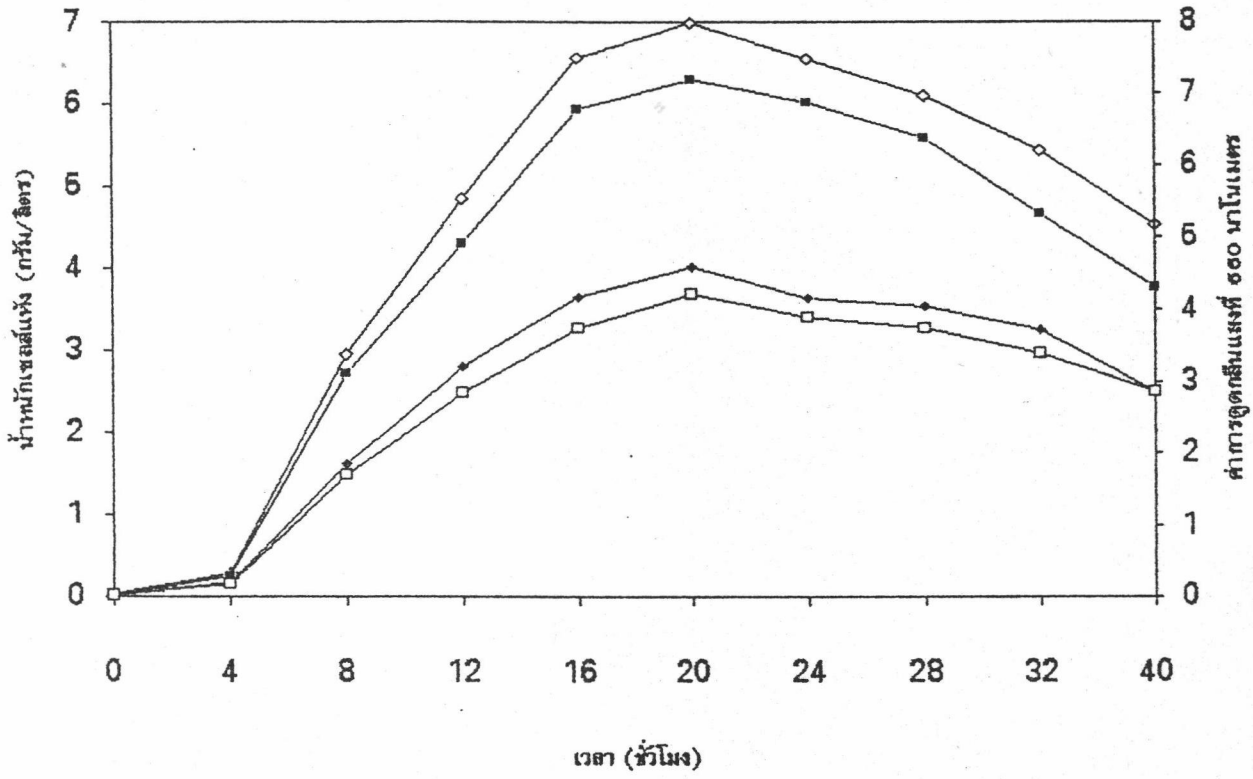
บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การเลือกอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ และเวลาในการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมกล้าเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อปริมาณมาก

เตรียมเชื้อตามวิธีข้อ 2.4.2 แล้วถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 และ 2 ตามวิธีข้อ 2.4.3 เลี้ยงเชื้อนาน 40 ชม. เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชม. นำแต่ละตัวอย่างมาหาความเข้มข้นของเซลล์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำข้อมูลมาเขียนกราฟดังแสดงในรูปที่ 20

พบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อทั้ง 2 สูตร โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่เวลา 20 ชม. การเลือกเวลาสำหรับการเติบโตของกล้าเชื้อ ก่อนจะนำมาถ่ายลงในอาหารสำหรับการสร้าง และสะสมสารผลิตภัณฑ์(อาหาร MSM)นั้น ควรคำนึงถึงปริมาณเซลล์ที่มาก และเซลล์นั้นควรอยู่ในระยะของการเติบโต เมื่อพิจารณาพบว่าเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อเท่ากับ 16 ชม. เนื่องจากกล้าเชื้อมีปริมาณเซลล์มากและยังอยู่ในช่วงที่มีการแบ่งตัว ถึงแม้การเติบโตของกล้าเชื้อที่เวลาเท่ากับ 12 ชม. เซลล์จะอยู่ในช่วงการแบ่งตัว แต่ปริมาณเซลล์ต่ำกว่าที่ 16 ชม.ประมาณ 1.3 เท่า และถึงแม้เซลล์จะมีปริมาณสูงสุดที่เวลา 20 ชม. แต่การเติบโตของเซลล์ได้ลดลงแล้ว การเติบโตจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อคือเวลาเท่ากับ 16 ชม.



น้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารสูตรที่ 1 (□) OD_{660}ในสูตรอาหารที่ 1 (■)

น้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารสูตรที่ 2 (◆) OD_{660}ในสูตรอาหารที่ 2 (◇)

รูปที่ 20 น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ของ *Alcaligenes sp.* A-04 เมื่อเลี้ยงในอาหารเตรียมกล้าเชื้อสูตรที่ 1 และ 2

3.2 <u>การคัดเลือกอาหารเลี้ยงหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ เพื่อให้มีการสะสมโคโพลีเมอร์สูงในขั้นตอนการผลิต</u>

จากผลการวิจัยข้อ 3.1 *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถเติบโตได้ดีใกล้เคียงกันในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อทั้ง 2 สูตร จึงทำการวิจัยประสิทธิภาพกล้าเชื้อที่มาจากอาหารแต่ละสูตรในขั้นตอนการสร้างและสะสมสารผลิตภัณฑ์ โดยเตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.4.2 ใส่ในอาหารสูตรที่ 1 และ 2 เลี้ยงกล้าเชื้อนาน 16 ชม.(จากผลการวิจัยข้อ 3.1) นำมาเตรียมเป็นกล้าเชื้อสำหรับขั้นตอนการผลิตโคโพลีเมอร์ตามข้อ 2.4.4 ถ่ายกล้าเชื้อจากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อสูตรที่ 1และ 2 ลงในอาหารสำหรับการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์(อาหาร MSM) โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น กรดวาเลอริก กรดบิวทิริกผสมกับโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท กลีเซอรอล น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร เลี้ยงเชื้อตามวิธีข้อ 2.4.5 เป็นเวลานาน 48 ชม. นำตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ที่ผลิตได้

จากการวิจัยพบว่า การเติบโตของกล้าเชื้อจากอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อทั้ง 2 สูตรในอาหาร MSM ใกล้เคียงกัน แต่เซลล์ที่มาจากอาหารเลี้ยงหัวเชื้อสูตรที่ 1มีการสร้างและสะสมสารผลิตภัณฑ์สูงกว่าเซลล์ที่มาจากอาหารเลี้ยงหัวเชื้อสูตรที่ 2 นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนที่เป็นกรดอินทรีย์ให้ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) สูงกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นโดยเฉพาะกรดวาเลอริก จากผลการวิจัยข้อ 3.1 และ 3.2 จึงคัดเลือกอาหารเลี้ยงหัวเชื้อสูตรที่ 1 สำหรับเตรียมกล้าเชื้อ เพื่อถ่ายลงในอาหารสำหรับการสร้างและสะสมสารผลิตภัณฑ์ (อาหาร MSM) ในการวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHA จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆที่สร้างโดย *Alcaligenes sp.* A-04

แหล่งคาร์บอน (20 กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัม/ลิตร)		ปริมาณPHA(%ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	
	อาหารสูตรที่ 1	อาหารสูตรที่ 2	อาหารสูตรที่ 1	อาหารสูตรที่ 2
กรดวาเลอริก	3.31	3.24	47	38
กรดบิวทิริก:โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท	2.81	2.95	28	21
กลีเซอรอล	2.26	2.28	15	12
น้ำมันถั่วเหลือง	3.04	3.44	15	13
น้ำมันปาล์ม	3.12	3.23	11	10

(กรดบิวทิริก:โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรทเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนัก)

3.3 การศึกษาความสามารถในการใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตโคโพลีเมอร์โดย *Alcaligenes sp.* A-04 และคัดเลือกชนิดของกรดอินทรีย์ที่ให้การเติบโตดี และปริมาณโคโพลีเมอร์สูง

จากผลการวิจัยข้อ 3.3 พบว่า *Alacigenes sp.* A-04 สามารถผลิตโคโพลีเมอร์ได้ดีโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นกรดอินทรีย์ ดังนั้นจึงศึกษาความสามารถในการใช้กรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่จะนำไปใช้วิจัยในขั้นต่อไป ขั้นตอนแรกเตรียมกล้าเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงหัวเชื้อสูตรที่ 1 และเลี้ยงเป็นเวลานาน 16 ชม. ซึ่งได้คัดเลือกจากผลการวิจัยข้อ 3.1 และ 3.2 ขั้นที่ 2 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาณ 0.4 กรัม (น้ำหนักเซลล์เปียก)/ขวด ลงในอาหาร MSM โดยมีกรดอินทรีย์ (กรดวาเลอริก กรดบิวทิริก โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท กรดโพพิโอนิก หรือโซเดียมอะซิเตท) เป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่ 30 °ซ เป็นเวลานาน 48 ชม. นำตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ คัดเลือกชนิดของกรดอินทรีย์ที่ให้ปริมาณโคโพลีเมอร์สูงสุด

ผลการวิจัยพบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 ผลิตโคโพลีเมอร์สูงสุดเมื่อเลี้ยงในกรดวาเลอริก โดยปริมาณโคโพลีเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงถึง 48% รองลงมาคือ กรดบิวทิริก โซเดียมอะซิเตท กรดโพรพิโอนิกและโซเดียม-4-ไฮดรอกซบิวทิเรท ตามลำดับโดยปริมาณโคโพลีเมอร์เท่ากับ 29 9 8 และ 5% (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ นอกจากนี้การเลี้ยงด้วยกรดวาเลอริกจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเช่นกัน คือ 3.38 กรัม/ลิตร และ *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถสร้างโคโพลีเมอร์ของ 3HB และ 3HV โดยมีปริมาณสัดส่วนของ 3HV สูงถึง 96 โมลเปอร์เซนต์ เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในตารางที่ 5 ดังนั้นจึงคัดเลือกกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการวิจัยเพื่อเพิ่มปริมาณการสร้าง และสะสมโคโพลีเมอร์ของ *Alcaligenes sp.* A-04 ต่อไป

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHA และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นกรดอินทรีย์

แหล่งคาร์บอน (20กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณPHA (%ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	ปริมาณ PHA (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซนต์)		
				3HB	3HV	4HB
กรดวาเลอริก	3.38	48	1.62	4	96	-
กรดบิวทิริก	2.52	29	0.73	100	-	-
โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท	1.53	5	0.77	65	-	35
กรดโพรพิโอนิก	1.44	8	0.12	63	-	37
โซเดียมอะซิเตท	1.39	9	0.12	100	-	-

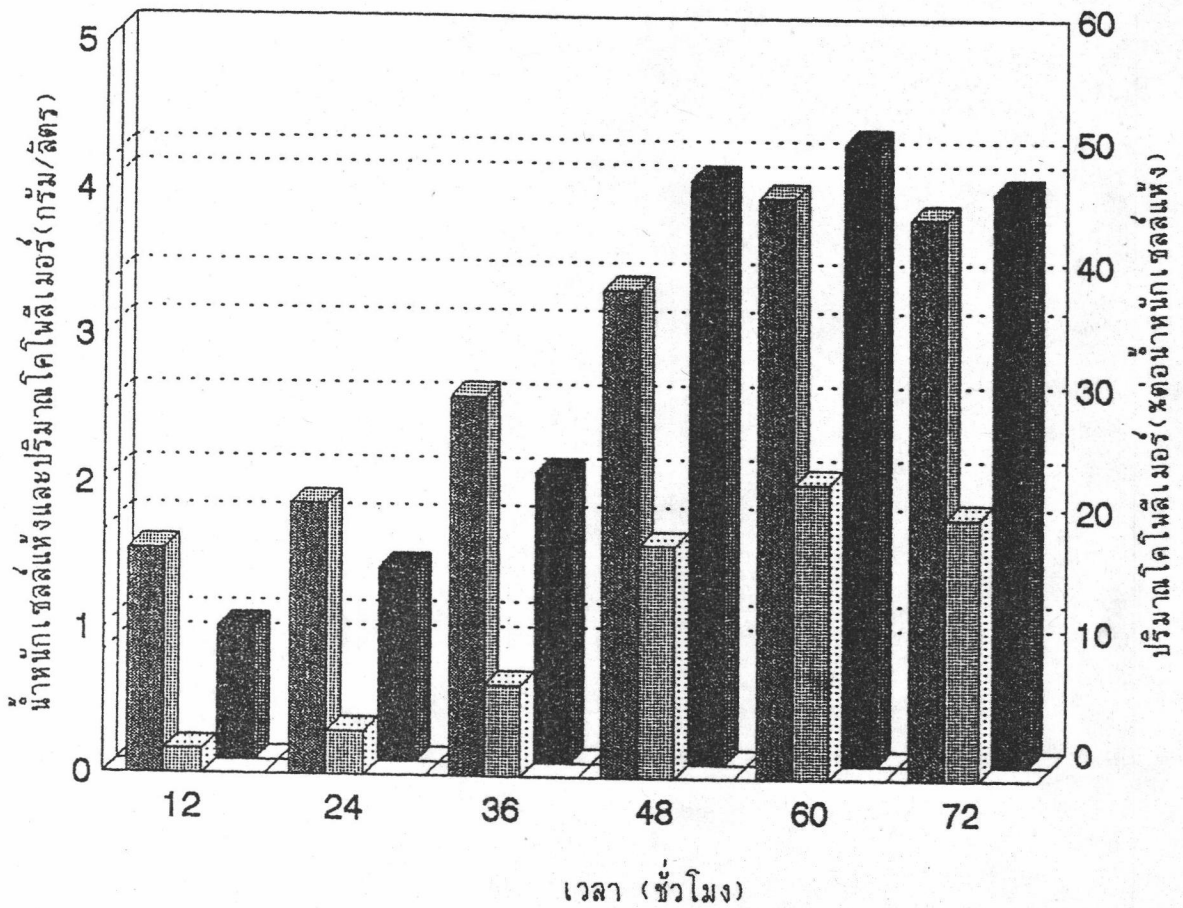
3.4 การหาเวลาที่เหมาะสมในการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์

จากรายงานวิจัยของ Doi และคณะ (1986 1987 และ 1988) และ Kunioka และคณะ (1989) ได้รายงานการสร้าง และสะสมโคโพลีเมอร์ของ *Alcaligenes eutrophus* โดยใช้กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เวลา 48 ชม.เท่านั้น ในการวิจัยนี้จึงได้ทำการวิจัยเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ของ *Alcaligenes sp.* A-04 เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน (ผลการวิจัยจากข้อ 3.3) การวิจัยในขั้นนี้ใช้กล้าเชื้อปริมาณ 0.4 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก)/ขวด ถ่ายเซลล์ลงในอาหาร MSM เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่ 30 °ซ นำแต่ละตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ที่เวลานาน 12 24 36 48 60 และ 72 ชม. คัดเลือกเวลาที่เหมาะสม ในการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ เพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป

จากผลการวิจัย (ตารางที่ 6) น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Alcaligenes sp.* A-04 จะค่อยๆเพิ่มขึ้น และสูงสุดที่เวลา 60 ชม.แล้วคงที่ ปริมาณโคโพลีเมอร์ (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เวลา 48 60 และ 72 ชม. ใกล้เคียงกัน โดยที่ 60 ชม.จะสูงกว่าเล็กน้อย นอกจากนี้ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร) ที่เวลา 60 ชม.จะสูงกว่าเช่นกัน เนื่องจากน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 60 ชม.จะสูงสุด ในขณะที่เวลา 48 และ 72 ชม. มีน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำกว่า ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร) ที่เวลา 48 และ 72 ชม. ต่ำกว่าที่เวลา 60 ชม. ระยะเวลาตั้งแต่ 12 ถึง 36 ชม. เป็นช่วงการเติบโตของเซลล์ (growth phase) พบว่าปริมาณการสะสมโคโพลีเมอร์ต่ำกว่าที่เวลา 48 60 และ 72 ชม. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เซลล์เติบโตเต็มที่ และอยู่ในช่วงของการสะสม (storage phase) ดังแสดงในรูปที่ 22 สัดส่วนของโมโนเมอร์ที่เวลา 48 60 และ 72 ชม.ไม่แตกต่างกัน โดยประกอบด้วย 3HV และ 3HB เท่ากับ 96 และ 4 โมลเปอร์เซนต์ ในระยะการเติบโต (12 24 และ 36 ชม.) พบว่าสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยโคโพลีเมอร์ที่เวลา 12 24 และ 36 ชม. ประกอบด้วย 3HV เท่ากับ 89 91 และ 95 โมลเปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่สร้างโดย *Alcaligenes sp.* A-04 ที่เวลาต่างๆ เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (ชม.)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซนต์)	
				3HB	3HV
12	1.55	11	0.17	11	89
24	1.87	16	0.30	9	91
36	2.61	24	0.63	5	95
48	3.34	48	1.60	4	96
60	3.98	51	2.03	4	96
72	3.84	47	1.80	3	97



เวลา (ชั่วโมง)

น้ำหนักเซลล์แห้ง (■)

ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร (▦) และ % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (■))

รูปที่ 21 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ ที่สร้างโดย *Alcaligenes sp.* A-04 ที่เวลาต่างๆ เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน

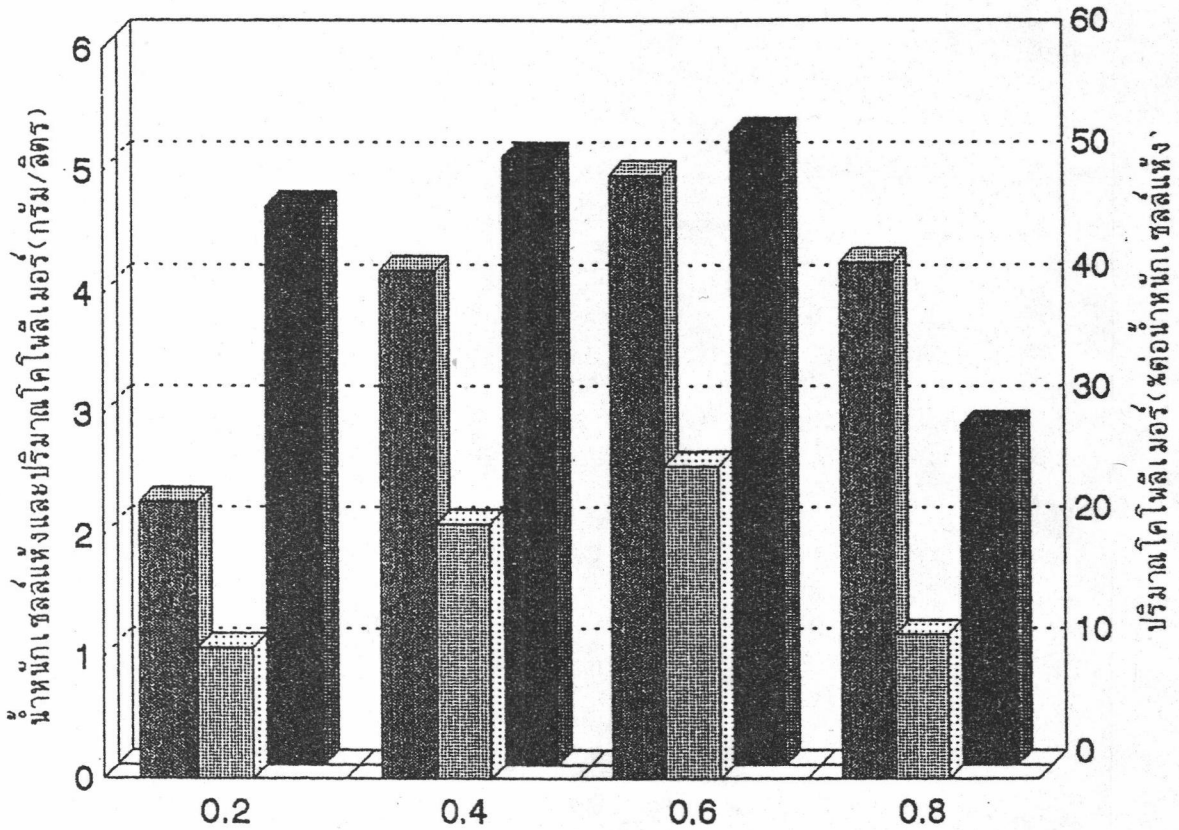
3.5 การหาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า

จากรายงานของ Doi และคณะ (1986) ใช้น้ำหนักเซลล์เปียกของ *Alcaligenes eutrophus* เท่ากับ 0.20-0.25 กรัม/ขวด โดยที่ใน 1 ขวดมีอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 100 มล. ต่อมาในปี 1988 Doi และคณะได้เพิ่มน้ำหนักเซลล์เปียกเป็น 0.4 กรัม/ขวด และจากผลการวิจัยข้อ 3.4 พบว่าการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ที่เวลา 48 60 และ 72 ชม. ถึงแม้จะได้ % ของโคโพลีเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่ใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร) จะขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ทั้งหมดด้วย เนื่องจากโคโพลีเมอร์เป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างและสะสมอยู่ภายในเซลล์ ดังนั้นจึงทำการวิจัยเพื่อหาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ เพื่อได้ % ของโคโพลีเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักเซลล์แห้งสูง การวิจัยในข้อนี้จึงแปรผันปริมาณกล้าเชื้อ (น้ำหนักเซลล์เปียก) เท่ากับ 0.2 0.4 0.6 และ 0.8 กรัม/ขวด ถ่ายเซลล์ลงในอาหาร MSM เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่ 30 °ซ เป็นเวลานาน 60 ชม.(จากผลวิจัยข้อ 3.4) นำแต่ละตัวอย่างมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ เพื่อคัดเลือกปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการวิจัยขั้นต่อไป

จากผลวิจัยตามตารางที่ 7 และรูปที่ 23 พบว่าปริมาณกล้าเชื้อเท่ากับ 0.6 กรัม (น้ำหนักเซลล์เปียก)/ขวด ให้ปริมาณโคโพลีเมอร์ (% ต่อน้ำหนักแห้ง) สูงสุดเท่ากับ 52 % และให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.97 กรัม/ลิตร หรือคิดเป็นปริมาณโคโพลีเมอร์ได้เท่ากับ 2.58 กรัม/ลิตร ซึ่งสูงกว่าปริมาณโคโพลีเมอร์ที่ได้จากการใช้กล้าเชื้อ 0.2 0.4 และ 0.8 กรัม (น้ำหนักเซลล์เปียก)/ขวด เท่ากับ 2.5 1.2 และ 2.2 เท่า ตามลำดับ ถึงแม้ว่าปริมาณของกล้าเชื้อจะต่างกัน แต่สัดส่วนของโมโนเมอร์(3HB และ 3HV)จะเหมือนกัน กล่าวคือประกอบด้วย 3HB เท่ากับ 4 โมลเปอร์เซนต์ และ 3HV เท่ากับ 96 โมลเปอร์เซนต์ ดังนั้นจึงเลือกปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.6 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก)/ขวด เพื่อใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่สร้างโดย *Alcaligenes sp.* A-04 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อต่างกันเป็นเวลา 60 ชม. เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน

ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (น้ำหนักเซลล์เปียก กรัม/ขวด)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (% ต่อน.น. เซลล์แห้ง)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซนต์)	
				3HB	3HV
0.2	2.28	46	1.08	4	96
0.4	4.19	50	2.10	4	96
0.6	4.97	52	2.58	4	96
0.8	4.26	28	1.19	4	96



น้ำหนักเซลล์แห้ง (▥)

ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร (▦) และ % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (■))

รูปที่ 22 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ ที่สร้างโดย *Alcaligenes sp.* A-04 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อต่างกัน เป็นเวลา 60 ชม. เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน

3.6 การปรับปรุงปริมาณสารอาหารหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มการสร้างโคโพลีเมอร์

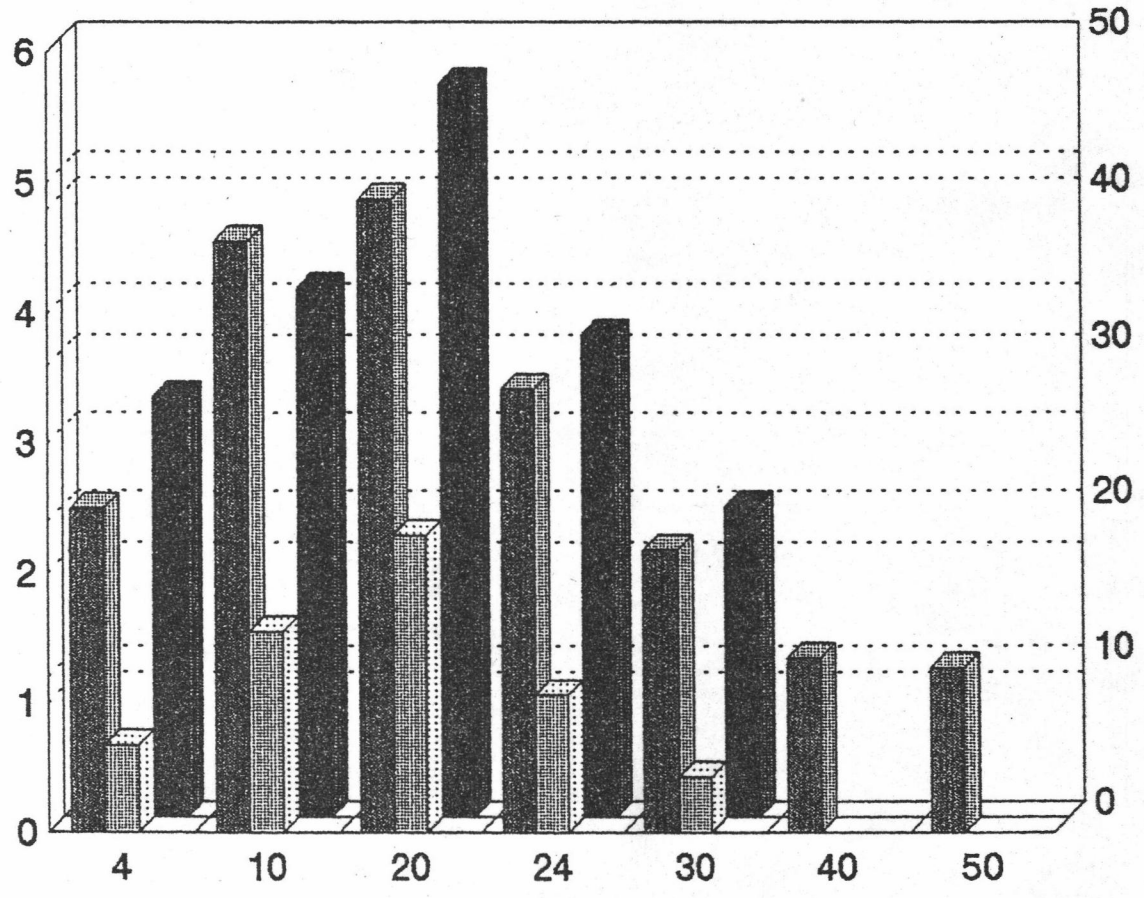
จากรายงานของ Dawes และ Senior (1973) พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างและสะสม PHB คือ แหล่งคาร์บอนมากเกินพอและการจำกัดปริมาณสารบางชนิดเช่น แหล่งไนโตรเจน แหล่งฟอสเฟต และแหล่งแมกนีเซียม เป็นต้น และจากงานวิจัยของอรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2536) ได้ทำการปรับปรุงปริมาณสารอาหารหลักในอาหาร MSM สำหรับ *Alcaligenes sp.* A-04 เพื่อเพิ่มการสร้างและสะสม PHB ดังนั้นจึงได้ทำการวิจัยต่อเพื่อปรับปรุงปริมาณสารอาหารหลักของอาหาร MSM สำหรับ *Alcaligenes sp.* A-04 ในการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ โดยใช้กล้าเชื้อปริมาณ 0.6 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก)/ขวด (จากผลการวิจัยข้อ 3.5) เป็นเวลานาน 60 ชม. (จากผลการวิจัยข้อ 3.4) และแหล่งคาร์บอนคือกรดวาเลอริก (จากผลการวิจัยข้อ 3.3) ถ่ายเซลล์ลงในอาหาร MSM ซึ่งได้ทำการแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนปริมาณไนโตรเจนจำกัด ปริมาณฟอสเฟตจำกัด และปริมาณแมกนีเซียมจำกัด

3.6.1 การหาปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ โดย *Alcaligenes sp.* A-04

เลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 ในอาหาร MSM โดยแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอน (กรดวาเลอริก) ตั้งแต่ 4 ถึง 50 กรัม/ลิตร (ตามวิธีข้อ 2.8.1) และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต(0.1 กรัม/ลิตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเมื่อใช้กรดวาเลอริกปริมาณเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถผลิตโคโพลีเมอร์ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 47 % (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อปริมาณกรดวาเลอริกเท่ากับ 4 และ 10 กรัม/ลิตร เซลล์จะสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ปริมาณน้อยกว่าคือเท่ากับ 27 และ 34 % (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ และที่เวลาสิ้นสุดการวิจัย (60 ชม.) ไม่พบว่ามีปริมาณกรดวาเลอริกเหลืออยู่ เมื่อใช้ปริมาณกรดวาเลอริกที่มากกว่า 20 กรัม/ลิตร พบว่าทั้งน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ต่ำกว่า โดยเฉพาะที่ปริมาณกรดวาเลอริกเท่ากับ 40 และ 50 กรัม/ลิตร ไม่พบการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ (ตารางที่ 8 และรูปที่ 24) รวมทั้งมีการเติบโตน้อย(น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.35 และ 1.27 กรัม/ลิตร ตามลำดับ) และมีกรดวาเลอริกเหลืออยู่เป็นปริมาณมาก เมื่อใช้ปริมาณกรดวาเลอริกเริ่มต้นเท่ากับ 20 24 และ 30 กรัม/ลิตร พบว่าสัดส่วนโมโนเมอร์ของ 3HV มีปริมาณสูงถึง 95 และ 96 โมลเปอร์เซนต์ ในขณะที่การใช้ปริมาณกรดวาเลอริกเริ่มต้นเท่ากับ 10 และ 4 กรัม/ลิตร สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV มีปริมาณเพียง 88 และ 85 โมลเปอร์เซนต์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินพอที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโคโพลีเมอร์โดย *Alcaligenes sp.* A-04 เท่ากับ 20 กรัม/ลิตร สำหรับการวิจัยในขั้นต่อไป

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยแปรผันปริมาณกรดวาเลอริกเริ่มต้นในอาหาร MSM

ปริมาณกรดวาเลอริกเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	ปริมาณกรดวาเลอริกที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (%ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์	
					3HB	3HV
4.0	0	2.50	27	0.67	15	85
10.0	0	4.56	34	1.55	12	88
20.0	8.9	4.88	47	2.29	5	95
24.0	10.2	3.42	31	1.06	4	96
30.0	21.9	2.18	20	0.43	4	96
40.0	38.5	1.35	0	0	-	-
50.0	49.1	1.27	0	0	-	-



น้ำหนักเซลล์แห้ง (▥)

ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร (▨) และต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (■))

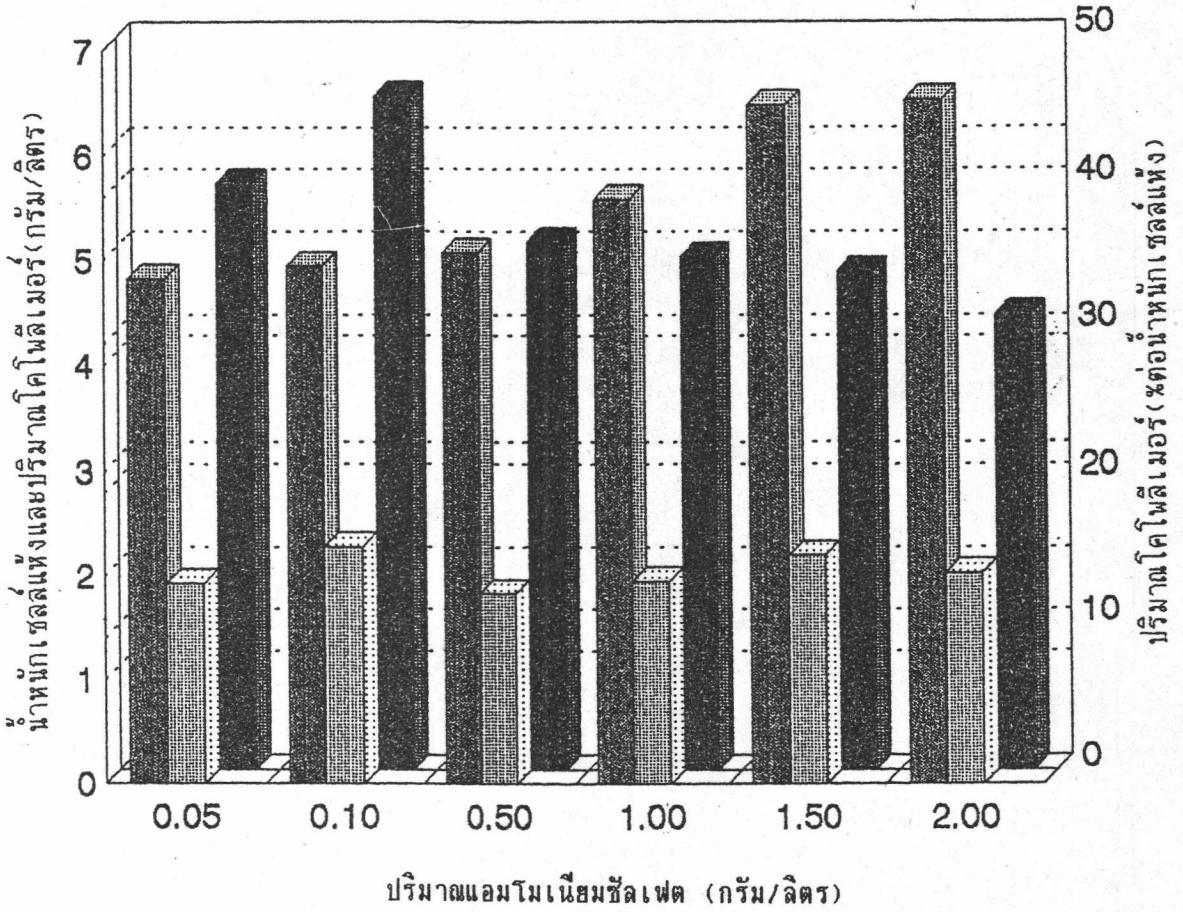
รูปที่ 23 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลา 60 ชม. โดยแปรผันปริมาณกรดวาเลอริกเริ่มต้นในอาหาร MSM

3.6.2 การหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนจำกัดที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ โดย *Alcaligenes sp.* A-04

เลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 ในอาหาร MSM โดยแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลเฟต) ตั้งแต่ 0.05 ถึง 2.00 กรัม/ลิตร (ตามวิธีข้อ 2.8.2) โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือกรดวาเลอริกปริมาณเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่มากเกินพอ พบว่าเมื่อใช้กรดวาเลอริกปริมาณเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร ปริมาณแอมโมเนียมจำกัดที่เหมาะสมเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร (ซึ่งเท่ากับปริมาณของแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MSM ที่ศึกษาโดยอรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ 2536)) โดย *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถผลิตโคโพลีเมอร์ได้เท่ากับ 46 %(ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ดังแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 25 พบว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่น้อยกว่าและเท่ากับ 0.5 กรัม/ลิตร ถูกใช้หมด และทำให้เซลล์มีการสะสมโคโพลีเมอร์ได้มากกว่าสภาวะที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตสูงเมื่อเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (ตั้งแต่ 1.0 กรัม/ลิตร) มีผลทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นแต่ไม่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้สร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ เนื่องจากเซลล์จะใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับช่วงการเติบโต เมื่อแหล่งไนโตรเจนหมดจึงเข้าสู่ระยะการสะสมโพลีเมอร์ จากผลการวิจัยพบว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับ *Alcaligenes sp.* A-04 เพื่อนำไปใช้ในการเติบโต และทำให้เซลล์มีการสะสมโคโพลีเมอร์ได้สูงสุด นอกจากนี้การแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตไม่มีผลต่อสัดส่วนของโคโพลีเมอร์ ดังนั้นจึงเลือกปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร สำหรับการวิจัยขั้นต่อไป และจากผลวิจัยในข้อนี้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนะแหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมคือ 20:0.1 หรืออัตราส่วน C/N เท่ากับ 300

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ และสัดส่วนของโมโนเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้ปริมาณกรดวาเลอริกเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

กรดวาเลอริกต่อแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (%ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์	
					3HB	3HV
20:0.05	0	4.83	40	1.93	4	96
20:0.10	0	4.95	46	2.28	4	96
20:0.50	0	5.08	36	1.83	4	96
20:1.00	0.003	5.59	35	1.95	3	97
20:1.50	0.006	6.49	34	2.20	4	96
20:2.00	0.215	6.54	31	2.03	3	97



น้ำหนักเซลล์แห้ง (▥)

ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร (▩) และ % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (■))

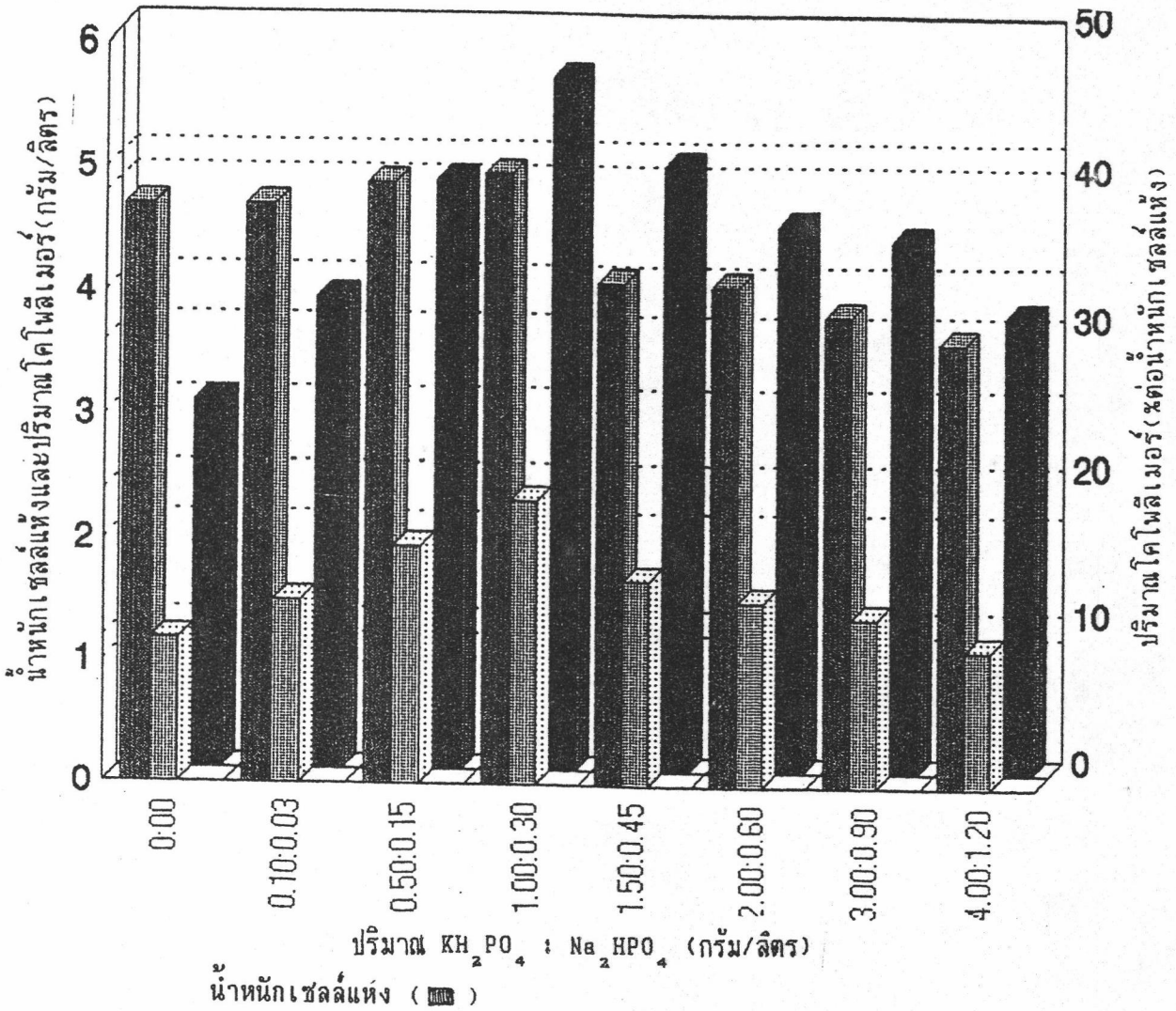
รูปที่ 24 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลา 60 ชม.โดยใช้กรดวาเลอริก 20 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

3.6.3 การหาปริมาณฟอสเฟตจำกัดที่เหมาะสมต่อการสร้าง และสะสมโคโพลีเมอร์โดย *Alcaligenes sp.* A-04

เลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 ในอาหาร MSM โดยใช้กรดวาเลอริกเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณ KH_2PO_4:Na_2HPO_4 ตั้งแต่ 0:0 ถึง 4.0:1.20 กรัม/ลิตร (ตามวิธีข้อ 2.8.3) พบว่าปริมาณของ KH_2PO_4:Na_2HPO_4 ที่เหมาะสมเท่ากับ 1.0:0.30 กรัม/ลิตร (ซึ่งเท่ากับปริมาณแหล่งฟอสเฟตในอาหาร MSM ที่ศึกษาโดย อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ 2536)) โดย *Alcaligenes sp.* A-04 สร้างและสะสมปริมาณโคโพลีเมอร์ได้สูงสุดเท่ากับ 47 % (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) หรือคิดเป็นปริมาณโคโพลีเมอร์เท่ากับ 2.31 กรัม/ลิตร จากผลการวิจัย (ตารางที่ 10) พบว่าปริมาณโคโพลีเมอร์ลดลงเมื่อให้ปริมาณของ KH_2PO_4 : Na_2HPO_4 น้อยกว่า 1.0:0.30 และมากกว่า 1.5:0.45 กรัม/ลิตร และการแปรผันปริมาณแหล่งฟอสเฟตไม่มีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ดังนั้นการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาณ KH_2PO_4:Na_2HPO_4 เท่ากับ 1.0:0.30 กรัม/ลิตร

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้กรดวาเลอริกเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณแหล่งฟอสเฟต (KH_2PO_4 : Na_2HPO_4) ตั้งแต่ 0:0 ถึง 4.0:1.20 กรัม/ลิตร

ปริมาณ(กรัม/ลิตร) KH_2PO_4:Na_2HPO_4	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (% ต่อน.น. เซลล์แห้ง)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซนต์)	
				3HB	3HV
0 : 0	4.70	25	1.18	4	96
0.1:0.03	4.71	32	1.50	5	95
0.5:0.15	4.89	40	1.95	5	95
1.0:0.30	4.97	47	2.33	5	95
1.5:0.45	4.10	41	1.68	4	96
2.0:0.60	4.08	37	1.51	4	96
3.0:0.90	3.84	36	1.38	3	97
4.0:1.20	3.62	31	1.12	3	97



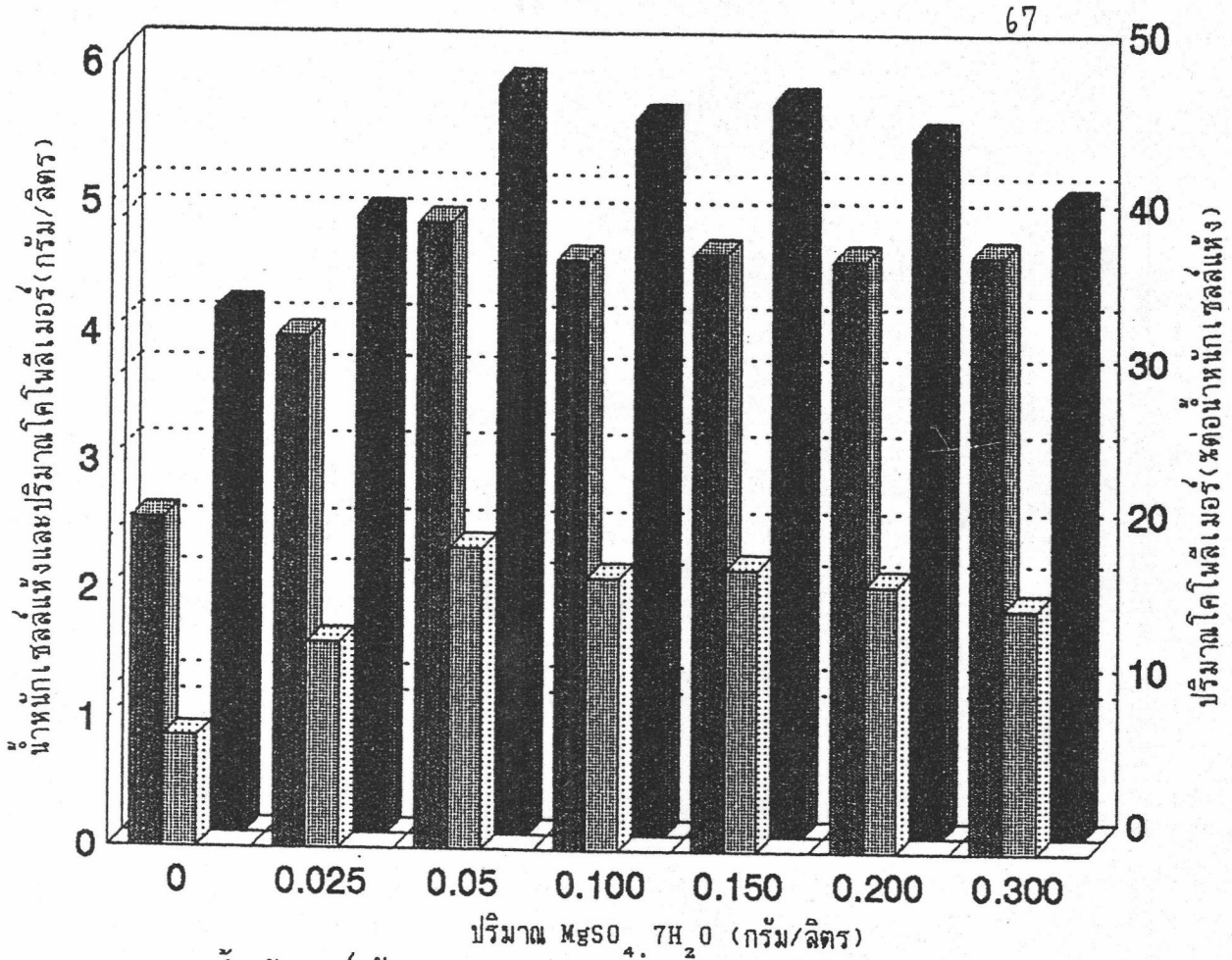
รูปที่ 25 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้กรดวาเลอริกเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณฟอสเฟต (KH_2PO_4 :Na_2HPO_4) ตั้งแต่ 0:0 ถึง 4.0:1.20 กรัม/ลิตร

3.6.4 การหาปริมาณแมกนีเซียมจำกัดที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์โดย *Alcaligenes sp.* A-04

เลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 ในอาหาร MSM โดยใช้กรดวาเลอริกเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร ปริมาณฟอสเฟต (KH_2PO_4:Na_2HPO_4) เท่ากับ 1.00:0.30 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 ถึง 0.30 กรัม/ลิตร (ตามวิธีข้อ 2.8.4) พบว่าปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมเท่ากับ 0.05 กรัม/ลิตร (ซึ่งเท่ากับปริมาณแหล่งแมกนีเซียมในอาหาร MSM ที่ศึกษาโดยอรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ 2536) โดย *Alcaligenes sp.* A-04 สร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ได้สูงสุดเท่ากับ 48 % (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) หรือคิดเป็นปริมาณโคโพลีเมอร์เท่ากับ 2.23 กรัม/ลิตร ดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 27 *Alcaligenes sp.* A-04 สร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ได้ปริมาณใกล้เคียงกัน เมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 0.050 0.0100 และ 0.150 กรัม/ลิตร และเมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณสูง หรือต่ำกว่านี้ พบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 สร้างและสะสมโพลีเมอร์ได้ปริมาณน้อยกว่า การแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตไม่มีผลต่อสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปเลือกปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.050 กรัม/ลิตร

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้กรดวาเลอริกเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร ปริมาณฟอสเฟต (KH_2PO_4:Na_2HPO_4) เท่ากับ 1.0:0.30 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 ถึง 0.30 กรัม/ลิตร

ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (% ต่อนน.เซลล์แห้ง)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซนต์)	
				3HB	3HV
0	2.56	34	0.87	4	96
0.025	3.99	40	1.60	5	95
0.050	4.87	48	2.34	5	95
0.100	4.60	46	2.12	6	94
0.150	4.66	47	2.19	5	95
0.200	4.61	45	2.07	6	94
0.300	4.64	41	1.90	5	95



รูปที่ 26 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้กรดวาเลอริกเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร ปริมาณฟอสเฟต (KH_2PO_4:Na_2HPO_4) เท่ากับ 1.0:0.30 กรัม/ลิตร และแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตตั้งแต่ 0 ถึง 0.30 กรัม/ลิตร

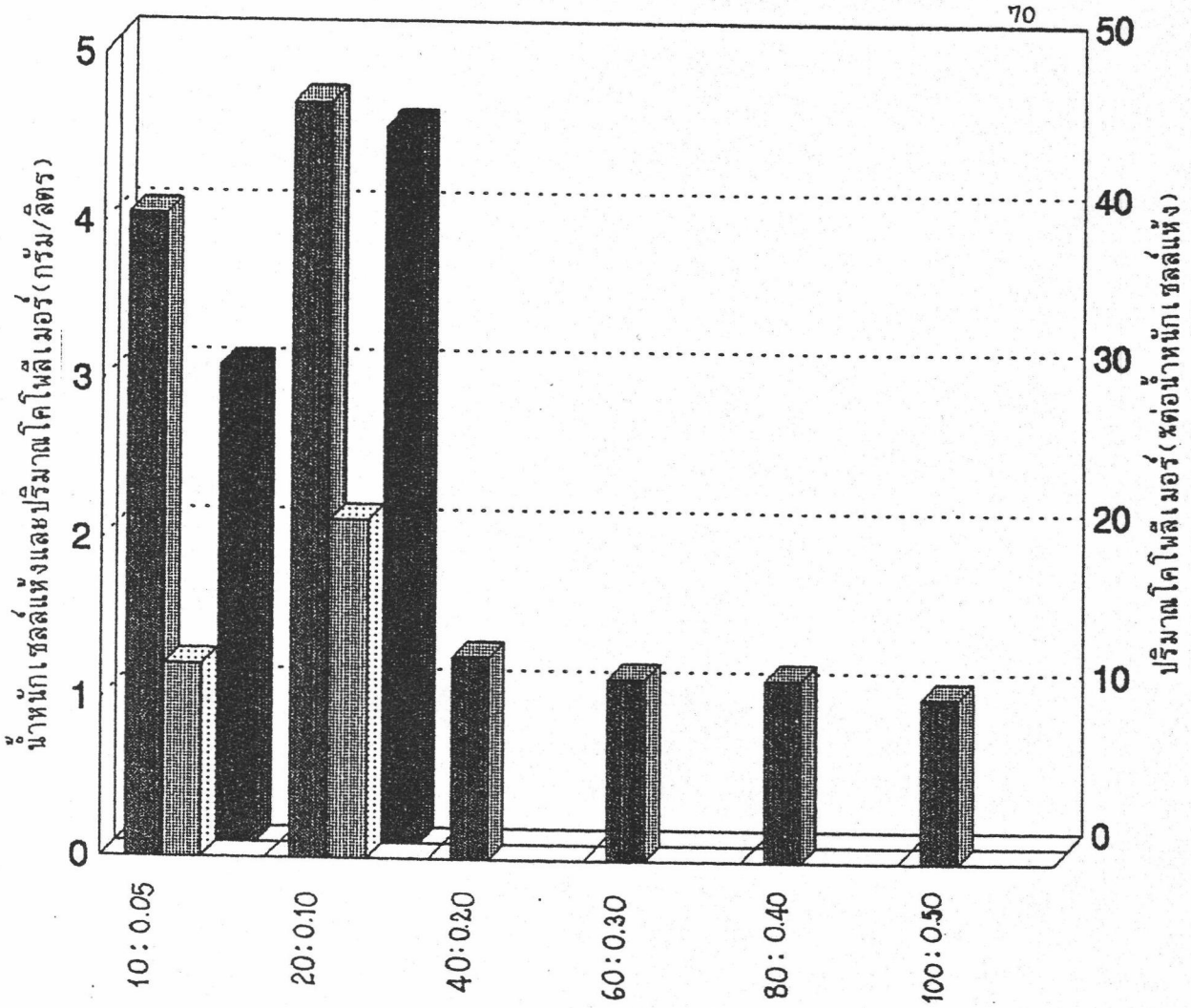
จากผลการวิจัยข้อ 3.6.1 ถึง 3.6.4 สรุปได้ว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์โดย *Alcaligenes sp.* A-04 ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร แหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร แหล่งฟอสเฟต (KH_2PO_4:Na_2HPO_4)เท่ากับ 1.0:0.30 กรัม/ลิตร และแหล่งแมกนีเซียม ($MgSO_4$)เท่ากับ 0.05 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสูตรเดียวกับสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการสร้างและสะสม PHB (อาหาร MSM) โดย *Alcaligenes sp.* A-04 ที่ศึกษาโดย อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์(2536)

3.7 การเพิ่มปริมาณทวีคูณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนโดยใช้อัตราส่วนเท่ากับ 20:1 เพื่อเพิ่มการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์

จากผลวิจัยข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 ได้ปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเท่ากับ 20:1 โดย *Alcaligenes sp.* A-04 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.95 กรัม/ลิตร และมีปริมาณโคโพลีเมอร์เท่ากับ 46 % (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) (จากผลการวิจัยข้อ 3.6.2) จึงทำการวิจัยเพื่อเพิ่มทั้งน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคโพลีเมอร์ โดยการเพิ่มปริมาณของทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอัตราที่เท่ากัน เลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเท่ากับ 0.6 กรัม(น้ำหนักเซลล์เปียก)/ขวด ถ่ายเซลล์ลงในอาหาร MSM ซึ่งเพิ่มปริมาณกรดวาเลอริกสูงสุดถึง 100 กรัม/ลิตร และจำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเพียงไม่เกิน 0.5 กรัม/ลิตร โดยแปรผันในรูปของความเข้มข้นของกรดวาเลอริก : แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 และ 5.0 เท่าของปริมาณ 20 :0.1 (ตามวิธีข้อ 2.9) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 60 ชม. จากการวิจัยพบว่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเท่ากับ 1.0 เท่า กล่าวคือปริมาณกรดวาเลอริกเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร (ซึ่งเท่ากับปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MSM) เมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.5 เท่า พบว่ามีการเติบโต(น้ำหนักเซลล์แห้ง)และปริมาณโคโพลีเมอร์น้อยกว่าที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 เท่า และมีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV น้อยกว่าคือเท่ากับ 87 โมลเปอร์เซนต์ นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มากกว่า 1.0 เท่า มีผลทำให้ทั้งน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง และไม่พบการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 28 ดังนั้นความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง และสะสมโคโพลีเมอร์เท่ากับ 1.0 เท่า หรือเท่ากับ 20 และ 0.1 กรัม/ลิตรตามลำดับ

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenese sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม และแปรผันความเข้มข้นทวีคูณของปริมาณกรดวาเลอริกและแอมโมเนียมซัลเฟต (20:1) โดยเพิ่มปริมาณกรดวาเลอริกสูงถึง 100 กรัม/ลิตร และจำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเพียง 0.5 กรัม/ลิตร

ปริมาณกรดวาเลอริก (กรัม/ลิตร)	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (%ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์	
					3HB	3HV
10	0.05	4.06	30	1.22	13	87
20	0.10	4.73	45	2.13	5	95
40	0.20	1.28	0	0	-	-
60	0.30	1.15	0	0	-	-
80	0.40	1.15	0	0	-	-
100	0.50	1.04	0	0	-	-



รูปที่ 27 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์ เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. และแปรผันความเข้มข้นทวีคูณของปริมาณกรดวาเลอริกและแอมโมเนียมซัลเฟต (20:1) โดยเพิ่มปริมาณกรดวาเลอริกสูงถึง 100 กรัม/ลิตร และจำกัดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเพียง 0.5 กรัม/ลิตร

3.8 การหาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยวชนิดต่างๆโดย *Alcaligenes sp.* A-04

จากผลการวิจัยข้อ 3.4 ถึง 3.7 จะได้สภาวะที่เหมาะสำหรับ *Alcaligenes sp.* A-04 ในการสร้างและสะสมโคโพลีเมอร์โดยใช้กรดวาเลอริกซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในกลุ่มของกรดอินทรีย์ จากรายงานของ Akiyama และคณะ (1992) พบว่า นอกจากกรดอัลคาโนอิกที่มีความยาวคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 2 ถึง 22 อะตอมแล้ว *Alcaligenes eutrophus* สายพันธุ์ AK201ยังสามารถใช้น้ำมันพืช และน้ำมันจากสัตว์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ แหล่งคาร์บอนในกลุ่มโพลีไฮดรอกซี ได้แก่ ซอร์บิทอล แมนนิทอล ซึ่งจัดเป็นอนุพันธ์ของแอลกอฮอล์ น้ำตาล และกลีเซอรอล นอกจากนี้ยังมีแหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจอีกกลุ่มหนึ่งคือแอลกอฮอล์ เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก ดังนั้นจึงได้ศึกษาหาความสามารถของ *Alcaligenes sp.* A-04 ในการใช้คาร์บอนกลุ่มต่างๆ ดังกล่าว (ตามวิธีข้อ 2.10) หลังจากการเลี้ยงนำตัวอย่างมาตรวจสอบชนิดและปริมาณของโพลีเมอร์ที่ผลิตได้โดย GC

จากผลการวิจัย (ตารางที่ 13 และรูปที่ 28) สำหรับแหล่งคาร์บอนที่เป็นกรดอินทรีย์ พบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถเติบโตและสะสมโพลีเมอร์ได้ดี โดยเฉพาะกรดวาเลอริก เมื่อใช้กรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอนอะตอมเลขคู่ (กรดบิวทิริก และโซเดียมอะซิเตท) *Alcaligenes sp.* A-04 มีการสร้างและสะสม PHB ในขณะที่การใช้กรดอินทรีย์ซึ่งมีคาร์บอนอะตอมเลขคี่ (กรดวาเลอริก และกรดโพรพิโอนิก) *Alcaligenes sp.* A-04 มีการสะสมโคโพลีเมอร์ของ 3HB และ 3HV และเมื่อใช้โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรทเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้โคโพลีเมอร์ของ 3HB และ 4HB (35 โมลเปอร์เซนต์) เมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน *Alcaligenes sp.* A-04 มีปริมาณการสะสมโพลีเมอร์สูงสุด (47 % ต่อ นน.เซลล์แห้ง) และเมื่อใช้กรดบิวทิริก โซเดียมอะซิเตท กรดโพรพิโอนิก และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณโคโพลีเมอร์เท่ากับ 30 12 11 และ 7 % (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ตามลำดับ นอกจากนี้กรดวาเลอริกจะให้สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HV สูงสุดถึง 95 โมลเปอร์เซนต์ ในขณะที่กรดโพรพิโอนิกให้โมโนเมอร์ของ 3HV เพียง 37 โมลเปอร์เซนต์ แต่เมื่อใช้กรดออกทาโนอิก (C8 สายตรง) และกรด-2-เอทธิลเฮกซะโนอิก (C8-แตกกิ่ง)ไม่พบว่ามีการสร้างและสะสมโพลีเมอร์โดย*Alcaligenes sp.* A-04 สำหรับแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำมันพืช พบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถใช้น้ำมันพืชได้ เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันถั่วเหลืองผสมน้ำมันเมล็ดฝ้าย และน้ำมันเมล็ดทานตะวัน เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเติบโตและสร้าง PHB โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 19 21 16 23 และ 5 % (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) สำหรับแหล่งคาร์บอนในกลุ่มโพลีไฮดรอกซี พบว่า *Alcaligenes sp.*

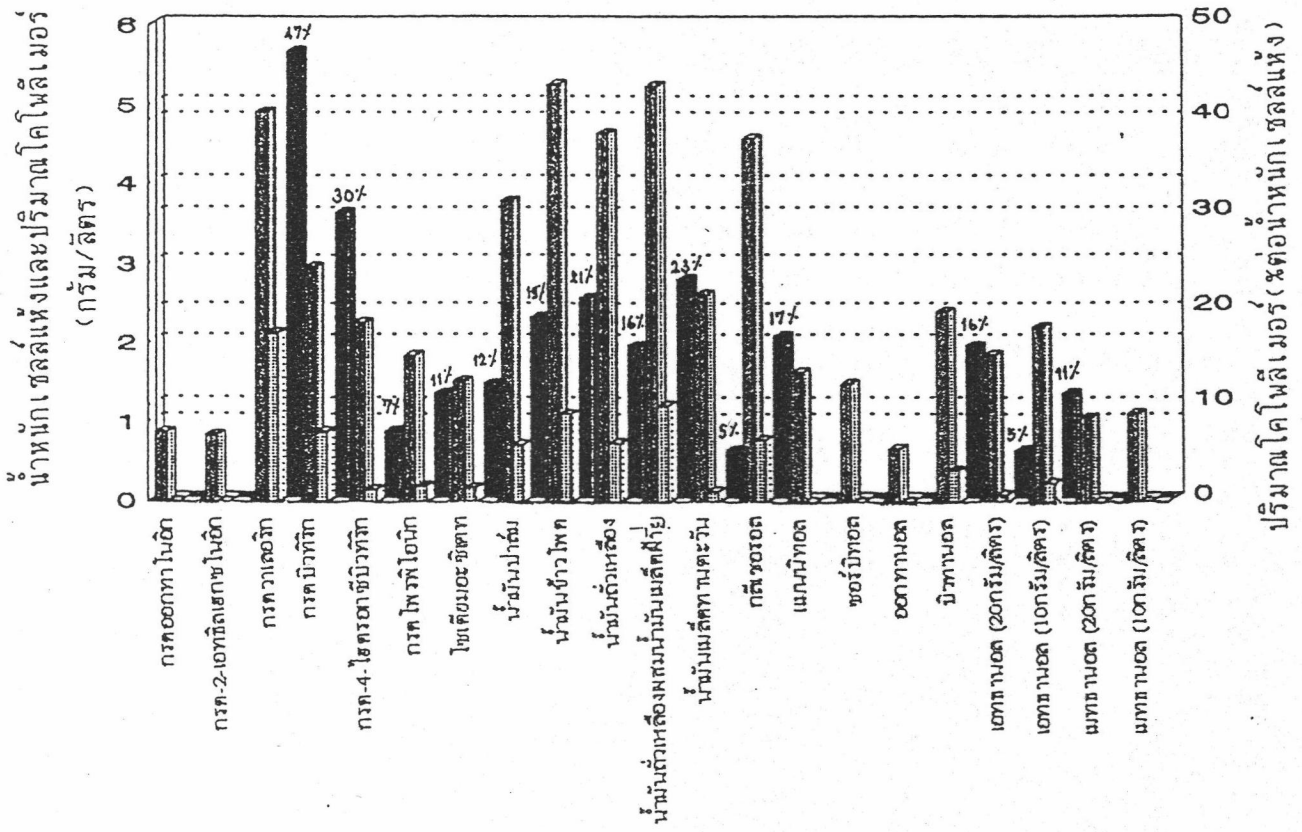
A-04 สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้างและสะสม PHBได้ท (17 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) แต่เชื้อสายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้แมนนิทอล และซอร์บิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้างและสะสมโพลีเมอร์ได้ สำหรับแหล่งคาร์บอนในกลุ่มแอลกอฮอล์ พบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถใช้บิวทานอล และเอทธานอลในการสร้าง PHB ได้ โดยการใช้บิวทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 16 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถใช้เอทธานอลความเข้มต่ำได้ดีกว่าที่ความเข้มสูง กล่าวคือ ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 11 และ 5 % (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อใช้เอทธานอลความเข้มข้นเท่ากับ 10 และ 20 กรัม/ลิตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถใช้ออกทานอล ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 8 และเมทธานอลซึ่งมีคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 1 ได้

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHA และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. ในแหล่งคาร์บอนเดี่ยวชนิดต่างๆ ที่เป็น กรดอินทรีย์ น้ำมันพืช โพลีไฮดรอกซี และแอลกอฮอล์ (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณPHA (% ต่อน.น. เซลล์แห้ง)	ปริมาณ PHA (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซนต์)		
					3HB	3HV	4HB
<u>กรดอินทรีย์</u>							
กรดออกทาโนอิก	20	0.88	0	0	-	-	-
กรด-2-เอทธิล-เฮกซะโนอิก	20	0.85	0	0	-	-	-
กรดวาเลอริก	20	4.92	47	2.31	5	95	-
กรดบิวทิริก	20	2.97	30	0.89	100	-	-
โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท	20	2.27	7	0.16	65	-	35
กรดโพรพิโอนิก	20	1.85	11	0.20	63	37	-
โซเดียมอะซิเตท	20	1.53	12	0.18	100	-	-

ตารางที่ 13 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณPHA (% ต่อนน. เซลล์แห้ง)	ปริมาณ PHA (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซนต์)		
					3HB	3HV	4HB
น้ำมันพืช							
น้ำมันปาล์ม	20	3.80	19	0.72	100	-	-
น้ำมันข้าวโพด	20	5.27	21	1.11	100	-	-
น้ำมันถั่วเหลือง	20	4.65	16	0.74	100	-	-
น้ำมันถั่วเหลืองผสม น้ำมันเมล็ดฝ้าย	20	5.25	23	1.21	100	-	-
น้ำมันเมล็ดทานตะวัน	20	2.62	5	0.13	100	-	-
โพลีไฮดรอกซี							
กลีเซอรอล	20	4.58	17	0.78	100	-	-
แมนนิทอล	20	1.64	0	0	-	-	-
ซอร์บิทอล	20	1.49	0	0	-	-	-
แอลกอฮอล์							
ออกทานอล	20	0.67	0	0	-	-	-
บิวทานอล	20	2.41	16	0.39	100	-	-
เอทธานอล	20	1.86	5	0.09	100	-	-
เอทธานอล	10	2.21	11	0.24	100	-	-
เมทธานอล	20	1.07	0	0	-	-	-
เมทธานอล	10	1.12	0	0	-	-	-



น้ำหนักเซลล์แห้ง (■)

ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร (▨) และ % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (■))

รูปที่ 28 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHA เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. ในแหล่งคาร์บอนเดี่ยวชนิดต่างๆ ที่เป็นกรดอินทรีย์ น้ำมันพืช โพลีไฮดรอกซี และแอลกอฮอล์

3.9 การสร้างโคโพลีเมอร์และเทอร์โพลีเมอร์สัดส่วนต่างๆโดยใช้แหล่งคาร์บอนผสม

3.9.1 การสร้างโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV) สัดส่วนต่างๆ โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริก และกรดบิวทิริก

จากผลการวิจัยข้อ 3.8 พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยวที่เป็นกรดอินทรีย์ *Alcaligenes sp.* A-04 มีการเติบโตและผลิตโคโพลีเมอร์ได้ในปริมาณสูง จึงนำกรดวาเลอริกซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้โมโนเมอร์ของ 3HVสูงถึง 96 โมลเปอร์เซนต์ผสมกับกรดบิวทิริกซึ่งเป็นแหล่งของ 3HB ในอัตราส่วนต่างๆกัน โดยให้มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร สำหรับ *Alcaligenes sp.* A-04 ใช้ในการเติบโต สร้างและสะสม P(3HB-co-3HV) ในสัดส่วนต่างๆกัน (ตามวิธีข้อ 2.22.1)

จากผลการวิจัย เมื่อเพิ่มปริมาณการผสมของกรดบิวทิริกต่อกรดวาเลอริกมีผลทำให้ปริมาณของ 3HB เพิ่มขึ้น จึงทำให้มีสัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HB ต่อ 3HV เพิ่มขึ้นตามปริมาณการเพิ่มของกรดบิวทิริก โดยมี 3HB เพิ่มขึ้นจาก 5 โมลเปอร์เซนต์ ถึง 10 โมลเปอร์เซนต์ ในขณะที่ 3HV ลดลงจาก 95 โมลเปอร์เซนต์ ถึง 0 โมลเปอร์เซนต์ เช่น ที่ปริมาณกรดวาเลอริกต่อกรดบิวทิริกเท่ากับ 20:0 18:2 และ 0:20 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HB:3HV เท่ากับ 5:95 10:90 และ 100:0 ตามลำดับ พบว่าการเติบโตและปริมาณโคโพลีเมอร์(กรัม/ลิตร)โดย *Alcaligenes sp.*A-04 ไม่แตกต่างกันมาก เมื่อเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริกะกรดบิวทิริก เช่นที่ปริมาณ 20:0 18:2 16:4 ถึง 2:18 *Alcaligenes sp.*A-04 มีการเติบโต(น้ำหนักเซลล์แห้ง) เท่ากับ 4.22 3.71 3.66 และ 3.38 กรัม/ลิตร และมีปริมาณการสร้างโคโพลีเมอร์เท่ากับ 1.98 1.89 1.98 และ 1.35 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าที่ปริมาณกรดวาเลอริก : กรดบิวทิริก เท่ากับ 0:20 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณโคโพลีเมอร์เท่ากับ 2.83 และ 0.99 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ปริมาณโคโพลีเมอร์(%ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก เมื่อแปรผันสัดส่วนของกรดวาเลอริก : กรดบิวทิริก โดยมีปริมาณโคโพลีเมอร์อยู่ในช่วง 35 ถึง 57 % (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริกและกรดบิวทิริก (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร) และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร

ปริมาณ(กรัม/ลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (% ต่อน.เซลล์แห้ง)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซนต์)	
กรดวาเลอริก	กรดบิวทิริก				3HB	3HV
20	0	4.22	47	1.98	5	95
18	2	3.71	51	1.89	10	90
16	4	3.66	54	1.98	19	81
14	6	3.48	57	1.98	29	71
12	8	3.47	46	1.60	35	65
10	10	3.52	45	1.58	45	55
8	12	3.47	50	1.73	49	51
6	14	3.46	38	1.31	54	46
4	16	3.42	43	1.47	64	36
2	18	3.38	40	1.35	77	23
0	20	2.83	35	0.99	100	

3.9.2 การสร้างโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV)สัดส่วนต่างๆโดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริก และฟรุกโตส

จากผลการวิจัยของ อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2537) พบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสร้างและสะสม PHB ได้ดี จึงใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนผสมร่วมกับกรดวาเลอริก เพื่อให้ *Alcaligenes sp.* A-04 สร้างและสะสมโคโพลีเมอร์ของ 3HB และ 3HV ในสัดส่วนต่างๆกัน โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมในอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งมีปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร ตามวิธีในข้อ 2.11.2

จากผลการวิจัย เมื่อผสมฟรุกโตสกับกรดวาเลอริก มีผลทำให้ปริมาณของ 3HB เพิ่มขึ้น จึงทำให้มีสัดส่วนของ 3HB ต่อ 3HV เพิ่มขึ้นตามปริมาณการเพิ่มของฟรุกโตส ดังแสดงในตารางที่15 โดยมี 3HB เพิ่มขึ้นจาก 6 โมลเปอร์เซนต์ ถึง 100 โมลเปอร์เซนต์ ในขณะที่ 3HV ลดลงจาก 94โมลเปอร์เซนต์ถึง 0 โมลเปอร์เซนต์ เช่น ที่ปริมาณกรดวาเลอริก :ฟรุกโตส เท่ากับ 20:0 18:2 และ 0:20 สัดส่วนของโมโนเมอร์ (3HB : 3HV) เท่ากับ 6:94 9:91 และ 100:0 ตามลำดับ (ตารางที่ 15) พบว่าการเติบโตของ *Alcaligenes sp.* A-04 ในแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริกและน้ำตาลฟรุกโตสสูงกว่าการเติบโตที่ทุกอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริกและกรดบิวทิริก เช่น ที่ปริมาณของกรดวาเลอริก : ฟรุกโตสเท่ากับ 18:2 น้ำหนักเซลล์แห้งของ*Alcaligenes sp.* A-04 เท่ากับ 4.45 กรัม/ลิตร ในขณะที่อัตราส่วนเดียวกันของกรดวาเลอริก : กรดบิวทิริก *Alcaligenes sp.* A-04 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพียง 3.71 กรัม/ลิตร ในทำนองเดียวกันปริมาณโคโพลีเมอร์ (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)ไม่แตกต่างกัน เมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดวาเลอริก : ฟรุกโตส โดยมีปริมาณโคโพลีเมอร์อยู่ในช่วงระหว่าง 44 ถึง 59 % (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริกและฟรุกโตส (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร) และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร

ปริมาณ(กรัม/ลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (% ต่อน.น. เซลล์แห้ง)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซนต์)	
กรดวาเลอริก	กรดฟรุกโตส				3HB	3HV
20	0	4.16	44	1.83	6	94
18	2	4.45	46	2.05	9	91
16	4	4.91	49	2.41	10	90
14	6	5.34	52	2.78	11	89
12	8	5.70	54	3.08	13	87
10	10	5.56	55	3.06	16	84
8	12	5.41	52	2.81	18	82
6	14	5.37	48	2.58	20	80
4	16	5.46	51	2.78	37	63
2	18	5.44	56	3.05	60	40
0	20	5.54	59	3.27	100	-

3.9.3 การสร้างโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-4HB) สัดส่วนต่างๆ โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดบิวทิริก และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท

จากผลการวิจัยข้อ 3.8 โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท เป็นแหล่งคาร์บอนที่ *Alcaligenes sp.* A-04 สามารถใช้และผลิตโคโพลีเมอร์ของ P(3HB-co-35 %4HB) ดังนั้นจึงใช้กรดบิวทิริกผสมโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรทในอัตราส่วนต่างๆกัน โดยมีปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร (ตามวิธีการวิจัยข้อ 2.11.3)

จากผลการวิจัยพบว่า เมื่อผสมกรดบิวทิริกกับโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท มีผลให้ปริมาณของ 3HB เพิ่มขึ้น จึงทำให้มีสัดส่วนของ 3HB ต่อ 4HB เพิ่มขึ้น ตามปริมาณการเพิ่มของกรดบิวทิริก โดยมี 3HB เพิ่มขึ้นจาก 64 ถึง 100 โมลเปอร์เซนต์ ในขณะที่ 4HB ลดลงจาก 36 ถึง 0 โมลเปอร์เซนต์ เช่น ที่ปริมาณโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท:กรดบิวทิริก เท่ากับ 20:0 18:2 และ 0:20 สัดส่วนของโมโนเมอร์ (3HB:4HB) เท่ากับ 64:36 65:35 และ 100:0 ตามลำดับ (ตารางที่ 16) การเติบโตของ *Alcaligenes sp.* A-04 ไม่แตกต่างกันเมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดบิวทิริกและโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท และปริมาณโคโพลีเมอร์ (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) จะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณกรดบิวทิริก เช่น ที่ปริมาณโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท : กรดบิวทิริก เท่ากับ 20:0 18:2 12:8 และ 4:16 ปริมาณโคโพลีเมอร์เท่ากับ 8 17 23 และ 32 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดบิวทิริกและโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวเรท (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร) และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร

ปริมาณ(กรัม/ลิตร)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซนต์)	
โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท	กรดบิวทิริก				3HB	4HB
20	0	2.10	8	0.16	64	36
18	2	2.47	17	0.43	65	35
16	4	2.40	16	0.38	66	34
14	6	2.40	16	0.39	68	32
12	8	2.65	23	0.61	78	22
10	10	2.97	26	0.75	89	11
8	12	2.68	25	0.66	96	4
6	14	2.68	28	0.75	97	3
4	16	2.57	32	0.82	98	2
2	18	2.20	32	0.70	99	1
0	20	2.67	30	0.80	100	-

3.9.4 การสร้างเทอร์โพลีเมอร์ P(3HB-4HB-3HV) สัดส่วนต่างๆ โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริก กรดบิวทิริก และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท

จากรายงานของ Kunioka และคณะ (1988) พบเทอร์โพลีเมอร์ของ P(3HB-4HB-3HV) โดยการใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริกและโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมในการสร้างเทอร์โพลีเมอร์จากแหล่งคาร์บอนผสม ในการวิจัยนี้จึงใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกรดวาเลอริก กรดบิวทิริก และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท ซึ่งเป็นแหล่งของ 3HV 3HB และ 4HB สูง โดยใช้อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนทั้งสามต่างๆ กัน โดยมีปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร โดยแบ่งปริมาณออกเป็น 4 ส่วน และแปรผันแหล่งคาร์บอนของกรดวาเลอริกเป็นหลัก (5 10 และ 15 กรัม/ลิตร) และปริมาณที่เหลือเป็นการแปรผันปริมาณการผสมของกรดบิวทิริกและโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท ปริมาณแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร (ตามวิธีการวิจัยข้อ 2.11.4)

จากผลการวิจัยพบว่า เมื่อความเข้มข้นของกรดวาเลอริกคงที่เท่ากับ 5 กรัม/ลิตร) สัดส่วนของโมโนเมอร์ 4HB เพิ่มขึ้น (1-15 โมลเปอร์เซนต์) เมื่อเพิ่มปริมาณของโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท (5-15 กรัม/ลิตร) และโมโนเมอร์ของ 3HB เพิ่มขึ้น (21-50 โมลเปอร์เซนต์) เมื่อเพิ่มปริมาณของกรดบิวทิริก (1-10 กรัม/ลิตร) ในทำนองเดียวกัน เมื่อความเข้มข้นของกรดวาเลอริกเข้มข้นคงที่เท่ากับ 10 กรัม/ลิตร โมโนเมอร์ของ 4HB เพิ่มขึ้น (1 - 4 โมลเปอร์เซนต์) เมื่อเพิ่มปริมาณของโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท (2.5 - 10 กรัม/ลิตร) และโมโนเมอร์ของ 3HB เพิ่มขึ้น (13 - 33 โมลเปอร์เซนต์) เมื่อเพิ่มปริมาณของกรดบิวทิริก (0 - 7.5 กรัม/ลิตร) และเมื่อกรดวาเลอริก กรดบิวทิริก และ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท เข้มข้นเท่ากับ 15 2.5 และ 2.5 กรัม/ลิตร พบว่าโมโนเมอร์ของ 3HB มีปริมาณเท่ากับ 15 โมลเปอร์เซนต์ ซึ่งมากกว่าเมื่อมีเพียงโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท (5 กรัม/ลิตร) โมโนเมอร์ของ 4HB เท่ากับ 2 โมลเปอร์เซนต์ เมื่อปริมาณโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท เท่ากับ 5 กรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าเมื่อปริมาณโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท เท่ากับ 2.5 กรัม/ลิตร การเติบโตและการผลิตโคโพลีเมอร์ของ *Alcaligenes sp.* A-04 ไม่แตกต่างกัน เมื่อแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนทั้งสามชนิด โดยเมื่อกรดวาเลอริกเข้มข้น 15 กรัม/ลิตร *Alcaligenes sp.* A-04 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโพลีเมอร์(% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)สูงกว่าเล็กน้อย เมื่อให้กรดวาเลอริกปริมาณ 10 และ 5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคโพลีเมอร์ และสัดส่วนของโมโนเมอร์เมื่อเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เป็นเวลานาน 60 ชม. โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่าง กรดวาเลอริก กรดบิวทิริก และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวเรท (ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร) และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.1 กรัม/ลิตร

ปริมาณ(กรัม/ลิตร)			น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)	ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร)	สัดส่วนของโมโนเมอร์ (โมลเปอร์เซนต์)		
กรดวาเลอริก	กรดบิวทิริก	Na(4HB)				3HB	3HV	4HB
5.0	0	15.0	3.27	20	0.65	21	64	15
5.0	5.0	10.0	3.28	29	0.95	31	60	9
5.0	7.5	7.5	3.71	28	1.04	47	51	2
5.0	10.0	5.0	3.24	23	0.74	50	49	1
10.0	0	10.0	3.62	29	1.05	13	83	4
10.0	2.5	7.5	3.72	31	1.15	21	77	2
10.0	5.0	5.0	3.54	35	1.24	28	70	2
10.0	7.5	2.5	3.86	33	1.27	33	66	1
15.0	0	5.0	4.02	42	1.68	12	86	2
15.0	2.5	2.5	4.12	43	1.77	15	84	1

Na(4HB) คือ โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท

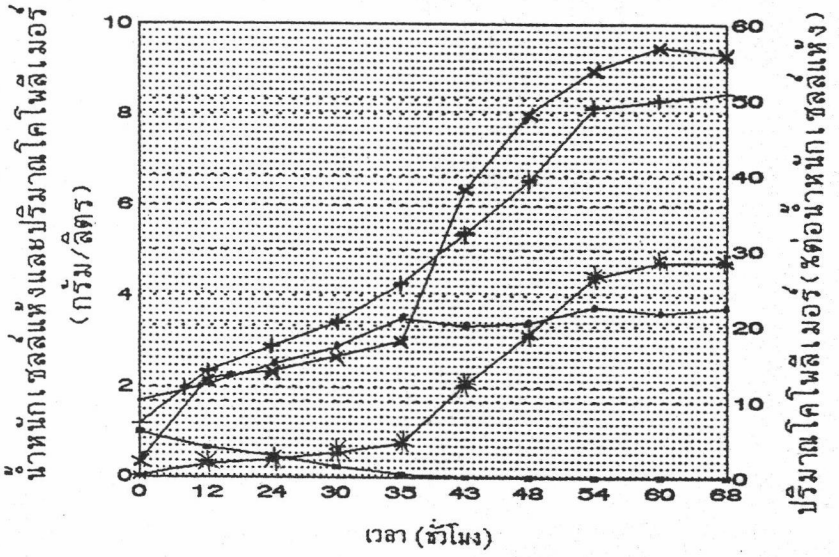
3.10 การเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 เพื่อผลิตโคโพลีเมอร์ และเทอร์โพลีเมอร์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เนื่องจากต้องการปริมาณสารผลิตภัณฑ์มากเพื่อนำไปทดสอบสมบัติทางกายภาพ และทางเคมี เนื่องจากเป็นสายพันธุ์เดียวกับ ชนัญ ผลประไพ (2537) ดังนั้นบางสภาวะที่ใช้ควบคุมได้มาจากการศึกษาของ ชนัญ ผลประไพ คือเลี้ยงเซลล์ที่ 30 °ซ จึงเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ตามวิธีข้อ 2.12 โดยใช้กล้าเชื้อเท่ากับ 12 กรัม (น้ำหนักเซลล์เปียก)/ลิตร ปริมาณแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสภาวะเดียวกับในระดับขวดเขย่า แหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 1 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสภาวะที่เพิ่มจากระดับขวดเขย่า 10 เท่า และควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ตลอดระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ ปริมาณสารอื่นตามสูตรอาหาร MSM และควบคุม pH เท่ากับ 7.0 ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงเซลล์ที่ 30 °ซ อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.8 vvm (ชนัญ ผลประไพ 2537) โดยเลี้ยงจนกระทั่งเชื้อมีการเติบโตสูงสุดและคงที่

3.10.1 การผลิตโคโพลีเมอร์ของ *Alcaligenes sp.* A-04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

การผลิตโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-3HV)โดยเลี้ยงตามวิธีข้อ 2.12.1 เมื่อให้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว พบว่าที่เวลา 86 ชม.*Alcaligenes sp.* A-04 มีการเติบโตโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.17 กรัม/ลิตร และผลิตโคโพลีเมอร์ P(3HB-97% 3HV) ปริมาณเท่ากับ 38 % (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อให้กรดวาเลอริก และกรดบิวทิริก เป็นแหล่งคาร์บอนผสมอัตราส่วนเท่ากับ 3:2 (โดยน้ำหนัก) พบว่าที่เวลา 68 ชม. *Alcaligenes sp.* A-04 มีการเติบโตสูงกว่า โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.47 กรัม/ลิตร และผลิตโคโพลีเมอร์ P(3HB-82% 3HV) ปริมาณเท่ากับ 56% (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ดังแสดงในรูปที่ 30 จากกราฟพบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 มีการเติบโตในช่วงเวลาตั้งแต่ชม.ที่ 0 ถึง 35 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ลดลงเนื่องจากการใช้เพื่อการเติบโตของเซลล์ ในช่วงนี้พบการสะสมโพลีเมอร์ต่ำ (18 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) หลังจากชม.ที่ 35 เมื่อปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเกือบเท่ากับศูนย์ เซลล์จะเริ่มเข้าสู่ระยะการสะสมโคโพลีเมอร์(ชม.ที่ 35-54) พบว่าปริมาณโคโพลีเมอร์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (15-54 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) และน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นในช่วงนี้ เนื่องมาจากปริมาณของโคโพลีเมอร์ที่เพิ่มขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ

residual biomass (น้ำหนักเซลล์ที่มิใช่โพลีเมอร์) ที่ค่อนข้างคงที่ ต่อมาเซลล์เข้าสู่ช่วงการสะสมโคโพลีเมอร์สูงสุดและคงที่ (ชม.ที่ 54-68)



น้ำหนักเซลล์แห้ง (+) Residual biomass (•) $NH_2(SO_4)$ (▬)
ปริมาณโคโพลีเมอร์ (กรัม/ลิตร (✱) และ % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (✕))

รูปที่ 29 การเติบโต และการสร้างโคโพลีเมอร์ P(3HB-3HV) ของ *Alcaligenes sp.* A-04 เมื่อเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนผสมของกรดวาเลอริกะกรดบิวทิริก (3:2 โดยน้ำหนัก) ปริมาณรวมเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.0 กรัม/ลิตร เลี้ยงที่ 30 °ซ อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.8 vvm และควบคุม pH ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

การผลิตโคโพลีเมอร์ P(3HB-co-4HB) โดยเลี้ยงตามวิธีข้อ 2.12.2 เมื่อให้กรดบิวทิริก และโซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรทเป็นแหล่งคาร์บอนผสม อัตราส่วนเท่ากับ 3:1 (โดยน้ำหนัก) พบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 มีการเติบโต(น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 9.86 กรัม/ลิตร) และผลิตโคโพลีเมอร์ P (3HB-38% 4HB) ปริมาณเท่ากับ 66 % (ต่อน้ำหนักแห้ง)

3.10.2 การผลิตเทอร์โพลีเมอร์ของ *Alcaligenes sp.* A-04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

การผลิตเทอร์โพลีเมอร์ P(3HB-4HB-3HV) โดยเลี้ยงตามวิธีข้อ 2.12.3 เมื่อให้กรดวาเลอริก:กรดบิวทิริก:โซเดียม-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท อัตราส่วนเท่ากับ 1:2:2 (โดยน้ำหนัก) พบว่า *Alcaligenes sp.* A-04 มีการเติบโต(น้ำหนักเซลล์แห้ง)สูงสุดเท่ากับ 11.24 กรัม/ลิตร และผลิตเทอร์โพลีเมอร์ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) ปริมาณเท่ากับ 67 % (ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)

3.11 ลักษณะของสารผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

นำสารผลิตภัณฑ์จากการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร (จากผลการวิจัยข้อ 3.10) มาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 2.16 สารผลิตภัณฑ์ได้แก่ P(3HB-97% 3HV) P(3HB-82% 3HV) P(3HB-38% 4HB) และ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) ดังแสดงในรูปที่ 31 ถึง 35

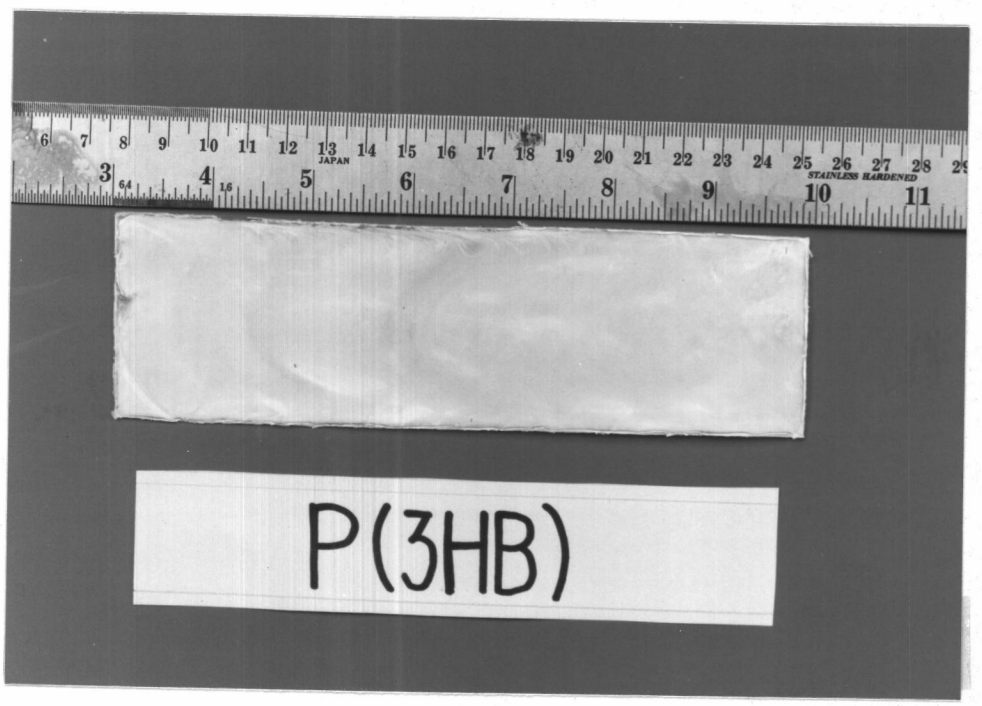
จากการสังเกตพบว่าโฮโมโพลีเมอร์ P(3HB) เป็นแผ่นฟิลม์สีขาวขุ่น มีลักษณะแข็งและเปราะ เมื่ออยู่ในรูปของโคโพลีเมอร์ของ 3HB และ 3HV ได้แก่ P(3HB-97% 3HV) และ P(3HB-82% 3HV) แผ่นฟิลม์จะมีลักษณะใสขึ้น แผ่นฟิลม์ของโคโพลีเมอร์ P(3HB-38% 4HB) มีสีขาวขุ่นคล้ายกับแผ่นฟิล์มของ P(3HB) เมื่อสัมผัสที่ผิว และดึงเบาๆ จะมีลักษณะของยาง และแผ่นฟิล์มของเทอร์โพลีเมอร์ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) นอกจากจะมีความใสซึ่งเนื่องมาจากมีโมโนเมอร์ของ 3HV แล้ว ยังมีลักษณะของยางอันเนื่องมาจากโมโนเมอร์ของ 4HB

รูปที่ 30 แผ่นฟิลม์ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-97% 3HV) ซึ่งได้จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านการสกัดและทำให้บริสุทธิ์

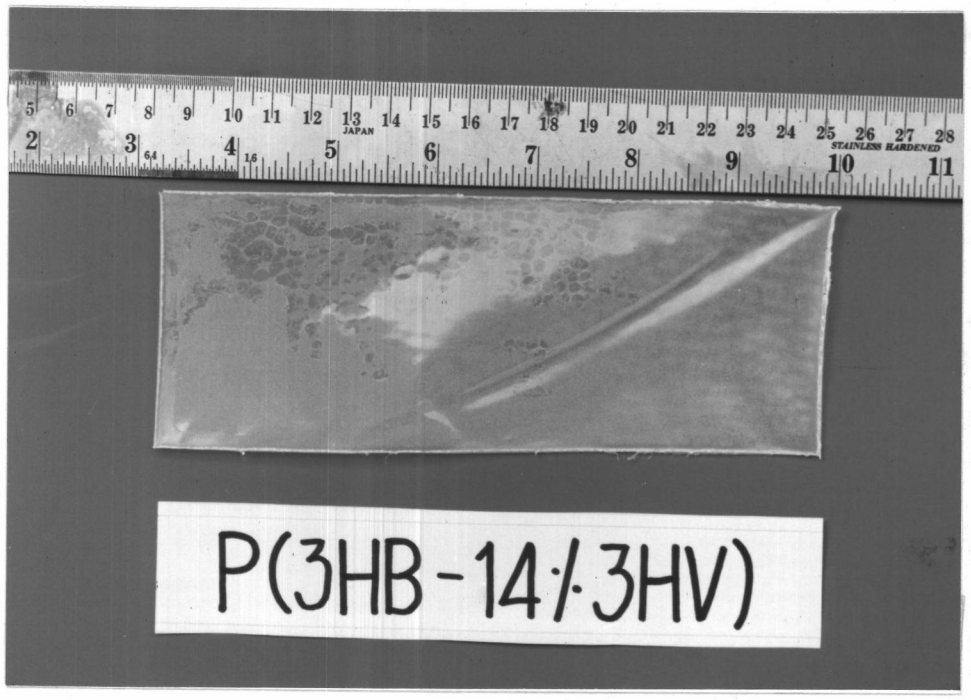
รูปที่ 31 แผ่นฟิลม์ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-82% 3HV) ซึ่งได้จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านการสกัดและทำให้บริสุทธิ์

รูปที่ 32 แผ่นฟิลม์ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-38% 4HB) ซึ่งได้จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านการสกัดและทำให้บริสุทธิ์

รูปที่ 33 แผ่นฟิลม์ของสารผลิตภัณฑ์ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) ซึ่งได้จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านกาารสกัดและทำให้บริสุทธิ์



รูปที่ 34 แผ่นฟิลม์ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB) ซึ่งได้จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านกาารสกัดและทำให้บริสุทธิ์ (ชนัญ ผลประไพ, 2537)

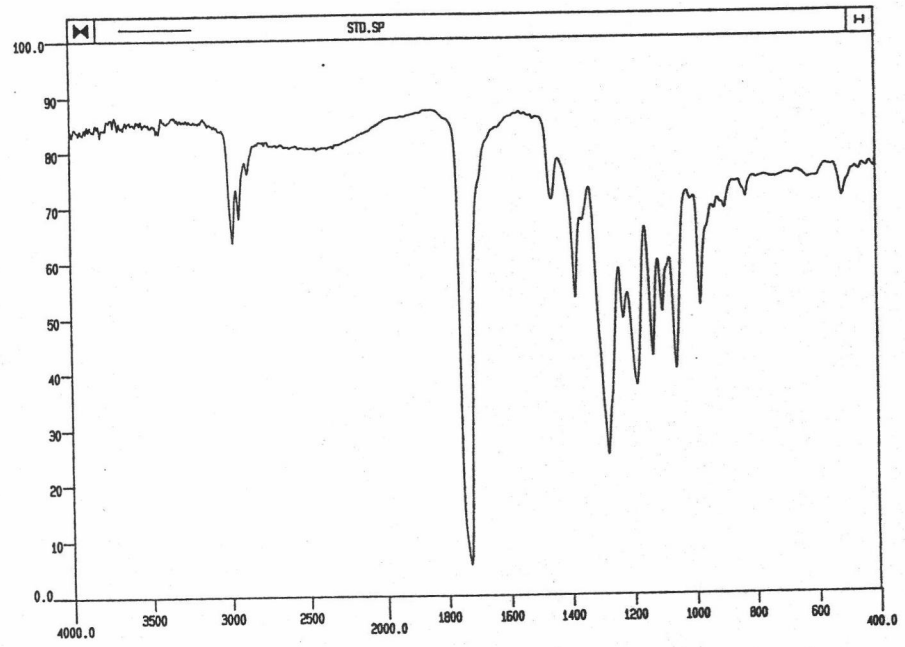


รูปที่ 35 แผ่นฟิลม์ของสารมาตรฐาน P(3HB-14% 3HV) ของบริษัท Aldrich

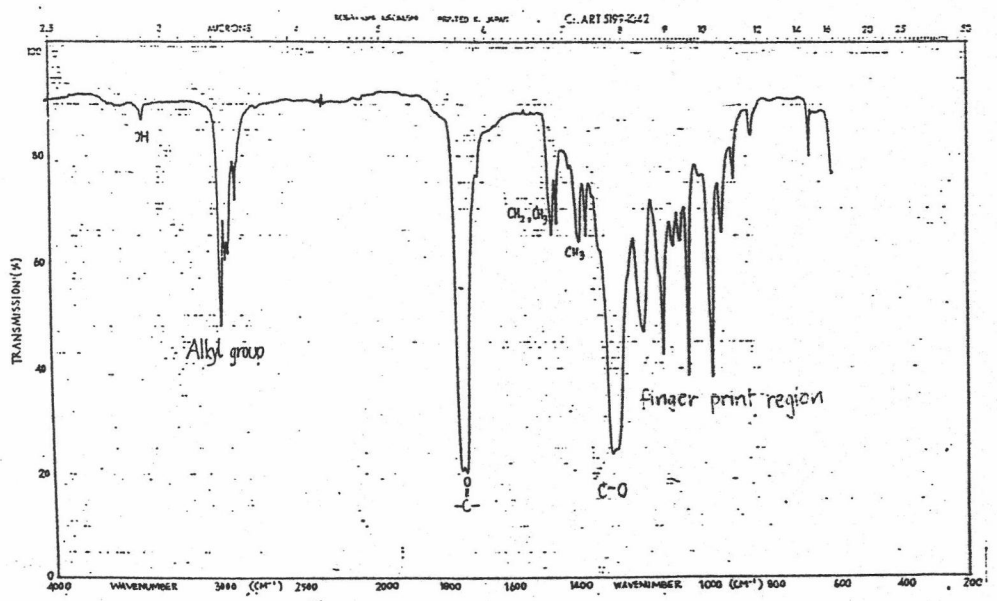
3.12 การตรวจลักษณะของสารผลิตภัณฑ์โคโพลีเมอร์ และเทอร์โพลีเมอร์

3.12.1 การตรวจโครงสร้างโมเลกุลโดยเครื่องอินฟาเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

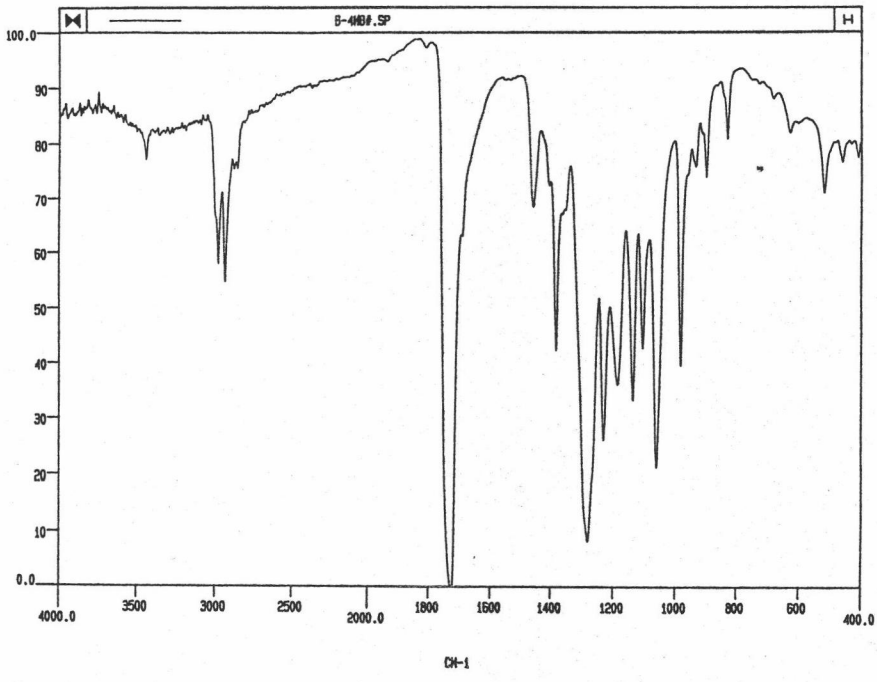
นำสารผลิตภัณฑ์ที่สกัดจาก *Alcaligenes sp.* A-04 จากการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร และผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 3.11 มาตรวจหมู่ฟังก์ชั่นตามวิธีข้อ 2.17 โดยเลือกสารผลิตภัณฑ์ที่มีชนิดโมโนเมอร์ต่างกัน เช่น โคโพลีเมอร์ (3HB และ 3HV) ได้แก่ P(3HB-97% 3HV) โคโพลีเมอร์ (3HB และ 4HB) ได้แก่ P(3HB-38% 4HB) และเทอร์โพลีเมอร์ (3HB 3HV และ 4HB) ได้แก่ P(48% 3HB-39% 3HV -13% 4HB) ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 38 39 และ 40 พบว่าสเปกตรัมของสารมาตรฐาน (รูปที่ 37) และสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดประกอบด้วยพีคที่สำคัญคือ พีคของหมู่คาร์บอนิล (C=O) ที่ ~ 1726 cm^{-1} และพีกของหมู่ C-O streching ซึ่งแสดงว่าสารมาตรฐาน และสารผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดเป็นโพลีเอสเทอร์ โดยพันธะเอสเทอร์เกิดขึ้นระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวที่หนึ่ง กับหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งเบต้าของโมโนเมอร์อีกตัวหนึ่ง ดังนั้นจึงเหลือหมู่ไฮดรอกซีอิสระน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับพีกของ OH ที่มีขนาดเล็กดังที่ปรากฏในสเปกตรัม กล่าวคือเป็นพีกของหมู่ไฮดรอกซีอิสระของโนโนเมอร์ที่ปลายของสายโพลีเมอร์ และลักษณะของบริเวณ Finger print ของสารแต่ละชนิดจะมีลักษณะเฉพาะตัวที่แตกต่างกัน



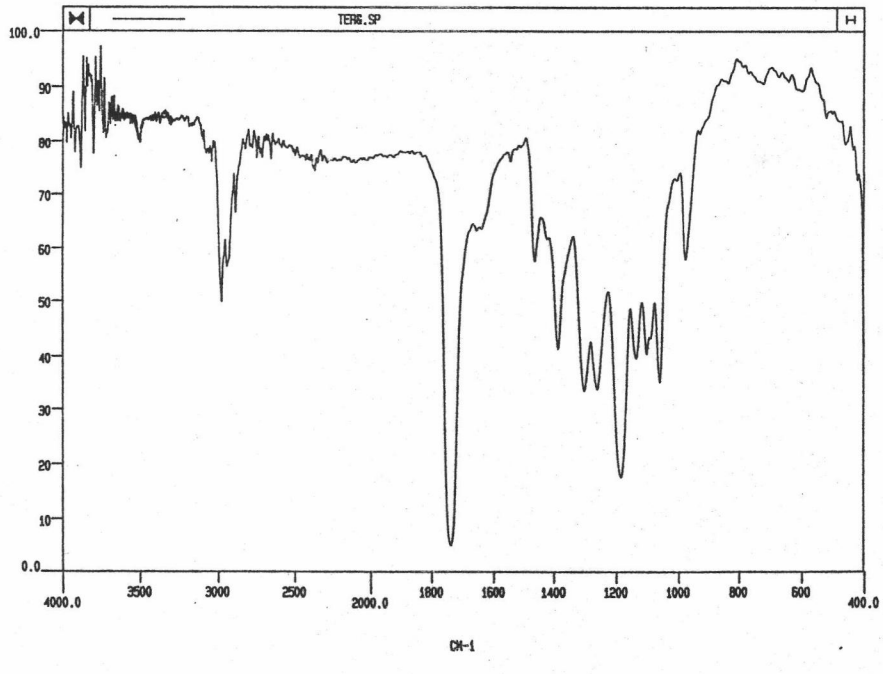
รูปที่ 36 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometer ของสารมาตรฐาน P(3HB-24% 3HV) ของบริษัท Aldrich



รูปที่ 37 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometer ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-97% 3HV) จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 และผ่านขั้นตอนการสกัด และทำให้บริสุทธิ์



รูปที่ 38 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometer ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-38% 4HB) จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านขั้นตอนการสกัด และทำให้บริสุทธิ์



รูปที่ 39 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี IR spectrophotometer ของสารผลิตภัณฑ์ P(48% 3HB-39% 3HV-43% 4HB)) จากการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* A-04 โดยผ่านขั้นตอนการสกัด และทำให้บริสุทธิ์

3.12.2 การตรวจโครงสร้างโมเลกุลโดยเครื่อง NMR

นำสารผลิตภัณฑ์ที่สกัดจาก *Alcaligenes sp.* A-04 โดยการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร และผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ตามวิธีในข้อ 3.4 มาตรวจโครงสร้างโมเลกุลตามวิธีข้อ 2.18 โดยเลือกสารผลิตภัณฑ์ที่มีชนิดของโมโนเมอร์ต่างกัน ได้แก่ P(3HB-97% 3HV) P(3HB-38% 4HB) และ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) และสารมาตรฐาน P(3HB-24% 3HV)

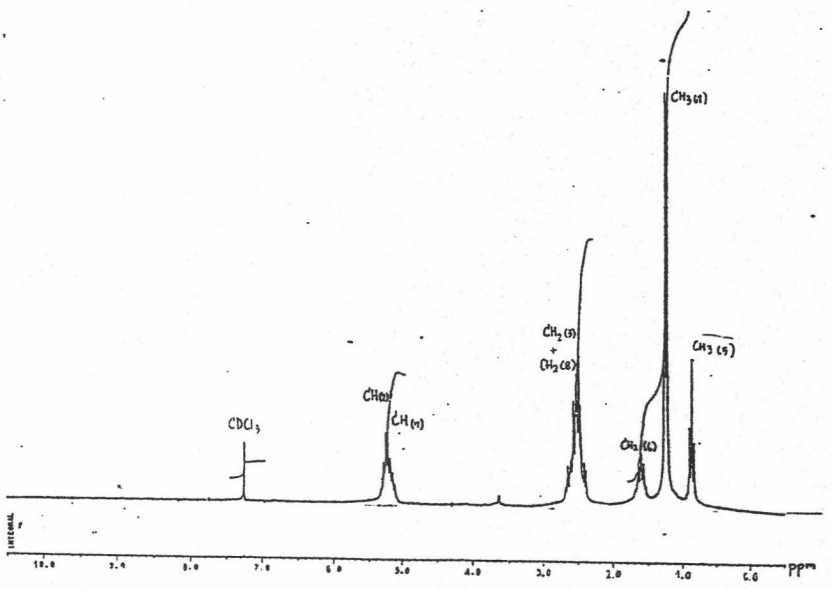
^{1}H NMR

จากสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-97% 3HV) ดังแสดงในรูปที่ 42 ประกอบด้วยพีกจากสัญญานของโปรตอนของหมู่เมทธิล ($-CH_3$) หมู่เมทธิลีน ($-CH_2-$) และหมู่เมทธีน (-CH-)ของโมโนเมอร์ 3HB ที่ตำแหน่ง 1.27 (doublet) 2.54 และ 5.25 ppm โมโนเมอร์ 3HV ประกอบด้วยพีกของ หมู่เมทธิล หมู่เมทธิลีน และหมู่เมทธีน ที่ตำแหน่ง 0.89 (triplet) 1.62 และ 2.55 และ 5.14 ppm ซึ่งสอดคล้องกับสเปกตรัมของสารมาตรฐาน P(3HB-24% 3HV) (รูปที่ 41) และเนื่องจากสารผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3HV สูงถึง 97 โมลเปอร์เซนต์ ดังนั้นพีกของหมู่เมทธิล (0.89 ppm) จึงสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพีกที่ตำแหน่งเดียวกันกับของสารมาตรฐาน (0.87 ppm) ซึ่งมีโมโนเมอร์ของ 3HV เพียง 24 โมลเปอร์เซนต์

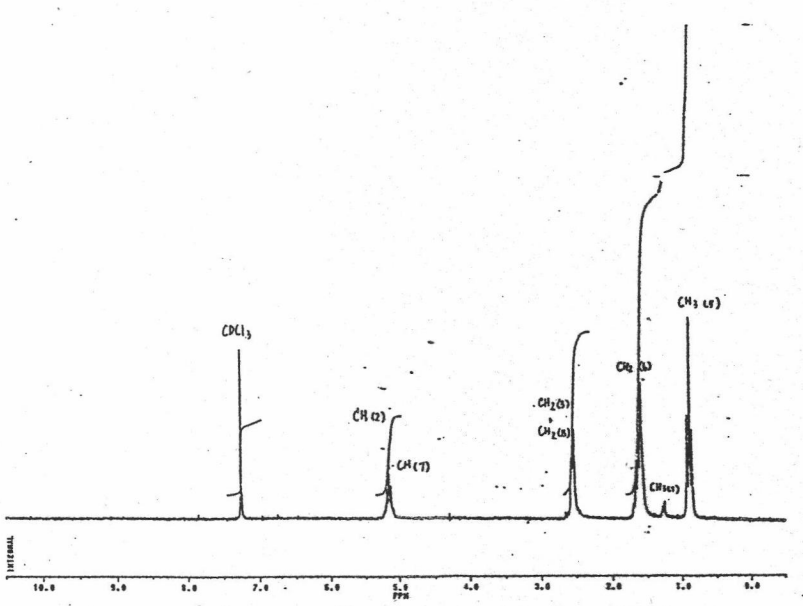
สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-38% 4HB) ที่ผลิตจาก *Alcaligenes sp.* A-04 ประกอบด้วยพีกของหมู่เมทธิล หมู่เมทธิลีน และเมทธีนของโมโนเมอร์ 3HB ที่ตำแหน่ง

สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-38% 4HB) ดังแสดงในรูปที่ 42 ประกอบด้วยพีกจากสัญญานโปรตอนของโมโนเมอร์ 3HB ที่ตำแหน่ง 1.24 ($-CH_3$) 2.55 ($-CH_2-$) และ 5.23 ($-CH_3-$) และโมโนเมอร์ 4HB ที่ตำแหน่ง 1

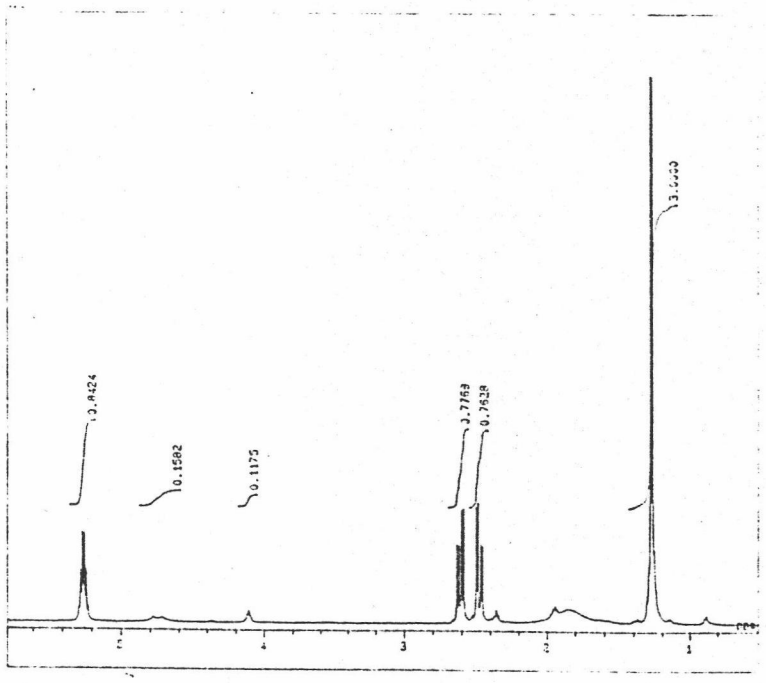
สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-39% 3HV-13% 4HB) ดังแสดงในประกอบด้วยพีกจากสัญญานโปรตอนของโมโนเมอร์ 3HB ที่ตำแหน่ง 1.26 2.58 และ 5.23 ppm โมโนเมอร์ 3HV ประกอบด้วยพีกที่ตำแหน่ง 0.92 1.63 2.56 และ 5.16 และโมโนเมอร์ของ 4HB ที่ตำแหน่ง 1.96 และ 2.39 และ 4.16 ppm



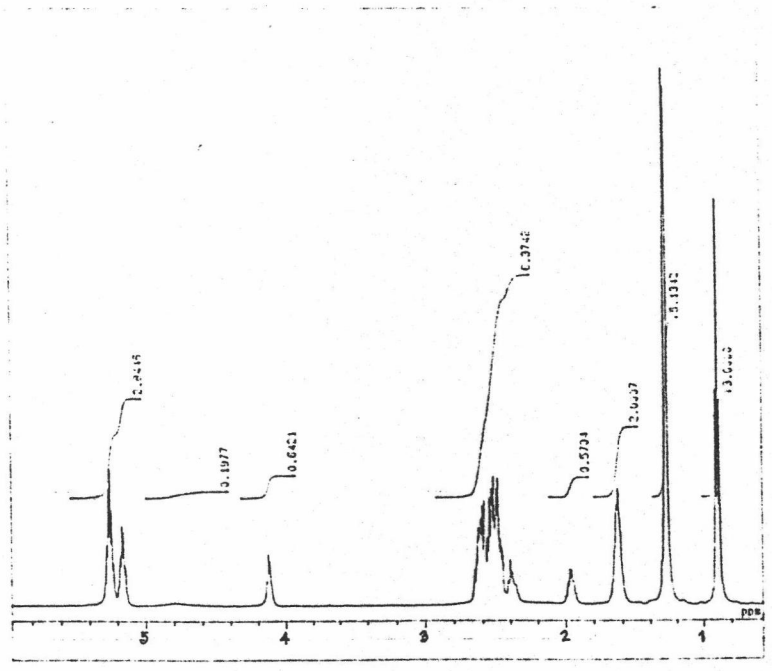
รูปที่ 40 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของสารมาตรฐาน P(3HB-24% 3HV)



รูปที่ 41 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-97% 3HV) ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes sp.* A-04



รูปที่ 42 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-38% 3HV) ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes sp.* A-04



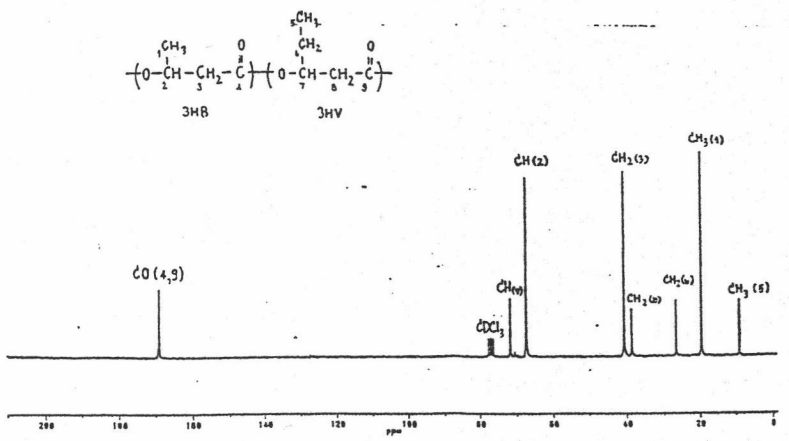
รูปที่ 43 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{1}H NMR spectroscopy ของสารผลิตภัณฑ์ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes sp.* A-04

^{13}C NMR

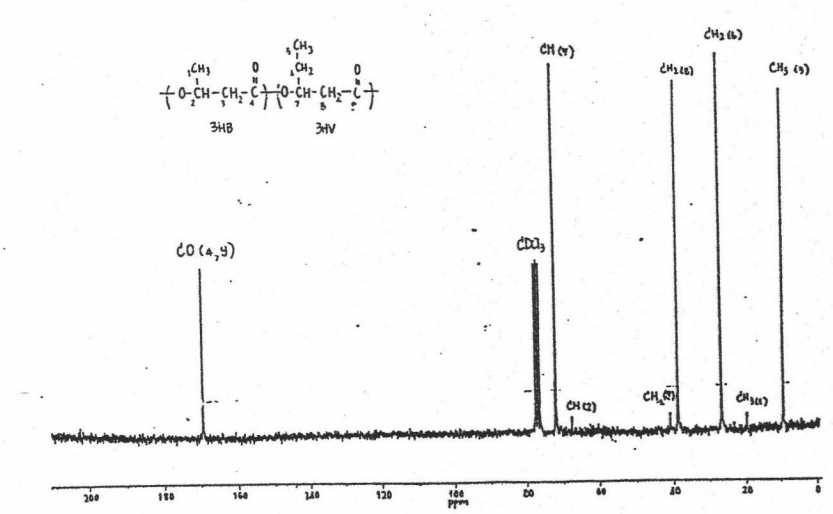
จากสเปกตรัมของสารมาตรฐาน P(3HB-24% 3HV) ดังแสดงในรูปที่ 45 ประกอบด้วยพีกจากสัญญานของ หมู่เมทธิล หมู่เมทธิลีน หมู่เมทธีน และหมู่คาร์บอนิล ของโมโนเมอร์ 3HB ที่ตำแหน่ง 19.53 40.67 67.43 และ 168.85 ppm โมโนเมอร์ 3HV ประกอบด้วยพีกของหมู่เมทธิล หมู่เมทธิลีน หมู่เมทธีน และหมู่คาร์บอนิล ที่ตำแหน่ง 9.05 26.65 38.64 71.75 และ 168.85 . สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-97% 3HV) ที่ผลิตจาก *Alcaligenes sp.* A-04 ดังแสดงในรูปที่ 46 ประกอบด้วยพีกของหมู่เมทธิล หมู่เมทธิลีน หมู่เมทธีน และหมู่คาร์บอนิล ของโมโนเมอร์ 3HB ที่ตำแหน่ง 19.40 40.82 67.23 และ 169.29 และพีกของหมู่เมทธิล หมู่เมทธิลีน หมู่เมทธีน และหมู่คาร์บอนิล ของโมโนเมอร์ 3HV ที่ตำแหน่ง 9.09 26.65 38.59 71.85 และ 169.29 ซึ่งสอดคล้องกับสเปกตรัมของสารมาตรฐาน P(3HB-24% 3HV)

สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-38% 4HB) ประกอบด้วยพีกจากโมโนเมอร์ของ 3HB ที่ตำแหน่ง 19.90 41.02 67.53 168.87 ppm และโมโนเมอร์ของ 4HB ที่ตำแหน่ง 24.41 31.87 64.03 และ 168.87 ppm

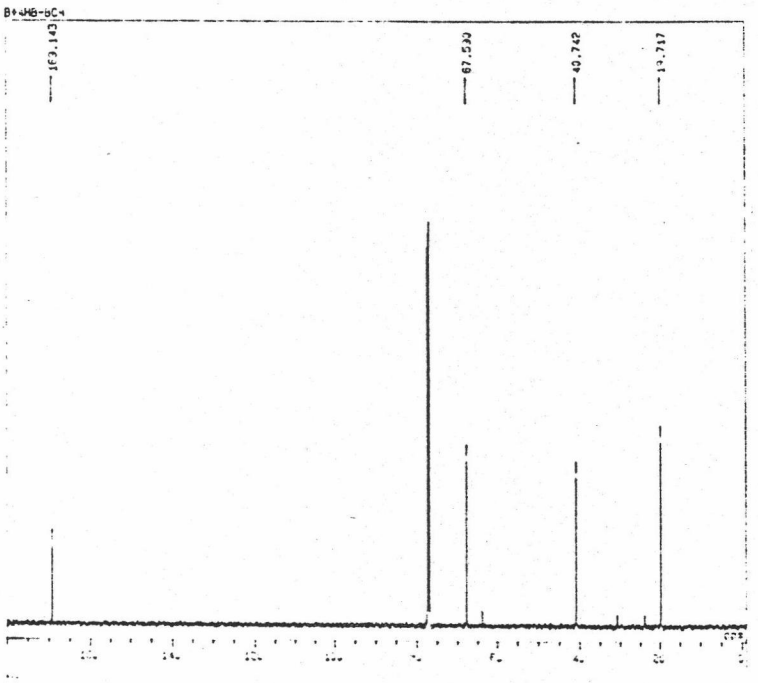
สเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-39% 3HV-13% 4HB) ประกอบด้วยพีกจากโมโนเมอร์ของ 3HB ที่ตำแหน่ง 19.87 41.05 67.50 และ 169.00 ppm โมโนเมอร์ของ 3HV ที่ตำแหน่ง 9.06 24.55 38.10 73.38 และ 168.87 ppm และโมโนเมอร์ของ 4HB ที่ตำแหน่ง 24.02 31.93 64.57 และ 168.87 ppm



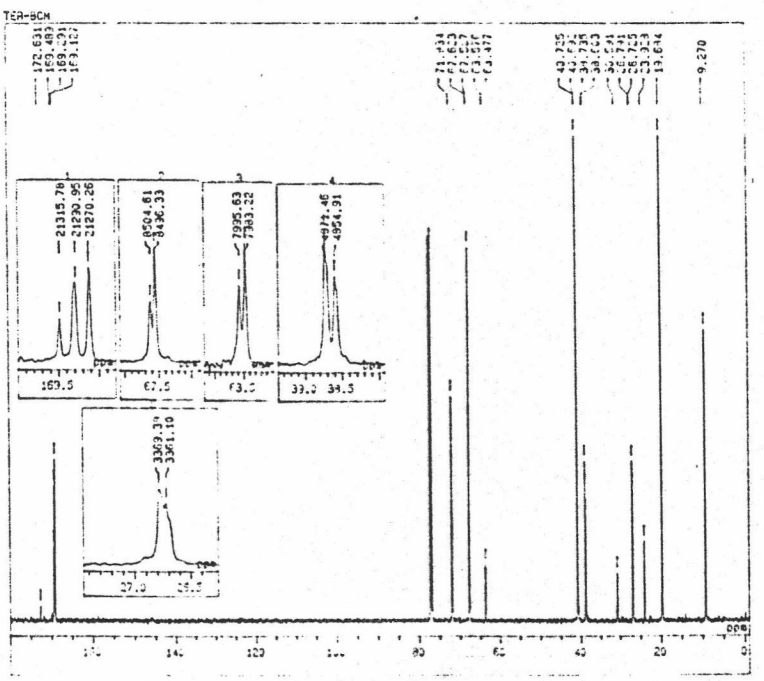
รูปที่ 44 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{13}C NMR spectroscopy ของสารมาตรฐาน P(3HB-24% 3HV)



รูปที่ 45 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{13}C NMR spectroscopy ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-97% 3HV) ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes sp.* A-04



รูปที่ 46 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{13}C NMR spectroscopy ของสารผลิตภัณฑ์ P(3HB-38% 4HB) ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes sp.* A-04



รูปที่ 47 สเปกตรัมที่วิเคราะห์โดยวิธี ^{13}C NMR spectroscopy ของสารผลิตภัณฑ์ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) ที่สกัดแยกได้จาก *Alcaligenes sp.* A-04

3.13 การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี

3.13.1 การหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์

นำสารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดย *Alcaligenes sp.* A-04 จากการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร และผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีในข้อ 3.11 ซึ่งได้แก่ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) P(3HB-82% 3HV) P(3HB-97% 3HV) P(3HB-38% 4HB) และ P(3HB) ซึ่งได้จาก ชนัญ ผลประไพ (ชนัญ ผลประไพ, 2537) และสารมาตรฐาน P(3HB-14% 3HV) (ซึ่งติดฉลากบอกน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 400,000-750,000) มาทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยเครื่อง GPC และหาค่า intrinsic viscosity [η] หรือความหนืด โดยเครื่อง viscometer ตามวิธีข้อ 2.19 ผลการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและค่า [η] ของสารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก *Alcaligenes sp.* A-04 ได้แก่ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) P(3HB-82% 3HV) P(3HB-97% 3HV) P(3HB-38% 4HB) และ P(3HB) และสารมาตรฐาน P(3HB-14% 3HV)

ตัวอย่าง	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย โดยเครื่อง GPC	[η] โดยเครื่อง viscometer
P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB)	134,800	0.34
P(3HB-82% 3HV)	130,100	0.23
P(3HB-97% 3HV)	-	0.54
P(3HB-38% 4HB)	-	0.35
P(3HB)	-	0.61
P(3HB-14% 3HV)	-	0.94

3.13.2 การหาค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) และ glass transition temperature (Tg)

นำสารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก *Alcaligenes sp.* A-04 จากการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตรและผ่านการทำให้บริสุทธิ์ได้แก่ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) P(3HB-97% 3HV) และ P(3HB) ซึ่งได้จาก ชนัญ ผลประไพ (ชนัญ ผลประไพ, 2537) และสารมาตรฐาน P(3HB-14% 3HV) มาวิเคราะห์หา Tm และ Tg โดยเครื่อง DSC ตามวิธีข้อ 2.22 ดังแสดงในตารางที่ 20 อุณหภูมิหลอมเหลว(Tm)ของโฮโมโพลีเมอร์ P(3HB) จะมีค่าสูงสุดคือ 183 °ซ และอุณหภูมิหลอมเหลวจะมีค่าลดลงเมื่อมีโมโนเมอร์ของ 3HV และ 4HB เพิ่มขึ้น หรือมีโมโนเมอร์ของ 3HB ลดลง เช่น เมื่อโมโนเมอร์ของ 3HV เท่ากับ 14 และ 97 โมลเปอร์เซนต์ อุณหภูมิหลอมเหลวลดลงเหลือเท่ากับ 159 และ 106 °ซ ตามลำดับ สารผลิตภัณฑ์เทอร์โพลีเมอร์ซึ่งมีโมโนเมอร์ของทั้ง 3HV และ 4HB เมื่อโมโนเมอร์ของ 4HB และ 3HV เพิ่มขึ้น เมื่อเป็นโฮโมโพลีเมอร์ (P(3HB)) มีค่า Tg เท่ากับ 8 °ซ และ Tg ลดลงเหลือเท่ากับ 3 °ซ เมื่ออยู่ในรูปของโคโพลีเมอร์ที่มีโมโนเมอร์ของ 3HV เท่ากับ 14 โมลเปอร์เซนต์ และเทอร์โพลีเมอร์P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) มีค่า Tg ลดลงเหลือเท่ากับ 10 °ซ เมื่อมีโมโนเมอร์ของ 3HV และ 4HB เท่ากับ 39 และ 13 โมลเปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 19 อุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) และ glass transition temperature (Tg) ของสารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก *Alcaligenes sp.* A-04 ได้แก่ P(3HB) P(3HB-97% 3HV) P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) และสารมาตรฐาน P(3HB-14% 3HV)

ตัวอย่าง	Tg (°ซ)	Tm (°ซ)
P(3HB)	8	183
P(3HB-14% 3HV)	3	159
P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB)	-10	93
P(3HB-97% 3HV)	-	106

3.14 การตรวจสอบคุณสมบัติเชิงกลของโคโพลีเมอร์ และเทอร์โพลีเมอร์ เปรียบเทียบกับ PP และ PE

นำแผ่นฟิลม์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดย *Alcaligenes sp.* A-04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีข้อ 2.16 ได้แก่ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) P(3HB-97% 3HV) และ P(3HB) จาก ชนัญ ผลประไพ (ชนัญ ผลประไพ, 2537) เพื่อเปรียบเทียบกับคุณสมบัติเชิงกลของ PP (ถุงพลาสติกชนิดทนร้อน หรือถุงร้อน) และ PE (ถุงพลาสติกปกติ หรือถุงเย็น) เตรียม specimen ดังแสดงในภาคผนวกที่ 8 แล้วนำมาตรวจสอบคุณสมบัติเชิงกลตามวิธีในข้อ 2.21 ได้แก่ ค่าแรงสูงสุด (maximum load) ที่ใช้ในการดึง specimen ให้ขาด ค่าการต้านแรงดึง (stress at max load หรือ tensile strenght) เป็นค่าของแรงต่อพื้นที่หน้าตัดของ specimen ค่า Young's Modulus เป็นดัชนีที่ใช้บอกถึงความแข็งและเปราะ (stiffness)ของพลาสติก ความเหนียว(toughness) เป็นค่าแสดงความสามารถในการรับพลังงานที่มากระทำต่อโพลีเมอร์ ก่อนที่จะหมดสภาพของโพลีเมอร์ ระยะที่ถูกยืด (displacement at maximum load) เป็นระยะที่ยืดออกมาจากความยาวเดิมของ specimen % Elongation คือการคำนวณในรูปเปอร์เซนต์ของระยะถูกยืดออกจากระยะเดิมเทียบกับระยะเดิม(100 มม.) (Billmeyer, 1984 และ Berins, 1991) จากผลการวิจัยในตารางที่ 20 พบว่า ค่าแรงสูงสุดที่ใช้ดึงตัวอย่างไบโอโพลีเมอร์จาก *Alcaligenes sp.* A-04 และปิโตรโพลีเมอร์ (PP และ PE) มีค่าใกล้เคียงกัน นั่นคือไบโอโพลีเมอร์มีค่าแรงดึงอยู่ในช่วง 1.8-4.4 นิวตัน ในกลุ่มของปิโตรโพลีเมอร์มีค่าแรงดึงอยู่ในช่วง 2.3-3.6 นิวตัน สำหรับกลุ่มไบโอโพลีเมอร์พบว่าเมื่ออยู่ในรูปโคโพลีเมอร์ต้องใช้ค่าแรงดึงสูงสุดมากกว่าโฮโมโพลีเมอร์ในการทำให้ specimen ขาด การต้านแรงดึงของปิโตรโพลีเมอร์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 13.608 ถึง 14.969 (MPa) สูงกว่าค่าต้านแรงดึงไบโอโพลีเมอร์ (4.075 ถึง 9.603 (MPa)) P(3HB)มีค่า Young's modulus สูงชี้ให้เห็นว่า PHB มีความแข็งและเปราะสูงโดยมีค่าเท่ากับ 2693 MPa และจะมีค่าลดลงเมื่ออยู่ในรูปของโคโพลีเมอร์ และ PHB ยังมีความแข็งและเปราะสูงกว่าปิโตรโพลีเมอร์ด้วย ดังแสดงในตารางที่ 20 ในทางตรงกันข้ามไบโอโพลีเมอร์มีค่าความเหนียวต่ำกว่าปิโตรโพลีเมอร์ และในกลุ่มของไบโอโพลีเมอร์ P(3HB) ความเหนียวต่ำที่สุด (0.02 MPa) พบว่าเมื่ออยู่ในรูปโคโพลีเมอร์ และเทอร์โพลีเมอร์จะมีค่าความเหนียวเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในรูปเทอร์โพลีเมอร์มีค่าความเหนียวเท่ากับ 0.28 MPa ระยะที่ถูกยืดมีความสัมพันธ์กับค่าความเหนียวคือ ถ้ามีความเหนียวสูงโพลีเมอร์นั้นจะถูกดึงได้ยาวกว่าที่มีความเหนียวน้อย เช่น ปิโตรโพลีเมอร์มีค่าความเหนียวสูงกว่าไบโอโพลีเมอร์จะมีระยะ

ถูกยืดมากกว่าไบโอโพลีเมอร์ ในกลุ่มของไบโอโพลีเมอร์ โคโพลีเมอร์และเทอร์โพลีเมอร์มีความเหนียวมากกว่าก็จะมีระยะยืดมากกว่าโฮโมโพลีเมอร์ การที่ปิโตรโพลีเมอร์มีทั้งความเหนียวและความแข็งที่สูงกว่าไบโอโพลีเมอร์นั้น เนื่องจากปิโตรโพลีเมอร์ที่พบในท้องตลาดมีการใส่สารแต่งเติมเพื่อปรับปรุงบัติของพลาสติก และในกลุ่มของไบโอโพลีเมอร์สามารถปรับปรุงสมบัติได้โดยทำให้อยู่ในรูปของโคโพลีเมอร์หรือเทอร์โพลีเมอร์ที่มี 3HB 4HB และ 3HV ในสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้งานต่างๆ ซึ่งควบคุมได้โดยการให้แหล่งคาร์บอนผสมในสัดส่วนที่เหมาะสม

ตัวอย่าง	Load at Max. Load (N)	Stress at Max. Load (MPa)	Young,s Modulus (stiffness) (MPa)	Toughness (MPa)	Displacement at Max. Load (mm)	% Elongation
P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB)	2.1	4.075	222	0.28	7.4	7
P(3HB-97% 3HV)	4.4	9.014	767	0.11	2.0	2
P(3HB-14% 3HV)	2.3	6.989	675	0.15	2.9	3
P(3HB)	1.8	9.603	2693	0.02	.0.4	0.4
PP[a]	2.3	14.268	749	38.52	388.88	388
PP[b]	2.6	13.608	837	40.80	390.9	390
PE[c]	2.6	14.964	163	9.45	97.2	97
PE[d]	3.6	14.868	139	25.30	235.3	235

PP[a] และ PE[c] คือถุงพลาสติกที่ซื้อจากสามย่าน

PP[b] และ PE[d] คือถุงพลาสติกที่ซื้อจากสำเพ็ง

ตารางที่ 21 เปรียบเทียบสมบัติเชิงกลของไบโอโพลีเมอร์ P(48% 3HB-39% 3HV-13% 4HB) P(3HB-97% 3HV) และ P(3HB) ที่ผลิตจาก *Aloaligenes sp.* A-04 และสารมาตรฐานP(3HB-14% 3HV) กับโพลีเมอร์จากปิโตรเคมี PP และ PE