


ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์และการผลิตพอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยเชื้อ

*Bacillus* sp. BA-019



นางสาวสุปริญญา สุขผลพลา

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3852-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE FACTORS AFFECTING POLY(-3-HYDROXYBUTYRATE) (PHB) PRODUCTION  
AND SPORE FORMATION BY *Bacillus* sp. BA-019



Miss Suparinya Sookphonpala

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-3852-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์และการผลิตพอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต  
โดยเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019

โดย

นางสาวสุปรียญา สุขผลพลา

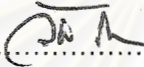
สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

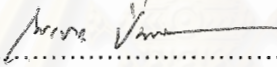
อาจารย์ที่ปรึกษา


รองศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา

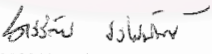
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

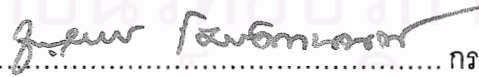
  
..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจริต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา)

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

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ ไชยิตานนท์)

นางสาวสุปริญญา สุขผลพลา : ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์และการผลิตพอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 (THE FACTORS AFFECTING POLY-(3-HYDROXYBUTYRATE) (PHB) PRODUCTION AND SPORE FORMATION BY *Bacillus* sp. BA-019)

อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สงศรี กุลปรีชา 141 หน้า. ISBN : 974-17-3852-8

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ในระดับขวดเขย่าได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อคือ แร่ธาตุและภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ(อุณหภูมิ การให้อากาศ และ พีเอช ) *Bacillus* sp. BA-019 เจริญเติบโตและผลิต PHB ได้โดยใช้แป้งที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีใกล้เคียงกับน้ำตาลกลูโคส คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 49.64 และ 49.69 %ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ จึงเลือกใช้แป้งที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากมีราคาถูก เปรียบเทียบการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในการเจริญเติบโตและผลิต PHB ได้ดีกว่าการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHB ได้สูงที่สุดที่เวลา 12 ชั่วโมงและสร้างสปอร์ได้จำนวนมากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อในทุกปัจจัยที่ศึกษา แร่ธาตุได้แก่ แมกนีเซียม แคลเซียม และแมงกานีส มีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียม 200 มก./ล *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHB ได้สูงที่สุดคือ 56.48 %ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และที่ภาวะนี้มีจำนวนสปอร์เท่ากับ  $7 \times 10^3$  CFU/ml. เมื่อเพิ่มหรือลดปริมาณแมกนีเซียมพบว่าการผลิต PHB ได้ต่ำลง เมื่อเพิ่มปริมาณแมกนีเซียมพบว่าการสร้างสปอร์เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่เพิ่มขึ้น ผลของปริมาณแคลเซียมและแมงกานีสพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแคลเซียมและแมงกานีสเท่ากับ 20 และ 0.08 มก./ล ส่งผลให้ปริมาณ PHB ที่ได้สูงสุดเท่ากับ 56.42 %ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง(มีจำนวนสปอร์เท่ากับ  $7.6 \times 10^3$  CFU/ml.) และ 56.68 %ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง(มีจำนวนสปอร์เท่ากับ  $7.1 \times 10^3$  CFU/ml.) ตามลำดับ เมื่อปริมาณแคลเซียมและแมงกานีสเพิ่มขึ้นพบว่าการผลิต PHB ต่ำลง แต่มีการสร้างสปอร์มากขึ้น อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์โดยพบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHB ได้ปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 53.42 %ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และที่อุณหภูมินี้มีจำนวนสปอร์เท่ากับ  $7 \times 10^3$  CFU/ml. ซึ่งเป็นค่าสูงที่สุดกว่าภาวะอื่นๆเมื่อลดหรือเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่อการผลิต PHB คือ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHB ลดลง อุณหภูมิมีผลต่อการสร้างสปอร์ในทำนองเดียวกับการผลิต PHB โดยเมื่อลดหรือเพิ่มอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียสมีการสร้างสปอร์น้อยลง การให้อากาศมีผลต่อการผลิต PHB โดยพบว่าเมื่อใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 มล. และที่ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที มีผลให้มีการผลิต PHB ได้ดีกว่าที่ภาวะการให้อากาศอื่น โดยได้ปริมาณ PHB สูงที่สุดเท่ากับ 53.81%ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และที่ภาวะนี้มีจำนวนสปอร์เท่ากับ  $7 \times 10^3$  CFU/ml. พบว่าการให้อากาศมีผลต่อการสร้างสปอร์โดยเมื่อปริมาณอากาศมากขึ้นมีการสร้างสปอร์น้อยลง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์ โดยค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้ *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHB ได้สูงที่สุดคือเท่ากับ 7.0 โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 54.65 %ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและที่ค่าพีเอชนี้ได้จำนวนสปอร์เท่ากับ  $1.8 \times 10^4$  CFU/ml. เมื่อค่าพีเอชต่างไปจากนี้พบว่าการผลิต PHB ลดลงและเมื่อค่าพีเอชต่ำกว่า 7.0 มีการสร้างสปอร์น้อยลง

ภาควิชา จุลชีววิทยา ปลายมือชื่อนิสิต.....  
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ปลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา 2546 ปลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



## 4372459723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : FACTORS / AFFECTING / PHB PRODUCTION / SPORE FORMATION / *Bacillus* sp. BA-019

SUPARINYA SOOKPHONPALA: THE FACTORS AFFECTING POLY(-3- HYDROXYBUTYRATE) (PHB) PRODUCTION AND SPORE FORMATION BY *Bacillus* sp. BA-019.

THESIS ADVISOR :ASSOC.PROF.SONGSRI KULPREECHA,Ph.D.,141 pp. ISBN 974-17-3852-8.

The factors affecting PHB production by *Bacillus* sp. BA-019 in shake flask culture were the composition of culture medium e.g. minerals and culture conditions(temperature,aeration and pH). Hydrolysed starch was utilized as C-source as well as that of glucose for growth and PHB production by *Bacillus* sp. BA-019 ; i.e. PHB content were 49.64 and 49.69 % wt ,respectively. Then hydrolysed starch was selected as C-source due to its low cost. Ammonium sulfate and urea were studied as N-source, it was shown that ammonium sulfate was better assimilated by *Bacillus* sp. BA-019 for growth and PHB production as compared to that of urea. In the investigation on cultivation conditions, the maximum PHB production at 12 h. and highest spore formation at 24 h. of cultivation were observed in all culture conditions studied. In addition, minerals in culture medium such as Mg, Ca and Mn accounted for PHB production and spore formation. The highest PHB content of *Bacillus* sp. BA-019 was 56.48 % wt and  $7 \times 10^3$  CFU/ml. spores was determined in the medium containing 200 mg/l of Mg. Lower PHB production was obtained with increasing or decreasing of Mg, while larger number of spores was produced with higher Mg concentration. Similarly, Ca and Mn concentration at 20 and 0.08 mg/l resulting in the highest PHB content of 56.42 % wt ( $7.6 \times 10^3$  CFU/ml. of spores) and 56.68 % wt ( $7.1 \times 10^3$  CFU/ml. of spores), respectively. Higher PHB production but less spore formation with increasing of Ca and Mn concentrations were investigated. Temperature was shown affected on PHB production and spore formation ; highest PHB content was 53.42 % wt and number of spores was  $7 \times 10^3$  CFU/ml. at  $30^{\circ}C$  , which was the larger number compared to that of other culture temperatures. Increasing and decreasing of culture temperatures also showed effect on reducing PHB production by *Bacillus* sp. BA-019. Similarly, temperature affected spore formation ; less spore formation at higher or lower temperature than  $30^{\circ}C$ . Moreover, PHB production was impacted by aeration ; 50 ml. of culture medium with shaking speed of 200 rpm resulting in the optimal PHB production with maximum PHB content at 53.81 % wt, and number of spores was  $7 \times 10^3$  CFU/ml. Aeration also had influence on spore formation i.e. less spore formation was observed in higher aeration condition. The pH of culture medium was another factor relating to PHB production and spore formation; maximum PHB content was shown at pH 7.0 with 54.65 % wt and  $1.8 \times 10^4$  CFU/ml. spores was found. As pH was differed, PHB production was decreased and spore formation was also less.

Department.....Microbiology.....

Student's signature.....

Field of study....Industrial Microbiology...

Advisor's signature.....

Academic year.....2003 .....

Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือ และความกรุณาอย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้กรุณาให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิจัยด้วยดีตลอด และ ยังได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าจึงกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณาเป็น ประธานกรรมการสอบ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ในการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษานี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนถึง หน่วยงานอื่น ๆ นอกรอบ ที่ให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดหลักสูตรการศึกษานี้

ขอขอบคุณนายอดิพล บุญเรืองถาวร ที่ให้กำลังใจและช่วยเหลือในการจัดพิมพ์วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้า ซึ่งเป็นกำลังสำคัญที่สุดที่ช่วยเหลือด้านทุนทรัพย์และให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูป.....	ฐ
คำย่อ.....	ฒ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทัศน์.....	12
3. อุปกรณ์ และ วิธีดำเนินการวิจัย.....	42
4. ผลการวิจัย.....	53
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	112
รายการอ้างอิง.....	121
ภาคผนวก.....	130
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	141

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 บริษัทผู้ผลิต จุลินทรีย์และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม	4
2 จุลินทรีย์ที่สะสม PHA.....	14
3 สมบัติทางกายภาพและความร้อนบางประการของพอลิเมอร์.....	21
4 เปรียบเทียบต้นทุนการผลิต PHB โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ.....	27
5 ผลของราคาสับสเตรท และผลผลิต PHB ต่อราคา PHB.....	28
6 ข้อแตกต่างระหว่างสปอร์(endospore) และเซลล์(vegetative cells).....	33
7 การเจริญเติบโตของ <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ.....	54
8 การเจริญเติบโตและการผลิต PHBโดย <i>Bacillus</i> sp.BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ฟรักโตส น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร และ แบ่งที่ผ่านการย่อย ที่มี ปริมาณน้ำตาลรวม 15 กรัมต่อลิตร.....	57
9 เปรียบเทียบการผลิต PHB ที่ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อ <i>Bacillus</i> sp.BA-019 โดยแหล่ง คาร์บอนได้แก่กลูโคส ฟรักโตส น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตรและแบ่งที่ผ่านการย่อย ที่มีปริมาณน้ำตาลรวม 15 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง.....	58
10 การเจริญเติบโต ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ของ <i>Bacillus</i> sp. BA-019 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน.....	61
11 เปรียบเทียบการผลิต PHB และการเจริญเติบโตเมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019โดย ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 2 และ 3 กรัมต่อลิตร.....	62
12 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต.....	66
13 จำนวนสปอร์ และ จำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 ในอาหาร เลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต.....	66
14 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร(ในชุดควบคุม).....	67
15 จำนวนสปอร์ และจำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 ในอาหาร เลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร(ในชุดควบคุม).....	67



สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
16 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	68
17 จำนวนสปอร์ และจำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	68
18 เปรียบเทียบสรุปการผลิต PHB และการสร้างสปอร์ที่ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณต่างกัน.....	69
19 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์.....	72
20 จำนวนสปอร์ และ จำนวน Vegetative cells ที่สร้างโดย <i>Bacillus</i> sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์.....	72
21 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม).....	73
22 จำนวนสปอร์ และจำนวน Vegetative cells ที่สร้างโดย <i>Bacillus</i> sp.BA-019 เมื่อมี แคลเซียมคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม).....	73
23 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	74
24 จำนวนสปอร์ และ Vegetative cells ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	74
25 เปรียบเทียบสรุป การผลิต PHB และการสร้างสปอร์ ที่ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ต่างกัน.....	75
26 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมกนีเซียคลอไรด์(ชุดควบคุม)	78

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
27 จำนวนสปอร์ และ จำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมงกานีสคลอไรด์(ชุดควบคุม).....	78
28 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	79
29 จำนวนสปอร์ และ จำนวน Vegetative cells ในชุดควบคุมเมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	79
30 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เท่ากับ 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	80
31 จำนวนสปอร์ และจำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เท่ากับ 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	80
32 เปรียบเทียบสรุป การผลิต PHB และการสร้างสปอร์ที่ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมงกานีสคลอไรด์ต่างกัน.....	81
33 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส.....	85
34 จำนวนสปอร์ และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส.....	85
35 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส.....	86
36 จำนวนสปอร์ และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส.....	86
37 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส.....	87
38 จำนวนสปอร์ และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส.....	87

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
39 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส.....	88
40 จำนวนสปอร์ และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส.....	88
41 สรุปผลการผลิต PHB และการจำนวนสปอร์ ที่ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 30 40 และ 45 องศาเซลเซียส.....	89
42 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 โดยใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร	93
43 จำนวนสปอร์ และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA 019 เท่ากับ 25 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร.....	93
44 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 โดยใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร	94
45 จำนวนสปอร์ และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 โดยใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร.....	94
46 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 โดยใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 75 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร	95
47 จำนวนสปอร์และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 โดยใช้ ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 75 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร.....	95
48 เปรียบเทียบ การผลิต PHB และการสร้างสปอร์ ที่ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรต่างกัน.....	96
49 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที.....	100
50 จำนวนสปอร์ และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 โดยใช้ ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที .....	100
51 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....	101



## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
52 จำนวนสปอร์และจำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....	101
53 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรีดิวซ์แห้ง เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 300 รอบต่อนาที.....	102
54 จำนวนสปอร์และจำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 300 รอบต่อนาที.....	102
55 เปรียบเทียบ การผลิต PHB และการสร้างสปอร์ที่ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ที่ความเร็วรอบของการเขย่าต่างกัน.....	103
56 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรีดิวซ์แห้ง เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 ด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์.....	107
57 จำนวนสปอร์และจำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 ด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์.....	107
58 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรีดิวซ์แห้ง เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์.....	108
59 จำนวนสปอร์และจำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์.....	108
60 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรีดิวซ์แห้งเมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์.....	109
61 จำนวนสปอร์และจำนวน Vegetative cellsเมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์.....	109
62 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรีดิวซ์แห้ง เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 ด้วยทริสบัฟเฟอร์.....	110
63 จำนวนสปอร์และจำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 ด้วยทริสบัฟเฟอร์.....	110
64 เปรียบเทียบ การผลิต PHB และการสร้างสปอร์ที่ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp.BA-019 ที่ค่าพีเอชต่างกัน.....	111



## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก PHA(ข้าว) และการย่อยสลายของขวดแชมพู ที่ผลิตจาก PHBV(ขวา).....	5
2 บัตรเครดิตที่ผลิตจาก PHA.....	6
3 ตัวอย่างอุปกรณ์ทางการแพทย์และเภสัชกรรม.....	7
4 วัฏจักรของ PHA.....	8
5 สูตรโครงสร้างของ PHA.....	16
6 แกนหมุนของ PHB ในเซลล์ของ <i>Ralstonia eutropha</i> .....	18
7 โครงสร้างผลึกของ PHB.....	20
8 วิธีการสังเคราะห์และวิธีการย่อยสลาย PHB โดยเชื้อ <i>Ralstonia eutropha</i> .....	23
9 โครงสร้างของสปอร์ <i>B. subtilis</i> ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	34
10 ขั้นตอนการสร้างสปอร์.....	36
11 ความสัมพันธ์ของการสร้างสปอร์ต่อกราฟการเจริญ.....	37
12 รูปแบบการเจริญเติบโต(Theoretical Growth Curves) และกราฟของค่า pH (pH curves)สำหรับ <i>Bacillus</i> ในถังหมัก.....	40
13 การเจริญเติบโตของ <i>Bacillus</i> sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ.....	54
14 รูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ โดย <i>Bacillus</i> sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม)	65
15 รูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ โดย <i>Bacillus</i> sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม)	71
16 รูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ โดย <i>Bacillus</i> sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมงกานีสคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	77
17 รูปแบบการผลิต PHB การสร้างสปอร์และการเจริญเติบโตของ <i>Bacillus</i> sp.BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส.....	84

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
18	รูปแบบการผลิต PHB การสร้างสปอร์และการเจริญเติบโตของ <i>Bacillus</i> sp.BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร.... 92
19	รูปแบบการผลิต PHB การสร้างสปอร์ และการเจริญเติบโตของ <i>Bacillus</i> sp.BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที..... 99
20	รูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ โดย <i>Bacillus</i> sp.BA-019 เมื่อควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์..... 106



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
% by wt	เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
CFU/ml	โคโลนีต่อมิลลิลิตร
GC	ก๊าซโครมาโตกราฟี(gas chromatography)
g/l	กรัมต่อลิตร
pH	ค่าความเป็นกรดต่าง



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 1

### บทนำ

ปัจจุบันพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันอย่างมาก เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น มีความทนทาน น้ำหนักเบา ควบคุมการซึมผ่านของออกซิเจนและน้ำได้ พลาสติกสังเคราะห์เหล่านี้ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น พอลิเอทิลีน (polyethelene) หรือ PE พอลิโพรไพลีน (polypropylene) หรือ PP พอลิสไตลีน (polystyrene) หรือ PS พอลิไวนิลคลอไรด์ (polyvinyl chloride) หรือ PVC และ พอลิเอทิลีนเทเรพทาเลท (polyethalene terephthalate) หรือ PET (EvansและSikdar,1990) การที่พลาสติกเหล่านี้ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความคงทนแข็งแรง ไม่เป็นสนิม มีสีสันสวยงาม น้ำหนักเบา ทำให้เป็นรูปร่างต่างๆได้ง่ายรวมทั้งทำให้เป็นเส้นใยและฟิล์มบางๆได้ ปริมาณการใช้พลาสติกเหล่านี้มีปริมาณสูงถึง 150 ล้านตัน (Brauneggและคณะ,1998) และมีการผลิตพลาสติกขึ้นมากกว่า 100 ล้านตันในทุกๆปี กรุงวอชิงตันมีการใช้พลาสติก 80 กิโลกรัม ในกลุ่มประเทศยุโรป 60 กิโลกรัม และในอินเดีย 2 กิโลกรัม (Kaliaและคณะ, 2000 ; Reddyและคณะ ,2003 ) การใช้พลาสติกที่เพิ่มมากขึ้นตามจำนวนประชากรโลกที่เพิ่มขึ้น ทำให้ปัญหาพลาสติกซึ่งเป็นปัญหาทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่สุดในปัจจุบัน ด้วยเหตุนี้เองความพยายามที่จะลดอันตรายและปัญหาที่เกิดจากพลาสติกในหลายประเทศ จึงมีโครงการจัดการของเสียที่เป็นของแข็ง (solid-waste management program) โดยทั่วไปการกำจัดขยะในโปรแกรมนี้มี 3 แนวทางคือ การฝังกลบ การเผาไหม้ และการนำกลับมาใช้ใหม่ 40 เปอร์เซ็นต์ของพลาสติกที่ผลิตขึ้น 75 ล้านปอนด์ในทุกปีถูกนำไปทิ้งโดยวิธีฝังกลบ การฝังกลบมีข้อเสียคือ พื้นที่รองรับขยะมีจำกัดและเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพต่ำ เนื่องจากพลาสติกนี้ใช้เวลาสลายตัวในดินนานทำให้เป็นอุปสรรคต่อการไหลซึมของน้ำ การเผาไหม้เป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนสูง และอาจมีปัญหาคาร์บอนควันหรือเขม่า รวมทั้งก๊าซพิษที่เกิดขึ้นเป็นสารเคมีอันตราย เช่น ไฮโดรเจนไซยาไนด์ ไฮโดรเจนคลอไรด์ และ คาร์บอนมอนนอกไซด์ซึ่งปล่อยออกมาในระหว่างการเผา (Reddyและคณะ ,2003 ) การนำกลับมาใช้ใหม่ บางครั้งก็พบว่าทำได้ยาก เนื่องจากต้องมีการจำแนกชนิดของพลาสติก และการเปลี่ยนวัตถุดิบที่เป็นพลาสติกเพื่อนำกลับไปใช้ใหม่มีข้อจำกัด นอกจากนี้ยังสามารถลดปัญหาขยะพลาสติกและ ปัญหาสิ่งแวดล้อมโดยการแทนที่พลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (eco-friendly products) รวมถึงพัฒนาพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ใน



ธรรมชาติ (biodegradable plastics) โดยที่พลาสติกดังกล่าวนี้ต้องมีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพลาสติกสังเคราะห์แบบเดิม และควรที่จะย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ( EvansและSikdar, 1990 ; Lee, 1996a ;Lee, 1996b ; Brauneggและคณะ,1998)

### พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ แบ่งเป็น 3 ชนิดได้แก่

#### 1). พลาสติกที่ย่อยสลายโดยอาศัยแสง

พลาสติกประเภทนี้จะมีหมู่ที่เปราะบางต่อแสงเป็นองค์ประกอบเมื่อสัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเล็ต(ใช้เวลาหลายสัปดาห์หรือนานเป็นเดือน) สามารถสลายตัวทำให้โครงสร้างพอลิเมอร์เปิดออก เป็นผลให้โมเลกุลของพลาสติกเล็กลงและแตกที่เรียกย่อยสลายได้ที่บริเวณนี้(Reddyและคณะ, 2003 )

#### 2). พลาสติกที่ย่อยสลายได้บางส่วน

พลาสติกประเภทนี้มีแบ่งเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง ทำให้ชิ้นส่วนพลาสติกมีขนาดเล็กลงเมื่อทิ้งพลาสติกประเภทนี้ในดินแบคทีเรียในดินจะเกาะกินแบ่ง แต่ยังคงเหลือชิ้นส่วนของพลาสติกซึ่งไม่สามารถย่อยสลายได้ เพียงแต่มีขนาดเล็กลง (Reddyและคณะ ,2003 )

#### 3). พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์

พอลิเมอร์ประเภทนี้สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติอย่างสมบูรณ์ได้เป็น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก ซึ่งไม่ทำให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม โดยพอลิเมอร์กลุ่มนี้ถูกสร้างและสังเคราะห์โดยสิ่งมีชีวิต biosynthesis) พอลิเมอร์กลุ่มนี้ได้แก่พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต(poly hydroxyalkanoate หรือ PHA ) พอลิแลคเตต ( polylactate หรือ PLA) อลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyesters) พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) พอลิเอสเทอร์เอไมด์ ( polyester amide) เป็นต้น (Chiellini, 1994 ; Lee ,1996a ; Reddyและคณะ ,2003)

ในกลุ่มพอลิเมอร์ที่ได้กล่าวมาข้างต้น พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต มีคุณสมบัติด้านต่างๆที่ใกล้เคียงกับพลาสติกที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี คือ พอลิโพรไพลีน และ พอลิเอทิลีน จึงมีความน่าสนใจในการวิจัยและพัฒนาเพื่อนำไปใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์บางชนิด การนำ PHA ไปใช้สามารถลดปัญหาค่าใช้จ่ายมหาศาลในการจัดการกับขยะพลาสติกที่มากขึ้น มีการนำพอลิเมอร์ในกลุ่ม PHA มาประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆในเชิงพาณิชย์ตั้งแต่ปี ค.ศ 1970 เนื่องด้วยในปีนั้นได้เกิดวิกฤตการณ์ขาดแคลนน้ำมัน ซึ่งส่งผลถึงการขาดแคลนวัตถุดิบในการผลิตพลาสติก

สังเคราะห์ โดยบริษัท Zeneca Bioproducts ในเครือบริษัท ICI (ปัจจุบันเป็นบริษัท Monsanto) ได้เริ่มวิจัยและพัฒนาผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม จนกระทั่งปัจจุบันมีการผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ในทางการค้าในชื่อ Biopol (มีส่วนผสมของโมโนเมอร์ 3HV เป็นองค์ประกอบไม่เกิน 24 โมลเปอร์เซ็นต์) ในการผลิต PHA ยังคงมีปัญหาด้านราคาผลิตภัณฑ์ที่สูงกว่าพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เนื่องจากกำลังการผลิตยังอยู่ในขนาดเล็ก คือ ประมาณ 600 ตันต่อปี ดังนั้นจึงได้เพิ่มกำลังการผลิตอีก 20 เท่าเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการ โดยผลิตภัณฑ์นี้ได้รับความนิยมอย่างมากในกลุ่มประเทศยุโรป ซึ่งข้อดีของ Biopol ก็คือช่วยลดขนาดพื้นที่ในการฝังกลบ และพบว่าจะย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วถ้าพอลิเมอร์อยู่ในภาวะการย่อยสลายแบบไร้อากาศ ซึ่งเหมาะสมกับการกำจัดโดยวิธีฝังกลบ (Flechter, 1990 และ Atlas, 1996 อ้างถึงใน <http://www.ICMA.com>) นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก PHA ที่ถูกนำไปใช้ประโยชน์ดังตารางที่ 1



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 บริษัทผู้ผลิต จุลินทรีย์และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม  
(Lee,1996a ; Reddyและคณะ, 2003)

จุลินทรีย์	บริษัทผู้ผลิต
<i>Alcaligenese eutrophus</i> H16	ZENECA Bio-product, UK
<i>A.latus</i>	Biotechnologische Forschungs gesellschaft mbH(Austria)
Bacteria	Petrochemical Danubia
	Biocorp (USA)
	Asahi Chemical and Institute of Physical and Chemical Research (Japan)
Recombinant <i>Escherichia coli</i>	Bio Ventures Alberta Inc. (Canada)
วัตถุดิบที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Starch	Warner's Lambert (USA)
	Fertec, Italy ( Ferruzie tecnologia)
	Biotec (Melitta) Emmerich (Germany)
	BASF Ludwigshafen (Germany)
	Bayer/Wolf Walsrode Leverkusen (Germany)
	Novamont Novara (Italy)
Cheap substrate	Polyferm Inc. (Canada)

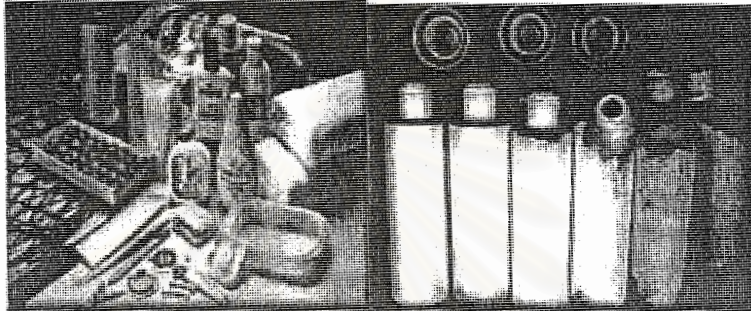
สถาบันวิจัยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์

ในการใช้ PHA สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทดังนี้

การประยุกต์ใช้ด้านบรรจุภัณฑ์ หรือ วัสดุใช้สอย

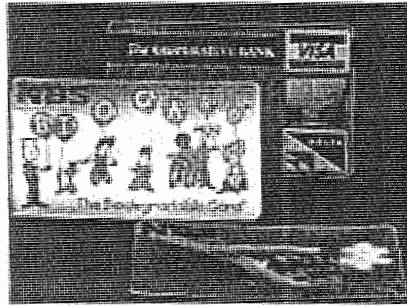
1. ใช้ผลิตขวดแชมพู บริษัทWella ผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผมของเยอรมัน ได้ออกวางจำหน่ายขวดแชมพูที่ผลิตจาก PHBV ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก PHA(ซ้าย) และ  
การย่อยสลายของขวดแชมพูที่ผลิตจาก PHBV(ขวา)  
([www.metabolix.com/publications/pressreleases.html](http://www.metabolix.com/publications/pressreleases.html))

2. ใช้ทำวัสดุที่ใช้ครั้งเดียวทิ้ง เช่น ผ้าอ้อม ผ้าอนามัย ด้ามมีดโกน เป็นต้น(Cox,1994 ; Lee, 1996a)
3. ใช้ทำบรรจุภัณฑ์ประเภทถุง ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จ รูปแผ่นฟิล์มถนอมอาหาร(Doi,1990 ; Lee, 1996a)
4. ใช้ทำแผ่นกรองอากาศทำจากแกรนูลของสวอนผสมไซเดียมคลอไรด์ 90 เปอร์เซ็นต์และ PHBV 10 เปอร์เซ็นต์
5. ทำวัสดุอื่นๆ เช่น ที่วางลูกกอล์ฟ กาวที่ละลายด้วยความร้อน สารเคลือบผิว แผ่นฟิล์ม บัตรเครดิต (รูปที่2) วัสดุเส้นใย (โดยถ้าผสม PHB ลงในเส้นใยฝ้าย จะช่วยให้สมบัติในการรับความร้อนและคายความร้อนของเส้นใยช้าลง และเพิ่มความแข็งแรงให้กับเส้นใย) (Egging และคณะ ,1992 ; Lee,1996a ; Madison และ Huisman, 1999)





รูปที่ 2 บัตรเครดิตที่ผลิตจาก PHA

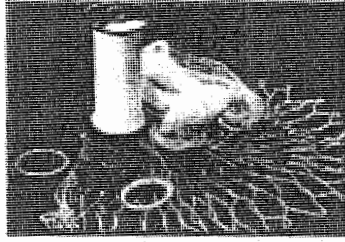
([www.metabolix.com/publications/pressreleases.html](http://www.metabolix.com/publications/pressreleases.html))

### การประยุกต์ใช้ทางการเกษตร

1. วัสดุผลิตแคปซูลบรรจุยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช หรือปุ๋ย โดยเมื่อไปรยลงในแปลงเพาะปลูกจะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน แล้วตัวยาถูกปล่อยออกมาทีละน้อย ช่วยให้ประหยัดค่าแรงและค่าใช้จ่ายในการฉีดยาป้องกันโรครวมทั้งการใส่ปุ๋ย (Lee, 1996a)
2. ใช้ทำแคปซูลบรรจุยาป้องกันโรค เช่น ยาถ่ายพยาธิ วัคซีนป้องกันโรคระบาด เป็นต้น ช่วยให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการกระตุ้นซ้ำ
3. ทำแหจับปลา สำหรับใช้ในน้ำทะเลได้เป็นเวลานาน และสามารถกำจัดเมื่อเลิกใช้โดยทิ้งลงน้ำได้เลย (ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.25) เนื่องจากสามารถย่อยสลายอย่างรวดเร็ว (Brandl และคณะ, 1995)

### การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และเภสัชกรรม

1. วัสดุทางด้านศัลยกรรม เช่น หลอดเลือดเทียม กระดูกเทียม เข็มเย็บผ้า ไหมเย็บแผล (รูปที่ 3) ผ้าซับเลือด เป็นต้น
2. แคปซูลบรรจุยา เพื่อให้แคปซูลถูกย่อยสลายอย่างช้าๆ ในร่างกาย ทำให้ร่างกายได้รับยาครั้งละน้อยเป็นเวลานาน



### รูปที่ 3 ตัวอย่างอุปกรณ์ทางการแพทย์และเภสัชกรรม

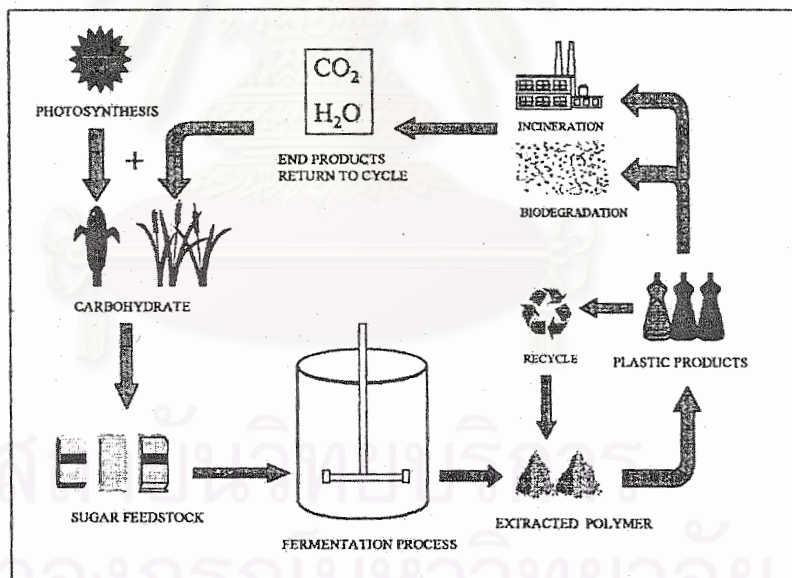
(<http://www.metabolix.com>)

3. ด้านทันตกรรม ใช้เป็นวัสดุตัวนำที่ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นใหม่ในโรคด้านปริทันต์ (periodontitis) (Zinnและคณะ,2001)
4. ใช้ร่วมกับคอมพิวเตอร์ในการดูภาพอัลตราซาวด์ (Zinnและคณะ,2001)
5. ใช้ในการบำบัดผู้ที่ติดแอลกอฮอล์ และโรค narcolepsy
6. ใช้ PHA เป็นสารตั้งต้นในการผลิต *R*-(-)-3-hydroxybutyric acids ซึ่งสารนี้เป็นส่วนประกอบสำคัญที่พบในเลือดโดยปกติ มีความเข้มข้นระหว่าง 0.3 และ 1.3 มิลลิโมลาร์ (Zinnและคณะ,2001) สาร *R*-(-)-3-hydroxybutyric acids สามารถใช้เป็น chiral building blocks สำหรับสังเคราะห์สารเคมีบริสุทธิ์ เช่น ยาปฏิชีวนะ วิตามิน และ ฟีโรโมน (pheromone) (MadisonและHuisman, 1999 ; Luengoและคณะ, 2003) PHB สามารถถูกไฮโดรไลซ์เป็น *R*-(-)-3-hydroxybutyric acids ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่ง *R*-(-)-3-hydroxybutyric acids ถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ยาโดยบริษัท Mercks ได้แก่ยา anti-glaucoma มีชื่อทางการค้าว่า "Truspot" (Reddyและคณะ ,2003)

เอสเทอร์ของกรดไฮดรอกซี ( $\beta$ -hydroxy acid esters) และอนุพันธ์สามารถเตรียมเป็นตัวทำละลายที่ไม่เป็นผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม (green solvent) เหมือนกับ เอสเทอร์ของกรดแลกติก (lactic acid esters) โดยเปลี่ยนกรดไฮดรอกซีให้อยู่ในรูปกรดโครโตนิก เช่น 1,3-butanediol กับแลกโตนเป็นต้น (Reddyและคณะ ,2003)

## วัฏจักรของ PHA

PHA นอกจากมีสมบัติในการถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ด้วยวิธีทางชีวภาพ และสามารถนำมาใช้ทดแทนพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีบางชนิดได้ PHA ยังสามารถผลิตจากวัตถุดิบที่เป็นทรัพยากรที่ผลิตขึ้นทดแทนได้ใหม่(renewable resource) ซึ่งเป็นข้อดีอีกประการหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกที่ได้จากวัตถุดิบประเภทฟอสซิล ซึ่งใช้เวลานานมากในการสร้างทดแทนขึ้นใหม่ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ วัฏจักรของ PHA แสดงในรูปที่ 4 เริ่มจากการผลิต PHA จากวัตถุดิบทางการเกษตรโดยกระบวนการหมัก จุลินทรีย์จะสร้างและสะสมแกรนูลของPHAที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ จากนั้นนำ PHA มาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกต่างๆ หลังจากผ่านการใช้งานแล้ว PHA อาจจะถูกกำจัดเช่นเดียวกับขยะประเภทของแข็งทั่วไป เมื่อเกิดการย่อยสลายโดยธรรมชาติจะได้เป็นปุ๋ยที่มีแหล่งอินทรีย์คาร์บอนที่สมบูรณ์ ช่วยเพิ่มปริมาณน้ำรักษาปริมาณสารอาหารในดิน และสามารถยับยั้งการเกิดโรคพืชบางชนิดได้ เมื่อย่อยสลายสมบูรณ์จะได้น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้สำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชและนำกลับมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิต PHA ต่อไป



รูปที่ 4 วัฏจักรของ PHA



PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (aliphatic polyesters) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวหนึ่ง กับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์อีกตัวหนึ่งตรงตำแหน่งปีต้าคาร์บอน PHA มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของโมโนเมอร์ที่มาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น โสโมพอลิเมอร์(พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ชนิดเดียว) ได้แก่ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ Poly(3-hydroxybutyrate) ; P(3HB) ; PHB พอลิไฮดรอกซีวาเลเลตหรือ Poly(3-hydroxyvalerate) ; P(3HV) ; PHBV โคพอลิเมอร์(พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิด) ได้แก่ Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate);P(3HB-co-3HV) Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) ; P(3HB-co-4HB) และ เทอร์พอลิเมอร์ (พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิด) ได้แก่ Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate- co-4-hydroxybutyrate) ; P(3HB-co-3HV-co-4HB) เป็นต้น พอลิเมอร์แต่ละชนิดมีสมบัติทางเคมีกายภาพ และสมบัติเชิงกลที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบของโมโนเมอร์จึงสามารถเลือก PHA ตามวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้งาน PHB เป็น PHA ชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจและมีประโยชน์เนื่องจากมีสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ คล้ายพลาสติกสังเคราะห์ PP และPE สามารถย่อยสลายอย่างสมบูรณ์โดยวิธีทางชีวภาพ มีสมบัติไพโซอิเล็กทริก(piezoelectric) และเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต(biocompatibility) มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก สามารถนำไปผสมกับพอลิเมอร์อื่น ๆ เพื่อให้มีสมบัติตามต้องการ ดังนั้นจึงสามารถนำ PHB ไปประยุกต์ใช้งานด้านต่าง ๆ ทั้งทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรมเภสัชกรรม (Brauneggและคณะ,1998) และยังสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิต R(-)-3-hydroxycarboxylic acids (Fishman และคณะ, 2001; Leeและคณะ, 1999)ซึ่งสามารถใช้เป็น chiral building blocks สำหรับสังเคราะห์สารเคมีบริสุทธิ์ เช่น ยาปฏิชีวนะ วิตามิน และ พีโรโมน (MadisonและHuisman, 1999 ; Luengo และคณะ, 2003) ซึ่งสารดังกล่าวสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีได้ยาก และไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิต PHB จาก *Bacillus* sp.BA-019 ซึ่งแยกได้โดย รัตนศิริ มุทิตากุล(2538) พบว่าสามารถผลิต PHB จากกากน้ำตาลปริมาณ 4 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่น ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 31.84 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ต่อมาอติพล บุญเรืองถาวร(2543) ศึกษาการศึกษาการเพิ่มปริมาณ PHB โดยเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในถังหมักเพื่อให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูง(high cell density) สามารถผลิต PHBได้เท่ากับ 42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 72.57 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามปริมาณ PHB ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. BA-019 ยังมีปริมาณอยู่ในเกณฑ์ไม่สูงเท่าที่ควร สาเหตุประการหนึ่งที่ผู้วิจัยที่ได้ทำการวิจัยก่อนหน้านี้(รัตนศิริ มุทิตากุล, 2538 ; อติพล บุญเรืองถาวร , 2543)รายงานผลไว้ มีข้อสังเกตได้ว่าปริมาณ PHB ที่ผลิตได้สูงสุดแล้ว จะลดลงอย่างรวดเร็ว จึงคาดว่าสาเหตุประการหนึ่งอาจมาจากการที่ *Bacillus* sp.BA-019 เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ และในการวิจัยของผู้วิจัย(รัตนศิริ มุทิตากุล, 2538 ; อติพล บุญเรืองถาวร , 2543 และ ศศิพร โกมลเกษรวัช ,2545)ที่ศึกษาโดยใช้ *Bacillus* sp.BA-019 พบว่าสาเหตุหนึ่งอาจเป็นเพราะว่าแบคทีเรียนี้สามารถสร้างสปอร์และโดยทั่วไปเป็นที่ทราบว่าจะมีการใช้สาร PHB สำหรับการสร้างสปอร์จึงตั้งข้อสมมติฐานว่าการที่ปริมาณ PHB นั้นลดลงอาจเกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์โดย *Bacillus* sp. BA-019 ได้แก่องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อคือ แร่ธาตุ (แมกนีเซียม แคลเซียม และ แมงกานีส) ภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณอากาศ และค่าความเป็นกรดต่าง(พีเอช ; pH) การศึกษาปัจจัยเหล่านี้จะมุ่งที่การผลิต PHB เป็นหลัก เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิต PHB

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์โดย *Bacillus* sp.BA-019 โดยศึกษาผลขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ ผลของภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงเชื้อ

## ขั้นตอนการวิจัย

1. วิธีการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต PHB
2. ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิต PHB และ แร่ธาตุ ได้แก่ แมกนีเซียม แคลเซียม และ แมงกานีส ที่มีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์
3. ศึกษาภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณอากาศ และค่าพีเอช ที่มีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ได้ทราบถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ดังนั้นเมื่อทราบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์ สามารถทำให้ควบคุมภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อการผลิต PHB ให้ได้ปริมาณสูงขึ้น

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## วารสารปริทัศน์

### พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate) หรือ PHA

PHA เป็นพอลิเอสเทอร์ชนิดหนึ่งจัดอยู่ในกลุ่มไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นและสะสมได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตประเภทโปรคาริโอต (prokaryote) และยูคาริโอต (eukaryote) ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ รา สาหร่าย และยีสต์ PHA ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ในภาวะที่มีการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือ ออกซิเจน และมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป โดย PHA ที่สังเคราะห์ขึ้นจะถูกเก็บไว้อยู่ในรูปของแกรนูลภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ จำนวนและขนาดของแกรนูลในแต่ละเซลล์ จะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น *Ralstonia eutropha* จะมีแกรนูล 8-13 แกรนูลต่อเซลล์ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแกรนูลเท่ากับ 0.2-0.5 ไมครอน (Doi, 1990) จุลินทรีย์เก็บ PHA ที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน หรือแหล่งของรีดิวซิงเพาเวอร์ PHA ประกอบด้วยหน่วยโมโนเมอร์หลายชนิดโดยพบมากกว่า 90 ชนิด ซึ่งทั้งหมดอยู่ในรูป D-(-)-configuration เนื่องจากความจำเพาะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHA PHA มีสมบัติทางเคมีและกายภาพที่คล้ายกับพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีบางชนิด เช่น PE และ PP เมื่อ PHA ถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์โดยจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรีย สาหร่าย และ เชื้อรา ซึ่งมีอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน ทะเล และ ในน้ำทิ้ง ได้ผลเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก (และมีเทนภายใต้ภาวะที่ไร้อากาศ) ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังสามารถนำ PHA มาใช้ได้ใหม่ได้เช่นเดียวกับพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีที่ใช้ในปัจจุบัน ดังนั้นจึงได้มีความพยายามในการนำ PHA มาประยุกต์ใช้แทนพลาสติกสังเคราะห์ดังกล่าว (Anderson และ Dawes, 1990; Lee, 1996a,b; Madison และ Huisman, 1999)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## การค้นพบ PHA

PHA ที่ถูกค้นพบเป็นชนิดแรกได้แก่ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate) หรือ PHB ค้นพบในเซลล์ของ *Bacillus megaterium* โดย นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสชื่อ Lemoigne (อ้างถึงใน Braunegg, 1998 ; Zinn, 2001) Wallen และ Rodwedder (1974) รายงานการค้นพบ PHA ชนิดอื่นนอกจาก PHB โดยพบเสทเทอร์โรพอลิเมอร์ที่สกัดได้ในส่วนคลอโรฟอร์มของ activated sewage sludge โดยพบว่า PHA ประกอบด้วย 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตเป็นองค์ประกอบหลัก และมีกรดไฮดรอกซีที่มีคาร์บอนจำนวน 6-7 อะตอมเป็นองค์ประกอบรอง โดยเสทเทอร์โรพอลิเมอร์ที่ได้นี้มีจุดหลอมเหลวต่ำกว่า PHB และไม่ละลายในเอทานอลร้อนเช่นเดียวกับไฮโมพอลิเมอร์ Findley และ White (1983) ตรวจสอบพอลิเมอร์ที่สกัดจากตะกอนทะเลที่ได้จากโดยใช้การวิเคราะห์ด้วย capillary gas-chromatography (GC) พบ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต ส่วนพอลิเมอร์ที่สกัดได้จาก *B. megaterium* พบ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรตประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ 3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอตประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ 3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต 2 เปอร์เซ็นต์ และ กรด 3-ไฮดรอกซีอื่นๆ อีกเล็กน้อย Odham และคณะ (1986) พบว่า PHA ใน sewage sludge มีคาร์บอน 4, 6 และ 8 เป็นองค์ประกอบ ต่อมาในปี 1988 Legeveen รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas oleovorans* ใน octane พอลิเมอร์ที่ได้มี 3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต และ 3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอตเป็นองค์ประกอบหลักและองค์ประกอบรองตามลำดับ (อ้างถึงใน Anderson และ Dawes, 1990)

## จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์และสะสม PHA

จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ สามารถสังเคราะห์และสะสม PHA ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่สะสม PHA (Brandlและคณะ, 1990 ; Lee, 1996a ; Madison และ Huisman,1999)

<i>Acidovorax</i>	<i>Gamphosphaeria</i>	<i>Photobacterium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Actinobacillus</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Actinomycetes</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Aphanothece</i>	<i>Lamprocystis</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Synechococcus</i>
<i>Burkladeria</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Chloroflexus</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Thiocapsa</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Thiosphaera</i>
<i>Derxia</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Oceanospirillum</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Zoogloea</i>
<i>Ferrobacillus</i>	<i>Paucispirillum</i>	

## การผลิต PHB จากจุลินทรีย์ (Lee,1996b)

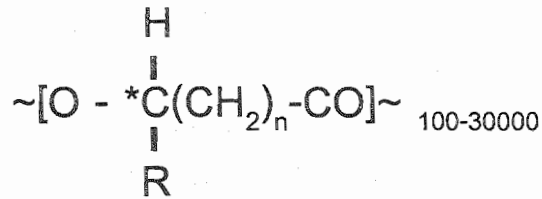
การผลิต PHB จากจุลินทรีย์สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ

1. growth-associated production เป็นการผลิต PHB โดยไม่จำเป็นต้องมีการจำกัดปริมาณสารอาหารที่จำเป็น จุลินทรีย์สามารถสะสมพอลิเมอร์ในระหว่างการเติบโต จุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ เช่น *Alcaligenes latus* สายพันธุ์กลายพันธุ์ของ *Azotobacter vinelandii* recombinant *Escherichia coli* เป็นต้น

2. non growth-associated production เป็นการผลิต PHB โดยจำเป็นต้องมีการจำกัดปริมาณสารอาหารที่จำเป็น เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โบแทสเซียม ออกซิเจน หรือ ซัลเฟอร์ เมื่อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์และสะสม PHB ได้เพิ่มขึ้น จุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มนี้เช่น *Ralstonia eutropha*, *Protomonas extroquens* และ *Pseudomonas oleovorans* เป็นต้น

## โครงสร้างของ PHA

PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (aliphatic polyesters) ที่ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ออกซิเจน และไฮโดรเจน สูตรโครงสร้างทั่วไปแสดงดังรูปที่ 5 โมโนเมอร์ของสายพอลิเมอร์ต่อกันแบบหัวต่อหาง โดยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวแรกกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์ตัวถัดไปตรงตำแหน่งปีศาจคาร์บอน ซึ่งจะเป็นไครัลคาร์บอน(chiral carbon) ที่แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration หมู่อัลคิล(R) อาจจะเป็นแบบพันธะไม่อิ่มตัว(unsaturated) แบบอะโรมาติก(aromatic) แบบฮาโลเจเนต(halogenate) หรือแบบแตกกิ่งก้าน(branched)ได้ (MadisonและHuisman,1999)



รูปที่ 5 สูตรโครงสร้างของ PHA (Lee และคณะ, 1996a,b ; Braunegg และคณะ, 1998)

~ คือพันธะเอสเทอร์

\*C คือตำแหน่งปีต้าคาร์บอน

เมื่อ n = 1	R = ไฮโดรเจน(H)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต)	; P(3HP)
	R = เมทิล (CH <sub>3</sub> )	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต)	; P(3HB)
	R = เอทิล (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	; P(3HV)
	R = โพรพิล (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต)	; P(3HHx)
	R = บิวทิล (C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต)	; P(3HH)
	R = เพนทิล (C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต)	; P(3HO)
	R = เฮกซิล (C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> )	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโนนาโนเอต)	; P(3HN)
	R = เฮปทิล (C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเดกคาโนเอต)	; P(3HD)
	R = ออกทิล (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีอันเดกคาโนเอต)	; P(3HUD)
	R = โนทิล (C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> )	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโดเดกคาโนเอต)	; P(3HDD)
เมื่อ n = 2	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ(4-ไฮดรอกซีบิวทีเรต)	; P(4HB)
เมื่อ n = 3	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ(5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	; P(5HV)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## การจัดจำแนกชนิดของ PHA

### 1. การจัดจำแนกชนิดตามองค์ประกอบทางเคมีของโมโนเมอร์(Luengoและคณะ,2003)

- 1.1 พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีอนุพันธ์ของกรดไขมันแบบอะโรมาติก
- 1.2 พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีอนุพันธ์ของกรดไขมันทั้งแบบอลิฟาติกและแบบอะโรมาติก
- 1.3 พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีสารประกอบอื่น เช่น poly- $\gamma$ -glutamic acid

### 2. การจัดจำแนกชนิดตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยโมโนเมอร์(Leeและคณะ ,1996a ; Yimและคณะ,1996 ; Hazenberg และWithlot, 1997)

- 2.1 short-chain-length (SCL) PHA คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 3-5 อะตอม
- 2.2 mediem-chain-length (MCL) PHA คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 6-14 อะตอม
- 2.3 long-chain-length (LCL) PHA คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมมากกว่า 14 อะตอม

### 3. การจัดจำแนกชนิดโดยแบ่งตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์แบ่งเป็น 2 ประเภทดังนี้

3.1 โฮโมพอลิเมอร์(homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน ตัวอย่างเช่น พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และพอลิ-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxyvalerate) เป็นต้น

3.2 เฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบดังนี้

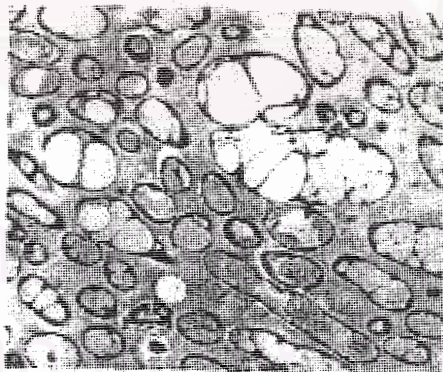
-โคพอลิเมอร์(copolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) หรือ PHBV] พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate หรือ P(3HB-co-4HB))] เป็นต้น



-เทอร์พอลิเมอร์(terpolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตโค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต [poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate co-4-hydroxybutyrate ; P(3HB-co-3HV-co-4HB)] พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตโค-4-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate co-4-hydroxyvalerate; P(3HB-co-3HV-co-4HV)] เป็นต้น

### พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ PHB

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) (Poly-3-hydroxybutyrate) หรือ PHB เป็นโฮโมพอลิเมอร์ของ3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และเป็นสารในกลุ่ม PHA ที่สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด PHB ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นถูกเก็บไว้ในแกรนูลภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (ดังแสดงในรูปที่ 6) แกรนูล PHB ถูกหุ้มด้วยเมมเบรนที่มีไขมันและโปรตีนหนาประมาณ 2 นาโนเมตร PHB ที่แยกได้จากเซลล์แบคทีเรียมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากประมาณ $10^5$ - $10^6$  และมีระดับความเป็นผลึก (degree of crystallinity)สูง (มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) มีอุณหภูมิหลอมละลายประมาณ 180 องศาเซลเซียสซึ่งแตกต่างจากพอลิเมอร์ทางชีวภาพอื่น ๆ เช่นโปรตีนและพอลิแซคคาไรด์ (Byrom,1987;Doi,1990) แบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถสะสม PHB ได้มากถึง 30-80 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเติบโตภายใต้ภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอและมีการจำกัดปริมาณสารอาหารจำเป็น(Lee,1996 a; Madison และ Huisman,1999)



รูปที่ 6 แกรนูลของ PHB ในเซลล์ของ *Ralstonia eutropha*  
([www.che.kaist.ac.kr/~biosyst/research/pha/pha.html](http://www.che.kaist.ac.kr/~biosyst/research/pha/pha.html))

## หน้าที่ของ PHB

1. เป็นแหล่งพลังงาน และ/หรือ แหล่งคาร์บอน (Dawes และ Senior , 1973 ; Doi, 1990 ; Braunegg และคณะ , 1998)

จุลินทรีย์ใช้ PHB เป็นแหล่งคาร์บอน และ แหล่งพลังงานในภาวะขาดแคลนสารอาหารเพื่อความอยู่รอด Macrae และ Wilkenson (1958) กล่าวว่า *Bacillus megaterium* ที่มีปริมาณ PHB สูง ช่วยชะลอการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) และการตายเนื่องจากขาดไนโตรเจน Sierra และ Gibbons (1962) ศึกษาบทบาทของ PHB ต่อการหายใจและการอยู่รอดของ *Micrococcus halodenitrificans* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการอยู่รอดและปริมาณ PHB Stokes และ Parson (1968) พบว่า *Sphaerotilus discophorus* ที่มีปริมาณ PHB สะสมอยู่มากจะอยู่รอดได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่มี PHB หรือมีปริมาณน้อย เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Tal และ Oken (1985) พบว่าเซลล์ *Azospirillum brasilense* ที่มีปริมาณ PHB สูง มีความสามารถในการอยู่รอดได้ดีกว่าเซลล์ที่มี PHB ต่ำ

2. การสร้างสปอร์ (sporulation) และการสร้างซีสต์ (encystment)

PHB เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ และการสร้างซีสต์ Juni และ Heym (1956) พบว่า *Bacillus cereus* สายพันธุ์ T นำ PHB ไปใช้ในการสร้างสปอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่าพีเอชสูง Kominek และ Halvorson (1965) รายงานว่า *B. cereus* สร้างและสะสม PHB โดยใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณ PHB สูงสุดอยู่ในช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ หลังจากนั้นปริมาณ PHB จะลดลงเนื่องจากการสร้างสปอร์ ทั้งยังศึกษาเมแทบอลิซึมของ PHB และอะซิโตอิน (acetoin) ในเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ T พบว่าการสังเคราะห์ PHB เริ่มต้นขึ้นหลังจากเชื้อหยุดเจริญเติบโต และสามารถสะสม PHB ได้สูงสุดก่อนเกิดการสร้างสปอร์ ซึ่งในระหว่างกระบวนการสร้างสปอร์ PHB จะถูกย่อยสลาย Nakata (1963) พบว่า *B. cereus* ใช้อะซิเตตและ PHB เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับการสร้างสปอร์เช่นกัน Kofronova และ คณะ (1994) รายงานว่า *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ 27 สามารถผลิต PHB ได้ และการเพิ่มของอุณหภูมิในอาหารเลี้ยงเชื้อจนถึง 43.5 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ และเพิ่มการผลิต PHB ในอาหาร SGAc จาก 35 เป็น 53 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Stevenson และ Socolofsky (1966) พบว่าการสะสม PHB โดย *Azotobacter vinelandii* เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตที่ไม่สมดุล เซลล์จะใช้แหล่งคาร์บอนภายนอกได้เร็วกว่าการตรึงไนโตรเจนที่



จำเป็นสำหรับการเปลี่ยนไปเป็นองค์ประกอบ จะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับการสร้างชีสต์

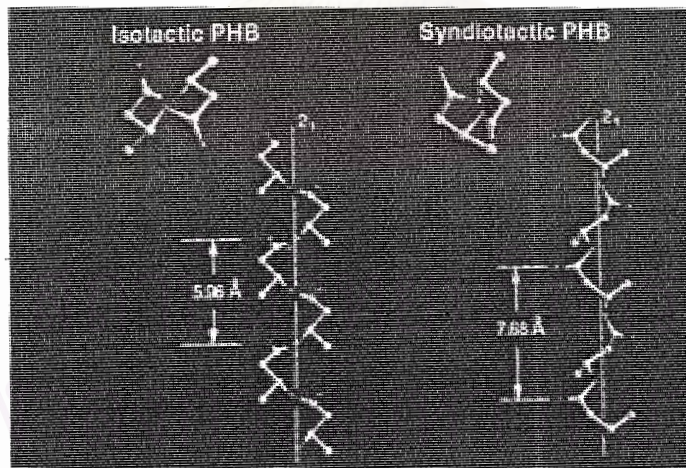
### 3. เป็นแหล่งอิเล็กตรอน (electron sink)

Jackson และ Dawes (1976) รายงานว่า *Azotobacter beijerinckii* มี NADH oxidase Activity ต่ำลงเมื่อจำกัดปริมาณออกซิเจน แต่อัตราส่วน NADH/NAD ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นทันทีเมื่อออกซิเจนหมดไป ในภาวะที่มีการจำกัดปริมาณออกซิเจนและมีอิเล็กตรอนมากเกินไป เซลล์เกิดการทำลายอิเล็กตรอนที่มากเกินไปโดยนำไปใช้ในปฏิกิริยารีดักชันแทนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน กรณีที่ออกซิเจนจำกัดจึงทำให้เกิดการสร้าง PHB ขึ้น

### โครงสร้างและสมบัติของ PHB

#### 1. โครงสร้างผลึก (crystal structure)

Cornibert และ Marchessault (1972) (อ้างถึงใน Dawes และ Senior, 1973 ; อ้างถึงใน Doi, 1990) ศึกษาโครงสร้างผลึกของ PHB โดยใช้เทคนิค X-ray diffraction พบว่ารูปร่าง (conformation) ของโมเลกุล PHB เป็นแบบอัดตัวแน่น (compact) และเกลียวหมุนขวา (right-handed  $2_1$  helix) และมีหน่วยซ้ำ (fiber repeat) 0.596 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 7 (รูปซ้าย)



รูปที่ 7 โครงสร้างผลึกของ PHB (Doi, 1990)

[ww2.mcgill.ca/.../marchessault/Research-publications.html](http://ww2.mcgill.ca/.../marchessault/Research-publications.html)

## 2. สมบัติทางกายภาพและความร้อน(physical และ thermal property)

PHB มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก อุณหภูมิหลอมเหลว(melting temperature)ประมาณ 180 องศาเซลเซียส เมื่อผลึกเย็นลงอย่างช้าๆหลังจากการหลอมเหลวได้เป็นสเฟียรูไลต์(spherulites) ขนาดใหญ่ PHBมีสถานะของแข็งคล้ายแก้ว(glass state) ที่อุณหภูมิกลาสทรานสิชัน(glass-transition)ประมาณ 4 องศาเซลเซียส เมื่อตกตะกอน PHB ด้วยสารละลายเจือจางจะได้ผลึกเป็นชั้นบางๆ ซึ่งความหนาของชั้นผลึกขึ้นกับอุณหภูมิการเกิดผลึก (crystallization temperature) และน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ค่า Young's modulus และ tensile strength ของแผ่นฟิล์ม PHB ใกล้เคียงกับ PP สมบัติบางประการของ PHB เปรียบเทียบกับพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี แสดงในตารางที่ 3 (Doi ,1990)

ตารางที่ 3 สมบัติทางกายภาพและความร้อนบางประการของพอลิเมออร์(Doi ,1990)

Properties	P(3HB)	Polypropylene	Poly(Ethylene Terephthalate)	Nylon-6,6
- Melting temperature( <sup>o</sup> c)	180	176	267	265
- Glass transition temperature( <sup>o</sup> c)	4	-10	69	50
- Crystallinity(%)	60-80	50-70	30-50	40-60
- Density(G/cm <sup>3</sup> )	1.250	0.905	1.385	1.14
- Water uptake(wt %)	0.2	0.0	0.4	4.5
- Young modulus(GPa)	3.5	1.7	2.9	2.8
- Tensile strength(MPa)	40	38	70	83
- Extension needed to break(%)	6	400	100	60

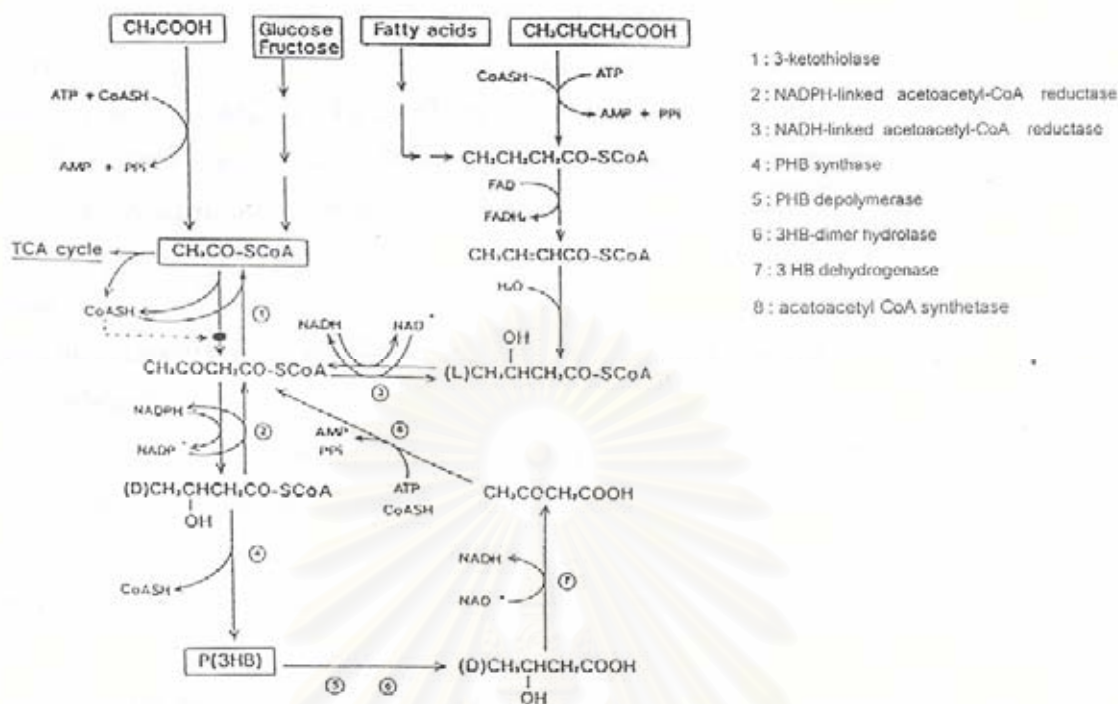


น้ำหนักโมเลกุลเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์ โดยมีส่งผลต่อคุณสมบัติกลศาสตร์ ความสามารถในการละลาย และความหนืด เป็นต้น PHB ที่ผลิตได้จะมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ และภาวะในการเลี้ยงเชื้อ(Doi, 1990) Yeom และ Yoo (1995) รายงานการศึกษาผลของค่าพีเอชต่อน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ซึ่งผลิตได้จาก *Alcaligenes* sp. K-912 พบว่าเมื่อใช้ค่าพีเอชในการเลี้ยงเชื้อสูงขึ้นจะได้ PHB ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 6.5 7.0 และ 8.0 PHB ที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 150,000 250,000 580,000 และ 650,000 ตามลำดับ

### วิธีการสังเคราะห์ PHB

การสังเคราะห์และการควบคุมการสังเคราะห์ PHB ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในเชื้อ *Alcaligenes latus*, *Ralstonia eutropha*, *Zoogloea ramigera* และ *Azotobacter beijerinckii* กลไกการสังเคราะห์ PHB ภายในเซลล์เกิดขึ้นโดยผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม (รูปที่ 8) ซึ่ง PHB จะถูกสังเคราะห์จากสารตั้งต้นคือ อะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่สำคัญ 3 ชนิดได้แก่ 3-ketothiolase จะเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของอะซิติลโคเอ 2 โมเลกุล ให้เป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ (Acetoacetyl-CoA) จากนั้นสารดังกล่าวนี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็น ดี(-)-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ (D(-)-3-hydroxybutyryl CoA) โดยการเร่งปฏิกิริยาของ NADPH/NADH-linked acetoacetyl-CoA reductase และเกิดปฏิกิริยาพอลิเมไรเซชัน (polymerization) ไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB synthase (Anderson และ Dawes, 1990; Doi, 1990; Braunegg, 1998)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 วิธีการสังเคราะห์และวิธีการย่อยสลาย PHB โดย *Ralstonia eutropha* ( Doi, 1990 ; Lee และคณะ, 1999)

ในระหว่างการศึกษาเจริญเติบโตแบบปกติของจุลินทรีย์ เกิดการคาตาบอลิซึมสารคาร์โบไฮเดรตผ่านวิถี Entner-Doudoroff ไปเป็นไพรูเวต ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นอะซีติลโค-เอ โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน(dehydrogenation) ดังนั้นอะซีติลโค-เอจะเข้าสู่ tricarboxylic acid(TCA) ด้วยการปล่อย CoASH และถูกออกซิไดซ์ได้คาร์บอนไดออกไซด์และพลังงานในรูป ATP และ reducing equivalents(NADH , NADPH และ  $FADH_2$ ) จุลินทรีย์จะนำพลังงานและสารตั้งต้น(biosynthetic precursors) ที่ได้ไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป อัตราที่อะซีติลโค-เอเข้าสู่ TCA cycle ขึ้นกับแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแร่ธาตุอื่นๆ ดังนั้นอัตราการสังเคราะห์ PHB จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีอะซีติลโค-เอปริมาณมาก ซึ่งจะเกิดขึ้นในภาวะที่เซลล์ขาดแคลนธาตุอาหารจำเป็น พบว่าเชื้อ *A.eutrophus* ที่ขาดแคลนสารอาหารดังนี้ คือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน แมกนีเซียม หรือ ซัลเฟต กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนจะสิ้นสุดลง เป็นผลให้ NADH และ NADPH มีปริมาณสูงขึ้น ซึ่งจะยับยั้ง citrate synthase และ isocitrate dehydrogenase เป็นผลให้เกิด TCA cycle ช้าลง และอะซีติลโค-เอจะเข้าสู่การสังเคราะห์ PHB ได้เพิ่มมากขึ้น (Doi,1990 ; Braunegg, 1998)

## การผลิต PHB จาก *Bacillus* sp.

หลังจาก Lemoigne(1926) ได้ตรวจพบ PHB ใน *Bacillus megaterium* เป็นต้นมา มีการทำวิจัยเกี่ยวกับการผลิต PHB มากขึ้น ปี 1958 Williamson และ Wilkinson ทำการสกัดและหาปริมาณ PHB ใน *Bacillus* สปีชีส์ต่างๆ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งทำให้เซลล์เกิดการย่อยสลายและปล่อย lipid inclusion ที่อยู่ภายในออกมา และเมื่อวิเคราะห์ inclusion ของ *B.cereus* ที่แยกได้และทำให้บริสุทธิ์ พบว่าประกอบด้วย PHB 89เปอร์เซ็นต์ และไลโปตีน ๗ ที่ละลายในอีเทอร์อีก 11 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาของ Wakisaka และคณะ(1982) สรุปได้ว่า *Bacillus thuringiensis* จะสร้าง PHB เมื่อมีความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ และแอมโมเนียมซัลเฟตจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างแกรนูล PHB ในสายพันธุ์ 290-1 เพิ่มขึ้น ต่อมาในปี 1991 Chen และคณะรายงานผลการศึกษการสร้างพอลิ-3-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในแบคทีเรียจีส *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้ *B.megaterium* DSM90 *B.laterosporus* DSM335 *B.subtilis* DSM10 *B.sphaericus* DSM20 *B.cereus* DSM31 *B.amyloliquefaciens* DSM7 *B.licheniformis* DSM394 *B.marerans* DSM2892 *B.circulans* DSM1529 *B.thuringiensis* DSM2046 และ *B.mycooides* DSM 2048 ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ขั้นตอนแรกให้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เติบโตในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (nutrient-rich medium) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วของเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที บ่มเชื้อเป็นเวลา 30 ชั่วโมง เก็บเซลล์แห้งมาล้างด้วยน้ำ จากนั้นนำเซลล์ล้างแล้วถ่ายลงในอาหารเหลวไม่มีไนโตรเจน (N-free medium) เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์พอลิเอสเทอร์ เมื่อจุลินทรีย์เติบโตในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ สายพันธุ์ต่างๆ สามารถสะสม PHB ได้ในปริมาณเล็กน้อย ซึ่งปริมาณ PHB ภายในเซลล์ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวอยู่ที่ 5-20 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เมื่อควบคุมการหมักให้อยู่ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอและจำกัดปริมาณไนโตรเจน แบคทีเรียสามารถผลิตพอลิเมอร์ได้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งปริมาณ PHB ที่ผลิตได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมอะซีเตต และ 3-ไฮดรอกซีบิวทิลที่เรดลงไป มีผลให้การสังเคราะห์ PHB เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารที่เติมเพิ่มลงไปทำให้ปริมาณอะซีติลโคเอ และ 3-ไฮดรอกซีบิวทิลโคเอภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น McCool และคณะ(1996) ศึกษาการสะสมของ PHA ใน *Bacillus megaterium* พบว่ามีการสะสม PHA สูงสุดในช่วง late exponential phase และช่วง early stationary phase ในช่วง early stationary phase จะพบ PHA มีปริมาณมากที่สุด Sabat และคณะ(1998) พบว่า *Bacillus megaterium* BS1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้สามารถ

สะสม PHB ได้ คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมสามารถผลิต PHB ความเข้มข้นเท่ากับ 1.9 กรัมต่อลิตร เมื่อนำแบคทีเรียไปทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าในสายพันธุ์กลายพันธุ์ UM10-BS1 มีปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นเล็กน้อย คือ ผลิต PHB ความเข้มข้นเท่ากับ 2.29 กรัมต่อลิตร Lawและคณะ(2001) ศึกษาการผลิต PHB จากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ซึ่งแยกได้จาก municipal activated sludge พบว่าเมื่อสกัดเซลล์จากสายพันธุ์ HF-1 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยลำดับเบสของดีเอ็นเอสามารถเปรียบเทียบได้กับ *Bacillus megaterium* LabusekและRadecka(2001) รายงานว่า *B. cereus* UW85 สามารถสะสม PHB และเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Borahและคณะ(2002) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB โดย *Bacillus mycoides* RLJ B-017 พบว่าสามารถผลิต PHB คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ  $69.4 \pm 0.4$  เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

รัตนศิริ มุกิตากุล(2538) ได้คัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิต PHB จากจุลินทรีย์ 30 ชนิด ที่แยกได้จากตัวอย่างต่างๆ พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BA-019 สามารถสร้างและสะสม PHB ได้ ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ จากนั้นอดิพล บุญเรืองถาวร(2543) รายงานการศึกษาการผลิต PHB โดยเชื้อเดียวกันพบว่าภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในถังหมักคือ ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ปริมาณออกซิเจนละลาย 60 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 โมลต่อโมล และเมื่อศึกษาการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 แบบบ่อนเป็นงวด 2 ขั้นตอน ที่มีการควบคุมการบ่อนสารอาหารด้วยเทคนิค pH-stat พบว่าเมื่อใช้สารอาหารบ่อนเข้าที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนแหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ ให้ผลการเจริญเติบโตของเซลล์อย่างรวดเร็ว และมีการผลิต PHB เพิ่มขึ้นอย่างมากและเมื่อใช้กากน้ำตาลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 400 กรัมต่อลิตร ใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมล เป็นสารอาหารบ่อนเข้าทำให้การผลิต PHB สูงที่สุด โดยได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 72.57 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ PHB เท่ากับ 30.52 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีอัตราการผลิต PHB เพิ่มขึ้นเป็น 1.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

### ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB

จากสมบัติที่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งสมบัติทางเคมีและกายภาพที่คล้ายกับพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ทำให้ PHB ได้รับความสนใจนำมาผลิตเป็นพลาสติกเพื่อใช้ทดแทนพลาสติกบางชนิดที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน แต่



อุปสรรคที่สำคัญอย่างยิ่งสำหรับการประยุกต์ใช้ PHB คือต้นทุนของการผลิต PHB ยังสูงกว่าพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีมาก(Byrom,1987 ; ChoiและLee ,1997) โดยต้นทุนการผลิต PHB เมื่อคำนวณจากพื้นฐานของข้อมูลดังนี้ คือ ผลิตด้วยกระบวนการหมักของเชื้อ *Ralstonia eutropha* ด้วยอัตราการผลิต 2.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในถังหมักแบบ stirred-tank ขนาด 334 ลูกบาศก์เมตร เท่ากับ 5.58 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ในขณะที่พลาสติกสังเคราะห์เช่น PP,PE และ PS ราคาขายในปัจจุบันเท่ากับ 0.62-0.96 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม(ChoiและLee ,1997 ; Steinbuchel และ Fuchtenbusch, 1998) เมื่อผลิต PHB โดย recombinant *E. coli* สามารถลดราคาต้นทุนเหลือ 4 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัมเป็นราคาที่ใกล้เคียงกับพลาสติกที่สามารถย่อยสลายชนิดอื่นได้ เช่น PLA และอลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ ซึ่งราคาประมาณ 3-5 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม (Lee, 1996b ; Reddy, 2003) ดังนั้นนักวิจัยหลายคนได้พยายามที่จะขจัดอุปสรรคดังกล่าวเพื่อให้สามารถลดต้นทุนการผลิต PHB ทางการค้า ซึ่งจะทำให้สามารถแข่งขันด้านราคากับพลาสติกสังเคราะห์ได้ วิธีการที่นำมาใช้ในการลดต้นทุนการผลิต PHB ได้แก่ การพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรีย การพัฒนากระบวนการหมักและกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามการผลิต PHB ให้มีต้นทุนต่ำสุดจะประสบผลสำเร็จได้ต้องพิจารณาถึงการออกแบบและกระบวนการที่เกี่ยวข้องอย่างเป็นระบบ

## 1. อัตราการผลิต PHB

นิยามของอัตราการผลิต PHB คือ ความเข้มข้นของการผลิต PHB ต่อหน่วยปริมาตร ในช่วงเวลาหนึ่ง การวิเคราะห์กระบวนการผลิต PHB โดย *Alcaligenes latus* *Methylobacterium organophilum* และ recombinant *E. coli* (ChoiและLee ,1999) แสดงให้เห็นถึงปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อต้นทุนการผลิต PHB ดังตารางที่ 4

เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการผลิต PHB จาก recombinant *E. coli* โดย 2 กระบวนการที่มีอัตราการผลิตแตกต่างกัน พบว่าเมื่ออัตราการผลิต PHB เพิ่มขึ้นจาก 1.98 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เป็น 3.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ต้นทุนการผลิต PHB ลดลงจาก 5.37 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม เหลือ 4.91 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม การเพาะเลี้ยง *A. latus* แบบเฟดแบช โดย WangและLee(1997a) ให้อัตราการผลิต PHB สูงสุด 4.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงทำให้ต้นทุน PHB ต่ำสุดเพียง 2.6 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ดังนั้นถ้าอัตราการผลิต PHB สูงขึ้นจะทำให้ต้นทุนการผลิต PHB ลดลง

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบต้นทุนการผลิต PHB โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ (ChoiและLee ,1999)

พารามิเตอร์	<i>A. latus</i> <sup>1</sup>	<i>A. latus</i> <sup>2</sup>	<i>E. coli</i> <sup>3</sup>	<i>E. coli</i> <sup>4</sup>	<i>M. organophilum</i> <sup>5</sup>
<b>Fermentation</b>					
Culture time(h)	18	20	41	49	70
Cell concentration(g/l)	143	111.7	112	204.3	250
PHB concentration(g/l)	71.4	98.7	81	157.1	130
PHB content(%)	50	88	72.3	77	52
PHB productivity(g/l-h)	3.97	4.94	1.98	3.2	1.86
PHB yield	0.17	0.42	0.29	0.27	0.19
<b>Economic valuation</b>					
Direct-fixed-capital-dependent cost	1.42	0.73	1.31	1.00	1.57
Labor dependent cost	0.23	0.12	0.21	0.16	0.23
Administration and overhead	0.09	0.05	0.09	0.08	0.11
Raw materials cost	4.94	1.26	2.99	2.97	3.31
Utilities	0.49	0.29	0.42	0.36	0.46
Waste treatment disposal	1.13	0.15	0.35	0.34	1.01
Total production cost [US\$/Kg PHB]	8.3	2.6	5.37	4.91	6.69

1 =งานวิจัยของ Yamaneและคณะ(1996)

2 =งานวิจัยของ WangและLee(1997a)

3 =งานวิจัยของ LeeและChang(1994)

4 =งานวิจัยของ WangและLee(1997b)

5 =งานวิจัยของ Kimและคณะ(1996)

## 2. ปริมาณ PHB

ปริมาณ PHB มีผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ เท่าๆกับ PHB yield ที่มีผลต่อแหล่งคาร์บอน recovery yield และความบริสุทธิ์ของ PHB มีผลต่อปริมาณ PHB ใช้สารที่ใช้สำหรับย่อย(digesting agent) ในปริมาณน้อยเพื่อแยกแกรนูลของ PHB ออกจากเซลล์ ทำให้ได้ปริมาณ PHB ที่สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิต PHB จาก *A. latus* ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบช(ChoiและLee ,1999) 2 วิธีการ ซึ่งได้จากผลการทดลองของนักวิจัย 2 กลุ่มที่ใช้จุลินทรีย์ชนิดเดียวกันดังนี้ Yamaneและคณะ(1996) รายงานผลการทดลองว่าได้ปริมาณ PHB 50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลผลิต PHB เท่ากับ 0.17 กรัม PHB ต่อกรัมน้ำตาลซูโครส

มีต้นทุนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 4.8 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม และจากการศึกษาของ Wang และ Lee (1997a) ได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นเป็น 88 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อโดยจำกัดปริมาณไนโตรเจน ได้ผลผลิตของ PHB สูงถึง 0.42 กรัม PHB ต่อกรัม น้ำตาลซูโครส ทำให้ต้นทุนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ลดลงเหลือเพียง 0.92 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม แสดงให้เห็นว่าต้นทุนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ลดลงอย่างมากเมื่อปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น (Choi และ Lee, 1999) ทั้งนี้เนื่องจากการผลิต PHB ได้ในปริมาณที่ต่ำต้องใช้สารเคมีในการย่อยปริมาณมาก และเพิ่มต้นทุนด้านอุปกรณ์อีกด้วย

### 3. แหล่งคาร์บอน และ ผลผลิต PHB

Yamane (1992, 1993) รายงานว่าราคาของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อต้นทุนการผลิต PHB อย่างมากในบรรดาสารอาหารที่ใช้ในกระบวนการหมัก แหล่งคาร์บอนมีผลต่อต้นทุนการผลิตมากที่สุด ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้มีมากมายหลายชนิดขึ้นอยู่กับความสามารถของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต น้ำมัน แอลกอฮอล์ ไฮโดรคาร์บอน เป็นต้นประสิทธิภาพของการเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็น PHB ก็มีความสำคัญต่อต้นทุนการผลิตเช่นเดียวกัน ตารางที่ 5 สรุปราคาของแหล่งคาร์บอนและผลผลิต PHB ตามทฤษฎี (theoretical yield) ซึ่งส่งผลต่อราคาของ PHB

**ตารางที่ 5** ผลของราคาสับสเตรท และผลผลิต PHB ต่อราคา PHB (Lee, 1996b ; Madison และ Huisman, 1999 ; Reddy และคณะ, 2003)

Substrate	Substrate price (US\$ Kg <sup>-1</sup> )	P(3HB) yield [(g P(3HB)(g substrate) <sup>-1</sup> ]	Production cost (US\$ (Kg P(3HB) <sup>-1</sup> )
Glucose	0.493	0.38	1.30
Sucrose	0.290	0.40	0.72
Methanol	0.180	0.43	0.42
Acetic acid	0.595	0.38	1.56
Ethanol	0.502	0.50	1.00
Cane molasses	0.220	0.42	0.52
Cheese whey	0.071	0.33	0.22
Hemicellulose	0.069	0.20	0.34
Hydrolysate			

เนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากน้ำตาลจากอ้อย หรือ หัวปืท หางนม(cheese whey) เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส มีราคาต่ำ ดังนั้นแหล่งคาร์บอนเหล่านี้จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิต PHB(Lee, 1996b ; ChoiและLee ,1997) แบบที่เรียบง่ายจำนวนมากสามารถผลิต PHB ได้จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาต่ำเหล่านี้ แต่โดยทั่วไปปริมาณ PHB และอัตราการผลิต PHB จะต่ำกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนบริสุทธิ์ KimและChang(1995)เลี้ยง recombinant *E. coli* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบช ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิต PHB ได้ 61 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของเซลล์ 106 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต PHB เท่ากับ 1.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 58 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Lee และคณะ(1997) ได้พัฒนา recombinant *E. coli* สายพันธุ์ซึ่งรับยีนสังเคราะห์ PHB จากเชื้อ *Ralstonia eutropha* เพื่อสะสม PHB ปริมาณมากในอาหารที่มีหางนมเป็นองค์ประกอบ WongและLee(1998) เลี้ยง recombinant *E. coli* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบช โดยใช้สารละลายหางนมเป็นสารอาหารป้อนเข้า(feeding solution) สามารถผลิต PHB ได้ 69 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของเซลล์ 87 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต PHB 1.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนบริสุทธิ์และได้ปริมาณ PHB สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Kim(2000) ศึกษาการผลิต PHB โดยเลี้ยง *Azotobacter chroococcum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิต PHB ได้ 25 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของเซลล์ 54 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต PHB เท่ากับ 0.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 46 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิต PHB ของ ChoiและLee (1997พบว่า ถ้าเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากกลูโคสที่มีราคา 0.5 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม เป็นการใช้อ้อยที่ผ่านการย่อยแล้วซึ่งมีราคา 0.22 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ต้นทุนการผลิต PHB จาก recombinant *E.coli* ซึ่งเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการเดียวกันลดลงจาก 4.91 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัมเหลือ 3.72 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัมหรือต่ำกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 1.19 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม

#### 4. ปัจจัยอื่น ๆ

การให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอเพื่อรักษาสภาพการมีอากาศ(aerobic condition) จะส่งผลต่อต้นทุนการผลิต PHB ด้วย การป้องกันการจำกัดออกซิเจนโดยทั่วไปจำเป็นต้องมีภาชนะที่ทนแรงดันได้ มีอัตราการไหลของก๊าซสูง และมีการเติมอากาศที่มีออกซิเจนมาก ปัจจัยเหล่านี้ทำให้ต้นทุนการ



ผลิตสูงขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ (ChoiและLee ,1999) ปัญหาที่สามารถแก้ไขได้ถ้าสามารถค้นพบแบคทีเรียที่ซึ่งสามารถผลิต PHB ได้ดีในภาวะที่มีออกซิเจนไม่เพียงพอ WangและLee(1997b) สามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณมากโดยการเลี้ยง recombinant *E. coli* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบช ในระยะการสังเคราะห์ PHB ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายถูกรักษาในระดับที่ 1-3 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว สามารถผลิต PHB ได้สูง 157.1 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB เท่ากับ 77 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีอัตราการผลิต PHB สูง 3.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Kim(2000) ศึกษาผลของปริมาณอากาศต่อการผลิต PHB เมื่อเลี้ยงเชื้อ recombinant *E. coli* จากหางนมด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบช ในรูปของความเร็วสูงสุดในการกวนให้อากาศจาก stirred tank fermentor ความเข้มข้นของเซลล์และอัตราการผลิต PHB สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเร็วสูงสุดในการกวนให้อากาศ ซึ่งปริมาณ PHB สูงที่สุดเมื่อให้ความเร็วสูงสุดในการกวนให้อากาศเท่ากับ 500 rpm เมื่อความเร็วสูงสุดในการกวนให้อากาศสูงกว่า 700 rpm ได้ ปริมาณ PHB เท่ากับ 56-58 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่านั้น เพราะว่ากระบวนการผลิตหยุดเนื่องจากปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Kim ยังได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของการจำกัดออกซิเจนในการเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบช พบว่าการจำกัดปริมาณออกซิเจนส่งผลให้ความเข้มข้นของ PHB ปริมาณ PHB และอัตราการผลิต PHB สูงกว่าไม่จำกัดปริมาณออกซิเจน Page(1992) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายของ *Azotobacter vinelandii* UWD โดยเติม fish peptone yeast extract cassamino acids bactopectone หรือ beef extract อย่างใดอย่างหนึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณเล็กน้อย ผลผลิต PHB ต่อคาร์บอนที่ถูกใช้ไปจะเพิ่มขึ้น แหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนเหล่านี้เพิ่มเฉพาะอัตราการผลิต PHB โดยไม่เพิ่มจำนวนเซลล์ ถึงแม้จะใช้ไนโตรเจนเชิงซ้อนในปริมาณเล็กน้อย แต่คุณภาพของแหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนเหล่านี้จะเปลี่ยนไปตามช่วงระยะเวลาในแต่ละปีและสถานที่ผลิต ซึ่งอาจส่งผลให้ผลจากกระบวนการหมักเปลี่ยนแปลงไปและคุณภาพของพอลิเมอร์ที่ได้ไม่คงที่ (ChoiและLee ,1999)

ราคาการผลิต PHB จะลดลงเมื่อขนาดการผลิตเพิ่มขึ้น (ChoiและLee ,1997 ; ChoiและLee , 1999) เมื่อขนาดการผลิตเปลี่ยนแปลง ต้นทุนการผลิตต่างๆจะเปลี่ยนแปลงด้วย โดยสัดส่วนของต้นทุนด้านวัตถุดิบเพิ่มขึ้นมากที่สุด คิดเป็นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนทั้งหมด ดังนั้นต้นทุนด้านวัตถุดิบจึงมีความสำคัญต่อการผลิต PHB มาก

## การผลิตในระดับอุตสาหกรรม

การผลิตพอลิเมอร์ทางชีวภาพในอุตสาหกรรมมีปัจจัยที่จำกัด 3 ประการ ได้แก่ ภาวะในการเจริญเติบโตของเชื้อสำหรับการผลิตสาร (โดยปกติแล้วภาวะที่ไม่สมดุลของสารอาหารเป็นสาเหตุให้เชื้อเจริญเติบโตช้า) วิธีการสังเคราะห์พอลิเมอร์จากสารตั้งต้นราคาถูก และ ประการสุดท้าย คือ ราคาของกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่สูง อย่างไรก็ตามปัจจุบันได้มีการนำความรู้เกี่ยวกับวิธีการสังเคราะห์และกลไกการควบคุมเพื่อใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ โดยการตัดต่อยีน (recombinant organisms) ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และพืช ทำให้สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์จากแหล่งคาร์บอนราคาถูก เช่น กากน้ำตาล ชูโครส แล็กโตส กลีเซอรอล น้ำมัน และ ก๊าซมีเทน แต่ในกระบวนการหมักโดยใช้แบคทีเรียที่ตัดต่อยีน (recombinant bacteria) และ พืชที่ตัดต่อยีน (recombinant plants) เพื่อผลิตพอลิเมอร์ในระดับอุตสาหกรรมนั้นยังคงไม่สมบูรณ์ (Steinbuchel และ Fuchtenbusch, 1998 ; Luengo และคณะ, 2003)

วิธีการผลิต PHB แตกต่างกันขึ้นกับการสังเคราะห์เอนไซม์ของเซลล์เพื่อผลิตพอลิเมอร์ การมีความรู้เกี่ยวกับระบบเอนไซม์ทำให้รู้ถึงความต้องการเกี่ยวกับพลังงาน เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตขนาดใหญ่ และ ทำให้ทราบวิธีการใหม่ๆ หรือ พัฒนากระบวนการผลิตพอลิเมอร์ในถังหมัก (Lee และ Choi, 1999 ; Luengo และคณะ, 2003)

## การสร้างสปอร์ (Endospore formation)

เนื่องจากการวิจัยโดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. BA-019 และในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสปอร์ได้พบวาระหว่างกระบวนการผลิต PHB ปริมาณ PHB จะลดลง อาจเนื่องมาจากเซลล์นำ PHB ไปใช้ในกระบวนการสร้างสปอร์ Benoit และคณะ (1990) ศึกษากระบวนการหมักในระหว่างการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของ *B. thuringiensis* พบว่าสามารถผลิต PHB และนำ PHB ไปใช้ในการสร้าง สปอร์และอาจจะใช้เป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ Slepecky และ Law (1960) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus megaterium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมการผลิต PHB โดยเติมกลูโคสและอะซีเตตในภาวะให้อากาศพบว่า การสร้างสปอร์เกิดขึ้นหลังจากผลิต PHB ระหว่างการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียเซลล์จะเปลี่ยนไปอยู่ในภาวะไม่มีการเติบโต เกิดโครงสร้างที่ทนความร้อน และสร้างสปอร์ สปอร์ของแบคทีเรียไม่มีเมแทบอลิซึมสามารถทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ทั้งความร้อน แสงอัลตราไวโอเล็ต และ สารเคมี (Atrih และ Foster, 2002)

ข้อแตกต่างระหว่างเซลล์กับสปอร์แสดงดังตารางที่ 6 การสร้างสปอร์ของแบคทีเรียไม่สามารถเกิดขึ้นระยะ exponential phase แต่จะสร้างขึ้นเมื่อเซลล์หยุดเจริญเติบโตเพราะสารอาหารที่จำเป็นหมด ตัวอย่างเช่น เมื่อเลี้ยงเชื้อให้เจริญเติบโตในอาหารเป็นแหล่งพลังงานเมื่อกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด เซลล์จะหยุดเจริญเติบโต และต่อมาจะพบสปอร์เกิดขึ้น แต่ถ้าเติมกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงท้ายของการเจริญเติบโตการสร้างสปอร์จะถูกยับยั้ง กลูโคสสามารถป้องกันการสร้างสปอร์โดยกระบวนการ catabolite repression โดยป้องกันการสังเคราะห์เอนไซม์ที่จำเพาะเกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ กลูโคสสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานและยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ จึงเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในภาวะที่แตกต่างกัน (Demain และ Solomon, 1985)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

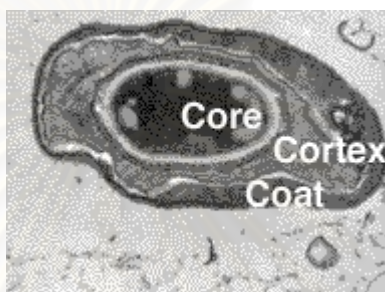
ตารางที่ 6 ข้อแตกต่างระหว่างสปอร์(endospore) และเซลล์(vegetative cells) (Demainและ Solomon, 1985)

	<b>Endospore</b>	<b>Vegetative cell</b>
<b>Structure</b>	Thick spore cortex, Spore coat, Exosporium(some species)	Typical Gram-positive cell
<b>Microscopic appearance</b>	Refractile	Nonrefractile
<b>Chemical compositions :</b>		
Calcium	High	Low
Dipicolinic acid	Present	Absent
PHB	Absent	Present
Polysaccharide	Low	High
Protein	Higher	Lower
Parasporal crystalline protein(some species)	Present	Absent
Sulfur amino acids	High	Low
<b>Enzymatic activity</b>	Low	High
<b>Metabolism(O<sub>2</sub> uptake)</b>	Low or absent	High
<b>Macromolecular synthesis</b>	Absent	Present
<b>mRNA</b>	Low or absent	Present
<b>Heat resistance</b>	High	Low
<b>Radiation resistance</b>	High	Low
<b>Resistance to chemical and acids</b>	High	Low
<b>Stainability by dyes</b>	Stainable only with special method	Stainable
<b>Action to lysozyme</b>	Resistant	Sensitive



## โครงสร้างสปอร์

โครงสร้างพื้นฐานของสปอร์ในระหว่างการสร้างสปอร์ดังแสดงในรูปที่9 สปอร์จะมีโครงสร้างที่ซับซ้อนมีส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วน



รูปที่ 9 โครงสร้างของสปอร์ *B. subtilis* ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน  
([www.bact.wisc.edu/.../bacterialstructure/Inclusions.html](http://www.bact.wisc.edu/.../bacterialstructure/Inclusions.html))

### 1. Coats

เป็นชั้นที่อยู่นอกสุดมีโครงสร้างหลายชั้นหุ้มสปอร์อยู่ประมาณ 25 พอลิเปปไทด์สปีชีส์ (Driks, 1999) ในชั้นนี้จะช่วยให้มีความต้านทานต่อสารเคมีและเอนไซม์ต่างๆ ภายใต้อัน coats มีชั้นของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) หนาประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้งของสปอร์ เปปติโดไกลแคนประกอบด้วย 2 ชั้น เป็นชั้นบางๆ ที่อยู่ด้านใน (primordial cell wall) ซึ่งพบ 2-5 เปอร์เซ็นต์ของเปปติโดไกลแคนทั้งหมดและ ชั้นนอก (outer cortex) coats เป็นชั้นที่ป้องกันเซลล์หลังจากการงอกและเป็นแม่แบบ (template) สำหรับการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคนระหว่างการเจริญเติบโต (Atrih และ Foster, 2002)

### 2. Cortex

โครงสร้างชั้นนี้ช่วยรักษาจำนวนสปอร์ที่สร้างโดยแบคทีเรีย (Atrih และ Foster, 2002) รวมทั้ง

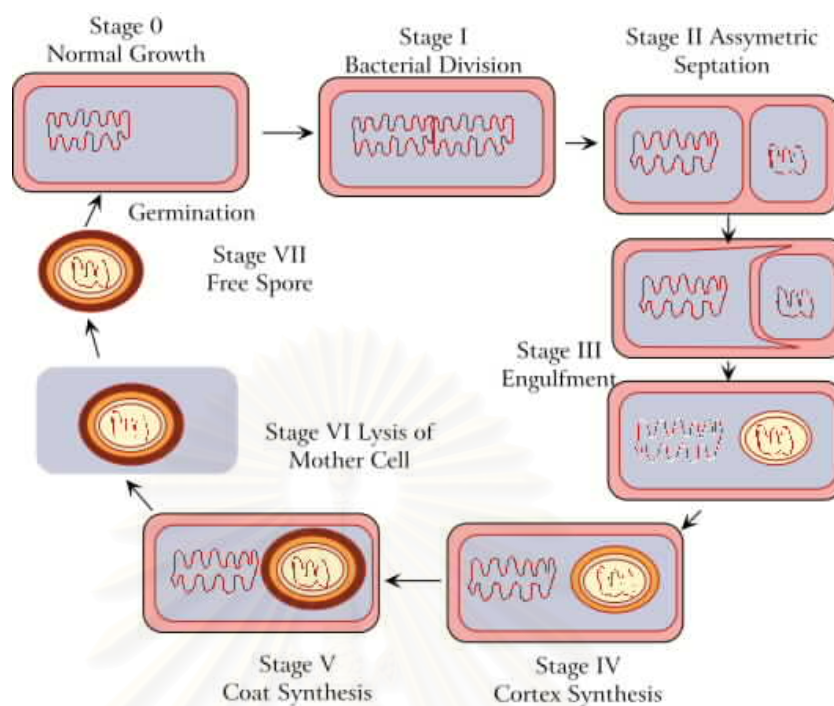
เกิด  $\delta$ -lactam ปริมาณมากในทุกตำแหน่งที่มี muramic acid และมีการเชื่อมต่อกันเกิดขึ้นเพียง 2.9 เปอร์เซ็นต์ของ muramic acid ในสปอร์ของ *B. subtilis* muramic  $\delta$ -lactam จำเป็นสำหรับจดจำสัณฐานสำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแบบจำเพาะในกระบวนการงอก ซึ่งเอนไซม์นี้มีความจำเพาะในการไฮโดรไลซ์ cortex ระหว่างกระบวนการงอกของสปอร์ ชั้นนี้มีความเกี่ยวข้องในการรักษาสปอร์ แต่ไม่เกี่ยวกับการทนความร้อนและความทนทานต่อสิ่งแวดล้อม (Ellar, 1978 ; Atri และคณะ, 1996 ; Atri และ Foster, 2002)

### 3. Core

ชั้นนี้ประกอบด้วยสารต่างๆที่จำเป็นต่อเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอ ไรโบโซม เอนไซม์ เอนไซม์ที่อยู่ในชั้นนี้ทำหน้าที่ระหว่างการงอกของสปอร์ และการได้รับน้ำ(rehydration) นอกจากนี้ยังพบแร่ธาตุในปริมาณสูงประกอบด้วยแคลเซียม ( $Ca^{2+}$ ) แมงกานีส ( $Mn^{2+}$ ) และ แมกนีเซียม ( $Mg^{2+}$ ) ซึ่งเกิดขึ้นเป็นองค์ประกอบจำเพาะร่วมกับกรดไดพิโคลินิก(dipicolinic acid) ภายในชั้นcore พบความเข้มข้นของโปรตีนปริมาณสูงมีความสัมพันธ์กับสปอร์ ดีเอ็นเอ และเกี่ยวข้องกับการทนรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Setlow, 1994 ; Atri และ Foster, 2002)

### วัฏจักรของสปอร์ (Spore life cycle)

การสร้างสปอร์เกิดขึ้น 7 ขั้นตอน (แสดงในรูปที่ 10) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่เกิดขึ้นในระหว่างการสร้างสปอร์ของเซลล์ เริ่มต้นจากขั้นแรกเกิดการสร้างองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ และแบ่งองค์ประกอบเหล่านั้นเป็น 2 ส่วน ภายในเซลล์แม่(mother cell) ขั้นต่อไปเป็นการสร้างชั้นต่างๆของสปอร์มากมายทั้งสปอร์และเซลล์แม่จะพบในขั้นตอนนี้ และในขั้นตอนสุดท้ายส่วนไซโตพลาสซึมจะได้รับน้ำและหลุดออกมาจากเซลล์แม่ได้เป็นสปอร์อิสระ(free spore)



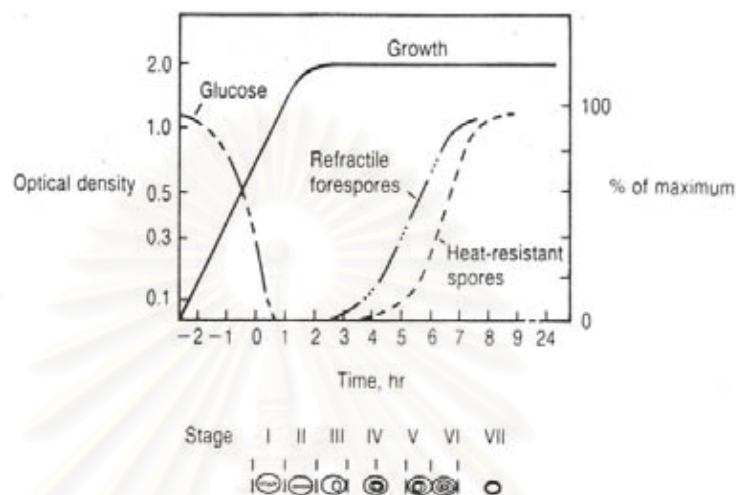
รูปที่ 10 ขั้นตอนการสร้างสปอร์

([www.bact.wisc.edu/.../bacterialstructure/Inclusions.html](http://www.bact.wisc.edu/.../bacterialstructure/Inclusions.html))

ความสัมพันธ์ของการสร้างสปอร์และกราฟการเจริญ ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์เช่น *Bacillus* แสดงดังรูปที่ 11 ในระยะ exponential growth เซลล์จะมีการสะสมกลูโคสในกระบวนการหมักและสะสมกรดอินทรีย์ทำให้พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง เมื่อกลูโคสหมดเซลล์จะเปลี่ยนกระบวนการหมักเป็นการเจริญเติบโตแบบ Oxidative growth และสังเคราะห์เอนไซม์สำหรับวัฏจักร tricarboxylic acid (TCA) กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นถูกนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน ที่ภาวะนี้พบว่าการนำออกซิเจนไปใช้เพิ่มขึ้น และค่าพีเอชเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายของกรดอินทรีย์จากอาหารเลี้ยงเชื้อไปสู่เซลล์ ขั้นตอนนี้มีการเริ่มสร้าง spore septum ขึ้น ในบริเวณด้านนอกของสปอร์ที่กำลังพัฒนาพบว่าการหยุดสร้างโปรตีนในไซโตพลาสซึม กรดอะมิโนที่ถูกปล่อยออกมาใช้สำหรับสังเคราะห์โปรตีนของสปอร์ และใช้เป็นแหล่งคาร์บอน (Demain และ Solomon, 1985)

แหล่งพลังงานทั้งหมดของการสร้างสปอร์ต้องมาจากแหล่งคาร์บอนภายในเซลล์นั่นคือได้จากโปรตีนและ PHB เนื่องจากแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด โมเลกุลของ mRNA ที่สร้างขึ้นใหม่ตอบสนองสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์ของสปอร์ใหม่ โดยสร้างผ่านขั้นตอนการสร้างสปอร์

จนกระทั่งได้สปอร์ที่สมบูรณ์ ขั้นตอนทั้งหมดของการสร้างสปอร์เริ่มตั้งแต่ระยะ late exponential growth จนกระทั่งได้สปอร์หลุดออกมานอกเซลล์ซึ่งใช้ระยะเวลาหลายชั่วโมง (Demain และ Solomon, 1985)



รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ของการสร้างสปอร์ต่อการเจริญ (Demain และ Solomon, 1985)

### ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์

สปอร์มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการอยู่รอด สปอร์สามารถทนทานต่อภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ พื้นฐานทางโมเลกุลสำหรับการทนความร้อนของสปอร์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย โปรตีนและเอนไซม์เป็นเป้าหมายหลักสำหรับความร้อนที่ทำลายสปอร์ (Belliveau และคณะ, 1992) โดยทั่วไปเอนไซม์ที่สกัดจาก สปอร์จะไม่ทำงาน (inactivate) เมื่ออยู่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิบริเวณสปอร์ อย่างไรก็ตาม ในการสร้างสปอร์ยังคงมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ ได้แก่

#### 1. การดึงน้ำออก (Dehydration)

การดึงน้ำออกของชั้น core ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการสร้างสปอร์ คิดเป็น 0.5 – 1 กรัมของ น้ำต่อกรัมของน้ำหนักแห้งเทียบกับเซลล์ที่หนัก 3-4 กรัม การดึงน้ำออกของบริเวณโปรโตพลาสต์ของเซลล์เกิดขึ้นระหว่างการสร้างสปอร์ และสัมพันธ์กับการทนความร้อนของสปอร์ (Nakashio และ



Gerhardt , 1985) ความสำเร็จในการลดปริมาณน้ำในชั้น core ต้องการการสะสมของแร่ธาตุและการพัฒนาชั้น cortex อย่างไรก็ตามยังไม่มีผลชัดเจนที่แสดงว่า ชั้น cortex สามารถควบคุมปริมาณน้ำในชั้น core(DriksและSetlow, 1999 ; AtrihและFoster, 2002)

## 2. โครงสร้างของชั้น cortex

มีการศึกษามากมายว่าชั้น cortex ช่วยให้ผู้สปอร์ทนต่อความร้อน ระดับการทนความร้อนยังสัมพันธ์กับขนาดของ cortex (MurrellและWarth, 1965) โครงสร้างของเปปติโดไกลแคนในสปอร์ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสปอร์ได้ อาจจะมีผลต่อความคงทนและทนความร้อนของสปอร์ (AtrihและFoster, 2001 ; AtrihและFoster, 2002)

## 3. แร่ธาตุและกรดไดฟิโคลินิก

สปอร์ของแบคทีเรียสะสมแร่ธาตุเพื่อความเสถียรและทนความร้อน (SlepeckyและFoster, 1959) แคลเซียม ( $Ca^{2+}$ ) แมงกานีส ( $Mn^{2+}$ ) และ แมกนีเซียม ( $Mg^{2+}$ ) เป็นแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบมากที่สุดและพบในชั้นของ core มากที่สุด ปริมาณของแร่ธาตุหลักในสปอร์สามารถแปรผันได้โดยการศึกษาในรูปของปริมาณแร่ธาตุในอาหารเลี้ยงเชื้อ (SlepeckyและFoster, 1959 ; Atrih และFoster, 2002)  $Mn^{2+}$  มีผลต่อการสร้างสปอร์ของ *B. megaterium* *B. subtilis* และ *B. fastidiosus* AtrihและFoster(2001)ศึกษาการเติม  $Mn^{2+}$  ในอาหารที่ใช้สร้างสปอร์ได้ผลคือทำให้ผลผลิตของสปอร์

(spore yield)เพิ่มมากขึ้น เพิ่มความทนทาน ความแข็งแรงของโครงสร้างชั้น cortex และเพิ่มการทนความร้อน  $Mn^{2+}$  ยังเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และเอนไซม์ phosphoglycerate phosphomutase ซึ่งต้องการภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของ *B. subtilis* *B.cereus* และ *B. megaterium*  $Mn^{2+}$  ยังคงมีกลไกในการแสดงออกของยีนและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์cortex นอกจาก  $Mn^{2+}$  แล้ว แร่ธาตุอื่นได้แก่  $Mg^{2+}$  และ  $Ca^{2+}$  ยังมีกลไกต่อเมแทบอลิซึมของสปอร์และความทนทานต่างๆ การใช้อัตราส่วนของแร่ธาตุที่พอเหมาะมีความสำคัญต่อสมบัติของสปอร์ (SlepeckyและFoster, 1959 ; AtrihและFoster, 2001) ความเข้มข้นของเกลือที่สูงอาจจะสำคัญต่อจำนวนสปอร์(SlepeckyและFoster, 1959) SlepeckyและFoster(1959) รายงานถึงแร่ธาตุที่อยู่ในขั้นตอนการสร้างสปอร์ซึ่งแร่ธาตุหลักที่เกี่ยวข้องคือ แคลเซียม

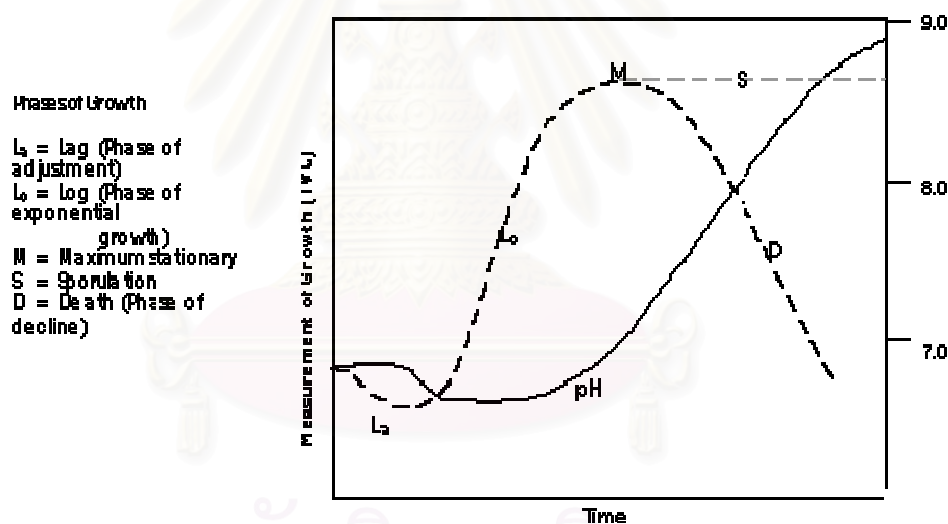
พบว่ามีความเข้มข้นของแคลเซียมสูงในสปอร์ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ปริมาณแคลเซียมที่สูงจำเป็นในการสร้างสปอร์ ในภาวะที่ขาดแคลเซียมเป็นผลให้การสร้างสปอร์ลดลงและการทนความร้อนจะลดลง ปริมาณแคลเซียมที่สูงในสปอร์และการปล่อยแคลเซียมไดฟิโคลินेट (calciumdipicolinate) นำไปสู่การงอกของสปอร์ ทำให้เชื่อได้ว่าแคลเซียมมีความสัมพันธ์ที่จำเพาะกับการทนความร้อนในสปอร์ของแบคทีเรีย แร่ธาตุในชั้น core ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำที่ลดลงในชั้น core ด้วยเหตุนี้เองอาจทำให้สปอร์ทนต่อความร้อน ผลของกรดไดฟิโคลินิกมีการศึกษาน้อยมากไม่เหมือนกับแร่ธาตุ Paidhungatและคณะ(2000) ศึกษาการกลายพันธุ์ของ *B.subtilis* ซึ่งมียีน *spoVFA* และ *spoVFB* ซึ่งมีการแสดงออกของ DPA synthase พบว่ามีผลทำให้น้ำในชั้น core เพิ่มขึ้น และความสามารถในการทนความร้อนและทนต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลดลง

#### 4. ปัจจัยอื่นๆ

ภาวะในการสร้างสปอร์ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ และ อุณหภูมิ มีผลต่อสมบัติของสปอร์ (SlepeckyและFoster, 1959 ; AtrihและFoster, 2001) SlepeckyและFoster(1960) รายงานการเลี้ยง *B. megaterium* ในอาหารที่ส่งเสริมการผลิต PHB (Macrae-Wilkinson medium) พบว่ามีการผลิต PHB และใช้ PHB โดยปฏิกิริยาของเซลล์ในระยะ exponential phase และพบว่ามีสปอร์เกิดขึ้นน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ภายใต้ภาวะนี้ แต่เมื่อเจริญเติบโตในอาหารที่ไม่เหมาะต่อการผลิต PHB และมีปริมาณอะซิเตดเล็กน้อยพบว่าการผลิต PHB เกิดขึ้นน้อยมาก (1 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ระหว่าง exponential phase และลดลงอย่างรวดเร็วในหลายชั่วโมงต่อมาก่อนขั้นตอนการสร้างสปอร์(พบสปอร์ 90 เปอร์เซ็นต์ภายใต้ภาวะนี้) เมื่อเติมกลูโคสและอะซิเตดในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณอากาศและความเร็วในการกวนพบว่าสามารถผลิต PHB ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและไม่พบสปอร์เกิดขึ้น PHB ถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 59 ในขณะที่มีสปอร์เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลานี้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์

เมื่อศึกษาสปอร์ของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่าที่อุณหภูมิสูงสปอร์ทนความร้อนได้ดีกว่าอุณหภูมิต่ำเนื่องจากระดับของheat shock protein ในเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นผลให้อุณหภูมิในการสร้างสปอร์สูงขึ้น สปอร์ของแบคทีเรียในกลุ่ม thermophiles ทนความร้อนได้ดีกว่าแบคทีเรียในกลุ่ม mesophiles ซึ่งกลุ่มนี้ทนความร้อนได้ดีกว่าแบคทีเรียในกลุ่ม psychrophiles(Warth, 1978 ; GerhardtและMarquis, 1989) Kofronovaและคณะ(1994)(อ้างถึง Strnadovaและคณะ ,1990)

รายงานการเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* สายพันธุ์ 27 เพื่อผลิต PHB พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อถึง 43.5 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้เกือบทุกสปีชีส์และทุกสายพันธุ์ของ *Bacillus* เมื่อ *B. thuringiensis* เจริญเติบโตในอาหารเหลวพบว่ามีความแตกต่างของค่าพีเอชอย่างมาก ที่ค่าพีเอชสูงจะพบของการสร้างสปอร์(รูปที่ 12) ที่เริ่มต้นของการเจริญเติบโตค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำทำให้มีสภาพเป็นกรด เนื่องจากเชื้อใช้น้ำตาลและสารตั้งต้นอื่นในการสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดเกิดขึ้นก่อนการสร้างสปอร์และใช้ในการสร้างสปอร์ สิ่งนี้มีความสำคัญเพราะว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักมากมายเช่น เอนไซม์บางชนิด ยาปฏิชีวนะบางชนิด ส่วนมากสร้างขึ้นระหว่างช่วงท้ายของ vegetative cell และช่วงต้นของการสร้างสปอร์



รูปที่ 12 รูปแบบการเจริญตามทฤษฎี(Theoretical Growth Curves) และค่า pH ในอาหาร *B. thuringiensis* ในถังหมัก  
([www.accessexcellence.org/AE/AEPC/Wards/e3ferm/measurements.html](http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/Wards/e3ferm/measurements.html))

Nakata(1963) ศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการสร้างสปอร์ของ *B.cereus* เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยควบคุมค่าพีเอชด้วยบัฟเฟอร์ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.4 7.0 และ 7.4 จากการย้อมเซลล์พบสปอร์ที่ 10 และ 11 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และ ที่ 12-13.5 ชั่วโมงพบการสร้างสปอร์เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์

เปรียบเทียบจำนวนสปอร์ที่ค่าพีเอชต่างๆให้ผลแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย Kominekและ Halvorson(1965) ศึกษาผลของพีเอชต่อการสร้างสปอร์ของ *B.cereus* โดยนับจำนวนสปอร์หลังจากเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบค่าพีเอชเท่ากับ 5.3 5.8 6.05 6.45 และ 7.9 พบว่าที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.45 และ 7.9 เซลล์สร้างสปอร์มากกว่า 100 เพอร์เซ็นต์ และ ที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 6.0 เกือบจะยับยั้งการสร้างสปอร์ (ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.3 สร้างสปอร์เพียง 0.2 เพอร์เซ็นต์) Benoitและคณะ(1990) ศึกษากระบวนการหมักระหว่างการเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. thuringiensis* HD-1 พบว่า vegetative cell ใช้กลูโคสในเจริญการเติบโตและสร้างสปอร์ ระหว่างการเลี้ยงเชื้อค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำลงและเกิดภาวะที่เป็นกรดและพบสปอร์ที่พีเอชใกล้ 7.0 สปอร์ถูกสร้างขึ้นในระยะ exponential phase เมื่อ PHB ถูกสร้างขึ้นและถูกใช้ในการสร้างสปอร์และอาจจะใช้ในการสร้างพลังงานให้กับเซลล์



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

#### 3.1.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
กล้องจุลทรรศน์รุ่น Labophot II	Nikon, Japan
กล้องดิจิทัล	Sony, Japan
เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี(gas chromatography)รุ่น 3004CX	Varian,USA.
เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี	Water,USA.
แคปพิลลารี คอลัมน์(capillary column)ชนิด cabowax-PEG เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม.	Packard,USA.
เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน(hydrogen generator) รุ่น 9002	Packard,USA.
เครื่องผลิตอากาศ(air compressor) รุ่น WL505000AJ	Campbell Hausfeld,USA.
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ(psychotherm incubator shaker) รุ่น G27 แบบหมุน(rotary)	New Brunswick Scientific, USA.
เครื่องชั่งละเอียด(analytical balance) รุ่น A200S	Sartorius,Germany
เครื่องชั่งหยาบ(laboratory balance) รุ่น L2002P	Sartorius,Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง(centrifuge) รุ่น KS-300P	Kubota,Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่นCentrikon T-42k	Kontron,Italy
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่น J2-21	Beckman,USA.
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง(VIS spectrophoyometer)รุ่น Novaspec II	Pharmacia Biotech,England
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง(pH meter) รุ่น 2000	Cyberscan,Singapore
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flowรุ่น BV-124	ISSCO,USA.
ตู้อบฆ่าเชื้อ(hot air oven) รุ่นUL-60	Mammert,Germany
ตู้อบแห้ง(dryer oven) รุ่นUL-80	Mammert,Germany
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ(autoclave) รุ่น SS-325	Tomy,Japan

## 3.1.1 อุปกรณ์ (ต่อ)

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ(waterbath) รุ่น W760	Mammert,Germany
เครื่องให้ความร้อน(stiring hot plate) รุ่น DS201HS	DMS,Japan
ไมโครปิเปตขนาด 100 200 และ 1000 มล.	Gilson,France
เครื่องวัดปริมาณไอออน(ion meter)รุ่น 69	ESD,USA.
หัววัดแอมโมเนียมไอออน(ammonium probe) รุ่น 35-6050	

## 3.1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
กรดซัลฟูริกเข้มข้น( $H_2SO_4$ )	E.Merck Damstadt,Germany
กรดซิตริก( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ )	Reidel,England
กรดบอริก( $H_3BO_3$ )	E.Merck Damstadt,Germany
กรดเบนโซอิก( $C_7H_6O_2$ )	Nacalai Tesque,Japan
คลอโรฟอร์ม( $CH_3Cl$ )	E.Merck Damstadt,Germany
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )	J.T.Baker,USA.
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	E.Merck Damstadt,Germany
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ )	Carco Erba,Italy
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	Carco Erba,Italy
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต( $NaH_2PO_4$ )	Fluka,Germany
โซเดียมคลอไรด์( $NaCl$ )	ปรุงทิพย์,ไทย
โซเดียมไฮดรอกไซด์( $NaOH$ )	Carco Erba,Italy
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต( $Na_2HPO_4$ )	Fluka,Germany
ไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต( $K_2HPO_4$ )	Fluka,Germany
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต( $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ )	E.Merck Damstadt,Germany
น้ำตาลทราย	มิตรผล,ไทย
แป้งมันสำปะหลัง	อซี.ทีซี.เอียบตงจัน, ไทย

## 3.1.2 เคมีภัณฑ์(ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต	Sigma Chemical,USA.
พอลิเปปไทด์(polypeptone)	Becton Dickinson,USA.
โพแทสเซียมคลอไรด์(KCl)	Carco Erba,Italy
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Univar,Australia
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Unilab,USA.
เมทานอล( $\text{CH}_3\text{OH}$ )	E.Merck Damstadt,Germany
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Fluka,Germany
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	Fluka,Germany
ยูเรีย( $\text{N}_2\text{H}_4\text{CO}$ )	E.Merck Damstadt,Germany
สารสกัดจากเนื้อ(beef extract)	Difco,USA.
สารสกัดจากยีสต์(yeast extract)	Difco,USA.
เอทานอล( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ )	E.Merck Damstadt,Germany
เอนไซม์กลูโคอะไมเลส	อาซิโนะโมไต๊ะ,ไทย
เอนไซม์อะไมเลส	อาซิโนะโมไต๊ะ,ไทย
เอนไซม์อินเวอร์เทส(grade V EC3.2.1.26)	Sigma Chemical,USA.
เอนไซม์ยูเรียเอส(urease,EC3.5.1.5)	E.Merck Damstadt,Germany
แอมโมเนียมซัลเฟต( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	May & Baker,England
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	J.T.Baker,USA.

## 3.2 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Bacillus* sp.BA-019 ซึ่งแยกและคัดกรองโดยรัตนศิริ มุทิตากุล(2538)

### 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ(stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
พอลิเปปโติน	5	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 หนึ่งฆ่าเชื้อความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที(การหนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

3.3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ(seed culture medium) ใช้สูตรของDoi และคณะ (1986) ซึ่งศึกษาปรับปรุงโดย สุดา สุภาชวินสวัสดิ์(2542) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	10	กรัม
พอลิเปปโติน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
น้ำตาลทราย	10	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 และหนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน แยกสารละลายน้ำตาลหนึ่งฆ่าเชื้อความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการสร้างและสะสม PHB คือ อาหาร MSM(mineral salt medium) ซึ่งปรับปรุงโดยอติพล บุญเรืองถาวร(2543) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลทราย	15	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.0	กรัม
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
กรดซิตริก	0.75	กรัม
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร



แยกละลายเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตไฮเดรตและ trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับพีเอชเป็น 6.0 และนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน ส่วนของสารละลายน้ำตาลแยกฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

สารละลาย trace element ใน 1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตไฮเดรต	1.3	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตไฮเดรต	0.2	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต	0.6	กรัม
กรดบอริก	0.6	กรัม

### 3.4 วิธีการเก็บรักษาเชื้อและเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

#### 3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเลี้ยง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85% w/v) เพื่อเป็นเซลล์แขวนลอยปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ถ่ายเชื้อจากปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

#### 3.4.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต PHB

เลี้ยงกล้าเชื้อตามข้อ 3.4.1 จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวเพื่อการผลิต PHB ซึ่งบรรจุในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร ซึ่งแหล่งคาร์บอน และ ไนโตรเจนเปลี่ยนตามที่ระบุไว้ในแต่ละการทดลอง เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.0 (อติพล บุญเรืองถาวร, 2543) เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 12 24 36 และ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้โดยวิธีของ Comeau และคณะ (1988)

### 3.5 ศึกษาผลของชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต PHB

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ตามข้อ 3.4.2 โดยมีแหล่งคาร์บอนได้แก่ น้ำตาลทราย กลูโคส ฟรักโตส และ แป้งที่ผ่านการย่อย (hydrolyzed starch) ที่มีความเข้มข้น 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เก็บตัวอย่างช่วงเวลาที่ 12 24 36 และ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีของ Comeau และคณะ (1988) และหาจำนวนสปอร์โดยวิธีของ Kominek และคณะ (1965) โดยนำตัวอย่างที่ได้ไปทำ serial dilution ต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วจึงนำมากระจายบนจานเลี้ยงเชื้อ (spread plate) และนับจำนวนโคโลนี

### 3.6 ศึกษาผลของชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PHB

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ตามข้อ 3.4.2 ใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นผลจากการศึกษาข้อ 3.5 ที่ใช้เลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 แล้วได้ปริมาณ PHB สูงที่สุด และสร้างสปอร์น้อย แปรชนิดและปริมาณไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย และ แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณเท่ากับ 2 และ 3 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างช่วงเวลาที่ 12 24 36 และ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีของ Comeau และคณะ (1988) และ หาจำนวนสปอร์โดยวิธีของ Kominek และคณะ (1965)

### 3.7 ศึกษาผลของแร่ธาตุต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ตามข้อ 3.4.2 ใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นผลจากการศึกษาข้อ 3.5 แหล่งไนโตรเจนที่เป็นผลจากข้อ 3.6 โดยแปรชนิด และ ปริมาณแร่ธาตุในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แมกนีเซียม แคลเซียม และ แมงกานีส ในรูปของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต และ แมงกานีสคลอไรด์ ตามลำดับ เก็บตัวอย่างช่วงเวลาที่ 12 24 36 และ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีของ Comeau และคณะ (1988) และ หาจำนวนสปอร์โดยวิธีของ Kominek และคณะ (1965)

### 3.8 ศึกษาภาวะแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณอากาศ และ ค่าพีเอช ที่มีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์

#### 3.8.1 ผลของอุณหภูมิ

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ตามข้อ 3.4.2 ใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นผลจากการศึกษาข้อ 3.5 แหล่งไนโตรเจนจากผลการศึกษาข้อ 3.6 แร่ธาตุที่เป็นผลการศึกษาจากข้อ 3.7 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าโดยแปรอุณหภูมิที่ 25 30 40 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 12 24 36 และ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ PHB ที่ผลิตได้โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีของ Comeau และคณะ(1988)และหาจำนวนสปอร์โดยวิธีของ Kominck และคณะ(1965)

#### 3.8.2 ผลของปริมาณอากาศ

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ตามข้อ 3.4.2 ใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นผลจากการศึกษาข้อ 3.5 แหล่งไนโตรเจนที่เป็นผลจากข้อ 3.6 แร่ธาตุที่เป็นผลการศึกษาจากข้อ 3.7 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เป็นผลการศึกษาจากข้อ 3.8.1 โดย

ก. แปรปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 50 และ 75 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าโดยคงที่ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที

ข. เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าโดยใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 มิลลิลิตร และ ความเร็วรอบในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 100 200 และ 300 รอบต่อนาที

เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 12 24 36 และ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ PHB ที่ผลิตได้โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีของ Comeau และคณะ(1988) และ หาจำนวนสปอร์โดยวิธีของ Kominck และคณะ(1965)

#### 3.8.3 ผลของค่าพีเอช

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ตามข้อ 3.4.2 ใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นผลจากการศึกษาข้อ 3.5 แหล่งไนโตรเจนที่เป็นผลจากข้อ 3.6 แร่ธาตุที่เป็นผลการศึกษาจากข้อ 3.7 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เป็นผลการศึกษาจากข้อ 3.8.1 ความเร็วรอบที่เป็นผลจากข้อ 3.8.2 แปรค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เท่ากับ 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ในการควบคุมค่าพีเอช

ใส่อะซิเตตบัฟเฟอร์(acetate buffer) สำหรับที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์(phosphate buffer) ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 และ 7.0 ทริสบัฟเฟอร์(Tris buffer) ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 12 24 36 และ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีของ Comeau และคณะ(1988) และหาจำนวนสปอร์โดยวิธีของ Kominek และคณะ(1965)

### 3.9 การวิเคราะห์

#### 3.9.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตรมาปั่นแยกเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15-20 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์อบแห้ง คำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง(ภาคผนวก ข ) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

#### 3.9.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ PHB โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี(Gas Chromatography :GC)

ตามวิธีของ Comeau และคณะ(1988) โดยทำการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์มาละลายในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เทใส่ถ้วยพลาสติก จากนั้นนำไปอบแห้งที่ตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์แห้งน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียว เดิมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 3(3% acidified methanol) 2 มิลลิลิตรที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายในปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม(ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ไปสกัดแยกกรดและกากเซลล์ด้วยน้ำกลั่นตามวิธีข้างต้นอีกครั้ง ถ่ายชั้นคลอโรฟอร์มใส่หลอดฝาเกลียวสำหรับวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟี วิเคราะห์ปริมาณ PHB โดยวิธี GC ภายใต้ภาวะดังนี้



ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด carbowax-PEG เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร
อุณหภูมิของ injector	: 250 องศาเซลเซียส(isothermal)
อุณหภูมิของ column	: 130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ detector(FID)	: 250 องศาเซลเซียส(isothermal)
split ratio	: 50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา	: ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	: 1 ไมโครลิตร

### 3.9.3 การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปน้ำตาลรีดิวซ์

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ถ้าเป็นน้ำหมักที่ใช้เลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลทราย ให้นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางตามความเหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Bernfeld(1955) โดยการเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก(dinitrosalicylic acid, DNSA ภาคผนวก ก ) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

### 3.9.4 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

เตรียมน้ำตาลที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน นำส่วนที่กรองได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีค(peak area) ของน้ำตาลกลูโคส โดยวิเคราะห์ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: carbohydrate column
ชนิดของดีเทคเตอร์	: Refractive Index Detector
Flow rate	: 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที
Mobile phase	: 70% อะซีโตไนไตรล์ในน้ำ(ปริมาตรต่อปริมาตร)
ปริมาตรสารตัวอย่าง	: 100 ไมโครลิตร

### 3.9.5 การวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมัก

ใช้วิธีของKemper(1974) โดยนำน้ำหมักที่ทำการปั่นแยกเซลล์ออกแล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 x 150 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมคลอไรด์(ภาคผนวก ก) ความเข้มข้น 2 โมลาร์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย EDTA (ภาคผนวก ก) 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพัสซายดรีเอเจนต์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรด์รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ก) 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจนและค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

### 3.9.6 การหาปริมาณแอมโมเนียมในน้ำหมักโดยเครื่องวัดปริมาณแอมโมเนียมอออน (ammonium probe)

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วประมาณ 2 มิลลิลิตร วัดปริมาณแอมโมเนียมอออนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดปริมาณแอมโมเนียมอออน นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณปริมาณแอมโมเนียมเป็นกรัมต่อลิตร(ภาคผนวก ข)

### 3.9.7 การหาปริมาณยูเรียในน้ำหมัก

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วประมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ยูเรียเอส (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที วัดปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดปริมาณแอมโมเนียมอิออน นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณปริมาณยูเรียเป็นกรัมต่อลิตร(ภาคผนวก ข)

### 3.9.8 วิธีการย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์

ซึ่งแป้งปริมาณ 300 กรัม(30% w/v) เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 6.0 เติมเอนไซม์อะไมเลสปริมาณ 0.18 มิลลิลิตร (0.6 มิลลิลิตรต่อแป้ง 1 กิโลกรัม) กวนผสมให้เข้ากัน ตลอดเวลาในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปให้ความร้อนที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที รอให้เย็น จากนั้นปรับค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสปริมาณ 0.138 มิลลิลิตร (0.46 มิลลิลิตรต่อแป้ง 1 กิโลกรัม) กวนผสมให้เข้ากัน ตลอดเวลาในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปให้ความร้อนที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที รอให้เย็น นำไปปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสไว้ใช้ต่อไป นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดย HPLC ตามวิธีข้อ 3.9.4 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีค(peak area) ของน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ค)

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ตามวิธีการทดลองข้อ

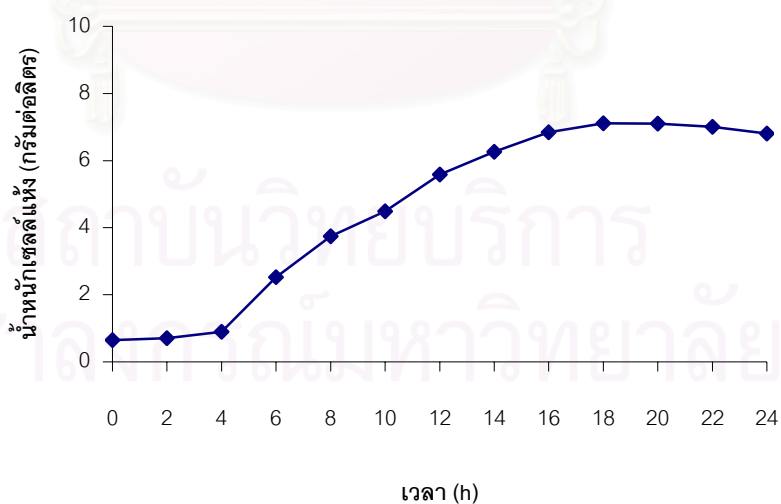
3.4.1 ติดตามการเติบโตเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ทุกๆ 2 ชั่วโมง โดยการหา  
น้ำหนักเซลล์แห้งและคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7 และรูปที่  
13 พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 มีการเจริญเติบโตจนถึงชั่วโมงที่ 18 จากนั้นจำนวนเซลล์  
ค่อนข้างคงที่และลดลงเล็กน้อยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อคำนวณอัตราการเจริญ  
จำเพาะ พบว่ากล้าเชื้ออายุที่ 6 ชั่วโมงให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.52 ต่อชั่วโมง  
ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมง นำไปใช้ในการวิจัยขั้นต่อไป

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 7 การเจริญเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

เวลา (h)	DCW(g/l)	อัตราการเจริญจำเพาะ ( $h^{-1}$ )
0	0.65	-
2	0.71	0.04
4	0.90	0.12
6	2.53	0.52
8	3.75	0.20
10	4.49	0.09
12	5.59	0.11
14	6.26	0.06
16	6.84	0.04
18	7.11	0.02
20	7.10	-0.001
22	7.01	-0.01
24	6.81	-0.01



รูปที่ 13 การเจริญเติบโตของ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

#### 4.2 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิต PHB ของ *Bacillus* sp. BA-019

การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน โดยเลือกแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและเชื่อมีการผลิต PHB ปริมาณมาก เพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยไม่พบว่ามีรายงานการวิจัยว่าแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการสร้างสปอร์ แหล่งคาร์บอนที่ใช้การผลิต PHB มีผลต่อต้นทุนการผลิต PHB อย่างมาก ในการผลิต PHB พบว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของราคาการผลิตทั้งหมด คือ ราคาของวัตถุดิบที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB จะต่างกันออกไปขึ้นกับความสามารถของชนิดของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังนั้นถ้าสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น แป้งมันสำปะหลัง กากน้ำตาล หางนม เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เป็นต้น หรือใช้ของเสีย และน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิต PHB จะเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถลดต้นทุนการผลิต PHB Sabat และคณะ (1998) ศึกษาการผลิต PHB จาก wheat bran โดย *Bacillus megaterium* BS1 สามารถผลิต PHB ได้ 1.9 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Yu(2001) ศึกษาการผลิต PHA จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งโดยเชื้อ *A.eutrophus* พบว่าสามารถผลิต PHB คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 48 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลิต PHBV คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 53 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

อดิพล บุญเรืองถาวร(2543) ศึกษาเปรียบเทียบการผลิต PHB จาก *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้กากน้ำตาล และ น้ำตาลทรายที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และพบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนการเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิต PHB สูงกว่าการใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน และการใช้กากน้ำตาลยังทำให้ลดต้นทุนการผลิต แต่เนื่องจากการใช้กากน้ำตาลยังคงมีปัญหาเรื่องเซลล์สามารถดูดซึ่มสีของกากน้ำตาล ถ้าจะนำ PHB ไปใช้ผลิต R-3-HB เพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์แล้วควรจะเลี่ยงปัญหาในเรื่องนี้ เนื่องจากต้องการผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการหาแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยเลือกใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถใช้แป้งได้โดยตรง ผู้วิจัยจึงใช้แป้งที่ผ่านการย่อยเปรียบเทียบกับกากน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรักโตส และ น้ำตาลทราย (ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร)

จากผลการวิจัยการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 12 24 36 และ 48 นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ ผลการวิจัยแสดงดังตารางที่ 8 และ ตารางที่ 9 พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน การผลิต PHB ไม่แตกต่างกับการใช้แป้งที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งคาร์บอนได้แก่ 49.69 และ 49.64 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือคิดเป็น 1.54 และ 1.60 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ส่วนในด้านการเจริญเติบโต ผลการทดลองแสดงว่า น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อด้วยกลูโคสสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อด้วยแป้งที่ผ่านการย่อยเล็กน้อย โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเท่ากับ 4.49 และ 3.11 กรัมต่อลิตรที่เวลา 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ แต่พิจารณาในด้านของราคาแล้ว แป้งที่ผ่านการย่อยมีราคาถูกกว่ามาก ดังนั้นจึงเลือกใช้แป้งที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาขั้นต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ 8** การเจริญเติบโตและการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคส ฟรักโตส น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร และ แป้งที่ผ่านการย่อย ที่มีปริมาณน้ำตาลรวม 15 กรัมต่อลิตร

แหล่งคาร์บอน	เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	PHB conc. (g/l)	Total sugar (g/l)
กลูโคส	0	0.64	-	-	14.23
	12	2.97	49.69	1.54	11.40
	24	3.10	47.82	1.48	7.79
	36	4.07	34.22	1.39	7.50
	48	4.49	29.16	1.31	7.07
แป้งที่ผ่านการย่อย	0	0.63	-	-	15.03
	12	2.67	49.64	1.60	11.50
	24	2.76	38.25	1.33	8.10
	36	2.86	26.12	0.75	7.40
	48	3.11	20.48	0.64	7.06
ฟรักโตส	0	0.64	-	-	15.02
	12	2.04	41.10	0.84	13.67
	24	2.36	35.59	0.84	19.87
	36	2.30	21.37	0.49	8.79
	48	2.40	11.68	0.28	7.20
น้ำตาลทราย	0	0.64	-	-	15.21
	12	2.62	48.62	1.12	12.36
	24	2.23	42.96	1.08	10.52
	36	2.55	32.87	0.84	10.34
	48	3.26	31.93	1.04	8.45



ตารางที่ 9 เปรียบเทียบการผลิต PHB ที่ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 โดยแหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคส ฟรักโตส น้ำตาลทราย 15 กรัมต่อลิตร และ แป้งที่ผ่านการย่อย ที่มีปริมาณน้ำตาลรวม 15 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง

แหล่งคาร์บอน	DCW (g/l)	PHB content (% by wt )	PHB conc.(g/l)
กลูโคส	2.97	49.69	1.54
แป้งที่ผ่านการย่อย	2.67	49.64	1.33
ฟรักโตส	2.04	41.1	0.84
น้ำตาลทราย	2.62	48.62	1.08

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.3 การศึกษาผลของชนิด และปริมาณ แหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต และการผลิต PHB ของ *Bacillus* sp. BA-019

แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อการเติบโตของจุลินทรีย์เช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน สำหรับการผลิต PHB โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีรายงานจำนวนมากที่ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเติบโตและการสังเคราะห์ PHB แต่ไม่พบว่ามีรายงานการวิจัยว่าแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการสร้างสปอร์ โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิต PHB ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมโดยส่วนใหญ่คือแอมโมเนียมซัลเฟต ทั้งนี้ขึ้นกับความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของจุลินทรีย์ Beaulieu และคณะ(1995)ศึกษาผลของเกลือแอมโมเนียมต่อการเจริญเติบโตและการผลิต PHB จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* โดยเปรียบเทียบระหว่างเกลือแอมโมเนียม 4 ชนิดคือซัลเฟต ไนเตรต ฟอสเฟต และคลอไรด์ พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ ปริมาณ PHB และอัตราการผลิต PHB สูงกว่าการใช้เกลือแอมโมเนียมชนิดอื่นเป็นแหล่งไนโตรเจน Grothe และคณะ(1999)พบว่าเชื้อ *A.latus* ไม่สามารถใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิต PHB ได้ และการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตโดยแบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตและการผลิต PHB สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ

รัตนศิริ มุทิตากุล(2538)ได้ศึกษาการผลิต PHB จาก *Bacillus* sp.BA-019 โดยให้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนระหว่างอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ และเกลือแอมโมเนียมหลายชนิด พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ทำให้ *Bacillus* sp.BA-019 สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ได้ดีกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น โดยได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นจาก 22.07 เป็น 31.73 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง มีผู้ศึกษามาก่อนในกลุ่มเดียวกับผู้วิจัย ได้แก่ สุดา สุภาชวินสวัสดิ์(2542) ศึกษาการผลิต PHBV โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ พบว่าสามารถใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีใกล้เคียงกับแอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียยังมีราคาถูกกว่าอติพล บุญเรืองถาวร(2543) ศึกษาการผลิต PHB ในถังหมักและพบว่าสามารถใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ดังนั้นในงานวิจัยขั้นตอนนี้จึงศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนโดยการใช้อินทรีย์ไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียซึ่งเป็นอินทรีย์ไนโตรเจนที่หาได้ง่ายและราคาถูก โดยมีราคาถูกกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตประมาณ 4 เท่า และศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.BA-019

จากการเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 เพื่อเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนทั้งสองชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย โดยปริมาณสารประกอบทั้งสองชนิดที่ใช้มีธาตุไนโตรเจนปริมาณ

เท่ากับเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร มีแบ่งที่ผ่านการย่อยความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน(ตามวิธีการทดลองข้อ 3.6) เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิต PHB ได้สูงกว่าการให้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนคิดเป็นปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 49.64 และ 23.64 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตารางที่ 11 แสดงผลการวิจัยเมื่อได้ผลว่าแอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลดีกว่ายูเรีย จึงแปรปริมาณไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 2 และ 3 กรัมต่อลิตร [ก่อนหน้านั้นผู้วิจัยได้ทดลองเลี้ยงเชื้อมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ปริมาณ PHB น้อยกว่า (31.47 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร] พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 3 กรัมต่อลิตร *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิต PHB ได้สูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร คือได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 53.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่ 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ได้เท่ากับ 3.39 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับ 1.41 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณไนโตรเจนลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อโดยเหลือประมาณ 6-7 กรัมต่อลิตรที่เวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 10 การเจริญเติบโต ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ของ *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน	เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	PHB conc. (g/l)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate or urea (g/l)
แอมโมเนียมซัลเฟต	0	0.63	-	-	15.03	1.99
	12	2.67	49.64	1.33	11.50	1.67
	24	2.76	38.25	1.60	8.10	1.43
	36	2.86	26.12	0.75	7.40	0.86
	48	3.11	20.48	0.64	7.06	0.41
ยูเรีย	0	0.71	-	-	14.22	1.91
	12	2.74	23.64	0.68	12.01	1.33
	24	3.59	14.43	0.52	8.70	1.21
	36	4.74	11.57	0.55	6.97	1.02
	48	5.01	9.16	0.45	6.20	0.86



ตารางที่ 11 เปรียบเทียบการผลิต PHB และการเจริญเติบโตเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 2 และ 3 กรัมต่อลิตร

ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (g/l)	เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	PHB conc. (g/l)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate(g/l)
2	0	0.93	-	-	14.22	1.99
	12	2.67	49.6	1.33	12.01	1.67
	24	2.76	38.25	1.60	8.70	1.43
	36	2.86	26.12	0.75	6.97	0.86
	48	3.11	20.48	0.64	6.20	0.41
	3	0	0.93	-	-	15.01
12		2.46	53.42	1.32	11.98	1.31
24		2.95	47.87	1.41	8.30	1.24
36		3.36	29.00	0.97	6.20	1.02
48		3.39	26.40	0.90	5.70	0.86

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.4 ศึกษาผลของแร่ธาตุต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์โดย *Bacillus* sp. BA-019

แร่ธาตุบางชนิดได้แก่ แมกนีเซียม แคลเซียม และแมงกานีส มีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์ Danielและคณะ(1992) รายงานถึงความสำคัญของการจำกัดปริมาณแมกนีเซียมต่อการผลิต PHB ใน *Pseudomonas* sp.สายพันธุ์ 135 ได้พบว่า ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแมกนีเซียมในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟต เชื้อผลิต PHB ได้ปริมาณมากกว่าการเติมแมกนีเซียม โดยผลิต PHB ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 42.50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Atrihและ Foster(2002) รายงานว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ มีการใช้แร่ธาตุบางชนิดในการสร้างความเสถียร และการทนความร้อนของสปอร์ โดยรายงานว่แมกนีเซียม แคลเซียม และแมงกานีสเป็นแร่ธาตุที่มีผลมากที่สุด และพบในชั้น core ของสปอร์

##### 4.4.1 ผลของแมกนีเซียม

เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ตามวิธีการทดลองข้อ3.7 ซึ่งควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยให้แมกนีเซียมในรูปแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณเท่ากับ 200(ชุดควบคุม) 400 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติม เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ผลการผลิต PHB เมื่อไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในตารางที่ 12 พบว่าที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ เซลล์ที่ได้มีปริมาณน้อยมากไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณPHBได้ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยเติมแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม)ดังตารางที่ 14 รูปที่ 14 เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 56.48 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อเพิ่มปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 400 มิลลิกรัมต่อลิตรแสดงดังตารางที่ 16 คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 24.75 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่ 12 ชั่วโมงของการเลี้ยง ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงใส่แมกนีเซียมในรูปของแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

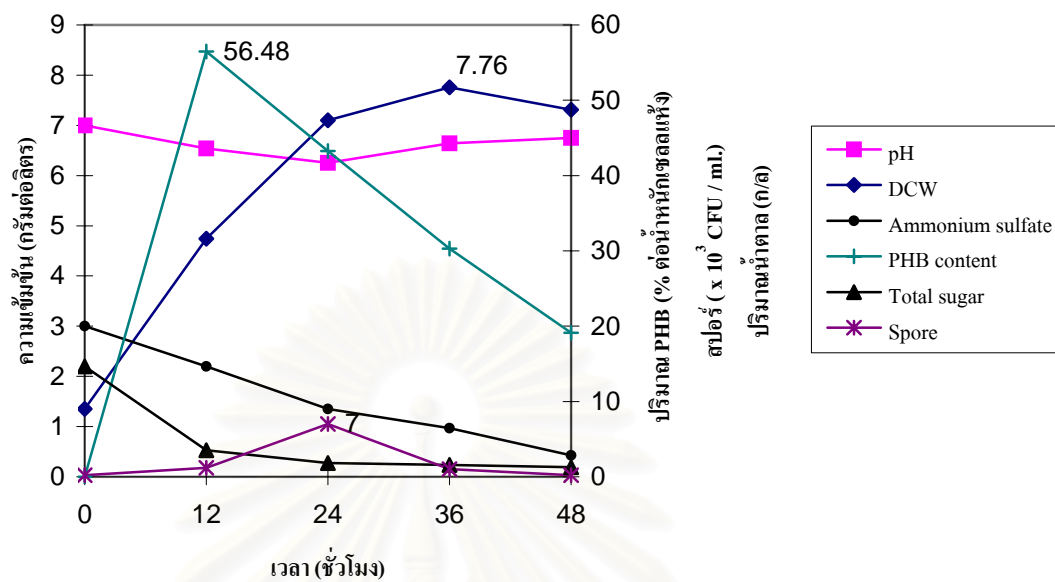
การนับจำนวนสปอร์โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา ต่างๆ ได้แก่ 12 18 24 30 36 42 และ 48 ชั่วโมง นำไปนับจำนวนเซลล์ และ นับจำนวนสปอร์ตามวิธีของ Kominekและคณะ (1965) ให้ผลการทดลองในตารางที่ 18 รูปที่ 14 จำนวนสปอร์ที่นับได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อและมี

จำนวนสปอร์มากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นค่อยๆ ลดลง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต นับจำนวนสปอร์ได้  $2.1 \times 10^3$  CFU/ml. เมื่อเติมแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) มีจำนวนสปอร์เท่ากับ  $7 \times 10^3$  CFU/ml. และเมื่อเพิ่มปริมาณแมกนีเซียมเป็น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้จำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้นเป็น  $12 \times 10^3$  CFU/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

ได้นำรูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 ผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุดมาแสดงสรุปดังรูปที่ 14 โดยจะเห็นได้ว่าการผลิต PHB สูงสุด (56.48 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เวลา 12 ชั่วโมง แล้วค่อยๆลดลงตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ และจำนวนสปอร์สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ( $7 \times 10^3$  CFU/ml.) น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.76 กรัมต่อลิตรที่เวลา 36 ชั่วโมง ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและแอมโมเนียมซัลเฟตค่อยๆลดลงเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโต



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 รูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ โดย *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม)



ตารางที่ 12 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต

เวลา (h)	pH	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate (g/l)
0	7.0	1.58	-	14.22	2.86
12	5.87	1.76	ND	13.67	2.54
24	6.28	2.01	ND	13.26	2.39
36	6.49	2.10	13.06	12.94	2.24
48	6.52	1.95	3.38	12.62	1.86

ND = มีเซลล์ปริมาณน้อยมากไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 13 จำนวนสปอร์ และ จำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต

เวลา (h)	Spores ( $\times 10^3$ CFU/ml)	Vegetative cells ( $\times 10^6$ CFU/ml)
0	-	-
12	1.6	13
18	1.9	23
24	2.1	27
30	0.8	30
36	0.6	38
42	0.4	16
48	0.1	12

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 14 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม) ควบคุมค่าพีเอชตลอดการทดลองที่ 7.0

เวลา (h)	pH	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate(g/l)
0	7.0	1.35	-	14.65	3.00
12	6.54	4.74	56.48	3.53	2.20
24	6.25	7.10	43.25	1.84	1.35
36	6.64	7.76	30.28	1.58	0.97
48	6.75	7.31	19.12	1.29	0.43

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 15 จำนวนสปอร์ และจำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร(ในชุดควบคุม)

เวลา (h)	Spores ( $\times 10^3$ CFU/ml)	Vegetative cells ( $\times 10^6$ CFU/ml)
0	-	-
12	1.2	23
18	3.0	53
24	7.0	67
30	1.0	60
36	1.0	58
42	0.9	36
48	0.2	22

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 16 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคุมค่าพีเอชตลอดการทดลองที่ 7.0

เวลา (h)	pH	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate (g/l)
0	7.0	1.52	-	14.22	2.62
12	6.25	3.73	24.75	9.92	1.90
24	5.79	4.04	21.18	8.65	1.32
36	5.77	3.49	19.94	7.39	1.09
48	5.75	3.36	13.44	6.22	0.93

ตารางที่ 17 จำนวนสปอร์ และจำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณเท่ากับ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (h)	Spores ( $\times 10^3$ CFU/ml)	Vegetative cells ( $\times 10^6$ CFU/ml)
0	-	-
12	6.2	11
18	8.0	18
24	12.0	21
30	6.0	23
36	6.0	30
42	5.1	22
48	4.3	18

เมื่อนำผลการวิจัยดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับสรุปผลดังตารางที่ 18 พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตได้เซลล์ปริมาณน้อยมากทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณ PHB ได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม)ได้ปริมาณ PHB สูงที่สุดเท่ากับ 56.48 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์ และเมื่อเพิ่มปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 400 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ปริมาณ PHB ลดลงเหลือเท่ากับ 24.75 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์ และพบว่าปริมาณแมกนีเซียมที่เพิ่มขึ้นมีผลให้จำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้นจาก  $7 \times 10^3$  เป็น  $12 \times 10^3$  CFU/ml. แต่ถ้าไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตพบจำนวนสปอร์น้อยกว่าเมื่อมีแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ( $2.1 \times 10^3$  CFU/ml.) เมื่อพิจารณาการผลิต PHB เป็นหลัก ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรเหมาะสมสำหรับการผลิต PHB

**ตารางที่ 18** เปรียบเทียบสรุป การผลิต PHB และการสร้างสปอร์ที่ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณต่างกัน

แมกนีเซียมซัลเฟต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	PHB content * (% by wt.)	Spores ** ( $\times 10^3$ CFU/ml)
0	ND	2.1
200(ชุดควบคุม)	56.48	7
400	24.75	12

ND หมายถึง มีเซลล์จำนวนน้อยมากไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้

\* หมายถึง ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

\*\* หมายถึง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

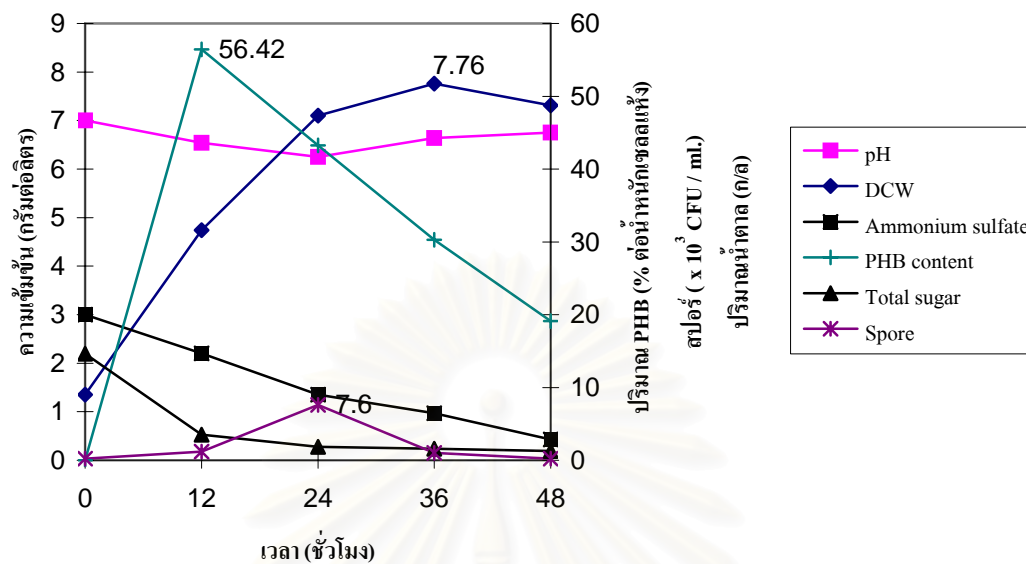


#### 4.4.2 ผลของแคลเซียม

เลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ตามวิธีการทดลองข้อ 3.7 ซึ่งควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที โดยมีแคลเซียมในรูปของ แคลเซียมคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 20 (ชุดควบคุม) และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่เติม เก็บ ตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองดังตารางที่ 19 พบว่าการทดลองที่ไม่เติมแคลเซียมได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 26.96 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยเพิ่มแคลเซียมเป็น 40 มิลลิกรัมต่อลิตรแสดงดังตารางที่ 23 พบว่า *Bacillus* sp.BA-019 ผลิต PHB ได้ลดลงคิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 29.31 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่ 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแคลเซียมเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม) ดังแสดงในตารางที่ 21 เชื้อสามารถเจริญเติบโต และผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 56.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงใส่แคลเซียมในรูปแคลเซียมคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

การนับจำนวนสปอร์โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา ต่างๆ ได้แก่ 12 18 24 30 36 42 และ 48 ชั่วโมง นำไปนับจำนวนเซลล์ และ นับจำนวนสปอร์ตามวิธีของ Kominek และคณะ (1965) ให้ผลการทดลองในตารางที่ 25 จำนวนสปอร์ที่นับได้เพิ่มขึ้นเมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อและพบว่าจำนวนสปอร์มากที่สุดที่ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อจากนั้นค่อยๆ ลดลง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแคลเซียม นับจำนวนสปอร์ได้เท่ากับ  $1.9 \times 10^3$  CFU/ml. เมื่อเติมแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตรมีจำนวนสปอร์เท่ากับ  $7.6 \times 10^3$  CFU/ml. ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อเพิ่มปริมาณแคลเซียมเป็น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้จำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้นเท่ากับ  $12.1 \times 10^3$  CFU/ml.

ได้นำผลการศึกษารูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA 019 มาแสดงเฉพาะการทดลองที่ได้ปริมาณ PHB สูงที่สุด (รูปที่ 15) โดยจะเห็นได้ว่าการผลิต PHB สูงสุด (56.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เวลา 12 ชั่วโมง แล้วค่อยๆลดลงตามเวลา การเลี้ยงเชื้อ และจำนวนสปอร์สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ( $7.6 \times 10^3$  CFU/ml.) น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.76 กรัมต่อลิตรที่เวลา 36 ชั่วโมง ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและแอมโมเนียมซัลเฟตค่อยๆลดลงเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโต



รูปที่ 15 รูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ โดย *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม)

ตารางที่ 19 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์ ควบคุมค่าพีเอชตลอดการทดลองที่ 7.0

เวลา (h)	pH	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate (g/l)
0	7.0	1.56	-	14.22	2.99
12	5.98	4.60	26.96	11.40	2.40
24	5.67	4.61	24.92	7.79	1.75
36	5.67	4.28	21.00	6.50	1.18
48	5.62	4.19	10.57	6.07	0.96

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 20 จำนวนสปอร์ และ จำนวน Vegetative cells ที่สร้างโดย *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์

เวลา (h)	Spores ( x 10 <sup>3</sup> CFU/ml)	Vegetative cells ( x 10 <sup>6</sup> CFU/ml )
0	-	-
12	0.69	7.0
18	1.20	11.4
24	1.90	13.5
30	0.81	8.6
36	0.64	8.9
42	0.21	7.3
48	0.11	6.8

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 21 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแคลเซียมคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชุดควบคุม) ควบคุมค่าพีเอชตลอดการทดลองที่ 7.0

เวลา (h)	pH	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate(g/l)
0	7.0	1.35	-	14.65	3.00
12	6.54	4.74	56.42	3.53	2.20
24	6.25	7.10	43.25	1.84	1.35
36	6.64	7.76	30.28	1.58	0.97
48	6.75	7.31	19.12	1.29	0.43

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 22 จำนวนสปอร์ และจำนวน Vegetative cells ที่สร้างโดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อมีแคลเซียมคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม)

เวลา (h)	Spores ( x 10 <sup>3</sup> CFU/ml)	Vegetative cells ( x 10 <sup>6</sup> CFU/ml)
0	-	-
12	1.2	23
18	3.0	53
24	7.6	67
30	1.0	60
36	1.0	58
42	0.9	36
48	0.2	22

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 23 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร คบขคุมค่าพีเอชตลอดการทดลองที่ 7.0

เวลา (h)	pH	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate (g/l)
0	7.0	1.23	-	15.03	2.98
12	5.57	3.68	29.31	9.97	2.43
24	5.67	4.69	23.81	7.93	1.56
36	5.61	4.39	18.51	6.33	1.31
48	5.56	4.36	15.67	5.86	0.96

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 24 จำนวนสปอร์ และ Vegetative cells ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (h)	Spores ( $\times 10^3$ CFU/ml)	Vegetative cells ( $\times 10^6$ CFU/ml)
0	-	-
12	4.00	12.2
18	8.00	17
24	12.10	19
30	2.10	20.4
36	1.90	20
42	1.70	17
48	0.32	15.9

- = ไม่ได้วิเคราะห์



เมื่อนำผลการวิจัยดังกล่าวมาเปรียบเทียบกันสรุปผลดังตารางที่ 25 พบว่าธาตุแคลเซียมมีผลสำหรับการผลิต PHB เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารที่มีแคลเซียมคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม) เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต PHB ได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 56.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อปริมาณแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นเป็น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ PHB ลดลงเหลือเท่ากับ 29.31 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และพบว่าถึงแม้ไม่เติมปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 สามารถการผลิต PHB ได้แต่ได้ปริมาณต่ำลงโดยได้เท่ากับ 26.96 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นมีผลให้จำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้นจาก  $7.6 \times 10^3$  เป็น  $12.1 \times 10^3$  CFU/ml. แต่ถ้าไม่เติมปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าจำนวนสปอร์ที่นับได้น้อยกว่าเมื่อมีแคลเซียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ( $1.9 \times 10^3$  CFU/ml.) เมื่อพิจารณาการผลิต PHB เป็นหลัก ปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตรเหมาะสมสำหรับการผลิต PHB

ตารางที่ 25 เปรียบเทียบสรุป การผลิต PHB และการสร้างสปอร์ ที่ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ต่างกัน

แคลเซียมคลอไรด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	PHB content * (% by wt.)	Spores ** ( $\times 10^3$ CFU/ml)
0	26.96	1.9
20(ชุดควบคุม)	56.42	7.6
40	29.31	12.1

\* หมายถึง ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

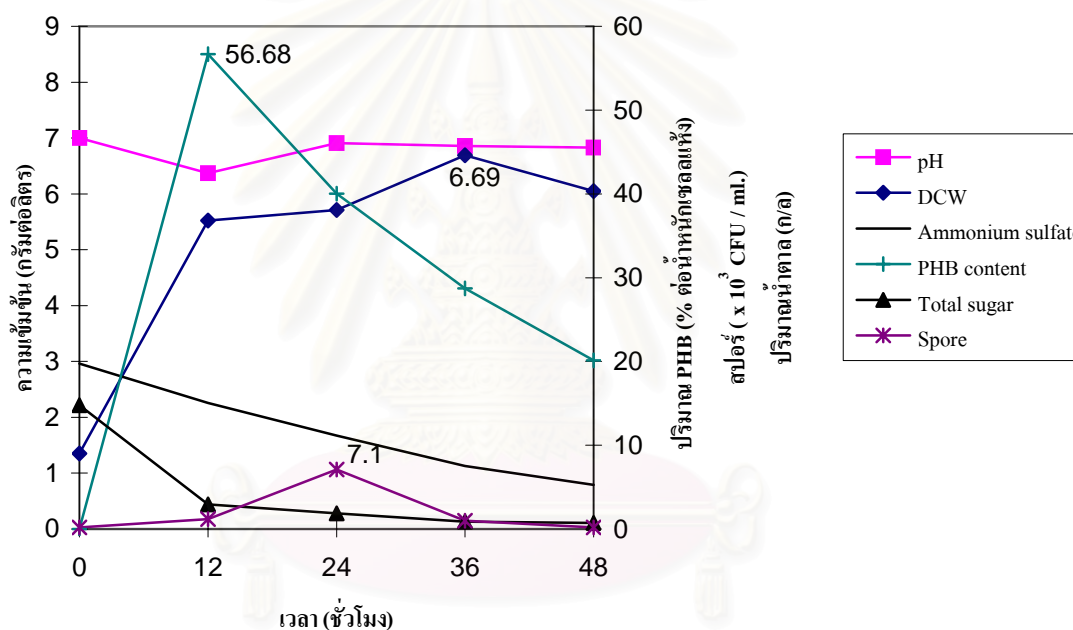
\*\* หมายถึง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

#### 4.4.3 ผลของแมงกานีส

เลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ตามวิธีการทดลองข้อ 3.7 ซึ่งควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที โดยมีแมงกานีสในรูปของแมงกานีสคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 0.08 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตรและไม่เติม(ชุดควบคุม) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองดังตารางที่ 26 พบว่าในการทดลองที่ไม่เติมแมงกานีสคลอไรด์(ชุดควบคุม)ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 47.04 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยเพิ่มปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เป็น 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตรแสดงดังตารางที่ 28 เชื้อสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณเท่ากับ 56.68 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ และจากตารางที่ 30 เมื่อเพิ่มปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เป็น 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 48.81 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยง เมื่อมีแมงกานีสคลอไรด์เพิ่มขึ้นปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ลดลงเล็กน้อย ดังนั้นในการทดลองที่เติมแมงกานีสคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ได้ปริมาณ PHB สูงที่สุดจึงเป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB

การนับจำนวนสปอร์โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา ต่างๆ ได้แก่ 12 18 24 30 36 42 และ 48 ชั่วโมง นำไปนับจำนวนเซลล์ และ นับจำนวนสปอร์ตามวิธีของ Kominekและคณะ (1965) ให้ผลการทดลองในตารางที่ 32 จำนวนสปอร์ที่นับได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อ และได้จำนวนสปอร์มากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อจากนั้นค่อยๆ ลดลง ในการทดลองที่ไม่เติมแมงกานีสคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อนับจำนวนสปอร์ได้เท่ากับ  $5.6 \times 10^3$  CFU/ml. เมื่อเติมแมงกานีสคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตรได้จำนวนสปอร์เท่ากับ  $7.1 \times 10^3$  CFU/ml และเมื่อเพิ่มปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เป็น 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้จำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้นเท่ากับ  $12.9 \times 10^3$  CFU/ml.

ได้นำผลการศึกษารูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA 019 มาแสดงเฉพาะการทดลองที่ได้ปริมาณ PHB สูงที่สุด (รูปที่ 16) โดยจะเห็นได้ว่าการผลิต PHB สูงสุด (56.68 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เวลา 12 ชั่วโมง แล้วค่อยๆลดลงตามเวลา การเลี้ยงเชื้อ และจำนวนสปอร์สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ( $7.1 \times 10^3$  CFU/ml.) น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.69 กรัมต่อลิตรที่เวลา 36 ชั่วโมง ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและแอมโมเนียมซัลเฟตค่อยๆลดลงเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโต



รูปที่ 16 รูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ โดย *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมงกานีสคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 26 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมงกานีสคลอไรด์ (ชุดควบคุม) ควบคุมค่าพีเอชตลอดการทดลองที่ 7.0

เวลา (h.)	pH	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate (g/l)
0	7.0	1.35	-	14.65	3.00
12	6.54	4.74	47.04	3.53	2.20
24	6.25	7.10	33.25	1.84	1.35
36	6.64	7.76	25.28	1.58	0.97
48	6.75	7.31	19.12	1.29	0.43

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 27 จำนวนสปอร์ และ จำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมงกานีสคลอไรด์ (ชุดควบคุม)

เวลา (h)	Spores ( $\times 10^3$ CFU/ml)	Vegetative cells ( $\times 10^6$ CFU/ml)
0	-	-
12	1.2	19
18	3.0	53
24	5.6	67
30	1.6	60
36	1.0	58
42	0.9	36
48	0.2	22

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 28 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคุมค่าพีเอชตลอดการทดลองที่ 7.0

เวลา (h)	pH	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate (g/l)
0	7.0	1.35	-	14.79	2.96
12	6.37	5.52	56.68	2.94	2.26
24	6.91	5.71	40.01	1.89	1.67
36	6.86	6.69	38.72	0.89	1.13
48	6.83	6.05	26.13	0.72	0.79

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 29 จำนวนสปอร์ และ จำนวน Vegetative cells ในชุดควบคุม เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (h)	Spores ( $\times 10^3$ CFU/ml)	Vegetative cells ( $\times 10^6$ CFU/ml)
0	-	-
12	4.00	23.0
18	4.10	56.6
24	7.10	64.0
30	1.24	68.5
36	1.09	89.0
42	1.00	61.0
48	0.59	60.0

- = ไม่ได้วิเคราะห์



ตารางที่ 30 ปริมาณ PHB การเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เท่ากับ 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ควบคุมค่าพีเอชตลอดการทดลองเท่ากับ 7.0

เวลา (h)	pH	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate (g/l)
0	7.0	1.10	-	14.34	3.00
12	6.68	4.99	48.81	7.94	2.66
24	6.71	4.46	39.61	6.46	1.99
36	6.70	4.37	27.81	5.37	1.35
48	6.60	4.88	15.35	4.08	0.97

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 31 จำนวนสปอร์ และจำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เท่ากับ 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตร

เวลา (h)	Spores ( $\times 10^3$ CFU/ml)	Vegetative cells ( $\times 10^6$ CFU/ml)
0	-	-
12	4.2	21
18	4.8	46
24	12.9	54
30	2.6	59
36	1.9	78
42	1.6	52
48	1.2	49

- = ไม่ได้วิเคราะห์

เมื่อนำผลการวิจัยดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับสูตรผลดังตารางที่ 32 พบว่าเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมงกานีสคลอไรด์ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 47.04 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเติมแมงกานีสคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 56.68 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อเพิ่มปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เป็น 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ปริมาณ PHB ลดลงเล็กน้อยโดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 48.81 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมงกานีสคลอไรด์ปริมาณเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตรนับจำนวนสปอร์ได้เท่ากับ  $7.1 \times 10^3$  CFU/ml. ปริมาณแมงกานีสคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นเป็น 0.16 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลให้จำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้นเท่ากับ  $12.9 \times 10^3$  CFU/ml. ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าไม่เติมแมงกานีสคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบจำนวนสปอร์ที่นับได้น้อยกว่าเมื่อมีแมงกานีสคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ( $5.6 \times 10^3$  CFU/ml.) พิจารณาการผลิต PHB เป็นหลัก ปริมาณแมงกานีสคลอไรด์เท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB

**ตารางที่ 32** เปรียบเทียบสรุป การผลิต PHB และการสร้างสปอร์ที่ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมงกานีสคลอไรด์ต่างกัน

แมงกานีสคลอไรด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	PHB content * (% by wt.)	Spores ** ( $\times 10^3$ CFU/ml)
0(ชุดควบคุม)	47.04	5.6
0.08	56.68	7.1
0.16	48.81	12.9

\* หมายถึง ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

\*\* หมายถึง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

#### 4.5 การศึกษาผลของภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณอากาศ และ ค่าพีเอช ต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์โดย *Bacillus* sp.BA-019

การวิจัยขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณอากาศ และ ค่าพีเอช ซึ่งมีต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp.BA-019 ในระดับขวดเขย่า เนื่องจากผลการวิจัยของผู้วิจัยในคณะวิจัย(สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ ,2542 และอติพล บุญเรืองถาวร ,2543)ที่ได้ศึกษาการผลิตสาร PHA จาก *Bacillus* sp.BA-019 สังเกตพบว่าเมื่อได้ปริมาณ PHA (PHB และ โคพอลิเมอร์ PHBV) สูงสุดแล้ว มีการลดลงของสารผลิตภัณฑ์อย่างรวดเร็วและลดลงเรื่อยๆตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ จึงสันนิษฐานว่าอาจจะเนื่องมาจาก *Bacillus* sp.BA-019 เป็นแบคทีเรียที่มีการสร้างสปอร์ เมื่อเชื้อมีการสร้างสปอร์จึงอาจนำ PHB ไปใช้ในกระบวนการสร้างสปอร์

##### 4.5.1 ผลของอุณหภูมิ

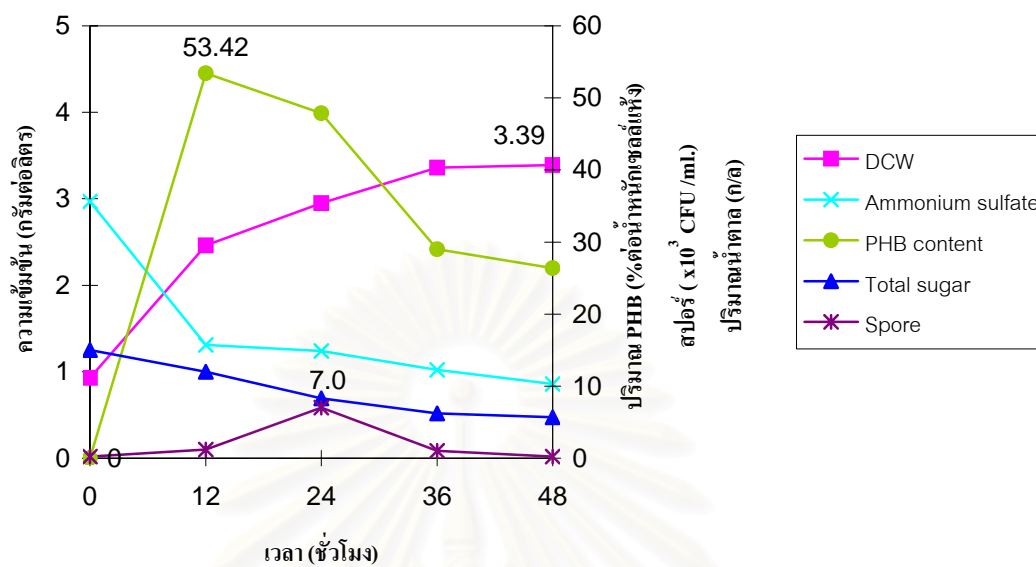
อุณหภูมิของในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิต PHB เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์อื่นๆ แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการเจริญเติบโต และการผลิต PHB ที่อุณหภูมิต่างกันไป Wu และคณะ(2001) ศึกษาการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp.JMa5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตคือ 35-37 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 25-35 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและเมื่ออยู่ในภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ เป็นผลให้เกิดกระบวนการสร้างสปอร์ซึ่งทำให้ปริมาณ PHB ลดลง Borahและคณะ(2002)ศึกษาผลของสารอาหารและภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิต PHBจาก *Bacillus mycooides* RLJ B-017 พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการผลิต PHB และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต PHB คือ 30 องศาเซลเซียส

ในงานวิจัยนี้จากการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่ใช้การเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่มีต่อการผลิต PHBโดยเลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองข้อ 3.8.1 บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิโดยแปรอุณหภูมิเท่ากับ 25 30 40 และ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 33-40 พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโต การผลิต PHB และการสร้างสปอร์

*Bacillus* sp. BA-019 มีการผลิต PHB สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 53.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนที่อุณหภูมิ 25 40 และ 45 องศาเซลเซียส แบคทีเรียจะสร้างและสะสม PHB ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่าคือเท่ากับ 23.37 38.02 และ 18.11 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงตามลำดับที่อุณหภูมิ 30 และ 25 องศาเซลเซียส *Bacillus* sp. BA-019 มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.39 และ 3.21 กรัมต่อลิตรที่เวลา 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ รูปแบบของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีในน้ำหมักของทุกภาวะพบว่าเป็นรูปแบบเดียวกัน คือความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

และจากการนับจำนวนสปอร์โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 12 18 24 30 36 42 และ 48 ชั่วโมง นำไปนับจำนวนเซลล์ และ นับจำนวนสปอร์ตามวิธีของ Kominek และคณะ (1965) สรุปผลการทดลองในตารางที่ 41 จำนวนสปอร์ที่นับได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และพบว่าจำนวนสปอร์มากที่สุดที่ 24 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ ลดลง อุณหภูมิมีผลต่อการสร้างสปอร์พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีจำนวนสปอร์มากที่สุดเท่ากับ  $7 \times 10^3$  CFU/ml. ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจำนวนสปอร์ที่ได้ลดลง เท่ากับ  $0.19 \times 10^3$  CFU/ml. ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

ได้นำผลการศึกษารูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA 019 มาแสดงเฉพาะการทดลองที่ได้ปริมาณ PHB สูงที่สุด (รูปที่ 17) โดยจะเห็นได้ว่าการผลิต PHB สูงสุด (53.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เวลา 12 ชั่วโมง แล้วค่อยๆ ลดลงตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ และจำนวนสปอร์สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ( $7 \times 10^3$  CFU/ml.) น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.39 กรัมต่อลิตรที่เวลา 48 ชั่วโมง ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและแอมโมเนียมซัลเฟตค่อยๆ ลดลงเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโต



รูปที่ 17 รูปแบบการผลิต PHB การสร้างสปอร์ และการเจริญเติบโต ของ *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 33 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส

เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate(g/l)
0	0.95	-	14.51	2.95
12	1.53	23.37	12.19	2.21
24	2.34	22.91	11.52	1.97
36	2.39	21.67	9.25	1.07
48	3.21	19.53	8.49	0.98

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 34 จำนวนสปอร์ และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส

เวลา (h)	Spores ( x 10 <sup>3</sup> CFU/ml)	Vegetative cells ( x 10 <sup>6</sup> CFU/ml)
0	-	-
12	1.1	20
18	1.9	42
24	2.4	50
30	1.4	46
36	1.1	50
42	1.0	32
48	0.8	17

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 35 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate (g/l)
0	0.93	-	15.01	2.97
12	2.46	53.42	11.98	1.31
24	2.95	47.87	8.30	1.24
36	3.36	29.00	6.20	1.02
48	3.39	26.40	5.70	0.86

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 36 จำนวนสปอร์ และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (h)	Spores ( $\times 10^3$ CFU/ml)	Vegetative cell ( $\times 10^6$ CFU/ml)
0	-	-
12	1.2	23
18	3.0	53
24	7.0	67
30	1.0	60
36	1.0	58
42	0.9	36
48	0.2	22

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 37 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส

เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate(g/l)
0	0.97	-	14.83	3.01
12	2.01	38.02	13.93	2.10
24	2.31	33.42	11.08	1.63
36	2.44	27.15	8.75	1.07
48	2.73	21.84	7.49	0.99

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 38 จำนวนสปอร์ และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส

เวลา (h)	Spores ( x 10 <sup>3</sup> CFU/ml)	Vegetative cells ( x 10 <sup>6</sup> CFU/ml)
0	-	-
12	1.1	23
18	2.4	42
24	6.0	56
30	0.6	60
36	0.7	54
42	0.3	32
48	0.1	17

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 39 ปริมาณ PHB น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส

เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate (g/l)
0	0.95	-	14.74	3.00
12	1.29	18.11	14.31	1.73
24	1.40	17.09	12.16	1.69
36	1.43	16.35	11.86	1.49
48	1.55	14.88	9.60	1.36

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 40 จำนวนสปอร์ และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส

Time (h.)	Spores (x 10 <sup>3</sup> CFU/ml)	Vegetative cells (x 10 <sup>6</sup> CFU/ml)
0	-	-
12	0.12	12
18	0.19	32
24	0.24	45
30	0.16	46
36	0.13	56
42	0.10	32
48	0.06	14

- = ไม่ได้วิเคราะห์

เมื่อนำผลการทดลองทั้ง 4 การทดลองมาเปรียบเทียบกันดังแสดงในตารางที่ 41 พบว่าที่ทุกอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อ ได้ปริมาณ PHB สูงสุดอย่างรวดเร็วที่เวลาเพียง 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อและปริมาณลดลงเรื่อยๆ จนสิ้นสุดระยะการเลี้ยงเชื้อ และหลังจาก 12 ชั่วโมง มีจำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้นและสูงที่สุดที่ 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ จึงมีความเป็นไปได้ที่เซลล์จะนำ PHB ไปใช้ในกระบวนการสร้างสปอร์ทำให้มีสปอร์เพิ่มมากขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHB สูงที่สุดเท่ากับ 53.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่ออุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อสูงหรือต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ต่ำกว่า ตัวอย่างเช่น ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณ PHB ที่ได้เพียง 18.11 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ จำนวนสปอร์จะลดลงเหลือ  $0.19 \times 10^3$  CFU/ml. ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

**ตารางที่ 41** สรุปผลการผลิต PHB และการจำนวนสปอร์ ที่ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 30 40 และ 45 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	PHB content* (% by wt.)	Spores** ( $\times 10^3$ CFU/ml)
25	23.37	1.9
30	53.42	7
40	38.02	6
45	18.11	0.19

\* หมายถึง ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

\*\* หมายถึง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ



#### 4.5.2 ผลของปริมาณอากาศ

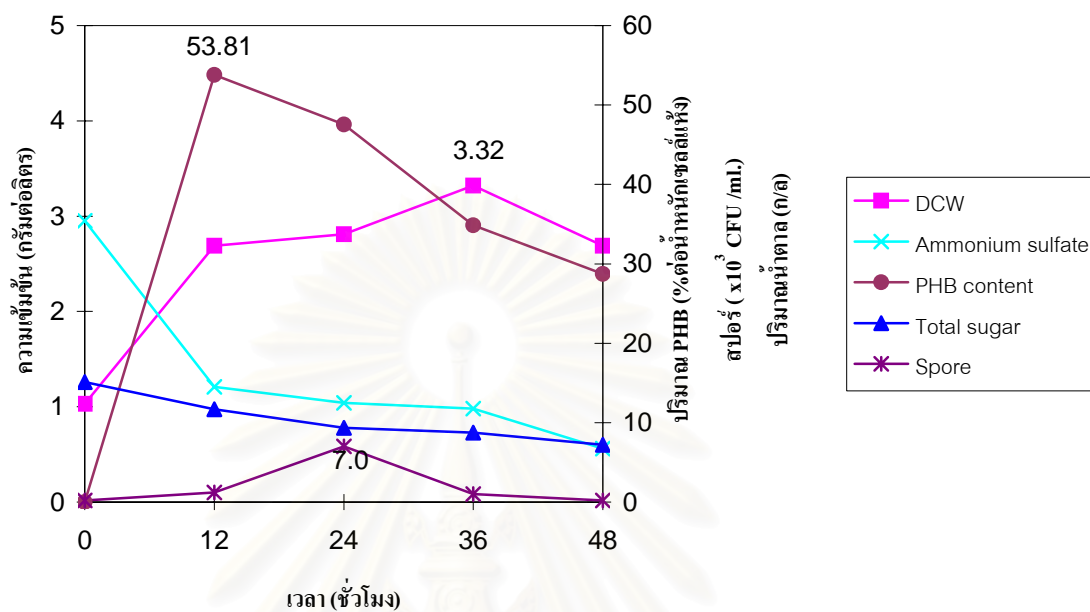
Lee และคณะ(1995) ศึกษาภาวะการให้อากาศต่อการผลิต PHB โดยแปรปริมาณอาหารเท่ากับ 50 100 150 200 และ 250 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที Kim(2000)ศึกษาการผลิต PHB จาก *Azotobacter chroococcum* ในระดับขวดเขย่าโดยแปรปริมาณอาหารเท่ากับ 50 ถึง 250 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ 100 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณอากาศมีผลต่อการเติบโตและการผลิต PHB เมื่อเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้การเติบโตลดลง แต่ปริมาณ PHB เพิ่มมากขึ้นสูงสุดเท่ากับ 74 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในอาหารปริมาตร 250 มิลลิลิตร เนื่องมาจากเมื่อปริมาณอาหารเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณอากาศน้อยลงมีผลต่อการเติบโตของเซลล์ลดลง แต่ปริมาณอากาศที่จำกัดส่งผลให้ผลิต PHB เพิ่มสูงขึ้น Savenkovaและคณะ(1999) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Azotobacter chroococcum* โดยใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 และ 100 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 750 มิลลิลิตร เขย่าที่ 190 รอบต่อนาที ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแปรปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองมีผลต่อปริมาณอากาศ

การวิจัยขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาผลของภาวะการให้อากาศ ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA-019 ด้วยการแปรผันปริมาณอาหาร โดยคงที่ขนาดของขวดทดลองและรอบการเขย่า ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการแปรผันปริมาณของอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการศึกษาในระดับขวดเขย่าตามวิธีการทดลองข้อ 3.8.2 โดยแปรปริมาณอาหารเท่ากับ 25 50 และ 75 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 42 44 และ 46 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยมีปริมาณอาหารเท่ากับ 50 มิลลิลิตร มีการผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 53.81 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ(ตารางที่ 44) และเมื่อปริมาณอาหารเท่ากับ 25 และ 75 มิลลิลิตร ให้ผลการทดลองใกล้เคียงกัน คือ ปริมาณ PHB เท่ากับ 30 และ 32.69 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 42 และ ตารางที่ 46 ตามลำดับ รูปแบบของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมักของทุกการทดลอง ในการวิจัยนี้พบว่าเป็นรูปแบบเดียวกัน คือความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง ส่วนการเจริญเติบโตพบว่าใกล้เคียงกันในทุก 3 การทดลอง

จากการนับจำนวนสปอร์โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา ต่างๆ ได้แก่ 12 18 24 30 36 42 และ 48 ชั่วโมง นำไปนับจำนวนเซลล์ และ นับจำนวนสปอร์ตามวิธีของ Kominekและคณะ (1965)

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 43 45 และ 47 จำนวนสปอร์ที่นับได้ค่อยๆ เพิ่มขึ้นหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และพบว่าจำนวนสปอร์มากที่สุดที่ 24 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ ลดลง ผลของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสปอร์พบว่าที่ปริมาณอาหารเท่ากับ 25 มิลลิลิตร (มีปริมาณอากาศมากที่สุด) มีจำนวนสปอร์น้อยที่สุดเท่ากับ  $6 \times 10^3$  CFU/ml. ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อปริมาณอาหารเพิ่มขึ้น (ปริมาณอากาศน้อยลง) เป็น 50 และ 75 มิลลิลิตร จำนวนสปอร์ที่ได้เพิ่มขึ้นเป็น  $7 \times 10^3$  CFU/ml. และ  $8 \times 10^3$  CFU/ml. ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 48

ได้นำผลการศึกษารูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA 019 มาแสดงเฉพาะการทดลองที่ได้ปริมาณ PHB สูงที่สุด (รูปที่ 18) โดยจะเห็นได้ว่าการผลิต PHB สูงสุด (53.81 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เวลา 12 ชั่วโมง แล้วค่อยๆ ลดลงตามเวลา การเลี้ยงเชื้อ และจำนวนสปอร์สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ( $7 \times 10^3$  CFU/ml.) น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.32 กรัมต่อลิตรที่เวลา 36 ชั่วโมง ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและแอมโมเนียมซัลเฟตค่อยๆ ลดลงเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโต



รูปที่ 18 รูปแบบการผลิต PHB การสร้างสปอร์ และการเจริญเติบโตของ *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร

ตารางที่ 42 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA 019 โดยใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร

เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate (g/l)
0	1.04	-	15.12	3.05
12	2.82	30.00	12.16	1.41
24	3.07	27.34	11.40	1.24
36	3.76	26.17	11.31	1.18
48	2.81	23.79	11.22	0.76

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 43 จำนวนสปอร์ และจำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ปริมาณอาหารเลี้ยง *Bacillus* sp. BA 019 เท่ากับ 25 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร

เวลา (h)	Spores ( x 10 <sup>3</sup> CFU/ml)	Vegetative cells ( x 10 <sup>6</sup> CFU/ml)
0	-	-
12	1.00	20
18	2.00	31
24	6.00	40
30	0.80	41
36	0.60	46
42	0.20	25
48	0.10	21

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 44 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรีดแห้งของ *Bacillus* sp. BA 019 โดยใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร

เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate(g/l)
0	1.03	-	15.11	2.95
12	2.69	53.81	11.69	1.21
24	2.81	47.53	9.34	1.04
36	3.32	34.85	8.73	0.98
48	2.69	28.75	7.21	0.56

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 45 จำนวนสปอร์ และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA 019 โดยใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร

เวลา (h)	Spores ( x 10 <sup>3</sup> CFU/ml)	Vegetative cells ( x 10 <sup>6</sup> CFU/ml)
0	-	-
12	1.2	23
18	3.0	53
24	7.0	67
30	1.0	60
36	1.0	58
42	0.9	36
48	0.2	22

- = ไม่ได้วิเคราะห์



ตารางที่ 46 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรีดแห้งของเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 75 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร

เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate(g/l)
0	1.01	-	15.08	2.97
12	2.28	36.29	12.42	1.50
24	2.47	31.76	11.42	1.35
36	3.36	29.07	10.89	1.18
48	2.18	24.03	10.85	1.05

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 47 จำนวนสปอร์และจำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 75 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร

เวลา (h)	Spores ( $\times 10^3$ CFU/ml)	Vegetative cells ( $\times 10^6$ CFU/ml)
0	-	-
12	1.3	24
18	4.0	51
24	8.0	57
30	1.2	60
36	1.2	48
42	1.0	42
48	0.7	21

- = ไม่ได้วิเคราะห์

เมื่อนำผลการวิจัยดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับสรุปผลดังตารางที่ 48 พบว่าถ้าเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารที่ปริมาณเพิ่มขึ้น (ปริมาณอากาศลดน้อยลง) มีผลทำให้การผลิต PHB ลดลง จาก 48.42 เหลือ 36.29 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เห็นได้ว่าปริมาณอากาศที่ลดลงนั้น ทำให้จำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้นจาก  $6 \times 10^3$  เป็น  $8 \times 10^3$  CFU/ml. สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 เพื่อผลิต PHB ในระดับขวดเขย่านั้น เมื่อคำนึงถึงปริมาณ PHB เป็นหลัก ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ทำให้มีการผลิต PHB สูงที่สุดจึงเลือกใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ในการศึกษาขั้นต่อไป

**ตารางที่ 48** เปรียบเทียบ การผลิต PHB และการสร้างสปอร์ ที่ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรต่างกัน

ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)	PHB content* (% by wt.)	Spores** ( $\times 10^3$ CFU/ml)
25	30.00	6
50	53.81	7
75	36.29	8

\* หมายถึง ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

\*\* หมายถึง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Kim(2000)ศึกษาการผลิต PHB โดยกระบวนการหมักแบบ fed-batch culture จากเชื้อ recombinant *Escherichia coli* พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยแปรผันความเร็วรอบของเครื่องเขย่าเท่ากับ 300 600 900 และ 1200 รอบต่อนาที พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราการผลิต PHB เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มการกวนให้อากาศ ซึ่งปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่การกวนให้อากาศเท่ากับ 500 รอบต่อนาที เมื่อเพิ่มการกวนให้อากาศสูงกว่า 700 รอบต่อนาทีพบว่าได้ปริมาณ PHB เพียง 56-58 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

การวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของปริมาณอากาศ โดยการแปรความเร็วรอบของการเขย่า เพื่อการผลิต PHB โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus sp.* BA-019 บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 100 200 และ 300 รอบต่อนาที โดยมีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อคงที่เท่ากับ 50 มิลลิลิตร บรจุในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการวิจัยดังตารางที่ 49 51 และ 53 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยให้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ให้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 53.81 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ(ตารางที่ 51) เมื่อใช้ความเร็วรอบของการเขย่าสูงกว่าหรือต่ำกว่าพบว่า *Bacillus sp.* BA 019 ผลิต PHB ได้ต่ำกว่าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที กล่าวคือเมื่อความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 32.69 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ(ตารางที่ 49) เมื่อเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 300 รอบต่อนาทีให้ปริมาณ PHB เท่ากับ 39.33 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ(ตารางที่ 53) รูปแบบของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียมีซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมักของทุกการทดลองพบว่าเป็นรูปแบบเดียวกันคือความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแอมโมเนียมีซัลเฟตถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง

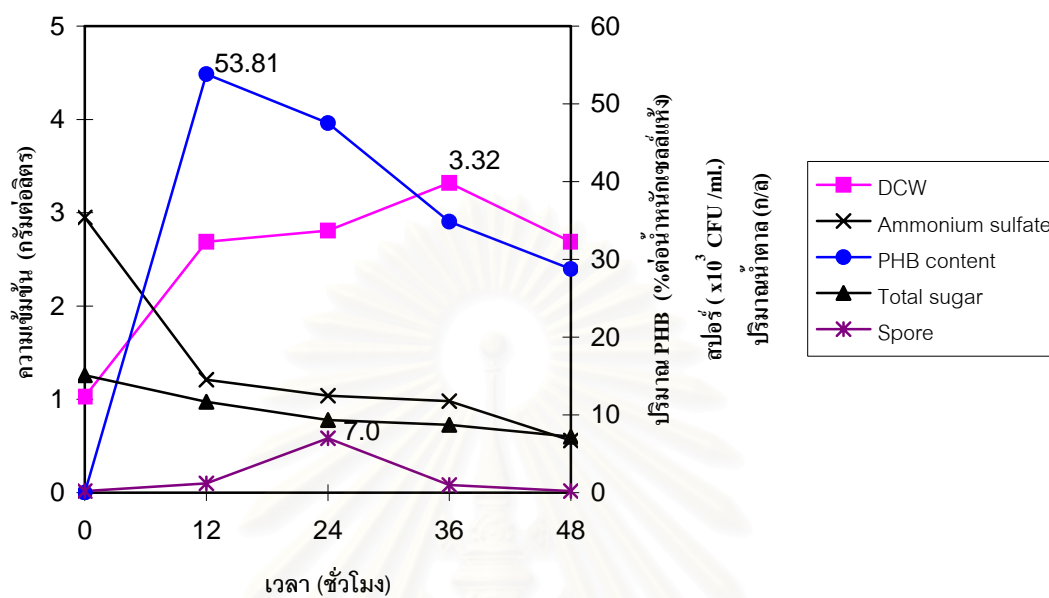
ในส่วนของการสร้างสปอร์ จากการนับจำนวนสปอร์โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา ต่างๆ ได้แก่ 12 18 24 30 36 42 และ 48 ชั่วโมง นำไปนับจำนวนเซลล์ และ นับจำนวนสปอร์ตามวิธีของ Kominekและคณะ (1965) ให้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 50 52 และ 54 จำนวนสปอร์ที่นับได้ค่อยๆเพิ่มขึ้นหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และพบว่าจำนวนสปอร์มากที่สุดที่ 24 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ ลดลง ผลของความเร็วรอบของการเขย่าต่อการสร้างสปอร์พบว่าที่ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 300 รอบต่อนาที มีจำนวนสปอร์น้อยที่สุดเท่ากับ  $4 \times 10^3$  CFU/ml. ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ(ตารางที่ 54) และเมื่อความเร็วรอบของการเขย่าลดลง(ปริมาณอากาศลดลง)

เป็น 200 และ 100 รอบต่อนาที จำนวนสปอร์ที่ได้เพิ่มขึ้นเป็น  $7 \times 10^3$  CFU/ml. และ  $7.2 \times 10^3$  CFU/ml. ตามลำดับที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

ได้นำผลการศึกษารูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA 019 มาแสดงเฉพาะการทดลองที่ได้ปริมาณ PHB สูงที่สุด(รูปที่ 19) โดยจะเห็นได้ว่าการผลิต PHB สูงสุด (53.81 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เวลา 12 ชั่วโมง แล้วค่อยๆลดลงตามเวลา การเลี้ยงเชื้อ และจำนวนสปอร์สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ( $7 \times 10^3$  CFU/ml.) น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.32 กรัมต่อลิตรที่เวลา 36 ชั่วโมง ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและแอมโมเนียมซัลเฟตค่อยๆลดลงเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโต



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 รูปแบบการผลิต PHB การสร้างสปอร์ และการเจริญเติบโตของ *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที



ตาราง 49 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที

เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate(g/l)
0	1.03	-	15.01	3.01
12	2.26	32.69	12.79	1.73
24	2.71	31.92	12.42	1.69
36	2.92	28.20	11.98	1.47
48	2.16	26.75	10.73	1.07

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 50 จำนวนสปอร์ และ จำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที

เวลา (h)	Spores ( $\times 10^3$ CFU/ml)	Vegetative cells ( $\times 10^6$ CFU/ml)
0	-	-
12	2.1	21
18	3.2	51
24	7.2	60
30	1.7	51
36	1.4	51
42	1.2	30
48	0.9	19

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตาราง 51 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที

เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate(g/l)
0	1.03	-	15.11	2.95
12	2.69	53.81	11.69	1.21
24	2.81	47.53	9.34	1.04
36	3.32	34.85	8.73	0.98
48	2.69	28.75	7.21	0.56

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 52 จำนวนสปอร์และจำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที

เวลา (h)	Spores ( x 10 <sup>3</sup> CFU/ml)	Vegetative cells ( x 10 <sup>6</sup> CFU/ml)
0	-	-
12	1.2	23
18	3.0	53
24	7.0	67
30	1.0	60
36	1.0	58
42	0.9	36
48	0.2	22

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตาราง 53 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 300 รอบต่อนาที

เวลา (h)	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate(g/l)
0	1.01	-	14.97	3.00
12	2.65	39.33	12.42	1.69
24	2.74	34.55	10.49	1.43
36	3.07	29.17	10.12	1.37
48	2.68	22.03	9.97	1.29

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 54 จำนวนสปอร์ และจำนวน vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 300 รอบต่อนาที

เวลา (h)	Spores ( x 10 <sup>3</sup> CFU/ml)	Vegetative cells ( x 10 <sup>6</sup> CFU/ml)
0	-	-
12	1.5	22
18	2.0	48
24	4.0	52
30	0.9	62
36	0.7	59
42	0.2	42
48	0.1	33

- = ไม่ได้วิเคราะห์

เมื่อนำผลการวิจัยดังกล่าวมาสรุปผลดังตารางที่ 55 พบว่าถ้าเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยเมื่อเพิ่มหรือลดความเร็วรอบของการเขย่า(ปริมาณอากาศเพิ่มขึ้นหรือลดลง) มีผลทำให้ได้ปริมาณ PHB น้อยกว่าที่ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที คือจาก 53.81 ลดลงเป็น 39.33 และ 32.69 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ พบว่าเมื่อปริมาณอากาศเพิ่มขึ้น(ที่ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 300 รอบต่อนาที)ทำให้จำนวนสปอร์ลดลงจาก  $7.2 \times 10^3$  เหลือ  $4 \times 10^3$  CFU/ml. ส่วนที่ปริมาณอากาศน้อยลง(ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที)พบว่าจำนวนสปอร์ที่สร้างใกล้เคียงกับเมื่อใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที( $7.2 \times 10^3$  และ  $7.0 \times 10^3$  CFU/ml.ตามลำดับ) จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.BA-019 เพื่อผลิต PHB ในระดับขวดเขย่านั้น เมื่อคำนึงถึงปริมาณ PHB เป็นหลักพบว่าที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm. ทำให้ได้ปริมาณ PHB สูงที่สุด

ตารางที่ 55 เปรียบเทียบ การผลิต PHB และการสร้างสปอร์ที่ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ที่ความเร็วรอบของการเขย่าต่างกัน

ความเร็วรอบของการเขย่า (รอบต่อนาที)	PHB content* (% by wt.)	Spores** ( $\times 10^3$ CFU/ml)
100	32.69	7.2
200	53.81	7
300	39.33	4

\* หมายถึง ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

\*\* หมายถึง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

#### 4.4.3 ผลของค่าพีเอช

พีเอชเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งมีผลต่อการผลิต PHB โดยทั่วไปการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าพบว่าควบคุมค่าพีเอชได้ยาก สามารถควบคุมค่าพีเอชโดยใช้ฟัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อควบคุมค่าพีเอชให้คงที่ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ Juni และ Heym (1956) รายงานการสร้างและสะสม PHB ของเชื้อ *Bacillus cereus* T พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่าพีเอชสูง จะมีการนำ PHB ไปใช้ในการสร้างสปอร์ ส่วนในอาหารที่มีค่าพีเอชต่ำจะมีการยับยั้งการนำ PHB ไปใช้ระหว่างการสร้างสปอร์ Nagata (1963) รายงานถึงพีเอชที่มีผลต่อการผลิต PHB ในเซลล์ ระหว่างช่วงแรกของการเกิดสปอร์ โดยพบว่า *B. cereus* T สร้างและสะสมพอลิเมอร์ระหว่างช่วงค่าพีเอช เท่ากับ 6.2 ถึง 6.4 Chung และคณะ (1997) ศึกษาการผลิต PHBV โดยใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 7.0 และ 7.5 พบว่าเมื่อปรับค่าพีเอชสูงขึ้นทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHBV สูงขึ้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร และ 28.9 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

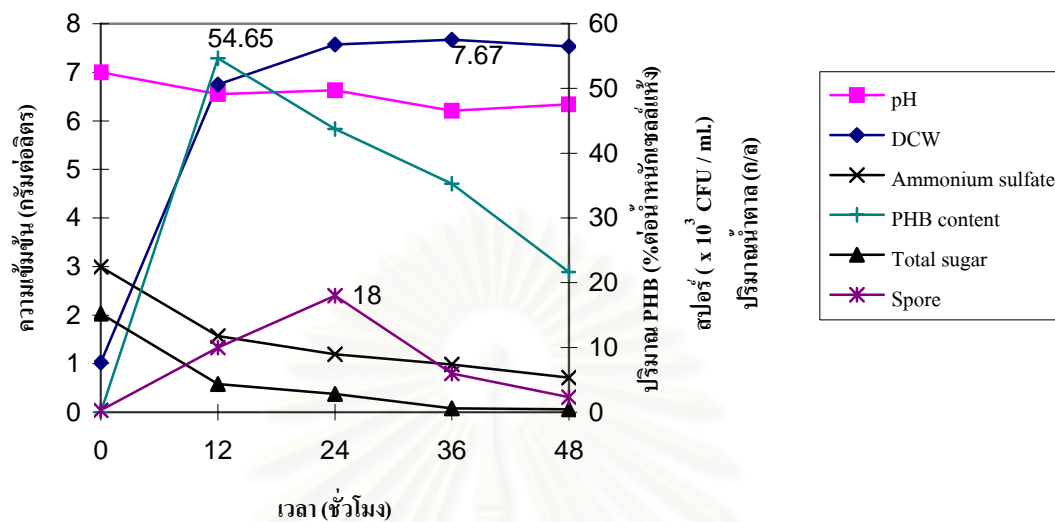
ผลการวิจัยนี้เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ตามวิธีการทดลองข้อ 3.8.3 ซึ่งควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยควบคุมค่าพีเอชที่ 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 การควบคุมค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลองโดยใช้บัฟเฟอร์ เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง การควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 โดยใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 56 พบว่าเชื้อเจริญเติบโตได้น้อยมากได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.74 กรัมต่อลิตรที่เวลา 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อและค่าพีเอชเกือบจะไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ PHB ได้เนื่องจากได้เซลล์ปริมาณน้อยมาก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยควบคุมค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 และ 7.0 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่าที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ( ดังแสดงในตารางที่ 60 ) เชื้อสามารถเติบโต และผลิต PHB ได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงที่ค่าพีเอชอื่นโดยได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 54.65 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 7.67 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 แสดงดังตารางที่ 58 ที่ค่าพีเอชนี้ได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 50.17 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อและได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.52 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 และ 7.0 เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงสิ้นสุดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ ตารางที่ 62 แสดงผลของค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 โดยใช้ทริสบัฟเฟอร์ในการคุมค่าพีเอช



พบว่าเชื้อเจริญเติบโตและผลิต PHB ได้เท่ากับ 47.04 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

และจากการนับจำนวนสปอร์โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 12 18 24 30 36 42 และ 48 ชั่วโมง นำไปนับจำนวนเซลล์และนับจำนวนสปอร์ตามวิธีของ Kominek และคณะ (1965) ให้ผลการทดลองในตารางที่ 64 จำนวนสปอร์ที่นับได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อ และพบจำนวนสปอร์มากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อจากนั้นจำนวนสปอร์ลดลง และที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 มีจำนวนสปอร์น้อยที่สุดเท่ากับ  $8 \times 10^3$  CFU/ml เมื่อเพิ่มค่าพีเอชในการเลี้ยงเชื้อพบว่า มีจำนวนสปอร์มากขึ้น และมากที่สุดเท่ากับ  $21 \times 10^3$  CFU/ml. ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8.0

ได้นำผลการศึกษารูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA 019 มาแสดงเฉพาะการทดลองที่ได้ปริมาณ PHB สูงที่สุด (รูปที่ 20) โดยจะเห็นได้ว่าการผลิต PHB สูงสุด (54.65 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่เวลา 12 ชั่วโมง แล้วค่อยๆลดลงตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ และจำนวนสปอร์สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ( $18 \times 10^3$  CFU/ml.) น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.67 กรัมต่อลิตรที่เวลา 36 ชั่วโมง ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและแอมโมเนียมซัลเฟตค่อยๆลดลงเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโต



รูปที่ 20 รูปแบบการผลิต PHB การเจริญเติบโต และการสร้างสปอร์ โดย *Bacillus* sp.BA-019 เมื่อควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ตารางที่ 56 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรีดิวซ์แห้ง เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 ด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์

เวลา (h)	pH	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate(g/l)
0	5.0	1.01	ND	15.27	3.00
12	4.79	1.07	ND	15.21	2.26
24	4.75	1.39	ND	14.21	2.21
36	4.72	1.74	ND	13.75	1.52
48	4.74	1.38	ND	13.12	1.41

หมายเหตุ ND หมายถึง มีเซลล์จำนวนน้อยมากไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้

ตารางที่ 57 จำนวนสปอร์ และจำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 ด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์

เวลา (h)	Spores ( x 10 <sup>3</sup> CFU/ml)	Vegetative cells ( x 10 <sup>6</sup> CFU/ml)
0	-	-
12	3.0	15
18	5.0	16
24	8.0	21
30	1.1	24
36	0.06	26
42	0.03	21
48	0.01	18

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 58 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรีดแห้งของ *Bacillus* sp.BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เวลา (h)	pH	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate (g/l)
0	6.0	1.01	-	15.21	3.01
12	5.57	3.24	50.17	4.39	1.77
24	5.42	3.99	44.17	3.53	1.28
36	4.60	4.52	31.44	2.35	1.08
48	4.48	4.40	26.30	1.04	0.89

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 59 จำนวนสปอร์ และ จำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เวลา (h)	Spores ( $\times 10^3$ CFU/ml)	Vegetative cells ( $\times 10^6$ CFU/ml)
0	-	-
12	6.3	31
18	7.5	47
24	10.0	53
30	5.2	71
36	4.2	88
42	3.2	78
48	1.9	58

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 60 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เวลา (h)	pH	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate (g/l)
0	7.0	1.02	-	15.23	2.99
12	6.55	6.75	54.65	4.33	1.57
24	6.63	7.57	43.75	2.82	1.19
36	6.21	7.67	35.28	0.61	0.98
48	6.34	7.53	21.64	0.44	0.71

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 61 จำนวนสปอร์ และจำนวน Vegetative cells เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เวลา (h)	Spores (x 10 <sup>3</sup> CFU/ml)	Vegetative cells (x 10 <sup>6</sup> CFU/ml)
0	-	-
12	10	56
18	11	66
24	18	82
30	9	166
36	6	182
42	4	136
48	2.3	64

- = ไม่ได้วิเคราะห์



ตารางที่ 62 ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรีดแห้งของ *Bacillus* sp.BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 ด้วยทริสบัฟเฟอร์

เวลา (h)	pH	DCW (g/l)	PHB content (% by wt.)	Total sugar (g/l)	Ammonium sulfate (g/l)
0	8.0	1.05	-	15.14	3.03
12	7.39	3.09	47.04	9.71	1.43
24	7.42	3.90	33.98	9.16	1.38
36	7.24	4.06	20.68	8.61	1.30
48	7.43	6.06	16.73	8.17	1.01

- = ไม่ได้วิเคราะห์

ตารางที่ 63 จำนวนสปอร์ และจำนวน Vegetative cells เมื่อเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 ด้วยทริสบัฟเฟอร์

เวลา (h)	Spores ( $\times 10^3$ CFU/ml)	Vegetative cells ( $\times 10^6$ CFU/ml)
0	-	-
12	11	49
18	17	53
24	21	72
30	7.3	112
36	6.2	135
42	4.1	94
48	2.7	66

- = ไม่ได้วิเคราะห์

สรุปผลการเปรียบเทียบผลของค่าพีเอชดังตารางที่ 64 พบว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB และพบว่าเมื่อค่าพีเอชเป็นกรด(พีเอช 5.0) เชื้อเจริญเติบโตน้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ PHB ได้ ส่วนที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 เชื้อสามารถผลิต PHB ได้ดีกว่าที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 ผลของพีเอชต่อการสร้างสปอร์พบว่าที่ค่าพีเอชสูงเชื้อสร้างสปอร์ได้จำนวนมากว่าที่ค่าพีเอชต่ำโดยจำนวนสปอร์สูงสุดเท่ากับ  $21 \times 10^3$  CFU/ml.เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 เชื้อมีการสร้างสปอร์ได้จำนวนมากเมื่อค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 64 เปรียบเทียบ การผลิต PHB และการสร้างสปอร์ที่ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp.BA-019 ที่ค่าพีเอชต่างกัน

ค่าพีเอชของ อาหารเลี้ยงเชื้อ	PHB content* (% by wt.)	Spores** ( $\times 10^3$ CFU/ml)
5.0	ND	8
6.0	50.17	10
7.0	54.65	18
8.0	47.04	21

หมายเหตุ ND หมายถึง มีเซลล์จำนวนน้อยมากไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้

\* หมายถึง ที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

\*\* หมายถึง ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

ในการศึกษาภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อพบว่า *Bacillus* sp.BA-019 ผลิต PHB ได้สูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อแล้วลดลง และสร้างสปอร์ได้จำนวนมากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และลดลงตามเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ในทุกปัจจัยที่ศึกษา

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์ โดย *Bacillus* sp. BA-019 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้เกณฑ์การพิจารณาจากภาวะที่เซลล์ผลิต PHB ได้ปริมาณมากที่สุด และพิจารณาถึงจำนวนสปอร์ที่สร้างขึ้นด้วย แล้วพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ PHB และจำนวนสปอร์ที่สร้างอันเป็นผลของปัจจัยที่ศึกษา โดยพบว่าการผลิต PHB สูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง แล้วลดลงตามระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนการสร้างสปอร์พบว่าสปอร์เพิ่มขึ้นเมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อและได้จำนวนมากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ รวมถึงการลดต้นทุนในการผลิตโดยการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกบางชนิดสำหรับการผลิต PHB ด้วย

#### 5.1 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิต PHB

ผลการวิจัยเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง จึงเลือกใช้กล้าเชื้ออายุ 6 ชั่วโมง สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเพื่อการผลิต PHB

เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาล 4 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส แป้งที่ผ่านการย่อยชูโครส และ ฟรักโตส พบว่าการใช้แป้งที่ผ่านการย่อยในการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp. BA-019 ได้ปริมาณ PHB ใกล้เคียงกับการใช้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนบริสุทธิ์ คือได้ ปริมาณ PHB เท่ากับ 49.64 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ 49.69 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต PHB โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากงานวิจัยนี้ปริมาณ PHB ที่ได้เท่ากับ 56.68 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โดยสมบูรณ์แล้วได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลูโคสบริสุทธิ์แล้วมีราคาถูกกว่ามาก มีรายงานจากผู้วิจัยหลายคนได้รายงานการใช้แป้งจากแหล่งต่างๆ ทั้งที่ไม่ผ่านการย่อยและที่ผ่านการย่อยสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกได้แก่ Lillo และ Valera (1990) ศึกษาการผลิต PHB โดยเชื้อ *Haloferax mediterranei* ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Kim และ Chang (1995) ศึกษาการผลิต PHB โดยใช้แป้งมันที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งคาร์บอนจากเชื้อ

*Ralstonia eutropha* ด้วยกระบวนการหมักแบบเฟดแบช ได้ความเข้มข้นของเซลล์ ปริมาณ PHB และอัตราการผลิต PHB เท่ากับ 106 กรัมต่อลิตร 58 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ 1.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ Martinez และคณะ(1995) ศึกษาการผลิต PHB จากแป้งโดยเชื้อ *Azotobacter chroococcum* H23 พบว่าสามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณ 74.2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Kim และ Chang(1998) ศึกษาการผลิต PHB จากแป้งโดยเชื้อ *Azotobacter chroococcum* พบว่าสามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณ 46 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Kim(2000) ศึกษาการผลิต PHB จากสับสเตรทที่ราคาถูก ได้แก่ แป้ง โดยกระบวนการหมักแบบแบช จากเชื้อ *Azotobacter chroococcum* สามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 73.9 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Hassan และคณะ(2001) ศึกษาการผลิต PHA จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งสาकुที่นำมาผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โดยเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* IFO12203 โดยได้ผลผลิตของ PHA สูงสุดเท่ากับ 0.18-0.26 (g.g<sup>-1</sup>) จากรายงานของ Choi และ Lee ในปี 1997 และ 1999 ซึ่งกล่าวไว้ว่าปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อต้นทุนการผลิต PHB คือราคาของสับสเตรทที่นำมาใช้ในการผลิต PHB ซึ่งแหล่งคาร์บอนมีผลต่อราคาสับสเตรทคิดเป็นประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของราคาวัตถุดิบทั้งหมด จากการวิเคราะห์ต้นทุนของการผลิต PHB ของ Choi และ Lee(1999) พบว่าถ้าเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากกลูโคสเป็นการใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยแล้ว ราคาแหล่งคาร์บอนถูกลงจากการใช้กลูโคสซึ่งมีราคาเท่ากับ 0.5 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัมเหลือเพียง 0.22 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ถ้าสามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกนำมาผลิต PHB จะช่วยให้ต้นทุนการผลิตลดลงได้มาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกด้วยซึ่งความสามารถของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในการใช้แหล่งคาร์บอนมีความแตกต่างกัน ในการทดลองนี้เลือกใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกในการผลิต PHB และข้อดีของการเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนคือเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่าย และมีปริมาณมากในประเทศไทย ซึ่งจัดเป็นการนำผลผลิตทางการเกษตรมาเพิ่มมูลค่าและเป็นวัตถุดิบที่สามารถสร้างขึ้นทดแทนได้ใหม่(renewable resource) ดังนั้นจึงเลือกใช้แป้งที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการศึกษาต่อไป

เมื่อพิจารณาถึงแหล่งไนโตรเจน เปรียบเทียบระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย ส่วนใหญ่มีรายงานว่าเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB โดยเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเพื่อการผลิต PHB ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เซลล์สามารถเจริญเติบโตและผลิต PHB ได้ดีกว่าการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ได้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 53.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อผลิต PHB ในภาวะที่

เหมาะสมได้ปริมาณ PHB เท่ากับ 56.68 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Beaulieu และคณะ (1995) ศึกษาการผลิต PHB จากเชื้อ *Ralstonia eutropha* โดยใช้เกลือแอมโมเนียมที่อยู่ในรูปแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตและการผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 48 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง รัตนศิริ มุทิตากุล(2538) รายงานการสร้างและสะสม PHB ของ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่าเชื้อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญเติบโตและการผลิต PHB ซึ่งกลไกที่แหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการสร้าง และสะสม PHB ยังไม่ทราบแน่ชัด

## 5.2 ผลของแร่ธาตุบางชนิด ได้แก่ แมกนีเซียม แคลเซียม และ แมงกานีส ที่มีต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์

การศึกษาผลของแร่ธาตุต่อการผลิต PHB โดยเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมกนีเซียมเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ปริมาณ PHB สูงที่สุด(56.48 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อไม่เติมแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อเซลล์มีการเจริญเติบโตน้อยมากและผลิต PHB ได้ปริมาณน้อยมาก สอดคล้องกับงานวิจัยของรัตนศิริ มุทิตากุล(2538)ซึ่งรายงานว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแมกนีเซียมปริมาณ PHB มีปริมาณน้อยที่สุด แสดงว่าแมกนีเซียมมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิต PHB ผลของปริมาณแมกนีเซียมต่อการสร้างสปอร์โดย *Bacillus* sp. BA-019 เมื่อเพิ่มปริมาณแมกนีเซียมพบว่าจำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้นและมีจำนวนสปอร์มากที่สุดเมื่อมีปริมาณแมกนีเซียมเท่ากับ 400 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากแมกนีเซียมเป็นแร่ธาตุที่พบมากในโครงสร้างชั้น core ของสปอร์ เมื่อเพิ่มปริมาณแมกนีเซียม มีผลให้จำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้นและยังมีผลต่อเมแทบอลิซึมของสปอร์และความทนทานต่างๆ การใช้อัตราส่วนของแร่ธาตุที่พอเหมาะมีความสำคัญต่อสมบัติของสปอร์(Slepecky และ Foster, 1959 ; Atrih และ Foster, 2001) ความเข้มข้นของเกลือที่สูงอาจจะมีผลต่อจำนวนสปอร์(Slepecky และ Foster, 1959)

ผลของแคลเซียมต่อการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp. BA-019 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแคลเซียมเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ปริมาณ PHB สูงที่สุด(เท่ากับ 56.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) ส่วนจำนวนสปอร์พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณแคลเซียมเป็น 2 เท่า(40 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบจำนวนสปอร์มากที่สุด(  $12.1 \times 10^3$  CFU/ml.) งานวิจัย



ของ Slepecky และ Foster (1959) รายงานว่าพบแคลเซียมปริมาณมากในชั้นตอนการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. เมื่อจำกัดปริมาณแคลเซียมมีผลให้จำนวนสปอร์ลดลงและความสามารถในการทนความร้อนลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียมมีความเกี่ยวข้องกับการทนความร้อนของสปอร์

ส่วนผลของแมงกานีสต่อการผลิต PHB โดย *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแมงกานีสปริมาณ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ปริมาณ PHB สูงที่สุดเท่ากับ 56.68 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง Grothe และคณะ (1999) รายงานว่าการเติมแร่ธาตุในปริมาณที่เหมาะสม ทำให้อัตราผลิต PHB และผลผลิต PHB สูง อย่างไรก็ตามถ้าความเข้มข้นต่ำหรือสูงเกินไปจะทำให้อัตราการผลิต PHB ลดลง ผลของปริมาณแมงกานีสต่อการสร้างสปอร์เมื่อเติมแมงกานีสปริมาณเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบจำนวนสปอร์เท่ากับ  $7.1 \times 10^3$  CFU/ml. และจำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้นโดยมีจำนวนมากที่สุดเมื่อเพิ่มแมงกานีสในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 เท่า ( $12.9 \times 10^3$  CFU/ml.) สปอร์ของแบคทีเรียสะสมแร่ธาตุเพื่อความเสถียรและทนความร้อน (Slepecky และ Foster, 1959) แคลเซียม ( $\text{Ca}^{2+}$ ) แมงกานีส ( $\text{Mn}^{2+}$ ) และแมกนีเซียม ( $\text{Mg}^{2+}$ ) เป็นแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบมากที่สุดและพบในชั้นของ core มากที่สุด (Slepecky และ Foster, 1959 ; Atrih และ Foster, 2002) Foster (2001) ศึกษาการเติมแมงกานีสในอาหารที่ใช้สร้างสปอร์มีผลคือทำให้ผลผลิตของสปอร์ (spore yield) เพิ่มมากขึ้น เพิ่มความทนทาน ความแข็งแรงของโครงสร้างชั้น cortex และเพิ่มการทนความร้อน แมงกานีสยังเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และเอนไซม์ phosphoglycerate phosphomutase ซึ่งต้องการภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของ *B. subtilis* *B. cereus* และ *B. megaterium* และแมงกานีสยังมีบทบาทในการแสดงออกของยีนและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โครงสร้างชั้น cortex ของสปอร์ด้วย

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 5.3 การศึกษาผลของภาวะแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณอากาศ และ ค่าพีเอช ที่มีต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์

อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิต PHB เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์อื่นๆ เชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการเจริญเติบโต และการผลิต PHB ได้ดีที่อุณหภูมิต่างกัน การวิจัยนี้พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 53.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์ การสังเคราะห์ PHB ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเมื่ออุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ปริมาณไขมันที่ผลิตได้จะลดลง (Asselineau, 1966) ดังจะเห็นได้จากปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ลดลง เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 30 องศาเซลเซียสเป็น 40 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียสที่เวลา 12 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อและพบว่าปริมาณ PHB ลดลงเหลือ 38.02 และ 18.11 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ Borah และคณะ(2002) ศึกษาผลของสารอาหารและภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB จากเชื้อ *Bacillus mycoides* RLJ B-017 พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการผลิต PHB และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต PHB คือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งรายงานการวิจัยต่างๆ ที่กล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยนี้

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA-019 อุณหภูมิที่ศึกษาคือ 25 30 40 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นจำนวนสปอร์ลดลงและที่อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียสมีจำนวนสปอร์น้อยที่สุด ( $0.19 \times 10^3$  CFU/ml.) โดยได้จำนวนสปอร์มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ( $7 \times 10^3$  CFU/ml.) ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ หลังจาก 24 ชั่วโมงจำนวนสปอร์ลดลงตามระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเนื่องจากสปอร์งอกและเจริญไปเป็น vegetative cell ผลการวิจัยเป็นไปในแนวทางเดียวกับผลงานของ Kofronova และคณะ(1994) ซึ่งรายงานถึงการเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* สูงเท่ากับ 43.5 องศาเซลเซียส มีผลยับยั้งการสร้างสปอร์และเพิ่มปริมาณการผลิต PHB โดยเพิ่มจากเดิม 40.1 เป็น 53 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

การศึกษาผลของปริมาณอากาศที่มีต่อการผลิต PHB พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 เจริญเติบโตและผลิต PHB ได้ปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 53.81 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ปริมาตรอาหารเท่ากับ 50 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 250 มิลลิลิตร และความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เมื่อเพิ่มและลดปริมาตรอาหาร(ปริมาณอากาศน้อยลงหรือมากขึ้น

ตามลำดับ) ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ลดลง(36.29 และ 30.00เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเมื่อมีอากาศปริมาณมากเกินไปหรือน้อยเกินไปไม่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB เนื่องจากเมื่อปริมาณอาหารเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเชื้อสามารถใช้อากาศในการเจริญและผลิต PHB ได้ลดลงสอดคล้องกับงานวิจัยของKim(2000)ศึกษาการผลิต PHB จากเชื้อ *Azotobacter chroococcum* ในระดับขวดเขย่าโดยแปรปริมาณอาหารเท่ากับ 50 ถึง 250 มิลลิลิตรต่อขวดขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ 100 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณอากาศมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตโดยได้ PHB ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 74 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารปริมาตร 250 มิลลิลิตร สูดา สุภาวรินทร์(2542) ศึกษาการผลิต PHBV โดยเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่าเมื่อแปรปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 50 75 และ 100 มิลลิลิตร ปริมาณ PHBV ได้สูงที่สุดเท่ากับ 44.23 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 75 มิลลิลิตร นอกจากนี้การที่จุลินทรีย์สามารถผลิต PHB ได้มากหรือน้อยนั้น ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากชนิดของจุลินทรีย์บางชนิดต้องการอากาศน้อย บางชนิดต้องการอากาศมาก จากการศึกษาผลของปริมาณอากาศต่อการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp.BA-019 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีอากาศปริมาณน้อย(ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น) ทำให้จำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้นโดยพบการสร้างสปอร์มากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 75 มิลลิลิตร ( $8 \times 10^3$  CFU/ml.) อาจเป็นไปได้ว่าเนื่องจากเมื่อมีปริมาณอากาศน้อยอาจมีผลให้เซลล์สร้างสปอร์มากขึ้นเพื่อความอยู่รอดของเซลล์

การเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 โดยควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 มีผลให้เซลล์มีความสามารถในการเจริญเติบโตและการผลิต PHB ได้ดีที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อมีการสร้างสารเมตาบอไลต์จึงทำให้ค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงไป ในการทดลองที่ไม่ควบคุมค่าพีเอชพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีภาวะเป็นกรดมากขึ้น ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHB เนื่องจากค่าพีเอชมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นการควบคุมค่าพีเอชให้คงที่ตลอดการเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมเซลล์จึงสามารถเจริญเติบโตและผลิต PHB ได้ปริมาณมาก Nakata(1962) รายงานว่าในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* เพื่อผลิต PHB ปริมาณของ PHB ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ขึ้นอยู่กับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ Nakata(1963)รายงานผลของค่าพีเอชต่อการผลิต PHB ในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* พบว่าเซลล์สะสม PHB ได้สูงที่สุดเมื่อควบคุมค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.2 ถึง 6.4 Suzukiและคณะ(1986) ศึกษาการผลิต PHB โดยเชื้อ *Pseudomonas* sp. K พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB เท่ากับ 7.0 ทั้ง

ในการศึกษาระดับขวดเขย่าและระดับถังหมัก Grotheและคณะ(1999)รายงานผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโตและการผลิต PHB พบว่าถ้าค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อย มีผลทำให้การเจริญของเชื้อลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่าพีเอชบางค่ามีผลต่อการนำแร่ธาตุบางตัวไปใช้เพื่อกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ เมื่อพิจารณาถึงผลของค่าพีเอชต่อการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA-019 พบว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ โดยจำนวนสปอร์จะมากที่สุดเมื่อค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 ( $21 \times 10^3$  CFU/ml.) สอดคล้องกับการศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* ในถังหมักพบว่าเมื่อค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้นจะพบจำนวนสปอร์เพิ่มมากขึ้นโดยพบจำนวนสปอร์สูงสุดที่ค่าพีเอชมากกว่า 8.0

([www.accessexcellence.org/AE/AEPC/Wards/e3ferm/Measurement.html](http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/Wards/e3ferm/Measurement.html))



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สรุปผลงานวิจัย

1. *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิต PHB ได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก คือ แป้งที่ผ่านการย่อยด้วยความเข้มข้นที่ใช้คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร สามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 49.64 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

2. แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB คือ แอมโมเนียมซัลเฟตโดยเมื่อใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 53.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

3. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมกนีเซียมเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม) *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 56.48 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีจำนวนสปอร์เท่ากับ  $7 \times 10^3$  CFU/ml. ในชุดการทดลองที่ไม่เติมแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเซลล์มีปริมาณน้อยมากทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณ PHB ได้ และที่ภาวะนี้ได้จำนวนสปอร์น้อยที่สุดเท่ากับ  $2.1 \times 10^3$  CFU/ml.

3. ผลของแคลเซียมต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์ พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHB สูงที่สุดเท่ากับ 56.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแคลเซียมเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร(ชุดควบคุม) และได้จำนวนสปอร์เท่ากับ  $7.6 \times 10^3$  CFU/ml. เชื้อผลิต PHB ได้ปริมาณต่ำที่สุดเท่ากับ 29.31 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในชุดการทดลองที่เติมแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 เท่า และได้จำนวนสปอร์น้อยที่สุดเท่ากับ  $1.9 \times 10^3$  CFU/ml. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแคลเซียม

5. เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแมกนีเซียปริมาณเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าได้ปริมาณ PHB สูงที่สุดเท่ากับ 56.68 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีจำนวนสปอร์เท่ากับ  $7.1 \times 10^3$  CFU/ml. ในการทดลองที่ไม่เติมแมกนีเซียในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าได้ปริมาณ PHB ต่ำที่สุดเท่ากับ 47.04 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้จำนวนสปอร์น้อยที่สุดเท่ากับ  $5.6 \times 10^3$  CFU/ml.

6. พบว่าอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งมีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA-019 โดยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต PHB ได้ปริมาณ PHB มากที่สุดเท่ากับ 53.42 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและมีจำนวนสปอร์เท่ากับ 7



$\times 10^3$  CFU/ml. ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมีการผลิต PHB ได้ปริมาณต่ำสุด( 18.11 เปอร์เซ็นต์ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง) และได้จำนวนสปอร์น้อยที่สุดคือ  $0.19 \times 10^3$  CFU/ml.

7. ปริมาณอากาศมีผลต่อการผลิต PHB และการสร้างสปอร์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มี ปริมาณอากาศมากน้อยต่างกันโดยการใช้ปริมาตรอาหาร และความเร็วรอบของการเขย่าต่างกัน

เมื่อใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 50 มิลลิลิตร *Bacillus* sp. BA-019 ผลิต PHB ได้ สูงสุดเท่ากับ 53.81 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีจำนวนสปอร์เท่ากับ  $7 \times 10^3$  CFU/ml. เมื่อใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 25 มิลลิลิตรมีการผลิต PHB ได้ปริมาณต่ำที่สุดเท่ากับ 30.00 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้จำนวนสปอร์น้อยที่สุดคือ  $6 \times 10^3$  CFU/ml.

เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยให้ความเร็วรอบของการเขย่า เท่ากับ 200 รอบต่อนาที พบว่าได้ปริมาณ PHB สูงที่สุดเท่ากับ 53.81 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์ แห้งและมีจำนวนสปอร์เท่ากับ  $7 \times 10^3$  CFU/ml. และมีการผลิต PHB ได้ปริมาณต่ำที่สุดเท่ากับ 32.69 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 100 รอบ ต่อนาทีและจำนวนสปอร์เพิ่มขึ้นเท่ากับ  $7.2 \times 10^3$  CFU/ml.

8. เมื่อควบคุมค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB คือที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ได้ปริมาณ PHB สูงที่สุดเท่ากับ 54.65 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและมีจำนวนสปอร์เท่ากับ  $18 \times 10^3$  CFU/ml. ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 เชื้อมีปริมาณน้อยมากทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณ PHB ได้ และที่ค่าพีเอชนี้เชื้อสร้างสปอร์น้อยที่สุดเท่ากับ  $8 \times 10^3$  CFU/ml

### ข้อเสนอแนะ

ในภาวะที่มีการผลิต PHB สูงพบว่าน้ำตาลลดลงมาก เพื่อให้มีการผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้นต่อไป ควรมีการศึกษาการเติมแหล่งคาร์บอน

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- รัตนศิริ มุทิตากุล .2538.การผลิตพอลิบีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. BA-019 ที่แยกได้. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโทบริหารธุรกิจ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศศิพร โกมลเกษรักษ์.2545.การผลิตและการศึกษาลักษณะสมบัติของเทอร์พอลิเมอร์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) จาก *Bacillus* sp. BA-019. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโทบริหารธุรกิจ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุดา สุภาวสินสวัสดิ์ .2542.ผลของข้อบ่งชี้ต่อสัดส่วนของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต ในพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโทบริหารธุรกิจ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อดิพล บุญเรืองถาวร .2543.การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดยการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BA-019 แบบป้อนเป็นงวด 2 ขั้นตอน ภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ 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.
- Atrih, A., and Foster, S.J. 2001. Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. J.Appl.Bacteriol. 91:1-9.
- Atrih, A., and Foster, S.J. 2002. Bacterial endospores the ultimate survivors.Inter.Dairy.J. 12:217-223.
- Atrih, A., Zollner, P., Allmaier, G. and Foster, S.J. 1996. Structural analysis of *Bacillus subtilis* 168 endospore peptidoglycan and its role during differentiation. J.Bacteriol. 178:6173-6183.
- 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.

- Belliveau, B.H., Beaman, T.C., Pankratz, S., and Gerhardt, P. 1992. Heat killing of bacterial spores analysed by differential scanning calorimetry. J.Bacteriol. 174:4463-4474.
- Benoit, T.G., Wilsom, G.R., and Baugh, C.L. 1990. Fermentation during growth and sporulation and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. Lett. Appl.Microbial. 10:15-18.
- Bernfeld, F. 1955. Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . In Colowich, P.S. and Kaplan, O.N. (eds). Method in Enzymology (p.149). London: Academic Press.
- Bormann, E.J., Leibner, M., and Beer, B. 1998(a). Growth-associated production of poly(hydroxybutyric acid) by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates. Appl.Microbial.Biotechnol. 49:84-88.
- Bormann, E.J., Leibner, M., Roth, M., Beer, B. and Metzner, K. 1998(b). Production of polyhydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* from protein hydrolysates. Appl.Microbial.Biotechnol. 50:604-607.
- Borah, B., Thakur, P.S. and Nigam J.N. 2002. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. J.Appl.Microbiol. 92(4): 776-783.
- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W. and Fuller, R.C. 1990. Plastic from bacterial : Poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural biocompatible and biodegradable polymers. Adv.Biochem.Eng. 41:78-79.
- 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., Konig, K.H., and Laffer, R.M. 1991. Occurrence of poly-D-(-)-3-hydroxyalkanoates in genus *Bacillus*. FEMS Microbial Lett. 84:173-176.
- Chiellini, E. 1994. Status of government policy, regulation and standards on the issue of biodegradable plastics materials in Italy. Doi, Y. and Fukuda, K. (eds.).
- Choi, J., and Lee, S.Y. 1997. Process analysis and economic evaluation for poly(3-

- hydroxybutyrate) production for fermentation. Bioprocess Engineering.17:335-342.
- Choi, J., and Lee, S.Y. 1999. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol.51:13-21.
- Comeau, Y., Hall, K.J., and Oldham, W.K. 1988. Determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-co-polyhydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography. Appl. Environ. Microbiol.54:2325-2327.
- Cox, M.K. 1994. Properties and applications of polyhydroxyalkanoates. Doi, Y. and Fukuda, K. (eds.). *Biodegradable Plastics and Polymers*. pp. 120-135. Elsevier Science B.V.
- Damain, A.L. and Solomon N.A. 1985. *Biology of Industrial Microorganisms*. Benjamin-Cummings Publishing Co., Menlo Park. pp. 318-321.
- Daniel, M., Choi, J., Kim, J.H., and Lebeau, H. 1992. Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium *Pseudomonas* 135. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:702-706.
- Dawes, E.A. and Senior, P.J. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. Appl. Microbiol. Physiol.10:203-206.
- Doi, Y. (ed.). 1990. Microbial polyesters. VCH. New York.
- Driks, A. 1999. *Bacillus subtilis* spore coat. Microbiol. and Molec. Bio. Rev. 63:1-20.
- Driks, A. and Setlow, P. 1999. morphogenesis and properties of bacterial spores in Y. Brun, and L. Shimkets (Eds), *Regulation of prokaryotic development*. Washington, DC: American Society for Microbiology pp. 191-218.
- Egging, G., Smegen, J., Ongen-baysal, G. and Huigbert, G.N.M. 1992. Bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). in Mathouth, M. (ed), *Food packaging and preservation* pp.128-194.
- Ellar, D.J. (1978). Spore specific structure structures and their functions. Sym. Soc. Gen. Microbe. 28:295-334.
- Evan, D.J., and Sikdar, K.S. 1990. Biodegradable plastic. Chemtech.5:38-42.
- Findley, R.H., and White, D.C. 1983. Polymeric beta-polyhydroxyalkanoates from

- environmental samples and *Bacillus megaterium*. Appl.Environ.Microbiol.45:71-78.
- Fishman, A., Eroshov, M., Dee-Noor, S.S., Mil, J.V., Cogan, U., and Effenberger, R. 2001. A two-step enzymatic resolution process for large-scale production of (S)- and (R)-ethyl-3-hydroxybutyrate. Biotechnol.and Bioeng.74(3):256-263.
- Gerald, D.B. Degradable Polymers [Online].(n.d.). Available from; [http://www.icma.com/industry information.html](http://www.icma.com/industry%20information.html)[2002, June 21]
- Gerhardt, P., and Marquis, R.E. 1989. Spore thermoresistance mechanisms. in Smith, I., Slepecky, R. and Setlow, P. (Eds), Regulation of prokaryote development. Washington, DC : American Society for Microbiology. pp.43-63
- Gilbert, D.B. PHA Structure and Properties. [Online].(n.d.). Available from; <http://www.metabolix.com/publications/pressreleases.html>[2003 July 25]
- Grothe, E., Moo-Yung, M., and Chisti, Y. 1999 Fermentation optimization for the production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. Enz.and Micro.Technol.25: 132-141.
- Harzenberg, w., And Witholt, B. 1997. Efficient production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from octane by *Pseudomonas oleovorans* : economic considerations. Appl.Microbiol.Biotechnol.48:588-596.
- Hassan, M.A., Shirai, Y., Kubota, A., Karim, M.I.A., Nakanishi, K., and Hashimoto, K. 2001. Effect of Oligosaccharides on Glucose Consumption by *Rhodobacter sphaeroides* in Polyhydroxyalkanoate Production from Enzymatically Treated Crude Sago Starch. Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics. 15:184-193.
- Jackson, F.A., and Dawes, E.A. 1976. Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. J.Gen.Microbiol. 97:303-312.
- Juni, E., and Heym, G.A. 1956. A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetylmethylcarbinol, and diacetyl. General aspects of the 2,3-butanediol cycle. J.Bacteriol. 71:425-432.
- Kalia, V.C., Raizada, N., and Sonakya, V., 2000. Bioplastics. J.sci.Ind.Res. 59: 433-445.



- Kemper, A.J. 1974. Determination of sub microquantities of ammonium and nitrates in soils with phenol, sodium nitroprusside and hypochlorite. Geoderma.12:201-206.
- Kim, B.S. 2000. Production of poly(-3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. Enz.and Micro.Technol. 27:774-777.
- Kim, B.S., Lee, S.Y., and Chang, H.N. 1992. Production of polyhydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol.Lett. 14:811-816.
- Kim, S.W., Kim, P., Lee, H.S., and Kim, J.H. 1996. High production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation. Biotechnol.Lett.18:25-30.
- Kim, M.K., Lee, I.Y. and Park, Y.H. 1996. Metabolites and amino acids affecting cellular cofactor concentrations and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus*.Biotechnol.Lett.18:559-564.
- Kim, B.S., and Chang, H.N. 1998. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*.Biotechnol.Lett. 20:109-112.
- Kofronova, O., Piackova, L., and Chaloupka, J. 1994. Poly(3-hydroxybutyrate) Granules of *Bacillus megaterium*. Folia.Microbiol.39(2):166-167.
- Kominek,L.A., and Halvorson,H.O. 1965.Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*.J.Bacteriology.90(5):1251-1259.
- Labuzek, S. and Radecka, I. 2001.Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. J.Appl.Microbiol. 90:353-357.
- Law, K.H., Leung, Y.C., Lawford, H., Chua, H., Wai-Hung, L., and Yu PH. 2001. Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge. Appl.Biochem.Biotechnol. 91-93:515-24.
- Lee, S.Y.1996(a).Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnol. and Bioeng.49:1-14.
- Lee, S.Y.1996(b).Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria.Tibtech.16:419-425.
- Lee, S.Y., and Chang, H.N. 1995. Production of Poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* strains : genetic and fermentation studies. Can.J.Microbiol. 41(suppl.1):207-215.
- Lee, J.H., Hong, J., and Lim, H.C. 1997. Experimental optimization of fed-batch for poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid production. Biotechnol.and Bioeng. 56:697-705.

- Lee, S.Y., Lee, Y., and Wang, F. 1999. Chiral compounds from bacterial polyesters: Sugars to plastics to fine chemicals. Biotecnol. and Bioeng. 65(3):363-368.
- Lee, S.Y., and Middelberg, A.P.J., and Lee, Y.K. 1997. poly(3-hydroxybutyrate) production From whey using recombinant *Escherichia coli* Biotecnol.Lett. 19:1033-1035.
- Lemoigne, M. 1926. Production dedydration and polymerization of  $\beta$ -hydroxybutyric. Bull.Soc.Chem.Biol. 8:770-782.
- Luengo, J.M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., and Olivera, E.R. 2003. Bioplastics from microorganisms. Current Opinion in Microbe. 6:1-10.
- Madison, L.L., and Huisman, G.W. 1999. Metabolic engineering of poly(3hydroxy alkanooates) from DNA to plastic. Microbiol.Mole.Biol.Rev. 63:21-53.
- Matinez-Toledo, M.V., Gonzalez-Lopez, J., Rodelas, B., Pozo, C., and Salmeron, V. 1995. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azotobacter chroococcum* H23 in chemically defined medium and alpechin medium. J.Appl.Bacteriol. 78:413-418.
- McCool, G.J., Fernandez, T., Li, N., and Cannon, M.C. 1996. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. FEMS.Microbiol.Lett. 138:41-48.
- Murrel, W.G., and Warth, A.D. 1965. Composition and heat resistance of bacterial spores. In Campbell, L.L. and Halvorson(Eds.), Spores III. Washington, DC : American Society for Microbiology. pp.1-24.
- Nakashio, S., and Gerhardt, P. 1985. Protoplast dehydration correlated with heat of bacterial spores. J.Bacteriol. 162:571-578.
- Nakata, H.M. 1963. Effect of pH on intermediates produced during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. J.Bacteriol. 86:577-580.
- Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A. and Setlow, P. 2000. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolini acid. J.Bacteriol. 182:5505-5512.
- Page, W.J. 1992. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources. Appl.Environ.Microbiol. 38:117-121.
- Page, W.J. and Cornish, A. 1993. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. Appl.Environ.

Microbiol.59:4236-4244.

- Paustian, T. Inclusions and other internal structures [online].(n.d.). Available from; <http://www.bact.wisc.edu/.../bacterialstructure/Inclusions.html> [2003, Jan 21]
- Ramsay, J.A., Hasson, M.C.A., and Ramsay, B.A. 1995. Hemicellulose as a potential substrate for production of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates).Can.J.Microbiol.41 (suppl.1):262-266.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi and Kalia, V.C. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview.Bioresource technol.87:137-146.
- Sabat, S., Deshpande, M.K., and Khandwekar, P.V. 1998. Microbial Production of Poly  $\beta$ -Hydroxy Butyrate- A Biopolymer. J.Sci. and Ind. Res. 57:654-657.
- Setlow, P. 1994. Mechanism which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. J.Appl.Bacteriol. 76:49S-60S.
- Slepecky, R.A., and Foster, J.W. 1959. Alteration in metal content of spores of *Bacillus megaterium* and the effect on some spore properties. J.Bacteriol. 78:117-123.
- Slepecky, R.A., and Foster, J.W.1960. A rapid spectrophotometric assay of  $\alpha,\beta$ -unsaturated acids and  $\beta$ -hydroxy acids. Anal.Chem.32:1697-1699.
- Slepecky, R.A, and Law J.H. 1961. Synthesis and Degradation of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*.J.Bacteriol. 82:37-42.
- Steinbuchel, A., and Fuchtenbusch, B. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. Tibtech.16:419-426.
- Stevenson, L.H., and Socolofsky, M.D. 1966. Cyst formation and poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid accumulation in *Azotobacter*. J.Bacteriol.91:304-310.
- Suzuki, T., Yamane, T., and Shimizu, S. 1986(a).Mass production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. Appl.Microbiol.Biotechnol.23:322-329.
- Suzuki, T., Yamane, T., and Shimizu, S. 1986(b). Mass production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding.Appl.Microbiol.Biotechnol.24:370-374.
- Tanaka, K., Katamune, K., and Ishizaki, A. 1995. Fermentative production of poly( $\beta$ -

hydroxybutyric acid) from xylose via L-lactate by a two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*. Can.J.Microbiol. 41(suppl.1):257-261.

The national house museum. Measurements [online].(n.d.). Available from;

[www.accessexcellence.org/AE/AEPC/Wards/e3ferm/measurements.html](http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/Wards/e3ferm/measurements.html) [2003, Jan 21]

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

Wallen, L.L., Rohwedder, W.K. 1974. Polyhydroxyalkanoate from activated sludge. Environ.Sci.Technol. 8: 576-579.

Wang, F., and Lee, S.Y. 1997(a). Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. Appl.Environ.Microbiol.63:3703-3706.

Wang, F., and Lee, S.Y. 1997(b). Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentous-suppressed recombinant *Escherichia coli*. Appl.Environ Microbiol.63:4765-4769.

Wang, J.G., and Bakken, L.R. 1998. Screening of soil bacterial for poly-beta-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. Microb. Ecol.35:94-101.

Wendlandt, K.D., lochorek, M., Helm, J., and Stottmeister, U. 2001. Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. J.Biotechnol. 86:127-133.

Warth, A.D. 1978. Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. J.Bacteriol. 134:699-705.

Whitaker ,A. 1980. Fed-batch culture. In Stanbury, P.F., and Whitaker ,A.(eds.). Principles of Fermentation Technology. Oxford : Pergamon Press pp.1-25.

Williamsom, D.H., and Wilkinson, J.K. 1958. The isolation and estimation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. J.Gen.Microbiol.19:198-209.

Wong. H.H., and Lee, S.Y. 1998. Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-

- density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. Appl.Microbiol.Biotechnol.50: 30-33.
- Wu, Q., Huang, H., Chen, J., Ho, K.P., and Chen, G.Q. 2001. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. Antonie van Leeuwenhoek. 80(2):111-118.
- Yamane, T. 1992. Cultivation engineering of microbial bioplastics production. FEMS. Microbiol.Rev. 103:257-264.
- Yamane, T. 1993. Yield of poly-D-(-)-3- hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. Biotechnol.Bioeng.41:165-170.
- Yamane, T. Fukunaga, M., and Lee, Y.W. 1996. Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus* , a growth-associated PHB producer Biotechnol.Bioeng.50:197-202.
- Yeom, S.H., and Yoo, Y.J. 1995. Effect of pH on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyric acid produced by *Alcaligenes* sp. Biotechnol.Lett.17:389-394.
- Yim, K.S., Lee, S.Y., and Chang H.N. 1996. Synthesis of poly(-3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol.Bioeng.49:495-503.
- Yu, P.H.F., Chua, H., Huang, A.L., Lo, W.H., and Ho, K.P. 1999. Transformation of industrial food waste into polyhydroxyalkanoates. Wat.Sci.Tech.40:365-370
- Yu, J. 2001. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. J.Biotechnol. 86:105-112.
- Zinn, M., Witholt, B., and Egli, T. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. Adv.Drug.Del.Rev. 53:5-21.





ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมสารที่ใช้ในงานวิจัย

#### 1. การเตรียมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส(invertase)

1.1 สารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ เตรียมจากการละลายไซเดียมอะซีเตตปริมาณ 9.10 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก 1.9 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 4.5 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.2 สารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส เตรียมจากการละลายเอนไซม์อินเวอร์เทสปริมาณ 0.15 กรัม ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

#### 2. การเตรียมสารละลายเอนไซม์ยูเรียเอส(urease)

2.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เตรียมจากการละลายไซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรตปริมาณ 3.28 กรัม และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณ 0.57 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.1 ปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร

2.2 สารละลายเอนไซม์ยูเรียเอส เตรียมจากการละลายเอนไซม์ยูเรียเอสปริมาณ 1.75 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

#### 3. การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก เตรียมจากสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาณ 1.0 กรัมในสารละลายไซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมโซเดียมตาร์ทเรต 30 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

#### 4. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียม

4.1 สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เตรียมจากการละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ปริมาณ 150 กรัมในน้ำกลั่นปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

4.2 สารละลายฟีนอลไนโตรพัสซายด์ เตรียมจากสารละลายฟีนอล 7 กรัม และโซเดียมไนโตรพัสซายด์ ปริมาณ 34 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 80 มิลลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ เก็บไว้ในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3 สารละลายบัพเฟอร์ไฮโปคลอไรต์ เตรียมจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.48 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 70 มิลลิตร เติมโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.98 กรัม และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์(คลอรวกซ์ 5-5.25) ปริมาตร 20 มิลลิตร ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 11.4-12.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

4.4 สารละลาย EDTA เตรียมจากการละลาย EDTA ไดโซเดียมซอลท์ปริมาณ 6 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 80 มิลลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข

### สูตรคำนวณ

#### 1. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง

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

#### 2. การคำนวณ PHB จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

การคำนวณปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตรต่อเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัม) ทำการประมวลผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป star chromatogram: version 4.02 ซึ่งจะคำนวณปริมาณ PHB เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน

การคำนวณปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร)

$$\text{สูตร ปริมาณ PHB} = \frac{\text{ค่าจากการวิเคราะห์ (กรัมต่อลิตร)} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)}}{10(\text{ปริมาณเซลล์ที่ซั่งได้})}$$

#### 3. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

$$\text{สูตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(กรัมต่อลิตร)} = OD_{540} \times \text{ความชัน} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

#### 4. การคำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคส(วิเคราะห์ด้วยHPLC)

$$\text{สูตร ปริมาณน้ำตาลกลูโคส(กรัมต่อลิตร)} = \text{ratio} \times (1 / \text{ความชัน}) \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

#### 5. การหาปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจนและยูเรียในน้ำหมัก

$$\text{สูตร ปริมาณยูเรีย (กรัมต่อลิตร)} = OD_{636} \times \text{ความชัน} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times \frac{60}{28} \times 10^{-3}$$

$$\text{ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต} = OD_{636} \times \text{ความชัน} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times \frac{132}{28} \times 10^{-3}$$

หมายเหตุ 132 คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอมโมเนียมซัลเฟต

60 คือ น้ำหนักโมเลกุลของยูเรีย

28 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย

## 6. การหาปริมาณยูเรียในน้ำหมัก

ปริมาณยูเรีย (กรัมต่อลิตร) = ค่าศักย์ไฟฟ้า(มิลลิโวลต์) x ความชัน x ค่าการเจือจาง



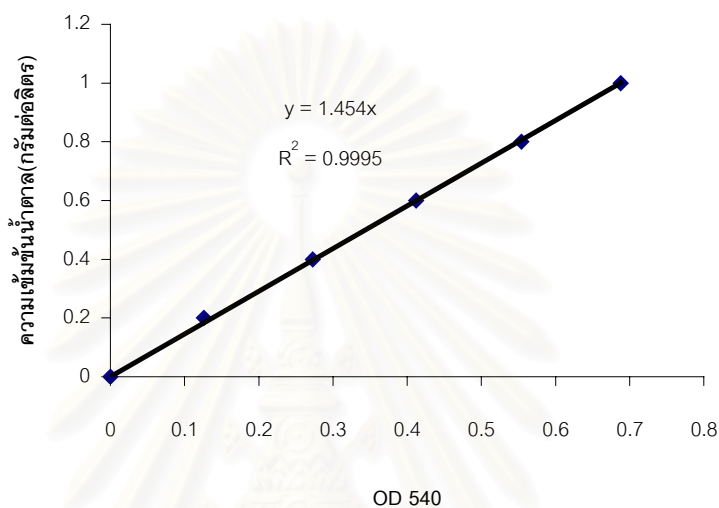
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ค

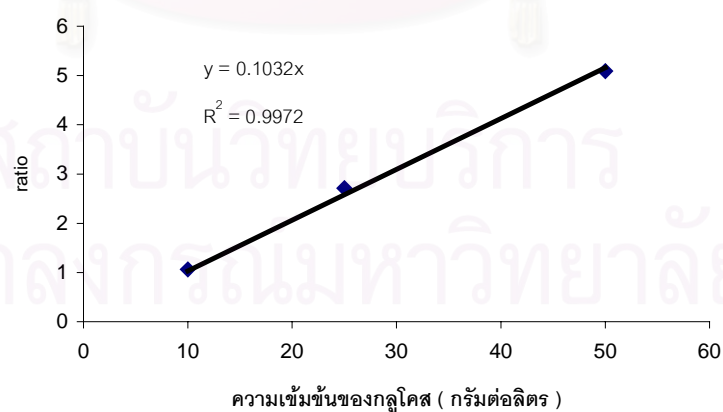
## กราฟมาตรฐาน

## 1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์



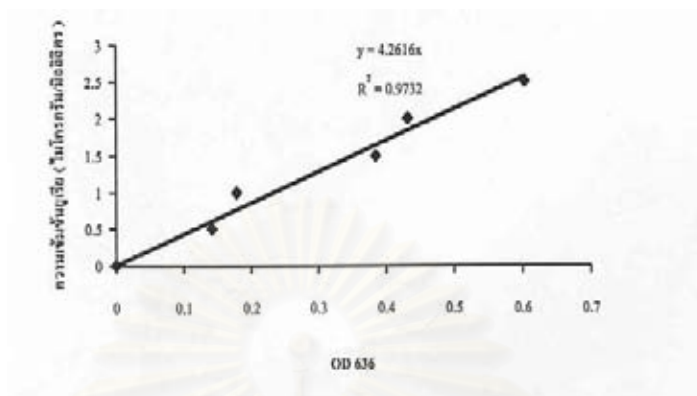
กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 1.454

## 2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสวิเคราะห์โดย HPLC



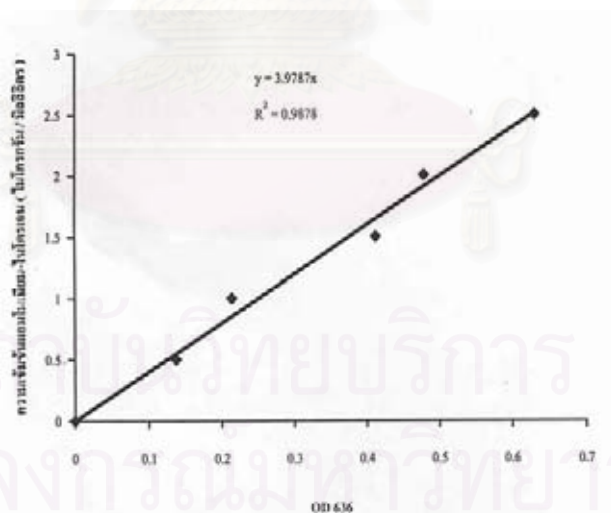
กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 10-50 กรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 0.103

### 3. กราฟมาตรฐานของยูเรีย



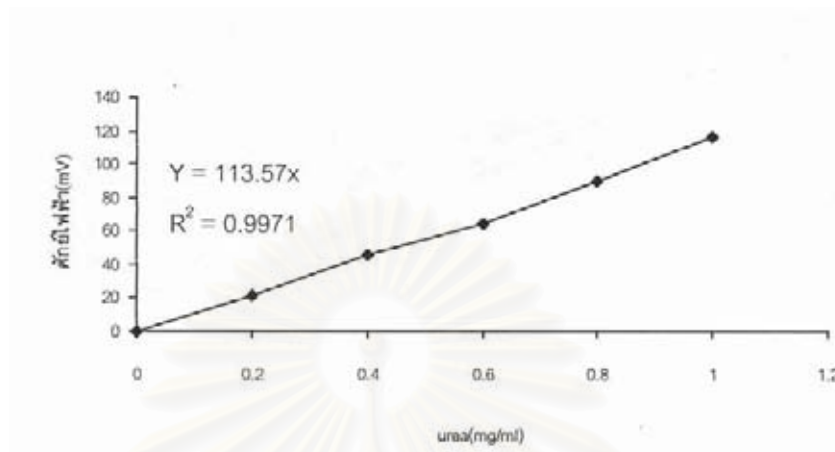
กราฟมาตรฐานของยูเรียในช่วงความเข้มข้น 0-2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 4.26

### 4. กราฟมาตรฐานของแอมโมเนียม-ไนโตรเจน



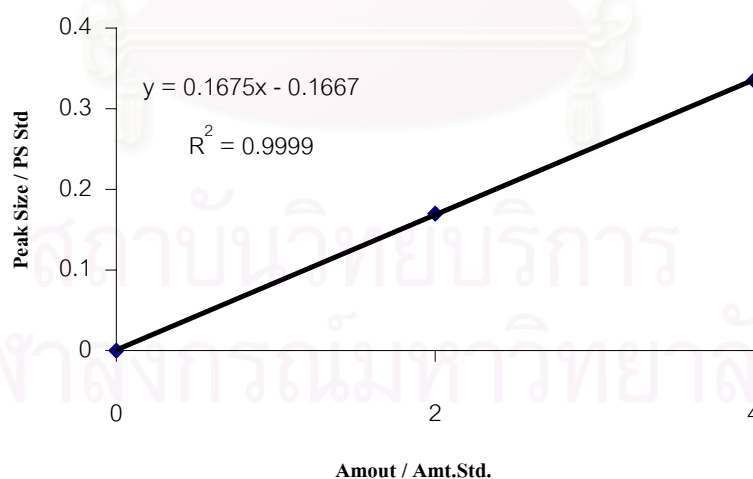
กราฟมาตรฐานของแอมโมเนียม-ไนโตรเจน ในช่วงความเข้มข้น 0-2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 3.98

5. กราฟมาตรฐานของยูเรีย(โดยแอมโมเนียอิเล็กโทรด)



กราฟมาตรฐานของยูเรียในช่วงความเข้มข้น 0-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 113.57

6. กราฟมาตรฐานของโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต(3HB)



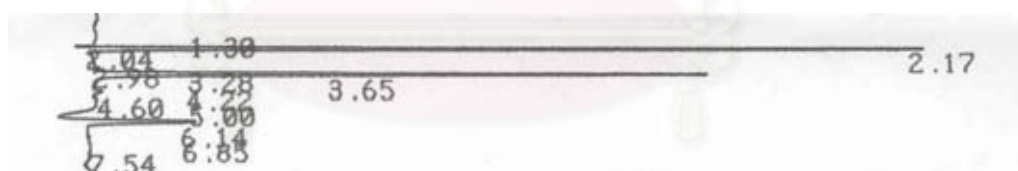
กราฟมาตรฐานของโมโนเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต ในช่วงความเข้มข้น 0-6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 0.17

### ตัวอย่างโครมาโตแกรม



- ที่ retention time 3.56 คือ glucose standard
- ที่ retention time 5.99 คือ internal standard

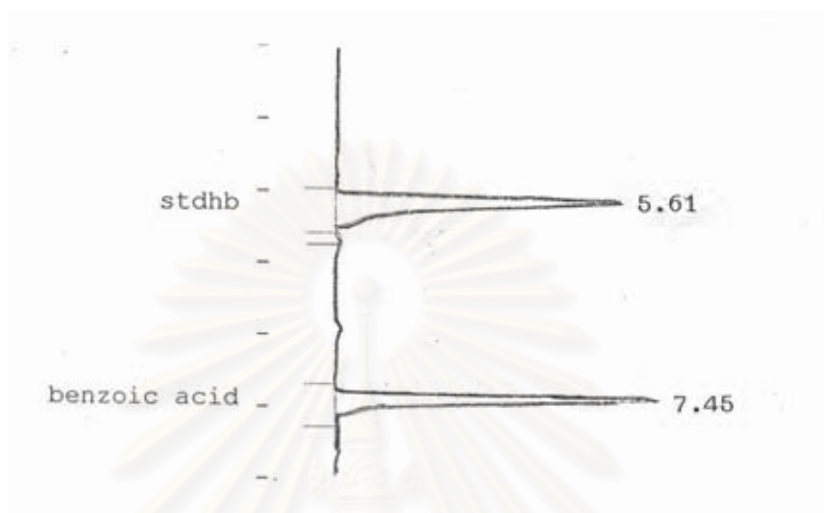
โครมาโตแกรมของน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 25 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งวิเคราะห์ด้วย HPLC



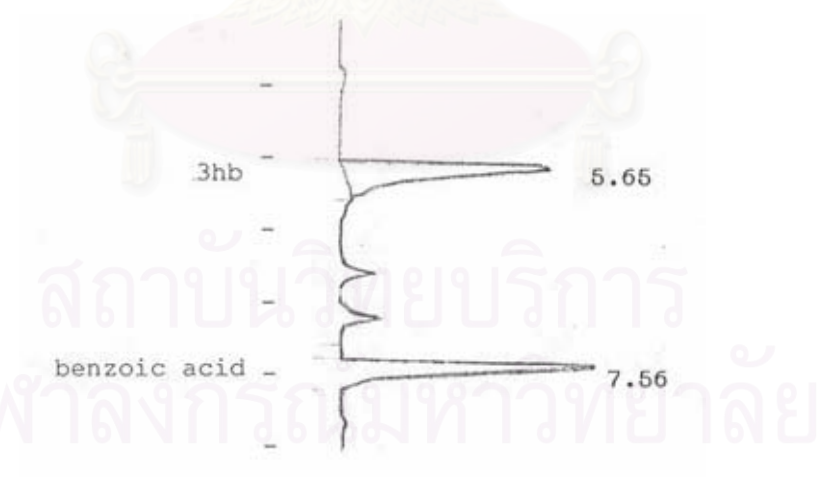
- ที่ retention time 3.65 คือ glucose standard
- ที่ retention time 5.99 คือ internal standard

โครมาโตแกรมของแป้งที่ผ่านการย่อย ซึ่งวิเคราะห์ด้วย HPLC

## ตัวอย่างโครมาโตแกรม



โครมาโตแกรมสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกซีซีบิวทิเรต(3HB) ซึ่งวิเคราะห์ด้วย GC



ตัวอย่างโครมาโตแกรมของ PHB จาก *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งวิเคราะห์ด้วย GC





6 ชม.



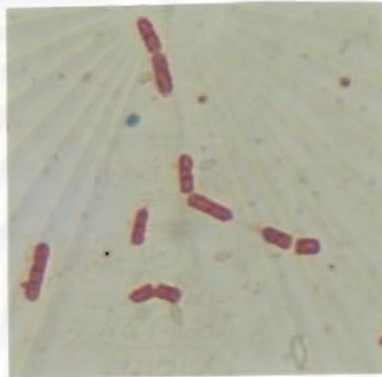
9 ชม.



12 ชม.



18 ชม.



24 ชม.



30 ชม.



36 ชม.



42 ชม.



48 ชม.

รูปสปอร์ของ *Bacillus* sp. BA-019 ที่สร้างที่เวลาต่างๆกัน ตั้งแต่ 6-48 ชั่วโมง ในอาหารที่เหมาะสม  
สำหรับการผลิต PHB และเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษา (x 1000)

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสุปริญญา สุขผลพลา เกิดวันที่ 9 กันยายน พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ปีการศึกษา 2541 จากนั้นเข้าทำงานที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏสวนสุนันทา และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยา ระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย