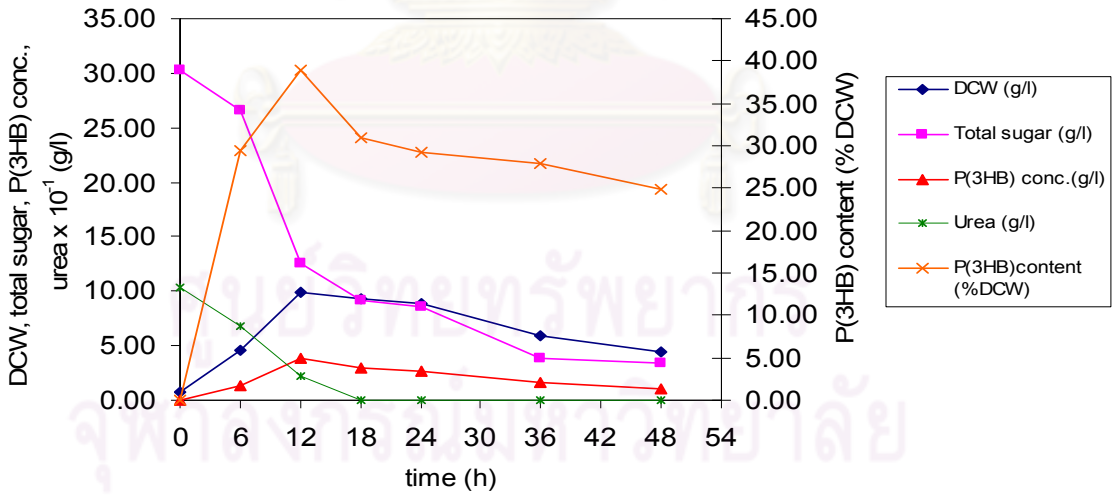
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.72±0.39	0.82±0.07	0.66±0.03	0.00	0.00
6	20.05±0.33	0.45±0.03	5.11±0.04	1.37±0.03	26.70±0.25
12	18.22±0.33	0.04±0.00	**8.88±0.03**	**3.87±0.05**	**43.25±0.37**
18	15.51±0.28	0.00±0.00	8.13±0.05	3.08±0.04	37.13±0.33
24	13.82±0.25	0.00±0.00	7.51±0.03	2.27±0.04	30.05±0.29
36	12.98±0.22	0.00±0.00	5.22±0.06	1.16±0.03	23.15±0.25
48	11.21±0.17	0.00±0.00	4.31±0.04	0.72±0.04	17.70±0.19



รูปที่ 4.11 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.11 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

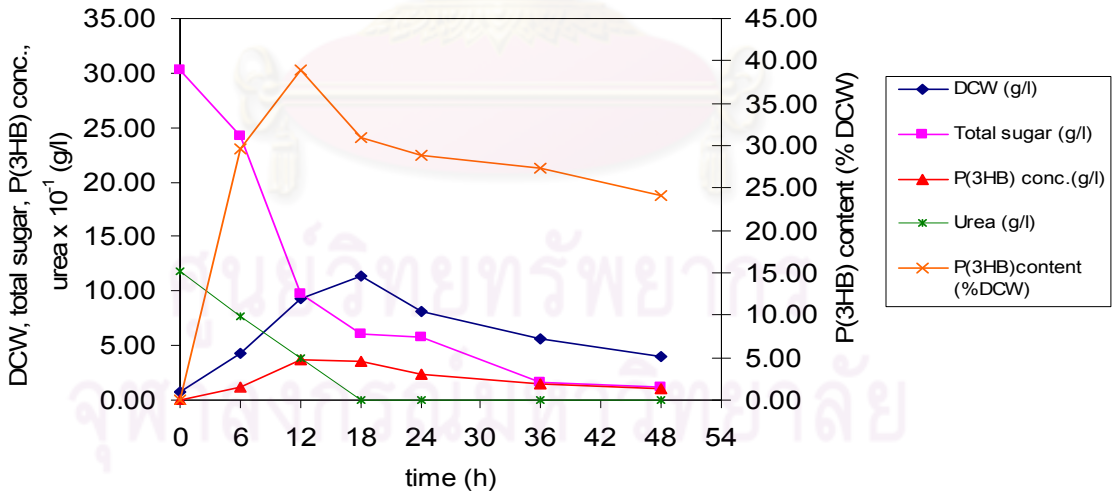
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.28±0.33	1.03±0.08	0.77±0.03	0.00	0.00
6	26.61±0.31	0.68±0.06	4.58±0.04	1.35±0.04	29.43±0.24
12	12.54±0.23	0.22±0.04	**9.85±0.03**	**3.84±0.03**	**39.01±0.32**
18	9.17±0.11	0.00±0.00	9.29±0.04	2.88±0.03	31.01±0.25
24	8.56±0.11	0.00±0.00	8.87±0.04	2.59±0.04	29.25±0.22
36	3.88±0.06	0.00±0.00	5.88±0.04	1.64±0.03	27.91±0.23
48	3.39±0.07	0.00±0.00	4.41±0.03	1.10±0.03	24.88±0.25



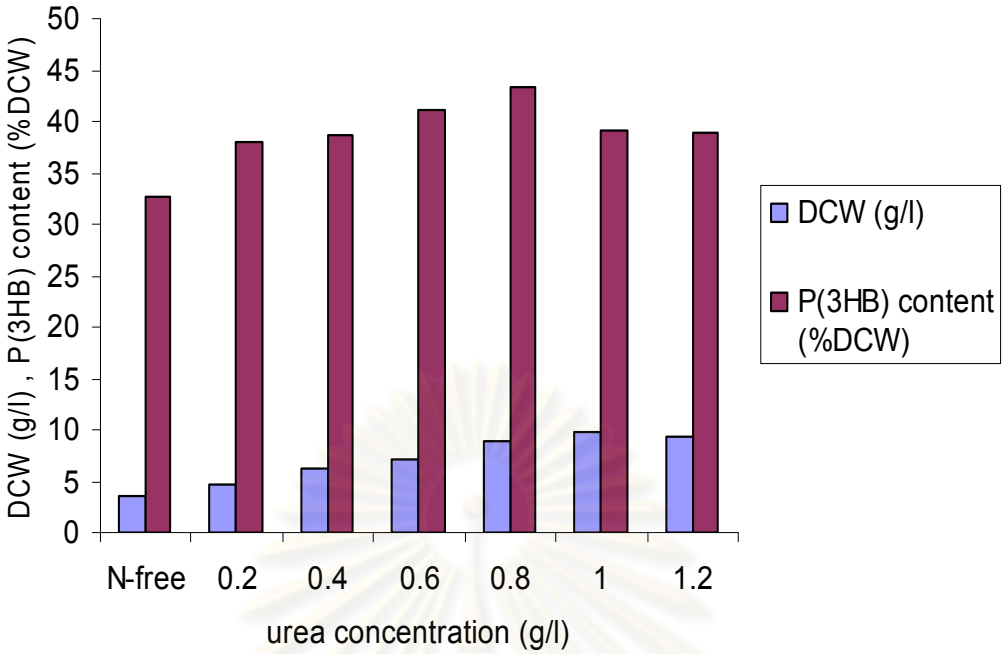
รูปที่ 4.12 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.12 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.2 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.31±0.39	1.18±0.07	0.73±0.04	0.00	0.00
6	24.16±0.33	0.77±0.07	4.24±0.04	1.25±0.03	29.58±0.25
12	9.79±0.14	0.39±0.03	9.30±0.04	**3.62±0.04**	**38.91±0.31**
18	6.12±0.11	0.00±0.00	**11.31±0.04**	3.50±0.04	30.97±0.24
24	5.81±0.09	0.00±0.00	8.13±0.04	2.35±0.03	28.90±0.27
36	1.62±0.03	0.00±0.00	5.55±0.04	1.52±0.03	27.37±0.25
48	1.13±0.04	0.00±0.00	4.05±0.04	0.98±0.03	24.18±0.26



รูปที่ 4.13 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.2 กรัมต่อลิตร (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 4.14 ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมยูเรีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.3 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียม

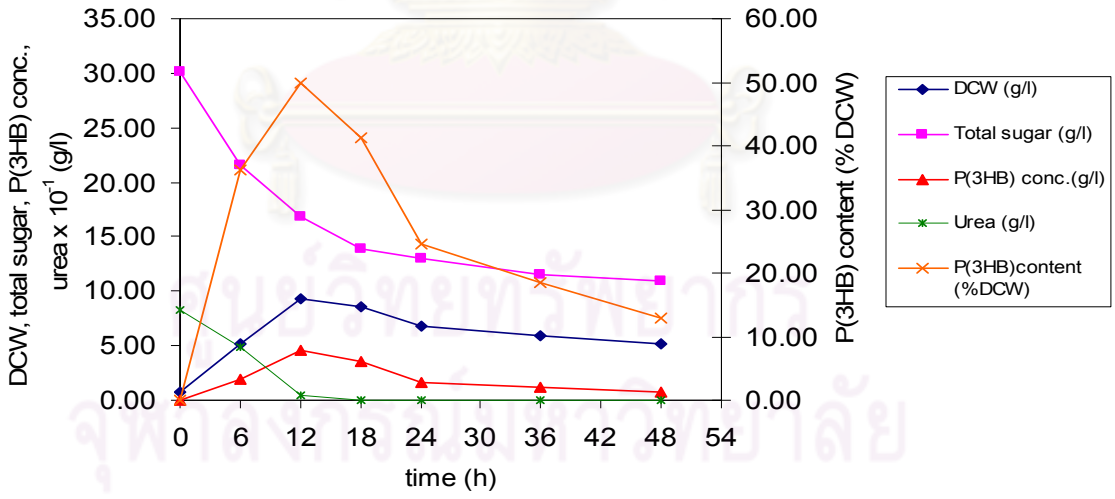
Daniel และคณะ(1992) รายงานว่า การจำกัดปริมาณแมกนีเซียมมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยเชื้อ *Pseudomonas* 135 พบว่าเมื่อไม่มีการเติมแมกนีเซียมในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟต ปริมาณ P(3HB) มีค่าเท่ากับ 42.50 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมีผลมากกว่าการจำกัดปริมาณแอมโมเนียม (37 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) และฟอสเฟต (34.5 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) รายงานว่า ผลของการจำกัดแมกนีเซียมในรูปแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ต่อมาภายหลังจัดจำแนกสปีชีส์เป็น *Alcaligenes eutropha* และเป็น *Ralstonia eutropha* และในปัจจุบันคือ *Cupriavidus necator* พบว่า อาหารที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตจะทำให้ปริมาณ P(3HB) เพิ่มขึ้นจาก 19.86 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเทียบกับอาหารสูตรที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร จะสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้เท่ากับ 37.70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียมในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ต่อการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 0.2 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต โดยใช้ปริมาณคาร์บอนและยูเรียที่ได้จากการทดลองข้างต้น คือ 30 และ 0.8 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.13-4.15 และรูปที่ 4.15-4.18 พบว่าเมื่อใช้อาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 47.26 และ 43.50 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต เชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.23 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.60 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 49.96 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.13 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

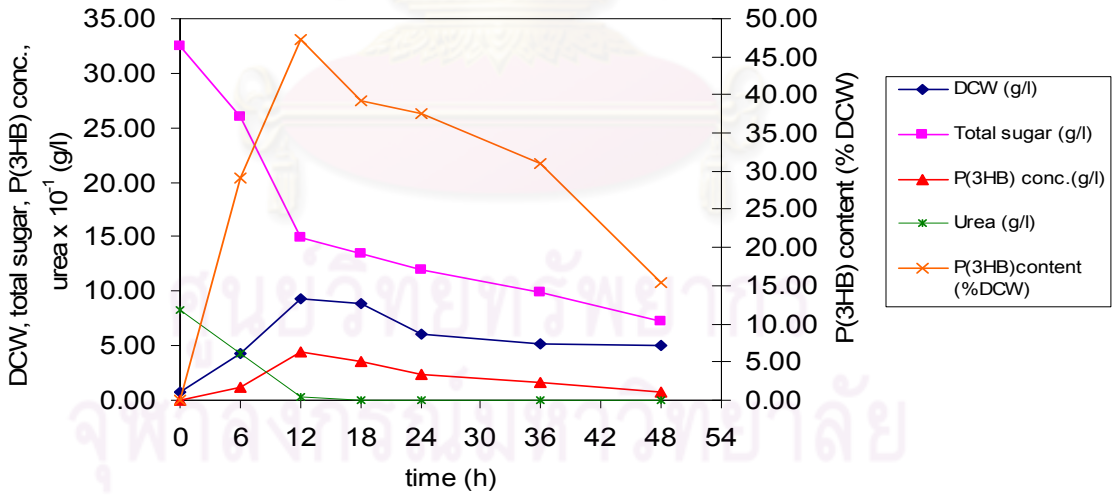
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.18±0.42	0.82±0.05	0.75±0.03	0.00	0.00
6	21.53±0.35	0.48±0.05	5.15±0.04	1.89±0.03	36.20±0.28
12	16.78±0.31	0.04±0.00	**9.23±0.05**	**4.60±0.03**	**49.96±0.30**
18	13.82±0.22	0.00±0.00	8.61±0.05	3.56±0.05	41.35±0.30
24	12.98±0.21	0.00±0.00	6.75±0.04	1.67±0.04	24.50±0.25
36	11.53±0.15	0.00±0.00	5.89±0.04	1.11±0.03	18.40±0.23
48	10.89±0.17	0.00±0.00	5.17±0.03	0.71±0.03	12.97±0.15



รูปที่ 4.15 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.14 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

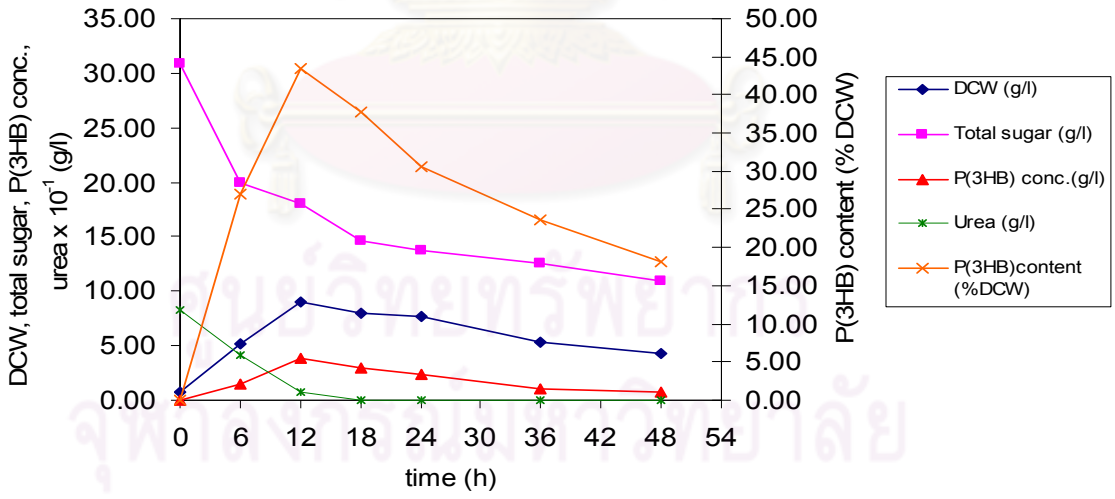
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	32.47±0.39	0.82±0.05	0.77±0.04	0.00	0.00
6	25.97±0.27	0.43±0.03	4.23±0.04	1.24±0.04	29.21±0.27
12	14.97±0.22	0.03±0.00	**9.26±0.03**	**4.38±0.05**	**47.26±0.30**
18	13.37±0.25	0.00±0.00	8.91±0.03	3.49±0.04	39.21±0.29
24	12.01±0.21	0.00±0.00	6.12±0.03	2.29±0.03	37.47±0.31
36	9.92±0.11	0.00±0.00	5.24±0.04	1.62±0.04	30.97±0.24
48	7.22±0.12	0.00±0.00	5.03±0.03	0.78±0.03	15.47±0.15



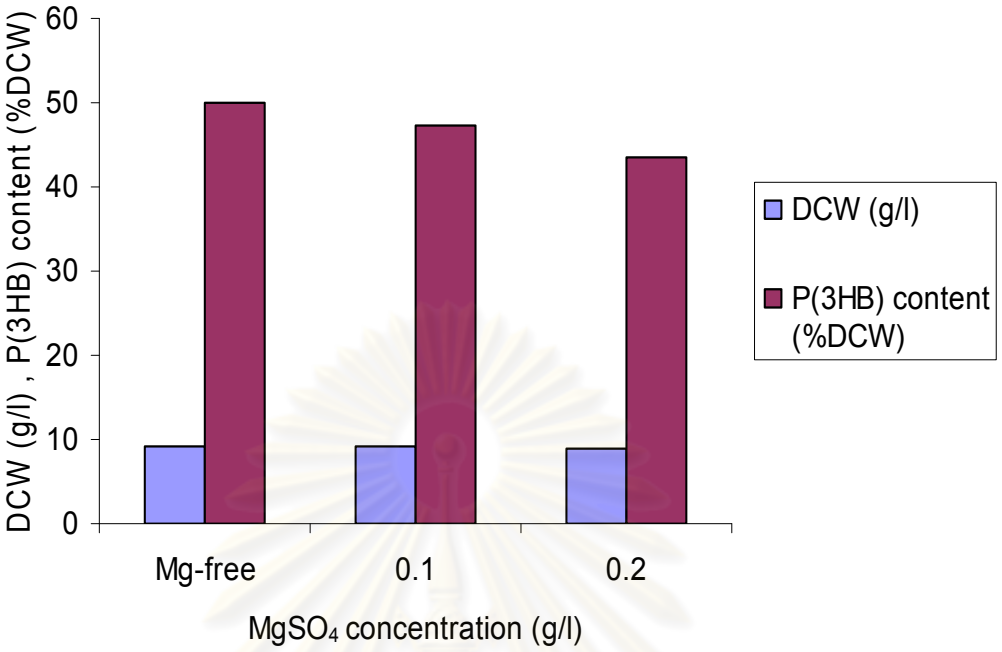
รูปที่ 4.16 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.15 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.81±0.42	0.82±0.07	0.67±0.03	0.00	0.00
6	19.98±0.27	0.42±0.05	5.17±0.03	1.41±0.04	27.10±0.23
12	17.95±0.25	0.07±0.00	**8.95±0.04**	**3.83±0.04**	**43.50±0.34**
18	14.59±0.23	0.00±0.00	8.02±0.05	3.01±0.04	37.80±0.31
24	13.77±0.24	0.00±0.00	7.62±0.04	2.35±0.03	30.50±0.30
36	12.55±0.24	0.00±0.00	5.33±0.05	1.10±0.04	23.55±0.22
48	10.95±0.22	0.00±0.00	4.22±0.05	0.78±0.03	18.05±0.22



รูปที่ 4.17 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 4.18 ความหนาแน่นของเซลล์และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 0.2 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

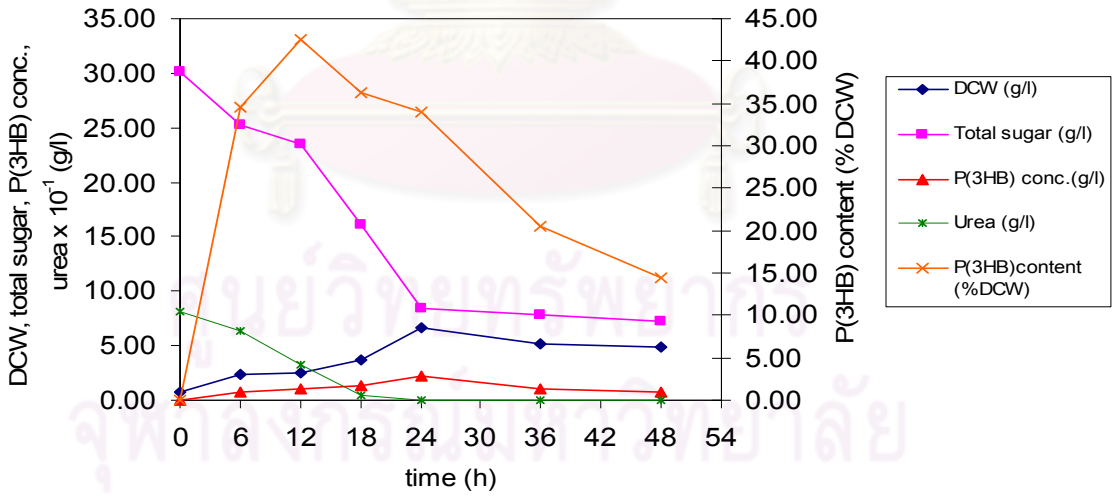
4.3.4 การศึกษาผลร่วมของการจำกัดโพแทสเซียมและฟอสเฟต

Daniel และคณะ(1992) รายงานว่า ศึกษาการจำกัดปริมาณฟอสเฟตมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* Z-I ในระดับถังหมัก พบว่าเมื่อจำกัดปริมาณฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีปริมาณเพียง 45 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณฟอสเฟตในสูตรอาหารเดิม ปริมาณ P(3HB) จะเพิ่มขึ้นจาก 9.9 เป็นเท่ากับ 23 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของการจำกัดโพแทสเซียมและฟอสเฟตในรูปของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ต่อการผลิต P(3HB) โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหาร MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยใช้ปริมาณคาร์บอน ยูเรียและแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตที่ได้จากการทดลองข้างต้น คือ 30 0.8 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ตามลำดับ ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.16-4.22 และรูปที่ 4.19-4.25 พบว่าเมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.21 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.62 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 50.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆ ลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นลดลง คือ 1.5 1.0 0.5 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 46.60 41.48 39.81 และ 42.59 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเพิ่มขึ้น คือ 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 44.45 และ 38.36 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (รูปที่ 4.26) ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตรในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.16 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

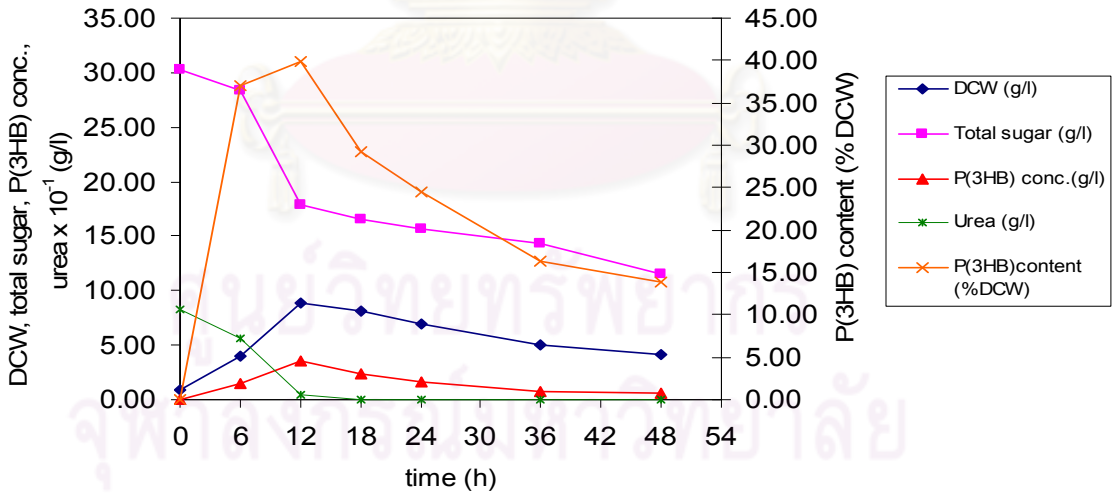
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.15±0.37	0.81±0.05	0.74±0.04	0.00	0.00
6	25.20±0.26	0.63±0.04	2.35±0.04	0.81±0.04	34.56±0.24
12	23.54±0.23	0.33±0.03	2.44±0.04	1.04±0.04	**42.59±0.34**
18	16.11±0.22	0.05±0.00	3.76±0.03	1.37±0.05	36.34±0.31
24	13.42±0.19	0.00±0.00	**6.67±0.03**	**2.26±0.04**	33.94±0.25
36	10.74±0.21	0.00±0.00	5.23±0.04	1.08±0.04	20.60±0.21
48	10.16±0.17	0.00±0.00	4.85±0.04	0.70±0.03	14.40±0.19



รูปที่ 4.19 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่ไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

ตารางที่ 4.17 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

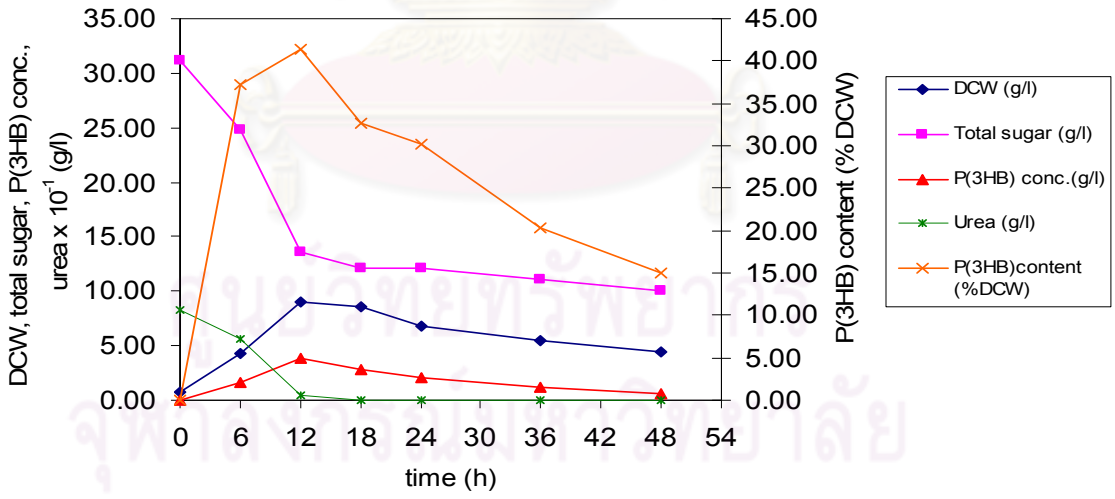
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.29±0.35	0.83±0.06	0.69±0.04	0.00	0.00
6	28.32±0.33	0.56±0.05	3.96±0.03	1.46±0.04	36.94±0.29
12	17.92±0.29	0.05±0.00	**8.82±0.03**	**3.51±0.03**	**39.81±0.36**
18	16.54±0.25	0.00±0.00	8.14±0.04	2.38±0.04	29.22±0.22
24	15.59±0.23	0.00±0.00	6.87±0.04	1.69±0.04	24.57±0.21
36	14.34±0.25	0.00±0.00	4.95±0.05	0.80±0.04	16.26±0.18
48	11.47±0.17	0.00±0.00	4.15±0.03	0.57±0.04	13.78±0.16



รูปที่ 4.20 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

ตารางที่ 4.18 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

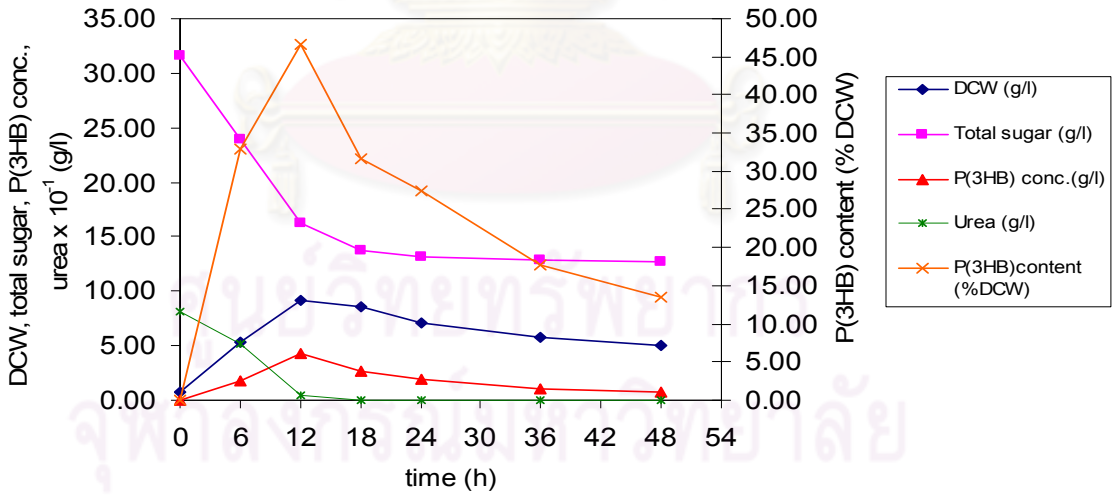
Time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	31.23±0.37	0.83±0.07	0.78±0.03	0.00	0.00
6	24.80±0.32	0.56±0.05	4.28±0.04	1.59±0.05	37.24±0.29
12	13.64±0.22	0.05±0.00	**8.95±0.05**	**3.79±0.02**	**41.48±0.33**
18	12.16±0.19	0.00±0.00	8.58±0.04	2.80±0.04	32.62±0.24
24	12.09±0.19	0.00±0.00	6.73±0.05	2.04±0.04	30.24±0.26
36	11.02±0.17	0.00±0.00	5.48±0.03	1.11±0.04	20.28±0.16
48	10.10±0.013	0.00±0.00	4.41±0.03	0.66±0.03	15.03±0.15



รูปที่ 4.21 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

ตารางที่ 4.19 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

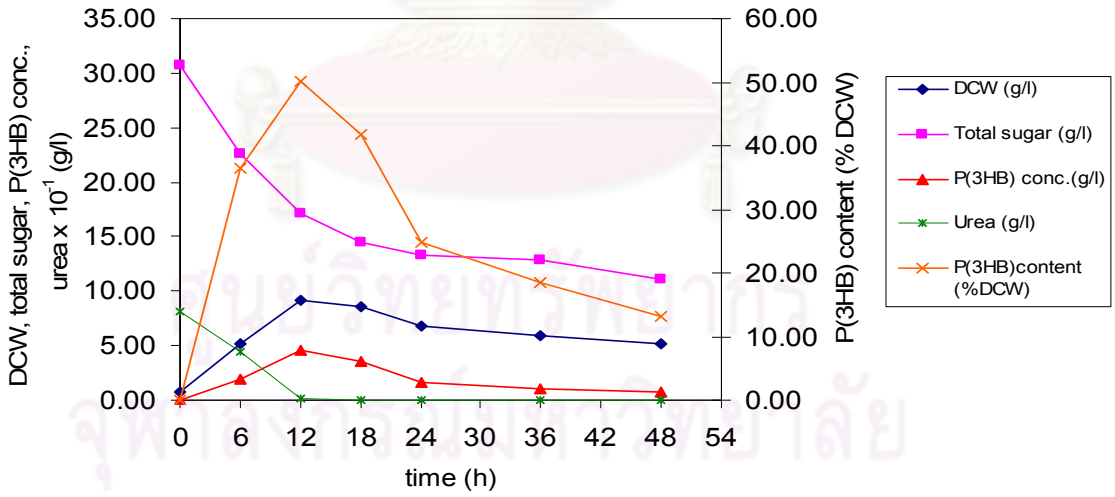
Time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	31.54±0.43	0.81±0.04	0.81±0.03	0.00	0.00
6	23.88±0.28	0.51±0.03	5.35±0.04	1.76±0.03	32.99±0.23
12	16.23±0.22	0.04±0.00	**9.09±0.04**	**4.24±0.03**	**46.60±0.30**
18	13.78±0.21	0.00±0.00	8.63±0.04	2.73±0.03	31.60±0.22
24	13.17±0.17	0.00±0.00	7.11±0.04	1.95±0.03	27.37±0.25
36	12.84±0.17	0.00±0.00	5.72±0.04	1.01±0.03	17.72±0.20
48	12.77±0.21	0.00±0.00	5.07±0.03	0.68±0.03	13.46±0.20



รูปที่ 4.22 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

ตารางที่ 4.20 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

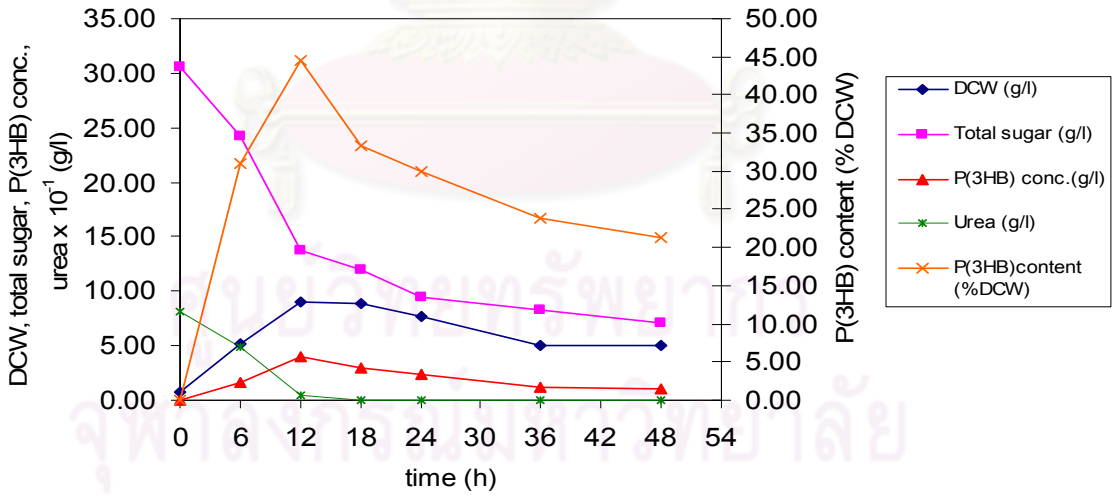
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.77±0.39	0.81±0.06	0.75±0.04	0.00	0.00
6	22.66±0.31	0.45±0.05	5.14±0.03	1.88±0.04	36.56±0.31
12	17.15±0.28	0.01±0.00	**9.21±0.04**	**4.62±0.04**	**50.12±0.34**
18	14.54±0.26	0.00±0.00	8.58±0.03	3.58±0.04	41.71±0.31
24	13.32±0.23	0.00±0.00	6.78±0.03	1.68±0.03	24.77±0.25
36	12.86±0.19	0.00±0.00	5.88±0.04	1.09±0.04	18.56±0.21
48	11.07±0.15	0.00±0.00	5.21±0.04	0.69±0.04	13.17±0.18



รูปที่ 4.23 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

ตารางที่ 4.21 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

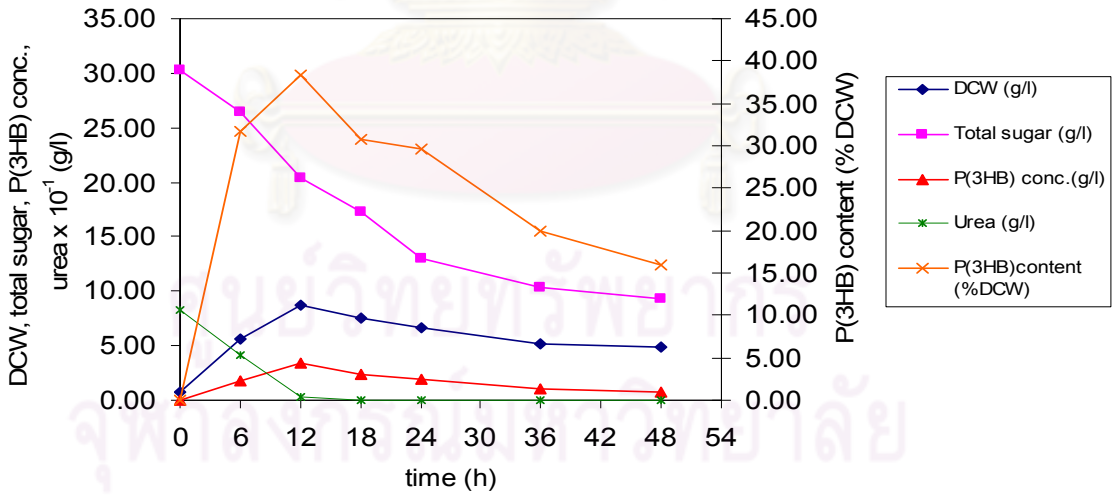
Time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.58±0.34	0.81±0.07	0.75±0.03	0.00	0.00
6	24.16±0.23	0.49±0.06	5.12±0.04	1.59±0.04	31.09±0.24
12	13.76±0.22	0.04±0.00	**9.04±0.04**	**4.02±0.04**	**44.45±0.33**
18	11.93±0.18	0.00±0.00	8.92±0.03	2.98±0.03	33.38±0.23
24	9.48±0.11	0.00±0.00	7.68±0.03	2.30±0.04	29.99±0.24
36	8.32±0.11	0.00±0.00	5.09±0.04	1.22±0.03	23.88±0.24
48	7.09±0.09	0.00±0.00	4.96±0.03	1.06±0.04	21.34±0.24



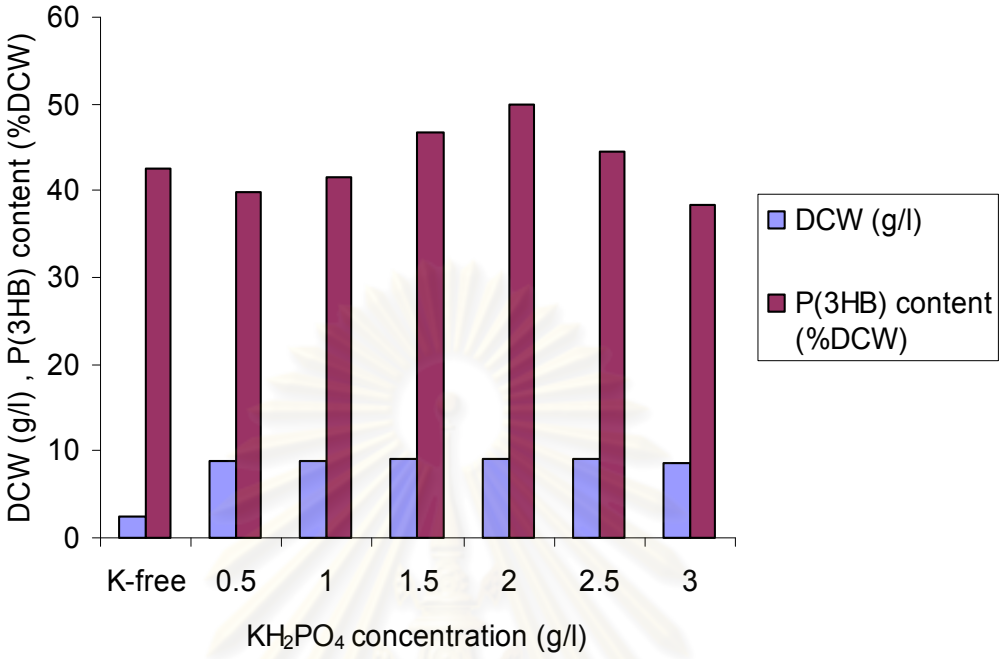
รูปที่ 4.24 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

ตารางที่ 4.22 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)

time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.24±0.42	0.83±0.06	0.71±0.04	0.00	0.00
6	26.37±0.25	0.42±0.04	5.56±0.04	1.76±0.03	31.62±0.28
12	20.39±0.25	0.03±0.00	**8.67±0.04**	**3.33±0.03**	**38.36±0.30**
18	17.23±0.22	0.00±0.00	7.53±0.04	2.32±0.03	30.77±0.29
24	13.01±0.13	0.00±0.00	6.68±0.04	1.98±0.04	29.63±0.28
36	10.37±0.11	0.00±0.00	5.21±0.04	1.04±0.04	20.01±0.20
48	9.25±0.09	0.00±0.00	4.87±0.04	0.77±0.04	15.89±0.15



รูปที่ 4.25 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร (ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต)



รูปที่ 4.26 ความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ P(3HB) สูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

4.4.1 การผลิต P(3HB) จากน้ำอ้อย

Jiang และคณะ(2008) รายงานว่า *Pseudomonas fluorescens* A2a5 สามารถใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) และใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 32 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 22 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 96 ชั่วโมง และค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

งานวิจัยนี้ศึกษาผลการผลิต P(3HB) จากการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้จากข้างต้นและควบคุมภาวะการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงกล้าเชื้อให้ได้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 3 ลิตร โดยเลือกภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) จากการทดลองข้างต้น ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ตลอดการเลี้ยงเชื้อ โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ตามลำดับ(อติพล บุญเรืองถาวร, 2543) เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.23 และรูปที่ 4.27 และคำนวณหาค่าอัตราการผลิต (productivity) (ตารางที่ 4.25) โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 9.61 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 42.52 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ

4.4.2 การผลิต P(3HB) จากกากน้ำตาล

Kulpreecha และคณะ(2009) ศึกษาเพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์และเพิ่มการผลิต P(3HB) โดย *Bacillus megaterium* BA-019 ใช้กากน้ำตาลและยูเรียซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก โดยใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 โมลต่อโมล ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อโดยวิธี fed-batch เพื่อให้ได้ทั้งความหนาแน่นของเซลล์และอัตราการผลิต P(3HB) สูงขึ้น จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 แบบ fed-batch ที่มีการควบคุมการป้อนสารอาหารด้วยวิธี pH-stat พบว่าเมื่อใช้สารอาหารป้อนเข้าที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุให้ผลการเติบโตของเซลล์อย่างรวดเร็วและมีการผลิต P(3HB) เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยผลการทดลองที่ได้ดีกว่าการใช้สารอาหารป้อนเข้า

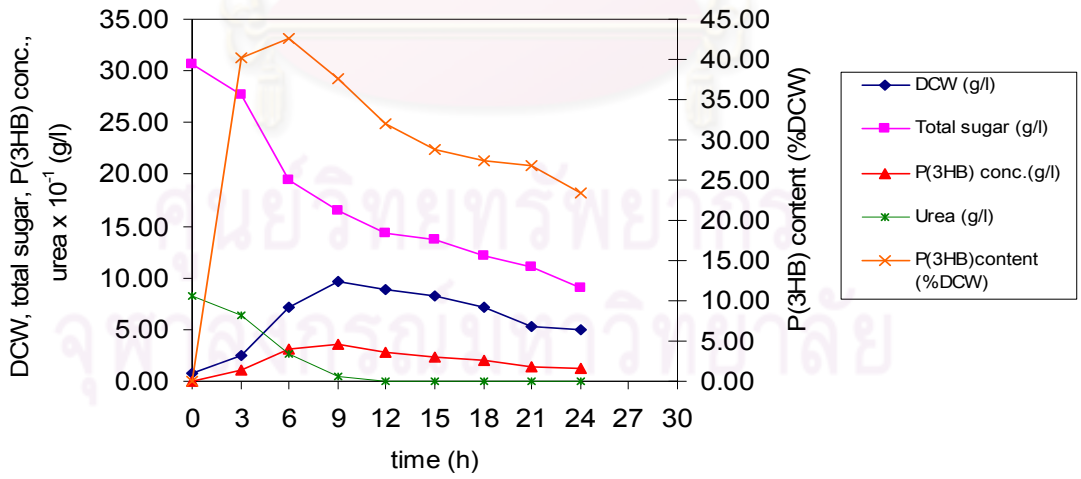
ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน หรือใช้แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ผลการศึกษาพบว่าการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมลในสารป้อนเข้า มีผลให้เพิ่มการผลิต P(3HB) และความหนาแน่นของเซลล์ โดยให้ความเข้มข้นของเซลล์ปริมาณสูงขึ้นมาก (72.57 กรัมต่อลิตร) ได้ปริมาณของ P(3HB) เท่ากับ 30.52 กรัมต่อลิตรคิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 42 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีอัตราการผลิต P(3HB) เพิ่มขึ้นเป็น 1.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

งานวิจัยนี้ศึกษาผลการผลิต P(3HB) จากการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้จากข้างต้นและควบคุมภาวะการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ตามข้อ 3.3.4.2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงกล้าเชื้อให้ได้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 3 ลิตร โดยเลือกภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) จากการทดลองข้างต้น ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ตลอดการเลี้ยงเชื้อ โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ตามลำดับ(อติพล บุญเรืองถาวร, 2543) เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 4.24 และรูปที่ 4.28 และคำนวณหาค่าอัตราการผลิต (productivity) (ตารางที่ 4.25) โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.97 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.31 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 33.23 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 15 ชั่วโมง ความเข้มข้นของยูเรียค่อยๆลดลงและหมดที่ชั่วโมงที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.23 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร

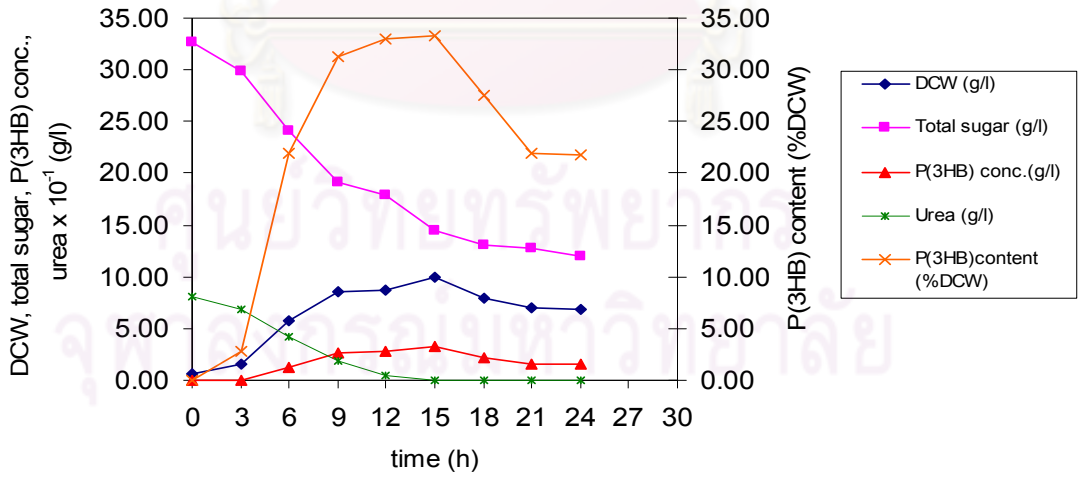
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	30.71±0.33	0.82±0.06	0.74±0.03	0.00	0.00
3	27.75±0.34	0.64±0.05	2.53±0.03	1.02±0.04	40.29±0.27
6	19.37±0.23	0.26±0.01	7.22±0.04	3.07±0.04	**42.52±0.26**
9	16.42±0.21	0.05±0.00	**9.61±0.04**	**3.61±0.04**	37.62±0.23
12	14.29±0.22	0.00±0.00	8.82±0.04	2.83±0.04	32.05±0.22
15	13.63±0.15	0.00±0.00	8.20±0.04	2.37±0.03	28.89±0.23
18	12.15±0.11	0.00±0.00	7.09±0.03	1.95±0.03	27.48±0.20
21	11.00±0.09	0.00±0.00	5.22±0.04	1.40±0.04	26.84±0.21
24	9.08±0.09	0.00±0.00	5.02±0.03	1.18±0.03	23.44±0.21



รูปที่ 4.27 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 4.24 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร

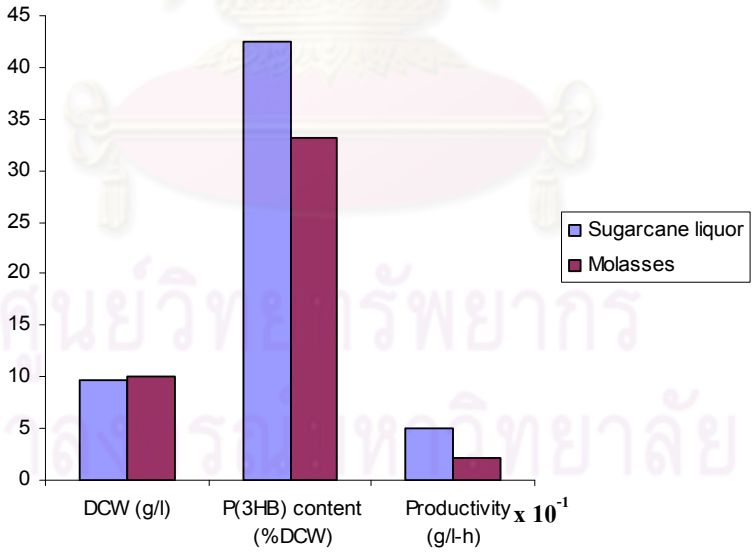
time (h)	total sugar (g/l)	urea conc. (g/l)	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB)content (%DCW)
0	32.64±0.37	0.81±0.05	0.69±0.03	0.00	0.00
3	29.93±0.35	0.68±0.05	1.49±0.04	0.04±0.03	2.79±0.22
6	24.09±0.31	0.42±0.02	5.72±0.03	1.26±0.04	21.95±0.22
9	19.10±0.024	0.18±0.01	8.59±0.04	2.68±0.03	31.22±0.26
12	17.96±0.22	0.04±0.00	8.67±0.03	2.86±0.03	32.97±0.24
15	14.53±0.19	0.00±0.00	**9.97±0.04**	**3.31±0.04**	**33.23±0.25**
18	13.11±0.17	0.00±0.00	7.90±0.03	2.17±0.04	27.50±0.25
21	12.73±0.15	0.00±0.00	6.97±0.04	1.52±0.03	21.87±0.23
24	11.97±0.11	0.00±0.00	6.82±0.03	1.49±0.04	21.79±0.22



รูปที่ 4.28 ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณยูเรีย และความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 4.25 ค่าอัตราการผลิต เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยและกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร

time (h)	Sugarcane liquor	Molasses
	P(3HB) productivity (g/l-h)	P(3HB) productivity (g/l-h)
0	0.00	0.00
3	0.34	0.01
6	0.51	0.21
9	0.40	0.30
12	0.24	0.24
15	0.16	0.22
18	0.11	0.12
21	0.07	0.07
24	0.05	0.06



รูปที่ 4.29 ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณ P(3HB) และค่าอัตราการผลิตสูงสุด เมื่อเลี้ยง *B.megaterium* BA-019 ในอาหาร MSM ที่มีน้ำอ้อยและกากน้ำตาลความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยให้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีในถังหมักขนาด 5 ลิตร

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 สายพันธุ์ที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัย โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต P(3HB) จากการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำอ้อยและยูเรียที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ โดยศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารจำเป็นบางชนิดที่มีต่อการเจริญ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้แก่ ความเข้มข้นของไนโตรเจน (ยูเรีย) ความเข้มข้นของแมกนีเซียม (แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต) และผลร่วมระหว่างโพแทสเซียมและฟอสเฟต (โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต) เพื่อกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เพิ่มมากขึ้น ผลการวิจัยพบว่า *B. megaterium* BA-019 สามารถเจริญพร้อมกับการผลิต P(3HB) ได้ดีโดยใช้น้ำอ้อยและยูเรียเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนซึ่งมีราคาถูก โดยเชื้อสามารถเจริญและผลิต P(3HB) ได้ดีขึ้นในภาวะการเจริญที่ไม่สมดุล (unbalanced growth condition) ศึกษาการผลิต P(3HB) ในถังหมักโดยใช้ภาวะที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าไปเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อผลิต P(3HB) ในถังหมักโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณ P(3HB) สูงสุดที่ผลิตได้ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ในขวดเขย่า แต่ความหนาแน่นของเซลล์และอัตราการผลิต P(3HB) เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักสูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า

5.1 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต

Keshavarz และ Roy (2010) รายงานว่า การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ควรเป็นกระบวนการต่อเนื่อง (serial process) ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก จุลินทรีย์จะมีการเจริญในแหล่งคาร์บอนโดยการนำสารอาหารนั้นไปสร้างองค์ประกอบของเซลล์และผลิตเซลล์ปริมาณมาก ส่วนในขั้นตอนที่สอง มีการเติมสารอาหารเพื่อใช้ในการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เซลล์ปริมาณมากที่ได้ในขั้นตอนแรกก็จะใช้สารอาหารนั้นเพื่อนำไปสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยอาจมีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรืออาจไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้น แต่ขนาดของเซลล์จะใหญ่ขึ้นเนื่องมาจากการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ภายในเซลล์ ดังนั้นในการทำให้เชื้อมีการผลิตเซลล์ปริมาณมากในขั้นตอนแรกจะส่งผลทำให้ได้ปริมาณ P(3HB) เพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อผลิตเซลล์ให้ได้ปริมาณมากในขั้นตอนแรก พบว่าเซลล์มีอัตราการเจริญจำเพาะ(μ) สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ 0.759 ต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมงสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเพื่อการสร้างและสะสม P(3HB)

5.2 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองภายใต้ภาวะการเจริญที่สมดุล

Choi และ Lee (1999) รายงานว่า ปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อต้นทุนการผลิต P(3HB) คือ ราคาของแหล่งคาร์บอนที่ใช้โดยคิดเป็น 70-80 เปอร์เซนต์ของต้นทุนวัตถุดิบทั้งหมด ดังนั้นถ้าสามารถเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกในการผลิต P(3HB) ก็จะมีผลทำให้ต้นทุนของการผลิต P(3HB) ลดลงได้มาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ในการแข่งขันด้านราคากับพลาสติกที่สังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น พอลิเอทธิลีน และพอลิโพรไพลีนได้

Liu และคณะ (1998) รายงานว่า recombinant *Escherichia coli* สายพันธุ์ HMS174/pTZ18u-PHB สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยการใช้กากน้ำตาลบีทเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส ทำให้ลดต้นทุนในการผลิต P(3HB) ได้ เนื่องจากกากน้ำตาลบีทเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ recombinant *Escherichia coli* สายพันธุ์ HMS174/pTZ18u-PHB แบบ fed-batch ที่มีการควบคุมการป้อนสารอาหารด้วยวิธี pH-stat ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 39.5 กรัมต่อลิตร ผลิต P(3HB) ได้เท่ากับ 80 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจที่จะใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB) เพื่อทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลง เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกมากในประเทศไทยและเป็นพืชที่สามารถตัดและเก็บเกี่ยวได้หลายครั้ง โดยในกระบวนการการผลิตน้ำตาลทรายจะใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบหลักและมีน้ำอ้อยเกิดขึ้นหลายขั้นตอน ซึ่งในน้ำอ้อยจะประกอบไปด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลักเฉลี่ยประมาณ 93.22 เปอร์เซนต์ กลูโคสเฉลี่ยประมาณ 4.55 เปอร์เซนต์ ฟรุกโตสเฉลี่ยประมาณ 1.40 เปอร์เซนต์ (วิเคราะห์โดย HPLC) รวมทั้งวิตามินและธาตุอาหารเป็นจำนวนมาก (มิตรผลวิจัย, 2551) ซึ่งน้ำอ้อยในแต่ละครั้งจะมีปริมาณน้ำตาลเฉลี่ยแตกต่างกันตามลักษณะพันธุ์อ้อย ฤดูกาล สภาพดิน การเก็บรักษา และกรรมวิธีการผลิตของโรงงาน และอีกประการหนึ่ง คือ เชื้อ *B. megaterium* BA-019 สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตสในการผลิต P(3HB) (รัตนศิริ มุทิตากุล, 2538) ส่วนแหล่งไนโตรเจนเลือกใช้ยูเรีย เนื่องจากมีราคาถูกและให้ผลผลิตดีกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (อติพล บุญเรืองถาวร, 2543) โดยในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาการผลิต P(3HB) ในภาวะการเจริญที่สมดุล (balanced growth condition) โดยเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในอาหารเพื่อการสร้างและการสะสม P(3HB) (MSM) ผลการวิจัยนี้พบว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 7.23 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 2.94 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 40.69 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 18 ชั่วโมง

5.3 ศึกษาผลของการจำกัดธาตุอาหารแต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอที่มีต่อการเจริญการสังเคราะห์และสะสม P(3HB)

5.3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต P(3HB)

Liu และคณะ (1998) ศึกษาเปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้กากน้ำตาลบีทที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันโดยใช้ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร recombinant *Escherichia coli* สายพันธุ์ HMS174/pTZ18u-PHB สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 16.7 กรัมต่อลิตรและผลิต P(3HB) ได้เท่ากับ 85 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20 และ 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิต P(3HB) ได้เท่ากับ 68 และ 77 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

Gouda และคณะ (2001) ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1-5 เปอร์เซนต์ที่เติมลงในอาหารสำหรับการผลิต พบว่ากากน้ำตาลความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ทำให้ *Bacillus megaterium* เจริญได้ดีที่สุดและกากน้ำตาล 2 เปอร์เซนต์เชื้อสามารถผลิต P(3HB) ได้มากที่สุด คือ 46.3 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่พบว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลมากขึ้น ทำให้มีการผลิต P(3HB) ลดลง

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต P(3HB) โดยเปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกันโดยใช้ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร *B. megaterium* BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสมP(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 8.92 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.85 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 43.16 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงโดยได้ผลดีกว่าภาวะการเจริญที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และเมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเพิ่มขึ้นพบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นแต่สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารอาหารที่สมบูรณ์มากกว่าส่งผลให้จุลินทรีย์นำสารอาหารที่มีอยู่อย่างสมบูรณ์ไปใช้ในการสร้างเซลล์และเพิ่มจำนวนมากกว่าจะนำไปสังเคราะห์และสะสมP(3HB) ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่เก็บไว้ใช้ในยามขาดแคลนสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญ (Evan และคณะ, 1990) โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 11.09 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.78 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 34.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตรเท่ากับ และได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 13.31 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 1.56 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 11.70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 50 กรัม

ต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอจะมีค่าเหมาะสมอยู่ค่าหนึ่ง คือ มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน แต่ถ้ามากเกินไปจะส่งผลให้การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ลดลง ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 30 กรัมต่อลิตร

5.3.2 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจน

นอกจากการให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) การจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือโพแทสเซียม ก็มีผลต่อการกระตุ้นให้เซลล์สังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้เพิ่มขึ้น (Pandian และคณะ,2010) โดย Beaulieu และคณะ, 1995 รายงานว่า ไนโตรเจนเป็นธาตุที่จุลินทรีย์ต้องการในช่วงการเจริญเพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ แต่ในช่วงที่มีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) การจำกัดปริมาณไนโตรเจนมีส่วนกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เพิ่มขึ้น

Gouda และคณะ (2001) ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจน โดยเลี้ยงให้ *Bacillus megaterium* ในอาหารสำหรับการผลิตที่มีความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพด 0.5-7 เปอร์เซนต์ พบว่าน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ เชื้อสามารถผลิต P(3HB) ได้มากที่สุดเท่ากับ 49.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดมีผลทำให้ความสามารถในการผลิต P(3HB) ลดลง

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณไนโตรเจนในรูปของยูเรียในอาหาร MSM ที่มีผลต่อการผลิต P(3HB) โดยเปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมยูเรีย (N-free medium) โดยใช้ปริมาณคาร์บอนที่ได้จากการทดลองข้างต้น คือ 30 กรัมต่อลิตรส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM) พบว่าเมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร *B. megaterium* BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 8.88 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.87 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 43.25 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้นลดลง คือ 0.6 0. 4 0.2 และไม่มีการเติมยูเรีย พบว่าทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลงอย่างชัดเจน โดยได้ P(3HB) เท่ากับ 32.63 38.06 38.71 และ 41.11 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้น 1.0 และ 1.2 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) ใกล้เคียงกัน คือ เท่ากับ 39.01 และ 38.91 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ จากการที่แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญสำหรับการเจริญเติบโต คือ เป็นสารสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน ดังนั้นถ้ามีแหล่งไนโตรเจนน้อยหรือไม่มีเลยย่อมทำให้เซลล์เจริญได้น้อย ดังนั้นการจำกัดแหล่งไนโตรเจนจึงมีค่าที่เหมาะสมอยู่ คือ มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 23 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน ซึ่งถ้าน้อยเกินไป

หรือไม่มีเลยจึงไม่มีการเจริญหรือการเจริญลดลง ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกใช้ยูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร

5.3.3 การศึกษาผลของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียม

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) รายงานว่า ผลของการจำกัดแมกนีเซียมในรูปแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยเชื้อ *Alcaligenes* sp. A-04 ต่อมาภายหลังจัดจำแนกสปีชีส์เป็น *Alcaligenes eutropha* และเป็น *Ralstonia eutropha* และในปัจจุบันคือ *Cupriavidus necator* พบว่า อาหารที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตจะทำให้ปริมาณ P(3HB) เพิ่มขึ้นจาก 19.86 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเทียบกับอาหารสูตรที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร จะสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้เท่ากับ 37.70 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ศึกษาผลของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียมในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ต่อการผลิต P(3HB) โดยเปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 0.2 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต โดยใช้ปริมาณคาร์บอนและยูเรียที่ได้จากการทดลองข้างต้น คือ 30 และ 0.8 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM) พบว่าเมื่อใช้อาหาร MSM ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 47.26 และ 43.50 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต เชื้อสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.23 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.60 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 49.96 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญอาจมีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการเจริญได้ตามปกติ เมื่อเซลล์อยู่ในภาวะเช่นนี้อาจถือได้ว่าอยู่ในภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล จึงกระตุ้นให้เซลล์สร้างสารที่สามารถเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้เพื่อให้เซลล์มีชีวิตอยู่รอด ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) แต่เชื้อจุลินทรีย์เป็นเชื้อต่างชนิดกัน ดังนั้นจึงพิจารณาให้ไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตในการทดลองขั้นต่อไป

5.3.4 การศึกษาผลร่วมของการจำกัดโพแทสเซียมและฟอสเฟต

Daniel และคณะ(1992) รายงานว่า การศึกษาการจำกัดปริมาณฟอสเฟตมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* Z-I ในระดับถังหมัก พบว่าเมื่อจำกัดปริมาณฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีปริมาณเพียง 45 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณฟอสเฟตในสูตรอาหารเดิม ปริมาณ P(3HB) จะเพิ่มขึ้นจาก 9.9 เป็นเท่ากับ 23 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

Sharma และ Mallick (2005) รายงานว่า การจำกัดปริมาณฟอสเฟตมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยเชื้อ *Nostoc muscorum* ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรีย พบว่าในภาวะที่ขาดแคลนฟอสเฟตและมีแหล่งคาร์บอนจากภายนอกเซลล์ คือ อะซิเตต กลูโคส มอลโตส ฟรุกโตสและเอทานอลจะทำให้มีการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เพิ่มสูงขึ้น และจากผลการวิจัยพบว่าเมื่อเติมอะซิเตต 0.2 เปอร์เซนต์ *Nostoc muscorum* สามารถผลิต P(3HB) เพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 35 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 7 วัน

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ศึกษาผลของการจำกัดโพแทสเซียมและฟอสเฟตในรูปของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ต่อการผลิต P(3HB) โดยเปรียบเทียบการผลิต P(3HB) เมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยใช้ปริมาณคาร์บอน ยูเรียและแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตที่ได้จากการศึกษาข้างต้น คือ 30 0.8 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ตามลำดับ ส่วนสารอื่นใช้ในปริมาณเท่าเดิม (สูตรอาหาร MSM) พบว่าเมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร *B. megaterium* BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.21 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 4.62 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 50.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นลดลง คือ 1.5 1.0 0.5 กรัมต่อลิตรและไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 46.60 41.48 39.81 และ 42.59 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเพิ่มขึ้น คือ 2.5 และ 3.0 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 44.45 และ 38.36 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตรสำหรับการศึกษาต่อไป

5.4 การผลิต P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ที่ศึกษาได้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

5.4.1 การผลิต P(3HB) จากน้ำอ้อย

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของการผลิต P(3HB) จากการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ภาวะที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าไปเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.61 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 42.52 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 6 ชั่วโมง จึงเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อในถังหมักซึ่งสามารถจัดภาวะต่างๆได้ดีกว่าในระดับขวดเขย่า เช่น ให้ปริมาณอากาศได้สูงกว่า มีการปั่นกวนด้วยใบกวนทำให้มีการผสมได้ดี ทำให้เซลล์สามารถเจริญค่อนข้างดีกว่า แต่ปริมาณ P(3HB) ใกล้เคียงกัน ซึ่งถ้ามีการศึกษาวิจัยต่อก็ควรจะมีการศึกษาปัจจัยบางประการที่อาจมีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เช่น การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ค่าปริมาณออกซิเจนละลาย รวมทั้งการเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งกะ(fed-batch cultivation) โดยมีการเติมสารอาหาร เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ในช่วงการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เป็นต้น ส่วนผลการเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่ดีกว่าการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าในการศึกษานี้ คือ การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุดใช้เวลาสั้นกว่าการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า โดยพบว่าที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ให้ค่าอัตราการผลิตในถังหมักมีค่าเท่ากับ 0.51 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าในระดับขวดเขย่าที่มีค่าเท่ากับ 0.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

5.4.2 การผลิต P(3HB) จากกากน้ำตาล

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของการผลิต P(3HB) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ภาวะเช่นเดียวกับข้อ 5.4.1 แต่ใช้กากน้ำตาลแทนน้ำอ้อย พบว่า ได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 9.97 กรัมต่อลิตรซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ได้ค่าความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 3.31 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 33.23 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 15 ชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและเวลาที่ได้ P(3HB) สูงสุดช้ากว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต P(3HB) จากการใช้น้ำอ้อยและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 5 ลิตร สรุปว่าเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าได้ปริมาณ P(3HB) และค่าอัตราการผลิต (productivity) สูงกว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกากน้ำตาลเป็นของเหลือที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทราย อาจจะมีสิ่งเจือปน (impurity) ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์นำมาใช้ได้ยากกว่าน้ำอ้อยที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า นอกจากนี้ในองค์ประกอบของกากน้ำตาลมีโลหะหนักอยู่หลายชนิด (Teclu และคณะ, 2009) ซึ่งอาจเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์และสะสม P(3HB)

การใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตสารผลิตภัณฑ์ มีข้อดีคือ น้ำอ้อยมีความบริสุทธิ์สูง การเตรียมก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก (pretreatment) มีเพียงเล็กน้อย ที่สำคัญคือเป็นส่วนที่ได้จากต้นกระบวนการของการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งจัดว่าเป็นการประหยัดพลังงาน (energy saving) ถ้าเปรียบเทียบกับน้ำตาลทราย (รูปที่ 2.8) และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ การแยกและทำบริสุทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ทำได้ง่าย ใช้ขั้นตอนน้อยกว่าเนื่องจากไม่มีสี รวมทั้งการบำบัดของเหลือทิ้งจากน้ำหมัก (effluent treatment) ก็ทำได้ง่ายและสะดวก และในกรณีการใช้กากน้ำตาลแม้จะพิจารณาว่ามีราคาถูก แต่ในปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารมีความต้องการกากน้ำตาลเป็นปริมาณมากขึ้นตามลำดับ ดังนั้น ราคาจึงสูงขึ้นกว่าแต่ก่อน นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาปัจจัยอื่นๆ พบว่ามีข้อด้อยกว่า ได้แก่ ก่อนนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ จะต้องมีขั้นตอนทำบริสุทธิ์หลายขั้นตอน (ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์) ได้แก่ การทำให้เจือจาง ตามด้วยการแยกส่วนกากตะกอนที่เป็นของแข็ง (solid particles) การบำบัดสี (decolorization) ถ้าจำเป็นในบางกระบวนการ รวมทั้งการกำจัดโลหะหนัก เช่น อะลูมิเนียม อะซินิค คอปเปอร์ เหล็ก แมงกานีส สังกะสี เป็นต้น (ซึ่งอาจจำเป็นในการผลิตผลิตภัณฑ์บางชนิด) เนื่องจากโลหะหนักบางชนิด อาจเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการผลิต แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารผลิตภัณฑ์ด้วย ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ทำให้กากน้ำตาลซึ่งจัดว่ามีราคาต่ำ มีราคาต้นทุนสูงขึ้น นอกจากนี้ การทำผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้บริสุทธิ์ ถ้าผลิตภัณฑ์อยู่ในน้ำหมักก็จะทำได้ยากกว่า เนื่องจากการมีสารปนเปื้อนในกากน้ำตาล รวมถึงการบำบัดของเหลือทิ้ง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการจะทำได้ยากกว่า

คณะผู้วิจัยได้ใช้วัตถุดิบหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 มาก่อนการศึกษานี้แล้ว รวมทั้งกำลังศึกษาวิจัยอยู่ โดยรัตนศิริ มุทิตากุล (2538) เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลซูโครส น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายแดงเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า *B. megaterium* BA-019 สามารถผลิต P(3HB) ได้สูงสุด 14.24 15.11 19.12 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM โดยใช้กากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิต P(3HB) ได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่น โดยสามารถผลิต P(3HB) ได้สูงสุด 31.84 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 24 ชั่วโมง และพบว่าเมื่อมีการเติมสารทวีน 80 ซึ่งเป็นสาร dissociating agent ปริมาณ 2.5 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหาร MSM มีผลทำให้ *B. megaterium* BA-019 มีการสร้าง P(3HB) เพิ่มมากขึ้นถึง 47.48 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 36 ชั่วโมง และต่อมาได้มีการวิจัยโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 อติพล บุญเรืองถาวร (2543) รายงานว่า *B. megaterium* BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้สูงสุด โดยได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 8.51 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 5.14 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 60.40 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 36 ชั่วโมง ค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยทั้งหมดทำการวิจัยในระดับขวดเขย่าและพบว่าปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้มีปริมาณแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ กากน้ำตาลที่ใช้ในการผลิต เป็นต้น ซึ่งกากน้ำตาลในแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ ฤดูกาล สภาพดิน การเก็บรักษาและกรรมวิธีการผลิตของโรงงาน เป็นต้น แต่ในขอบเขตของงานวิจัยนี้เป็นการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 โดยใช้น้ำอ้อยซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้โดยคณะผู้วิจัย และจากเหตุผลดังที่กล่าวมาจึงต้องการศึกษาการใช้น้ำอ้อยในการเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิต P(3HB) เพื่อให้ได้ข้อมูลในด้านต่างๆ จึงศึกษาในระดับขวดเขย่าซึ่งเป็นการทดลองที่ทำได้สะดวก ไม่ยุ่งยาก และศึกษาปัจจัยที่จำเป็นได้หลายประการ ได้แก่ การเจริญของจุลินทรีย์ *B. megaterium* BA-019 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ P(3HB) ที่ผลิตได้ และอัตราการผลิต ซึ่งจะได้นำมาพิจารณาในการศึกษาการเลี้ยงเชื้อระดับขยายส่วนต่อไป โดยในการวิจัยต่อไปควรเป็นการเลี้ยงเชื้อในถังหมักโดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำอ้อยและแหล่งไนโตรเจนเป็นยูเรีย โดยจำกัดธาตุอาหารที่มีผลต่อการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดย *B. megaterium* BA-019 ที่ศึกษาได้จากงานวิจัยนี้ และอาจมีการเติมสารอาหารเป็นครั้งคราว (fed-batch cultivation) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะทำให้ได้ปริมาณ P(3HB) สูงเพิ่มขึ้นอีก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบการผลิต P(3HB) โดยใช้จุลินทรีย์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

Strain	Carbon substrate	cultivation time (h)	Culture mode	DCW (g/l)	P(3HB) conc. (g/l)	P(3HB) content (% DCW)	productivity (g/l-h)	Reference
B. megaterium BA-019	Sugarcane liquor	12	Batch (Shake flask)	9.21	4.62	50.12	0.38	งานวิจัยนี้
B. megaterium BA-019	Sugarcane liquor	6	Batch(Fermenter)	9.61	3.07	42.52	0.51	งานวิจัยนี้
B. megaterium BA-019	Molasses	15	Batch (Fermenter)	9.97	3.31	33.23	0.22	งานวิจัยนี้
B. megaterium BA-019	Molasses	24	Batch (Shake flask)	5.75	2.73	47.48	0.08	รัตนศิริ มุทิตากุล, 2538
B. megaterium BA-019	Molasses	36	Batch (Shake flask)	8.51	5.14	60.40	0.14	อติพล บุญเรืองถาวร, 2543
B. megaterium	Molasses	48	Batch (Fermenter)	3.60	2.20	59.40	0.08	Gouda et al. (2001)
Pseudomonas cepacia	Lactose	120	Batch (Fermenter)	3.57	2.00	56.00	0.02	Young et al. (1994)
Azotobacter chroococcum	Starch	58	Batch (Fermenter)	1.17	0.86	73.90	0.01	Kim (2000)
Pseudomonas fluorescens A2a5	Sugarcane liquor	96	Batch (Fermenter)	32.00	22.00	70.00	0.23	Jiang et al. (2008)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กุสุมา กมลจรัสโสภา. 2547. การผลิตกรดอาร์-(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริกโดยการดีพอลิเมอไรเซชันในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัตนศิริ มุทิตากุล. 2538. การผลิตพอลีบีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่แยกได้. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ส่งศรี กุลปรีชา. 2536. การผลิตพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติจากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุกฤตยา วีระนนท์. 2539. การย่อยสลายทางชีวภาพของพอลิ(บีตา-ไฮดรอกซีแอลคาโนเอต) ที่ผลิตโดย *Alcaligenes* sp. A-04. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุดา สุภาชวินสวัสดิ์. 2542. ผลของซับสเตรทต่อสัดส่วนของของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตในพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อติพล บุญเรืองถาวร. 2543. การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดยการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp BA-019 แบบป้อนเป็นงวดภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. 2536. การตรวจลักษณะและการสร้างโพลี-บีต้า-ไฮดรอกซีบิวทีเรตโดย *Alcaligenes eutrophus* sp. A-04.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Anderson, A.J., and Dawes, E.A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol Rev. 54:450-472.

Asenjo, J.A., and Merchuk, J.C. (ed). 1995. Bioreactor system design. Marcel Dekkar. Inc.

Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S., and Goulet, J. 1995. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. Appl. Environ. Microbiol. 61:165-169.

Bernfeld, F. 1955. Amylase alpha and beta. In Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.(eds.) Method in Enzymology. pp.149-150. Academic Press. New York.

Bosco, F., and Chiampo, F. 2010. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge. Production of bioplastics using dairy residues. J. Biosci. Bioeng. 109:418-421.

Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W. and Fuller, R.C. 1990. Plastic from bacterial: Poly(β-hydroxyalkanoates) as natural biocompatible and biodegradable polymers. Adv.Biochem.Eng.Biotechnol. 41:77-93.

Braunegg, G.,Lefebvre ,G., and Genser,K.F.1998. Polyhydroxyalkanoates ,biopolyesters from renewable resources : physiology and engineering aspects. J.Biotechnol. 65:127-161.

Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms : technology and economics. Tibtech. 5:246-250.

Chen, G.Q., and Wu, Q. 2005. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Biomaterials. 26:6565-6578.

Chen, G.Q., Konig, K.H., and Lafferty, R.M. 1991. Occurrence of poly-(D)-3-hydroxyalkanoates in the genus Bacillus. FEMS Microbiol. Lett. 84:173-176.

Choi, J., and Lee, S.Y. 1999. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. App. Microbiol Biotechnol. 51:13–21.

Comeau, Y., H all, K.J., and Oldham, W.K. 1998. Determination of poly-β-hydroxybutyrate and poly-β-hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography. Appl. Environ. Microbiol. 54:2325-2327.

Daniel, M., Choi, J.H., Kim, J.H., and Kebeault, J.M. 1992. Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly-β-hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium, *Pseudomonas* 135. Appl. Environ. Microbiol. 54:2325-2327.

Dawes, E.A., and Senior, P.J. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. Adv. Microbiol. Physio. 10:203-206.

Doi,Y.(ed). 1990. Microbial polyesters. VCH. New York.

Evan, D.J., and Sikadr, K.S. 1990. Biodegredable Plastic. Chemtech. 5 : 38-42.

Gouda, M.K., Swellam, A.E., and Omar, S.H. 2001. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. Microbiol.Res. 156:201-207.

Groom, C.A., Luong, J.H.T., and Mulchandani, A. 1998. On-line culture fluorescence measurement during the batch cultivation of poly-β-hydroxybutyrate producing *Alcaligenes eutrophus*. J. Biotechnol. 8:271-278.

Halami, P.M. 2008. Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolates Bacillus cereus CFR06. World J. Microbiol Biotechnol. 24:805-812.

Huang, T.Y., Duan, K.J., Huang, S.Y., and Chen, C.W. 2006. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. J. Ind. Microbiol Biotechnol. 33:701-706.

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

Jiang, Y., Song, X., Gong, L., Li, P., Dai, C., and Shao, W. 2008. High poly(β-hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. Enzyme Microb. Technol. 42 : 167-172.

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

Keshavarz, T., and Roy, I. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. Curr. Opin. Microbiol. 13:1-6.

Kim, B.S. 2000. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. 27: 774-777.

Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Fermandes, E.G., Horvat, P., Kutschera, C., Hesse, P., and Braunegg, G. 2008. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. Bioresour. Technol. 99:4854-4863.

Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., and Thongchul, N. 2009. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. J. Biosci. Bioeng. 107:240-245.

Lafferty, R.M., Korsatko, B., and Korsatko, W. 1988. Microbial production of poly-β-hydroxybutyric acid. In Rehm, H.J., and Reed, G. (eds.). Biotechnology. pp. 135-176. vol. 6b. VCH Publishers. Weinheim. 810p.

Lee, S.Y. 1996. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Trends Biotechnol. 14:431-438.

Liu, F., Li, W., Ridgway, D., and Gu, T. 1998. Production of poly-β-hydroxybutyrate on Molasses by recombinant Escherichia coli. Biotechnol. Lett. 20:345-348.

Loo, C.Y., and Sudesh, K. 2007. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. Malays. Polym. J. 2:31-57.

López-Cortés, A., Lanz-Landázuri, A., and García-Maldonado, J.Q. 2008. Screening and isolation of PHB-producing bacteria in a polluted marine microbial mat. Microbial Ecol. 56:112-120.

Luengo, J.M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharo, G., and Olivera, E.R. 2003. Bioplastics from microorganisms. Curr. Opin. Microbiol. 6:251-260.

Madison, L.L., and Huisman, G.W. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates) : from DNA to plastic. Microbiol.Mole.Biol.Rev. 63:21-53.

Pandian, S.R., Deepak, V., Kalishwaralal, K., Rameshkumar, N., Jeyaraj, M., and Gurunathan, S. 2010. Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. Bioresour. Technol. 101:705-711.

Pozo, C., Martinez-Toledo, M.V., Rodelas, B., and Gonzalez-Lopez, J. 2002. Effects of culture Conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechin (wastewater from olive oil mills). J. Biotechnol. 97:125-131.

Quillaguamán, J., Delgado, O., Mattiasson, B., and Hatti-Kaul, R. 2006. Poly(β-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. Enzyme Microb. Technol. 99:151-157.

Quillaguamán, J., Doan-Van, T., Guzmán, H., Guzmán, D., Martín, J., Everest, A., and Hatti-Kaul, R. 2008. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. Appl. Environ. Biotechnol. 78:227-232.

Quillaguáman, J., Hashim, S., Bento, F., Mattiasson, B., and Hatti-Kaul, R. 2005. Poly(β-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate. J. Appl. Microbiol. 99:151-157.

Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, and Kalia, V.C. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresour. Technol. 87:137-146.

Ribera, R.G., Monteoliva-Sanchez, M., and Ramos-Cormenzana, A. 2001. Production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas putida* KT2442 haboring pSK2685 in wastewater from olive oil mill (alpechin). J. Biotechnol. 4:116-119.

Scragg, H.H. 1991. Bioreactors in biotechnology. London: Ellis Horwood pp. 26-85.

Sharma, L., and Mallick, N. 2005. Accumulation of poly-β-hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum* : regulation by pH, light-dark cycles, N and P status and carbon sources. Bioresour. Technol. 96:1304-1310.

Shrivastav, A., Mishra, S., Shethia, B., Pancha, I., Jain, D., and Mishra, S. 2010. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. Int. J. Biochem. Cell Biol. 47:283-287.

Snape, J.B., Dunn, I.J., Ingham, J., and Prenosil, J.E. 1995. Dynamics of environmental bioprocesses. VCH. New York. pp. 52-56.

Solaiman, D., Ashby, R., Hotchkiss, A., and Foglia, T. 2006. Biosynthesis of medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) from soy molasses. Biotechnol. Lett. 28:57-62.

Steinbüchel, A., and Fuchtenbusch, B. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. Tibtech. 16:419-427.

Suzuki, T., Yamane, T., and Shimizu, S. 1986. Mass production of poly-β-hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23:322-329.

Teclu, D., Tivchev, G., Laing, M., and Wallis, M. 2009. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. J. Hazard. Mater. 161:1157-1165.

Van-Thuoc, D., Quillaguáman, J., Mamo, G., and Mattiasson, B. 2008. Utilization of agricultural Residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. J.Appl. Microbiol. 104:420-428.

Wakisaka, Y., Masaki, E., and Nishimoto, Y. 1982. Formation of crystalline γ–endotoxin or poly-β-hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 43:1473-1480.

Yan, S., Tyagi, R.D., and Surampalli, R.Y. 2006. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using wastewater as carbon source and activated sludge as microorganism. Water Sci Technol. 53:175-180.

Young, F.K., Kastner, J.R., and May, S.W. 1994. Microbial production of poly-β-hydroxybutyric acid from D-xylose and lactose by *Pseudomonascepacia*. Appl. Environ. Microbiol. 60:4195-4198.

Zinn, M., Witholt, B., and Egli, T. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. Adv. Drug Deliv. Rev. 53:5-21.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมวัตถุดิบและสารที่ใช้ในการวิจัย

1. การเตรียมน้ำอ้อย

1.1 นำน้ำอ้อยใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์และปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

1.2 นำน้ำอ้อยที่ผ่านการปั่นแยกตะกอนออกแล้วมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม

น้ำอ้อยที่ผ่านการปั่นแยกตะกอน

2. การเตรียมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

2.1 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

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

2.2 สารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส

เตรียมจากการละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส 0.15 กรัม ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก เตรียมจากการละลายกรดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมโซเดียมตาร์เตรต 30 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

4. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยูเรีย

4.1 สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เตรียมจากการละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ปริมาณ 150 กรัมในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

4.2 สารละลายฟีนอลไนโตรพัสซายด์ เตรียมจากการละลายฟีนอล 7 กรัม และโซเดียมไนโตรพัสซายด์ปริมาณ 34 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซสเซียส

4.3 สารละลายบัฟเฟอร์ไฮเปอร์คลอไรด์ เตรียมจากการละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.48 กรัมในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.98 กรัม และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (คลอรอกซ์ 5-5.25 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 11.4-12.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

4.4 สารละลาย EDTA เตรียมจากการละลาย EDTA ไดโซเดียมซอลท์ปริมาณ 6 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สูตรคำนวณ

1. **การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง**

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

2. การคำนวณปริมาณ PHB จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟฟี

การคำนวณปริมาณ P(3HB) (กรัมต่อลิตร ต่อ เซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม)

ปริมาณ P(3HB) (กรัมต่อลิตร) = $\frac{\text{ค่าจากการวิเคราะห์(กรัมต่อลิตร)x น้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร)}}{20}$

3. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก

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

4. การหาปริมาณยูเรียในน้ำหมัก

ปริมาณยูเรีย (กรัมต่อลิตร) = $OD_{636} \times$ ความชัน$^{-1}$ x ค่าการเจือจาง

5. การคำนวณอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ยูเรีย

มวลโมเลกุลของยูเรียเท่ากับ 60 มีธาตุไนโตรเจนเท่ากับ 28

ถ้าใช้ความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร มีธาตุไนโตรเจนเท่ากับ 0.37 กรัมไนโตรเจน

น้ำอ้อย(น้ำตาลซูโครส)

มวลโมเลกุลของซูโครสเท่ากับ 342 มีธาตุคาร์บอนเท่ากับ 144

ถ้าใช้ความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร มีธาตุคาร์บอนเท่ากับ 8.42 กรัมคาร์บอน

ดังนั้นอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 8.42 : 0.37 = 23 กรัมคาร์บอนต่อกรัมไนโตรเจน

6. การคำนวณหา μ และ Productivity

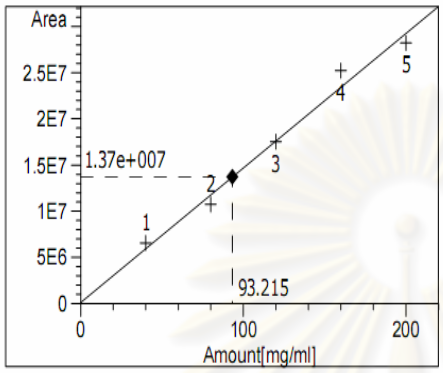
$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_o}{t}$$

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

ภาคผนวก ค

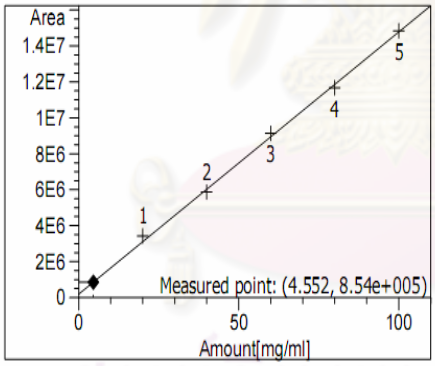
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส ในน้ำอ้อยวิเคราะห์โดย HPLC



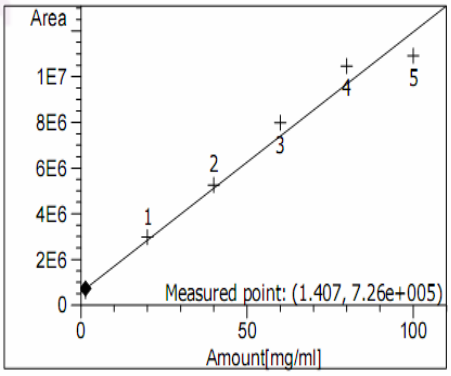
Sucrose at exp. RT: 17.791
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation: 0.99510
Residual Std. Dev.: 1210798.39108
Formula: y = mx + b
m: 145649.38893
b: 143564.52381
x: Amount[mg/ml]
y: Area

2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกูลโคส ในน้ำอ้อยวิเคราะห์โดย HPLC



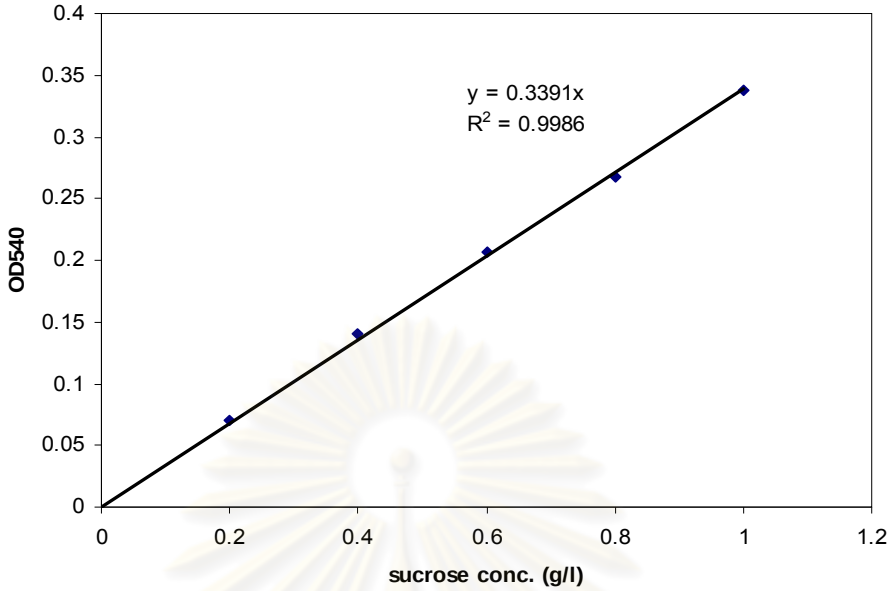
Glucose at exp. RT: 12.154
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation: 0.99920
Residual Std. Dev.: 245213.90447
Formula: y = mx + b
m: 146083.79357
b: 189322.90476
x: Amount[mg/ml]
y: Area

3. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรุกโตสในน้ำอ้อยวิเคราะห์โดย HPLC



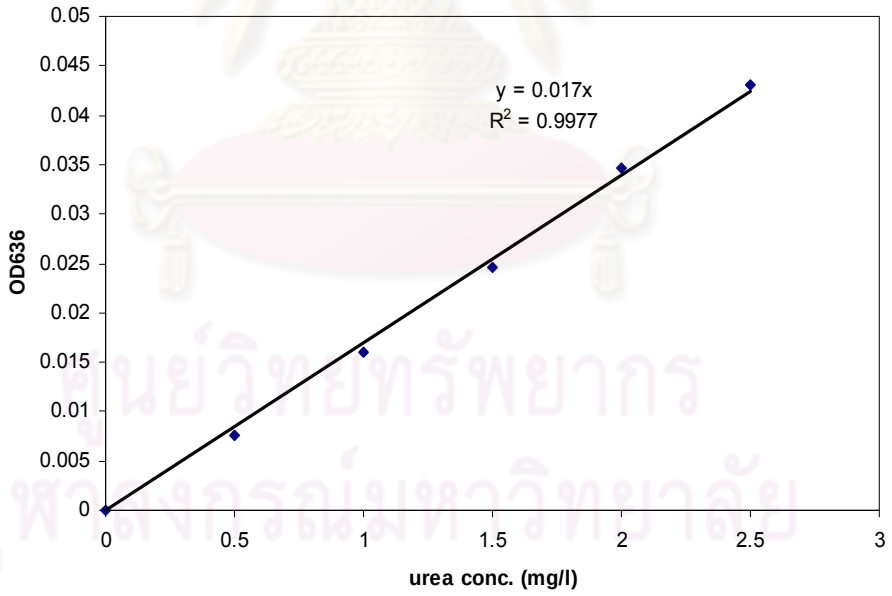
Fructose at exp. RT: 9.052
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation: 0.98706
Residual Std. Dev.: 774927.41736
Formula: y = mx + b
m: 114025.78714
b: 565078.14286
x: Amount[mg/ml]
y: Area

4. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์



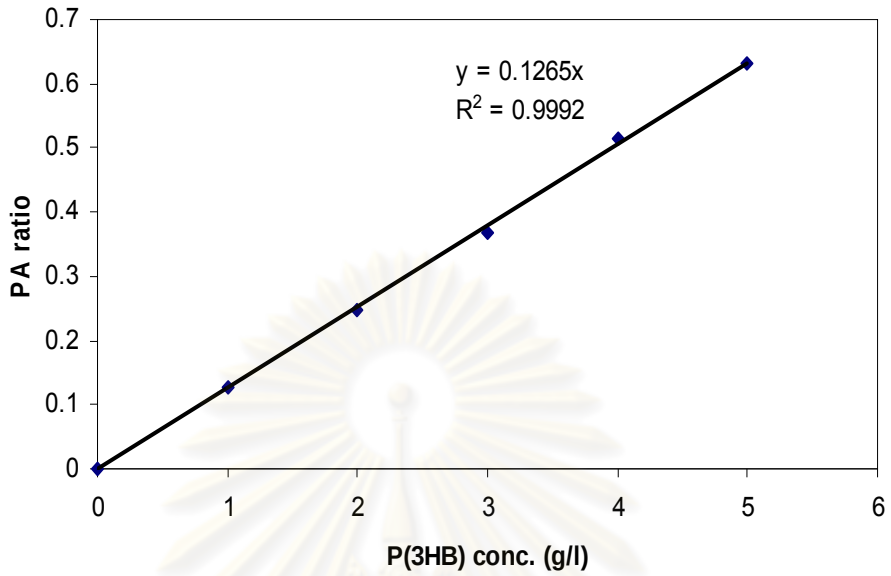
กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วง 0-1.0 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.3391

5. กราฟมาตรฐานยูเรีย



กราฟมาตรฐานของยูเรียในช่วง 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.017

6. กราฟมาตรฐาน P(3HB) วิเคราะห์ด้วยวิธี GC



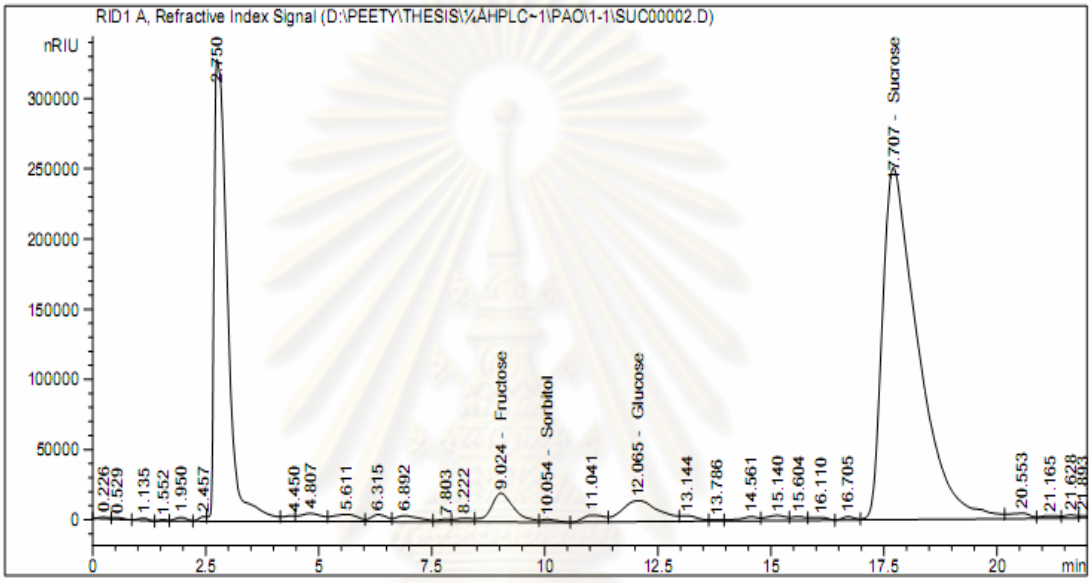
กราฟมาตรฐานของ P(3HB) ความเข้มข้น 0-5 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.1265

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

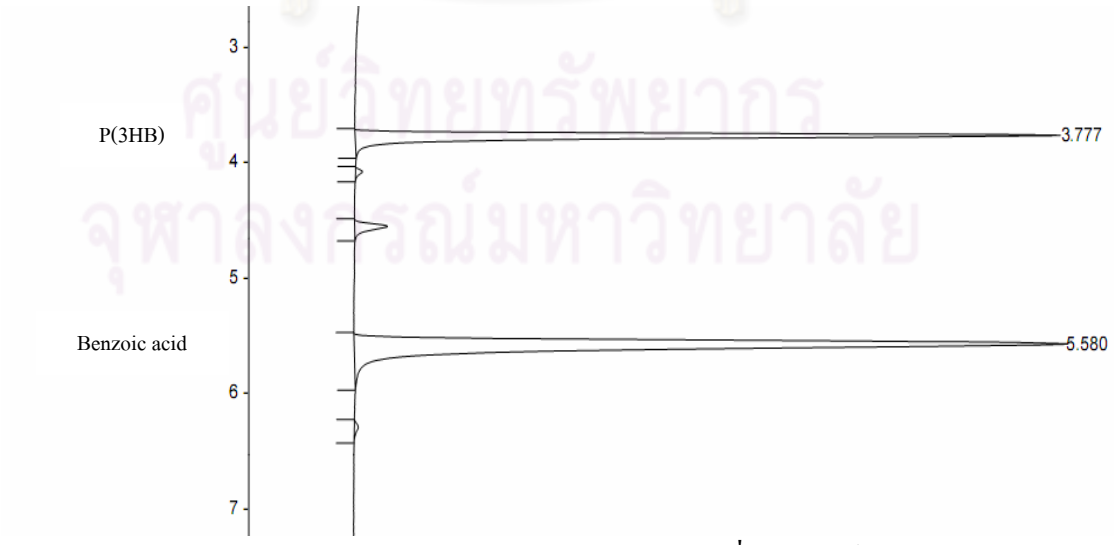
ภาคผนวก ง

โครมาโทแกรม

1. โครมาโทแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำอ้อยด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี

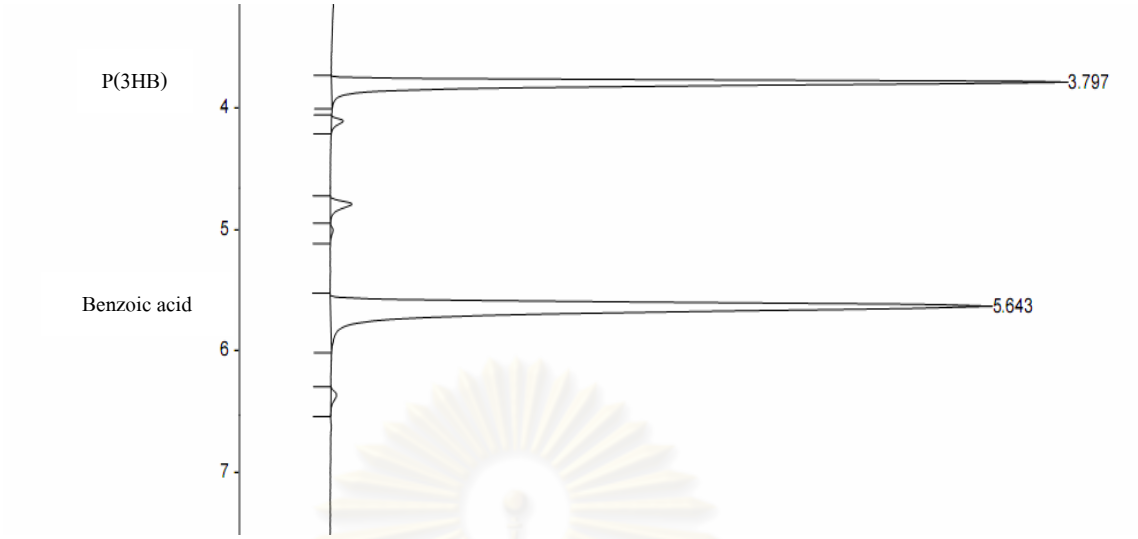


2. โครมาโทแกรมวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี



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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครมาโทแกรมของ P(3HB) จาก *Bacillus megaterium* BA-019 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศริญญา แก้วประดับ เกิดวันที่ 29 มกราคม 2527 ที่จังหวัดยะลา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เมื่อปีการศึกษา 2548 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549

ในระหว่างการศึกษาได้รับทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเข้าร่วมเสนอผลงานในงาน 13th Biological Sciences Graduate Congress ณ National University of Singapore ประเทศสิงคโปร์ ระหว่างวันที่ 15 ถึง 17 ธันวาคม 2551 และงาน The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB 2009) ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ ระหว่างวันที่ 24-25 กันยายน 2552 ในหัวข้อ Production of biodegradable plastic, poly(3-hydroxybutyrate), by *Bacillus megaterium* BA-019 from sugarcane liquor.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย