

การผลิตพอลิ(ปีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-ปีตาไฮดรอกซีวาลาเรต) โดย
Alcaligenes eutrophus NCIMB11599 จากกลูโคสและกรดโพรพิโอนิก
ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกึ่งต่อเนื่อง



นายกิตติพล กสิภาร์

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

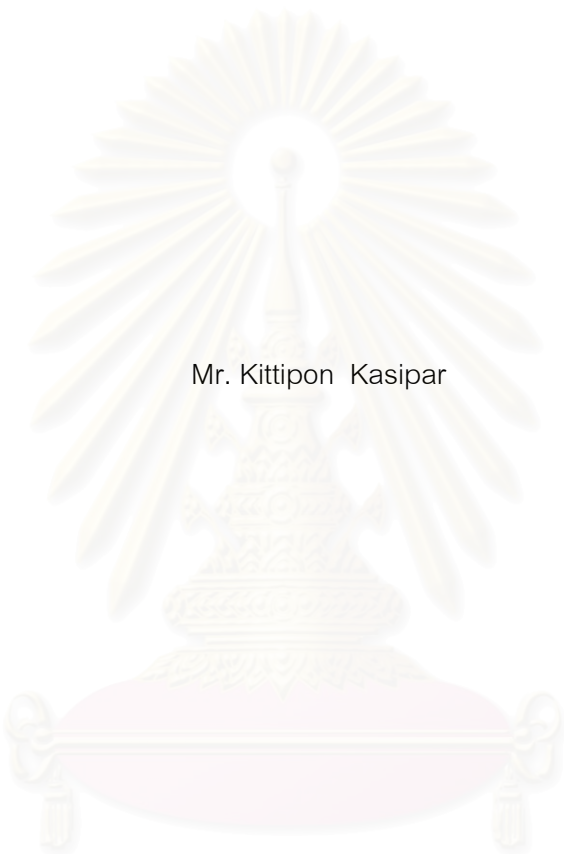
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1329-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF POLY(β -HYDROXYBUTYRATE – CO - β -
HYDROXYVALERATE) BY *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 FROM GLUCOSE
AND PROPIONIC ACID IN FED-BATCH BIOREACTOR



Mr. Kittipon Kasipar

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-1329-9

กิตติพล กสิภาร์ : การผลิตพอลิ(บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-บีตาไฮดรอกซีวาลาเรต
โดย *Alcaligenes Eutrophus* NCIMB11599 จากกลูโคส และ กรดโพรพิโอนิกในถัง
ปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกึ่งต่อเนื่อง(PRODUCTION OF POLY (β -

HYDROXYBUTYRATE CO - β -HYDROXYVALERATE)

BY *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 FROM GLUCOSE AND
PROPIONIC ACID IN FED-BATCH BIOREACTOR)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สีรุ่ง ปริษานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.จิรกานต์
เมืองนาโพธิ์, 168 หน้า. ISBN 974-03-1329-9

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิต PHBV โดย *Alcaligenes eutrophus*
NCIMB11599 จากกลูโคสและกรดโพรพิโอนิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกึ่งต่อเนื่อง โดย
ศึกษาอิทธิพลร่วมของค่าอัตราส่วนโมลอะตอมคาร์บอนต่อโมลอะตอมไนโตรเจน (C/N) และ
ร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโต
และการผลิต PHBV ด้วยวิธีการออกแบบการทดลอง (Experimental design) โดยพบว่า
สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์คือที่ C/N เท่ากับ 50 ร้อยละโดยโมลของ
กรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 25 และสภาวะที่เหมาะสมค่าอัตราการผลิต 3HB จำเพาะคือที่ C/N
เท่ากับ 200 ที่ร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 0 ซึ่งแตกต่างจากสภาวะที่เหมาะสม
ต่อค่าอัตราการผลิต 3HV จำเพาะซึ่งมีค่า C/N ระหว่าง 100 ถึง 150 และร้อยละโดยโมลของ
กรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 75 ซึ่งเกิดจากกิจกรรมที่ลดลงของเอนไซม์ต่างๆในวิถีสังเคราะห์บีตา-
ออกซีเดชันเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการจำกัดไนโตรเจนมากเกินไป ทั้งนี้จะได้ร้อยละโดย
โมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์สูงสุดประมาณร้อยละ 18 ที่สภาวะเดียวกับอัตราการผลิต 3HV
จำเพาะสูงสุด ซึ่งผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการผลิต PHBV ที่
มีค่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ตามที่ต้องการได้

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2544.....ลายมือชื่อที่ปรึกษาร่วม.....

4170228521 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: FED BATCH FERMENTATION, PHBV, *Alcaligenes eutrophus*

KITTIPON KASIPAR : PRODUCTION OF POLY (β - HYDROXYBUTYRATE
-CO - β -HYDROXYVALERATE) BY *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599
FROM GLUCOSE AND PROPIONIC ACID IN FED-BATCH BIOREACTOR.
THESIS ADVISOR : SEEROONG PRICHANONT, Ph.D., THESIS COADVISOR
:CHIRAKARN MUANGNAPOH, Dr. Ing. 168 pp. ISBN974-03-1329-9

The ultimate aim of this research project were to investigate the production of PHBV from glucose and propionic acid in fed-batch bioreactor. Effect of operating parameters which were C/N (mol•carbon atom/mol•nitrogen atom) and molepercent of propionic acid on growth and PHBV production. It was discovered that suitable conditions for specific growth rate of cell were C/N between 4 to 50 and molepercent of propionic acid between 0 to 25 ,and suitable conditions for specific production rate of 3HB were C/N between 150 to 200 and 0 molepercent of propionic acid which difference from the suitable conditions for specific production rate of 3HV were C/N between 100 to 150 and 75 molepercent of propionic acid, because enzyme activities in the β -oxidation pathway was suppressed due to the lack of nitrogen source, and maximum molepercent of 3HV in copolymer was 18 of the same suitable conditions for specific production rate of 3HV.

Department.....Chemical engineering.....Student's signature.....
Field of study.....Chemical engineering.....Advisor's signature.....
Academic year.....2001.....Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจากหลายๆท่านผู้วิจัย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีรุ่ง ปรีชานนท์ รองศาสตราจารย์ ดร. จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำในการพัฒนางานวิจัย ตลอดจนตรวจทานแก้ไข วิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เกริกชัย สุภาภรณ์จันท์ รองศาสตราจารย์ ดร. ส่องศรี กุลปรีชา และ อาจารย์ ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ ที่ได้กรุณารับเป็นประธาน กรรมการ และกรรมการการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ ทบวงมหาวิทยาลัย บัณฑิตวิทยาลัย และ ภาควิชาวิศวกรรม เคมีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาให้ใช้เครื่องมือต่างๆในงานวิจัยนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คุณเกษร บัวทอง ที่ให้การแนะนำและช่วยเหลือสิ่งต่างๆ ซึ่งเป็น ประโยชน์ต่องานวิจัยนี้เป็นอย่างมาก

ขอขอบพระคุณ คุณเสริมศิริ แห่งสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ช่วยเหลือด้านการจัดเก็บเชื้อจุลินทรีย์

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่ได้ให้การสนับสนุน และคอยให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ จนทำให้งานวิจัยนี้เสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญรูป.....	ด
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	5
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....	5
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ความเป็นมาของพอลิ(บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-บีตา-ไฮดรอกซีวาลาเรต).6	
2.1.1 คุณลักษณะ คุณสมบัติและการนำไปใช้งานของ PHBV.....	6
2.1.2 กลไกการสังเคราะห์ PHBV.....	8
2.1.3 เชื้อจุลินทรีย์และสารอาหาร.....	12
2.2 การพัฒนากระบวนการหมัก.....	18
2.2.1 การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง.....	18

สารบัญ

หน้า

2.2.2	การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง.....	20
2.2.3	การหมักแบบต่อเนื่อง.....	23
3.	ทฤษฎี.....	25
3.1	ลักษณะโดยทั่วไป.....	25
3.2	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง.....	27
4.	อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	31
4.1	อุปกรณ์.....	31
4.2	เคมีภัณฑ์.....	32
4.3	เชื้อจุลินทรีย์.....	33
4.4	อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	33
4.5	วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์.....	35
4.6	ขั้นตอนการทดลอง.....	36
4.7	การวัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์.....	40
4.8	การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส.....	40
4.9	การหาปริมาณไนโตรเจน.....	41
4.10	การหาปริมาณกรดโพธิโอนิค.....	42
4.11	การหาปริมาณ PHBV.....	43

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	46
5.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ <i>A.eutrophus</i> NCIMB11599	
ในขวดรูปชมพู่.....	47
5.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ <i>A.eutrophus</i> NCIMB11599	
ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกึ่งต่อเนื่อง.....	48
5.2.1 การเพาะเลี้ยง <i>A.eutrophus</i> NCIMB11599	
ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	49
5.2.2 ตัวแปรดำเนินการ.....	51
5.2.2.1 ค่าอัตราส่วนโดยโมลคาร์บอนต่อไนโตรเจน.....	52
5.2.2.2 ค่าร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิค.....	53
5.2.3 อิทธิพลของตัวแปรดำเนินการต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์.....	55
5.2.3.1 อิทธิพลที่มีต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์.....	56
5.2.3.2 อิทธิพลที่มีต่ออัตราการผลิต 3HB จำเพาะ.....	60
5.2.3.3 อิทธิพลที่มีต่ออัตราการผลิต 3HV จำเพาะ.....	62
5.2.3.4 อิทธิพลที่มีต่อร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์.....	65
5.2.3.5 อิทธิพลที่มีต่อร้อยละโดยน้ำหนักโคพอลิเมอร์ในเซลล์.....	68
5.2.3.6 อิทธิพลที่มีต่ออัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ.....	70
5.2.3.7 อิทธิพลที่มีต่ออัตราการใช้กรดโพรพิโอนิคจำเพาะ.....	73

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.2.3.8	อิทธิพลที่มีต่ออัตราการใช้ในโตรเจนจำเพาะ.....	75
5.2.3.9	อิทธิพลที่มีต่อผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส และอิทธิพลที่มีต่อผลได้ของ 3HV ต่อกกรดโพรพิโอนิค....	77
5.3	อิทธิพลของโมลอะตอมคาร์บอนต่อ ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์.....	81
5.4	สภาวะที่ให้ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์สูงสุด.....	84
5.5	บทสรุปการวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	85
5.5.1	อิทธิพลของค่า C/N ต่อ ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ในทางทฤษฎี.....	85
5.5.2	อิทธิพลของค่าร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิคต่อ ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ในทางทฤษฎี.....	86
5.5.3	การพยากรณ์สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHBV.....	87
6.	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	89
6.1	สรุปผลการทดลอง.....	89
6.2	ข้อเสนอแนะ.....	92
	รายการอ้างอิง.....	94
	ภาคผนวก	
	ภาคผนวก ก.....	99

ภาคผนวก ข.....	123
ภาคผนวก ค.....	132
ภาคผนวก ง.....	161
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	168



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	คุณสมบัติของ PHBV และพอลิเมอร์ในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตอื่นๆ.....7
2.2	ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สร้างและสะสม PHAs.....12
2.3	ปริมาณการสะสมและองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ของ PHAs ในจุลินทรีย์ <i>P. oleovorans</i> เมื่อใช้สารอาหารต่างๆกัน.....14
2.4	ตารางสรุปการผลิต PHA จากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....15
4.1	สภาวะที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกรดโพรพิโอนิค.....42
4.2	สภาวะที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ PHBV.....44
5.1	เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารอาหารที่ต้องควบคุมกับความเข้มข้น เฉลี่ยในถังปฏิกรณ์.....49
5.2	เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง <i>A.eutrophus</i> NCIMB11599 ที่โมลอะตอมคาร์บอน 0.081 และ 0.44.....83
5.3	ตัวอย่างการนำสมการความสัมพันธ์มาใช้พยากรณ์หาสภาวะที่เหมาะสม ในการผลิต PHBV ที่มีค่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ต่างๆกัน.....88
ก1	แสดงค่าการออกแบบการทดลองและ ผลของค่าตัวแปรกระบวนการที่ได้จากการทดลอง.....107
ก2	เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ที่ได้จากการที่ (ก8).....108
ก3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ (ก8)109
ก4	เปรียบเทียบอัตราการผลิต 3HB จำเพาะที่ได้จากการที่ (ก9).....113
ก5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการอัตราการผลิต 3HB จำเพาะ (ก9).....113

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ก6	เปรียบเทียบอัตราการผลิต 3HV จำเพาะที่ได้จากสมการที่ (ก10).....114
ก7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการอัตราการผลิต 3HV จำเพาะ (ก10)114
ก8	เปรียบเทียบอัตราการผลิต PHBV จำเพาะที่ได้จากสมการที่ (ก11).....115
ก9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการอัตราการผลิต PHBV จำเพาะ (ก11).....115
ก10	เปรียบเทียบร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ ที่ได้จากสมการที่ (ก12).....116
ก11	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการร้อยละ 3HV ในโคพอลิเมอร์ (ก12).....116
ก12	เปรียบเทียบอัตราการใช้กลูโคสจำเพาะที่ได้จากสมการที่ (ก13).....117
ก13	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการอัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ (ก13)117
ก14	เปรียบเทียบอัตราการใช้กรดโพรฟิโอนิคจำเพาะที่ได้จากสมการที่ (ก14).....118
ก15	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการใช้กรดโพรฟิโอนิคจำเพาะ(ก14).....118
ก16	เปรียบเทียบอัตราการใช้ในโตรเจนจำเพาะที่ได้จากสมการที่ (ก15).....119
ก17	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการอัตราการใช้ในโตรเจนจำเพาะ (ก15).....119
ก18	เปรียบเทียบผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส ที่ได้จากสมการที่ (ก16).....120
ก19	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส (ก16)120
ก20	เปรียบเทียบผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรฟิโอนิค ที่ได้จากสมการที่ (ก17).....121
ก21	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรฟิโอนิค(ก17).121
ก22	เปรียบเทียบร้อยละโดยน้ำหนักของ PHBV ที่ได้จากสมการที่ (ก18).....122
ก23	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการผลได้ของ 3HVต่อกรดโพรฟิโอนิค(ก18)..122

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ข1	แสดงตัวอย่างผลการทดลองของการทดลองที่ 1.....124
ค1	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 100.....133
ค2	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 171.3 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 14.7.....135
ค3	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 32.7 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 14.7.....137
ค4	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 32.7 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 85.4.....139
ค5	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 141 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 85.4.....141
ค6	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 0.....143
ค7	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 4 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 50.....145
ค8	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 200 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 50.....147

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ค9 ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 50.....	149
ค10 ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 50.....	151
ค11 ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 50.....	153
ค12 ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 50.....	155
ค13 ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 50.....	157
ค14 ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่ 0.44 โมลอะตอมคาร์บอน.....	159

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1	วัฏจักรของการใช้พลาสติกที่ย่อยสลายในธรรมชาติ.....2
1.2	สูตรโครงสร้างทั่วไปของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต.....4
2.1	โครงสร้างทางเคมีของพอลิ(บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-บีตา-ไฮดรอกซีวาลาเรต).....6
2.2	กลไกการสังเคราะห์ PHBV จากกลูโคสและกรดโพรพิโอนิก.....10
2.3	วัฏจักรการสังเคราะห์และการสลาย PHB.....11
2.4	ภาพตัดของเซลล์ <i>A.eutrophus</i> จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดง PHB แกรนูลภายในเซลล์.....13
3.1	กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง.....25
3.2	สมดุลมวลสารในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง.....27
4.1	แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียง.....37
4.2	แสดงหัวเชื้อตั้งต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรสมบูรณ์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร.....37
4.3	ถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่องขนาด 2 ลิตร.....39
4.4	แกสโครมาโตกราฟของกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติก.....43
4.5	แกสโครมาโตกราฟของ 3HB 3HV และกรดเบนโซอิก.....45
5.1	ผลการเพาะเลี้ยง <i>A.eutrophus</i> NCIMB11599 ในอาหารสูตรสมบูรณ์ อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที.....47
5.2	ผลการเพาะเลี้ยง <i>A.eutrophus</i> NCIMB11599 ในอาหารสูตรสังเคราะห์ ที่ C/N = 32.7 รัยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก 14.7.....50

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
5.3	แสดงผลิตภัณฑ์จากอะซิติกโคเอในสภาวะที่มีอาหารสมดุลและในภาวะที่มี สารอาหารไม่สมดุลแบบมีคาร์บอนมากเกินไป.....53
5.4	การเชื่อมโยงของกระบวนการสังเคราะห์ PHAs วิธีสังเคราะห์ปีตา-ออกซิเดชัน และ วัฏจักรเครปส์.....55
5.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อ ไนโตรเจนและเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่อ อัตราการผลิต 3HB จำเพาะ.....56
5.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของ คาร์บอนต่อไนโตรเจนและเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพรพิโอนิก ต่ออัตราการผลิต 3HB จำเพาะ.....61
5.7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของ คาร์บอนต่อไนโตรเจนและเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่อ อัตราการผลิต 3HV จำเพาะ.....62
5.8	ผลของความเข้มข้นของโพรพิโอเนต และเวลาเรตในการสะสม PHBV ใน <i>A.eutrophus</i> NCIMB11599 ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติกโคเอซินเทส.....64
5.9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่อร้อยละ 3HV ในโคพอลิเมอร์.....65

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
5.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนและเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพธิ์อินิคต่ออัตราการผลิต P(3HB-co-3HV) จำเพาะ.....	67
5.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนและเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพธิ์อินิคต่อร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์.....	69
5.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนและเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพธิ์อินิคต่ออัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ.....	71
5.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนและเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพธิ์อินิคต่ออัตราการใช้กรดโพธิ์อินิคจำเพาะ.....	73
5.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนและเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพธิ์อินิคต่ออัตราการใช้ไนโตรเจนจำเพาะ.....	75
5.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนและเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพธิ์อินิคต่อผลได้ของ3HBต่อกลูโคส.....	78

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
5.16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่อผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรพิโอนิก...	78
5.17(ก) ผลการเพาะเลี้ยง <i>A.eutrophus</i> NCIMB11599 ในอาหารสูตรสังเคราะห์ ที่โมลอะตอมคาร์บอนเท่ากับ 0.44.....	81
5.17(ข) ผลการเพาะเลี้ยง <i>A.eutrophus</i> NCIMB11599 ในอาหารสูตรสังเคราะห์ ที่โมลอะตอมคาร์บอนเท่ากับ 0.44.....	82
ก1 แสดงการออกแบบการทดลอง 13 การทดลองจากสองตัวแปร.....	101
ข1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln X_{rV} - \ln X_{rVo}$ และ t-to.....	126
ข2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $C_{3HB} - C_{3HB0}$ และ t-to.....	127
ข3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $C_{3HV} - C_{3HV0}$ และ t-to.....	129
ข4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $C_{PHBV} - C_{PHBV0}$ และ t-to.....	130
ค1 ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 100.....	134
ค2 ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 171.3 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 14.7.....	136
ค3 ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 32.7 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 14.7.....	138

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
ค4	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 32.7 และร้อยละโดยโมลกรดไพโรพิอินิค เป็น 85.4.....140
ค5	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 141 และร้อยละโดยโมลกรดไพโรพิอินิค เป็น 85.4.....142
ค6	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดไพโรพิอินิค เป็น 0.....144
ค7	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 4 และร้อยละโดยโมลกรดไพโรพิอินิค เป็น 50.....146
ค8	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 200 และร้อยละโดยโมลกรดไพโรพิอินิค เป็น 50.....148
ค9	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดไพโรพิอินิค เป็น 50.....150
ค10	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดไพโรพิอินิค เป็น 50.....152
ค11	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดไพโรพิอินิค เป็น 50.....154
ค12	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดไพโรพิอินิค เป็น 50.....156

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
ค13	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่มีค่า C/N เป็น 102 และร้อยละโดยโมลกรดไพโรฟิโอนิค เป็น 50.....158
ค14	ผลการเพาะเลี้ยง <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB11599 บนอาหารสังเคราะห์ ที่ 0.44 โมลอะตอมคาร์บอน.....160
ง1	แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง.....162
ง2	แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ 3HB.....163
ง3	แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ 3HV.....164
ง4	แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรดไพโรฟิโอนิค.....165
ง5	แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกลูโคส.....166
ง6	แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต.....167

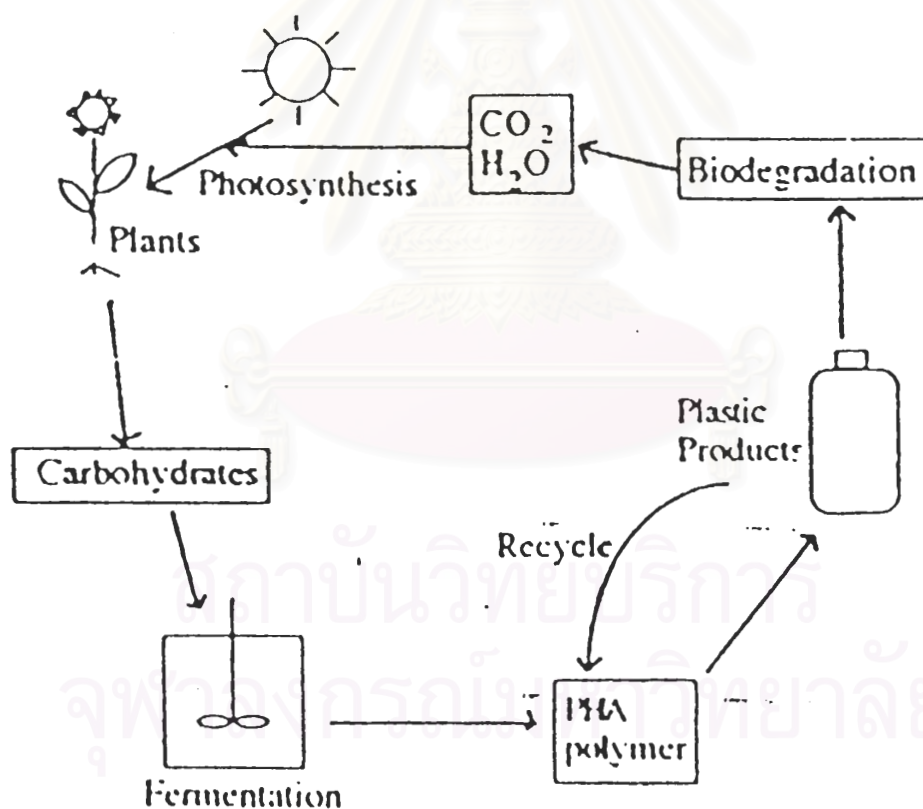
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ในปัจจุบันนี้ปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากขยะพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ (synthetic polymer) มีความรุนแรงมาก เนื่องจากขยะดังกล่าวต้องอาศัยระยะเวลาในการย่อยสลายเป็นเวลานาน ทำให้มีการสะสมของขยะพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก โดยพบมีการสะสมของพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้กว่า 25 ล้านตันต่อปี (Lee, 1991) นอกจากนี้ประชากรบนโลกยังเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจทำให้ทรัพยากรธรรมชาติบนโลกหมดไปได้ในอนาคตอันใกล้ และถึงแม้ว่าจะสามารถนำเอาพลาสติกบางส่วนกลับมาใช้ใหม่ได้ และมีการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยแสงอาทิตย์ (photodegradable polymer) ซึ่งเป็นสารจำพวกแป้งเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ก็อาจลดปัญหาสภาวะแวดล้อมได้ไม่มากนัก (อรรถกร ปาละสุวรรณ, 2539) ทางแก้ไขที่ดีทางหนึ่ง คือ การนำพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable polymer) เช่น พลาสติกในกลุ่มของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates; PHAs) และพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพในกลุ่มอื่นๆ ที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ และสามารถหมุนเวียนทำให้เกิดความสมดุลในสิ่งแวดล้อมได้ (รูปที่ 1.1) โดยพลาสติกดังกล่าวมีคุณสมบัติทางกลและทางเคมีที่ดีเช่นเดียวกับพลาสติกสังเคราะห์

ทั้งนี้พอลิเมอร์ในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จะได้เปรียบกว่าพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่หลากหลาย และสามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติอย่างสมบูรณ์ โดยพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเป็นพอลิเอสเทอร์ที่มีกรดไฮดรอกซีอัลคาโนอิก เป็นโมโนเมอร์โดยประกอบกันเป็นพอลิเมอร์ได้มากกว่า 80 ชนิด (Lee, 1995) ชนิดที่สำคัญได้แก่ พอลิ(บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) [poly(β -hydroxybutyrate) ; PHB] และ พอลิ(บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-บีตา-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) ; PHBV] เป็นต้น



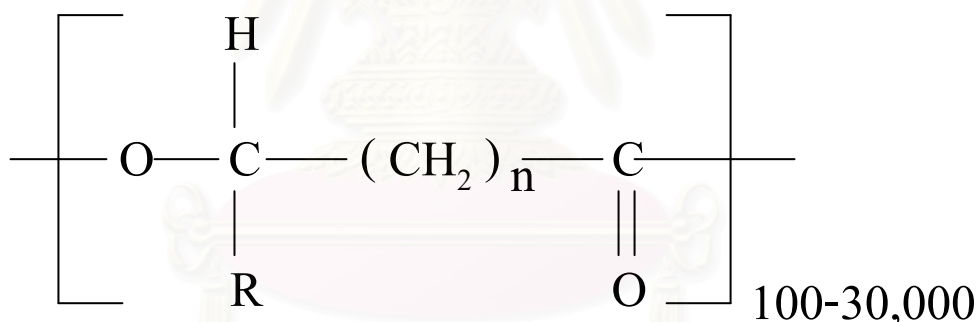
รูปที่ 1.1 วงจรของการใช้พลาสติกที่ย่อยสลายในธรรมชาติ (Lee , 1996)

พอลิ(บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) เป็นพอลิเมอร์ที่พบเป็นชนิดแรกในกลุ่ม PHAs โดย Lemoigne (1927) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและสังเกตการสร้าง PHB ของ *Bacillus* spp. โดยพบว่าการสะสม PHB ซึ่ง PHB เป็นโฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ 3-hydroxybutyric acid แต่เนื่องจาก PHB มีจุดหลอมเหลวประมาณ 160 ถึง 180 องศาเซลเซียส ทำให้ต้องใช้พลังงานสูงมากในการหลอม มีความแข็งและเปราะ PHB จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภท (อรรถกร ปาละสุวรรณ, 2539) จึงได้มีการพัฒนาการผลิต PHAs ชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะ PHAs ที่เป็นโคพอลิเมอร์ ซึ่งทำให้พลาสติกที่ได้มีคุณสมบัติที่หลากหลาย ตามอัตราส่วนโดยโมลของโมโนเมอร์ที่ประกอบเป็นโคพอลิเมอร์

พอลิ(บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-บีตาไฮดรอกซีวาเลอเรต) เป็นโคพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3-hydroxybutyric acid (3HB) และ 3-hydroxyvaleric acid (3HV) ซึ่งการประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิดจะทำให้มีคุณสมบัติที่ดีกว่า PHB กล่าวคือสามารถลดความเปราะ โดยสามารถเพิ่มความเหนียวและความต้านทานในแรงกระแทกเมื่ออัตราส่วนโดยโมลของ 3-hydroxybutyric acid ในโคพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น (Lee , 1995) นอกจากนี้ PHBV ยังสามารถลดอุณหภูมิหลอมตัว ทำให้สามารถผ่านกระบวนการแปรรูปที่อาศัยความร้อนได้ ทั้งนี้สามารถนำ PHBV ไปใช้ในลักษณะของฟิล์ม (film) ไฟเบอร์ (fibre) ชีต (sheet) หรือหล่อให้เป็นรูปทรงต่างๆได้ตามต้องการ ซึ่งทำให้ PHBVสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการแพทย์และเกษตรกรรมเช่นการผลิตเส้นเลือดและกระดูกเทียม ใช้เป็นวัสดุบรรจุหีบห่อในอุตสาหกรรมทั่วไป ทั้งนี้การที่พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพดัง

กล่าวสามารถย่อยสลายได้โดยอาศัยเอ็นไซม์ที่มีอยู่ในจุลินทรีย์ตามธรรมชาติโดยย่อยสลายให้กลายเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมคือ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และ กรดคาร์บอกซิลิก (อรรถกร ปาละสุวรรณ, 2539)

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการผลิตพอลิ(ปีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-ปีตา-ไฮดรอกซีวาลาเรต) โดยใช้จุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 จากกลูโคส และกรดโพธิโอนิก ที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) ในช่วง 4 ถึง 200 และร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโอนิกในช่วง 0 ถึง 200



n=1		Polymer
	R = hydrogen	Poly (3-hydroxypropionate)
	R = methyl	Poly (3-hydroxybutyrate)
	R = ethyl	Poly (3-hydroxyvalerate)
	R = propyl	Poly (3-hydroxyhexanoate)
	R = pentyl	Poly (3-hydroxyoctanoate)
n=2	R = hydrogen	Poly (4-hydroxybutyrate)
n=3	R = hydrogen	Poly (4-hydroxyvalerate)

รูปที่ 1.2 สูตรโครงสร้างทั่วไปของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Lee, 1995)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการผลิตพอลิ(บิตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-บิตา-ไฮดรอกซีวาลาเรต) โดยจุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 จากกลูโคสและกรดโพรพิโอนิกในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

ขอบเขตการวิจัย

ทำการหมักเพื่อผลิต PHBV โดยใช้จุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 จากกลูโคส และ กรดโพรพิโอนิกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) และอัตราส่วนโดยโมลของกรด โพรพิโอนิกที่มีผลต่อ

- อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ_t)
- อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (ρ_t)
- อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (V_t)
- ร้อยละโดยโมลของ บิตา-ไฮดรอกซีวาลาเรตในโคพอลิเมอร์ (%HV)
- ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสารอาหาร ($Y_{P/S}$)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้ออกแบบ และควบคุมการผลิต พอลิ(บิตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-บิตา-ไฮดรอกซีวาลาเรต)จากจุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 ในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง
2. เป็นทางเลือกหนึ่งในการลดปัญหาสิ่งแวดล้อม โดยการแทนที่พลาสติกสังเคราะห์ด้วยพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

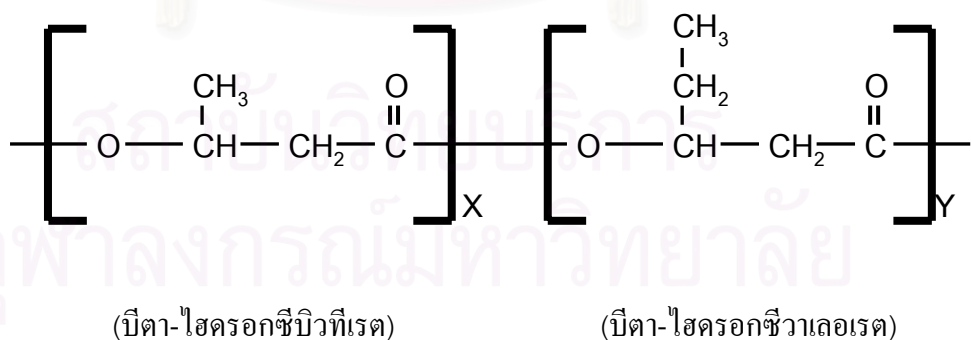
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความเป็นมาของพอลิ(บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-บีตา-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

2.1.1 คุณลักษณะ คุณสมบัติ และการนำไปใช้งานของ PHBV

PHBV ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1972 โดย Wallen และ Davis (Braunegg และคณะ, 1998) โดยทำการสกัดแยกจากตะกอนบำบัดน้ำเสีย (activated sludge) โดยพบว่าพอลิเอสเทอร์ที่ได้มีคุณสมบัติทางฟิสิกส์ และเคมีที่แตกต่างไปจาก PHB ที่มีความแข็ง เปราะ และต้องใช้พลังงานในการหลอมตัวสูง โดยจากการวิเคราะห์พบว่าโมโนเมอร์ภายในประกอบด้วย 3-hydroxyvaleric acid (3HV) และ 3-hydroxybutyric acid (3HB) เป็นหลัก PHBV มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีสูตรโครงสร้างทั่วไปดังนี้



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของพอลิ(บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-บีตา-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

PHBV เป็นพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติที่หลากหลาย โดยคุณสมบัติทางฟิสิกส์และทางเคมี จะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนโดยโมลของ บีตา-ไฮดรอกซีวาลเอเรตใน โคพอลิเมอร์ซึ่งสามารถแสดง ได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของ PHBV และพอลิเมอร์ในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตอื่นๆ

Polymers	Melting point (°C)	Young's modulus (GPa)	Tensile strength (Mpa)	Elongation to break (%)	Notched izod impact strength (J/m)
P(3HB)	179	3.5	40	5	50
P(3HB-co-3HV)					
3 mol% 3HV	170	2.9	38	- ^a	60
9 mol% 3HV	162	1.9	37	-	95
14 mol% 3HV	150	1.5	35	-	120
20 mol% 3HV	145	1.2	32	-	200
25 mol% 3HV	137	0.7	30	-	400
P(3HB-co-4HB)^b					
3 mol% 4HB	166	-	28	45	-
10 mol% 4HB	159	-	24	242	-
16 mol% 4HB	-	-	26	444	-
64 mol% 4HB	50	30	17	591	-
90 mol% 4HB	50	100	65	1080	-
P(4HB)^c	53	149	104	1000	-
P(3HHx-co-3HO)^d	61		10	300	-
Polypropylene	170	1.7	34.5	400	45
Polyethylene-terephthalate	262	2.2	56	7300	3400
Polystyrene	110	3.1	50	-	21

^aData not available

^bPoly(3-droxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)

^cPoly(4-hydroxybutyrate)

^dPoly(3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate)

ซึ่งคุณสมบัติที่หลากหลายของ PHBV ดังกล่าวจึงทำให้สามารถนำ PHBV มาใช้ได้
อย่างกว้างขวาง ทั้งนี้สามารถแบ่งกลุ่มของการนำ PHBV ไปใช้ประโยชน์ได้เป็น 2 กลุ่มคือ

1. ใช้เป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เช่น ด้านการเกษตรโดยนำไป
ขึ้นรูปเป็นวัสดุสำหรับทำหีบห่อ เช่น แผ่นฟิล์มพลาสติก ถุงใส่ของ ขวด และกล่องต่างๆ
นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ทำวัสดุห่อหุ้มสารเพื่อการเจริญเติบโต หรือ สารกำจัดศัตรูพืชที่
สามารถย่อยสลายได้ในดิน

2. การประยุกต์ด้านการแพทย์ เช่น การทำสารห่อหุ้มที่ย่อยสลายเพื่อค่อยๆปลดปล่อย
ยาที่บรรจุอยู่ภายในอย่างช้าๆ วัสดุทางการศัลยกรรมตกแต่ง สารโครงสร้างสำหรับใช้ทดแทน
กระดูก (bone plate) เป็นต้น

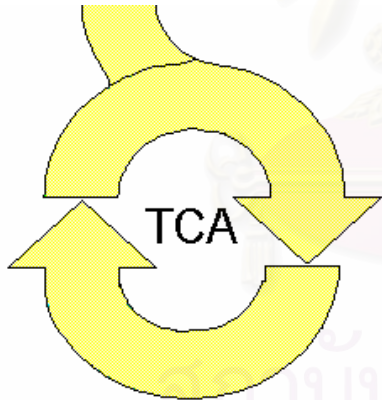
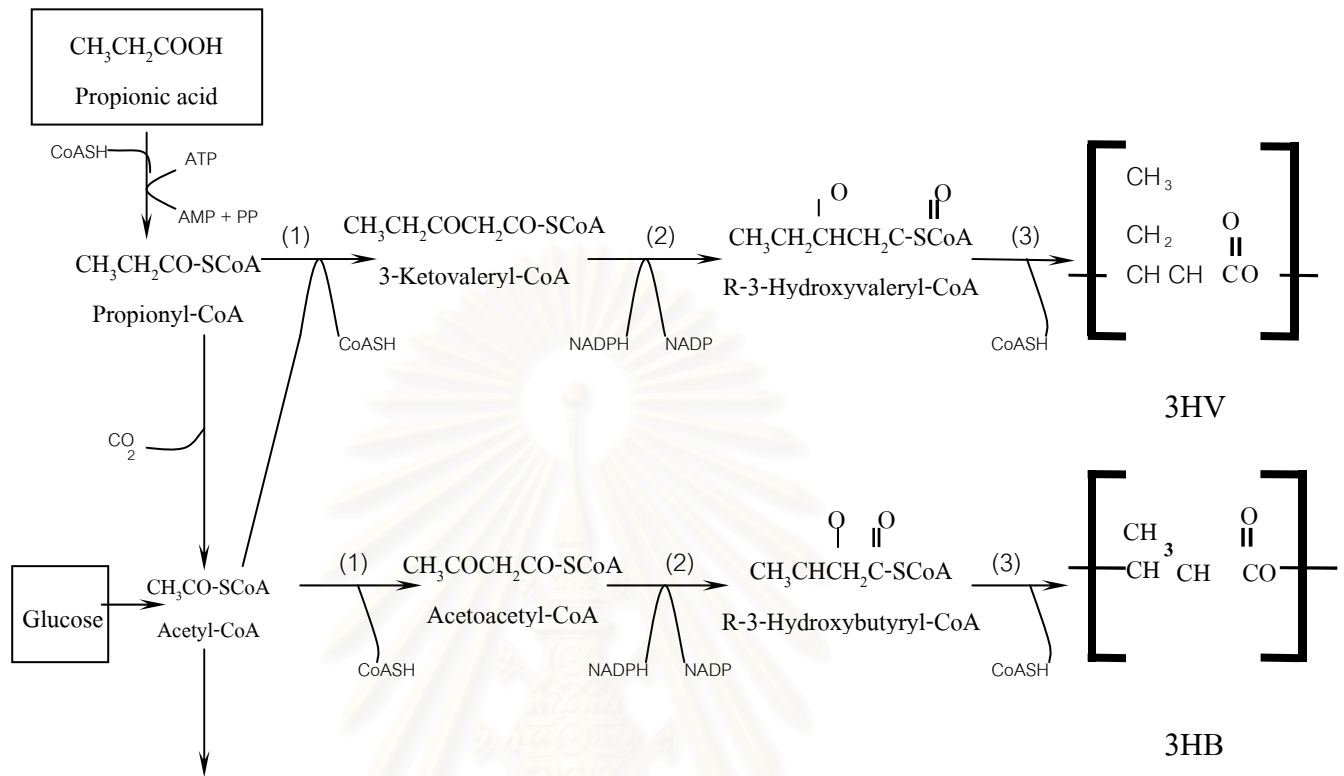
2.1.2 กลไกการสังเคราะห์ PHBV

การสะสม PHAs ใน *Alcaligenes eutrophus* และแบคทีเรียหลายชนิด จะเกิดขึ้น
เมื่อจุลินทรีย์ผ่านเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดแล้ว และภายใต้ภาวะที่สารอาหารไม่สมดุล ก็จะมี
แหล่งคาร์บอนมากเกินไป แต่มีปัจจัยจำกัดบางอย่าง เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส
แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ (Byrom, D., 1987) ซึ่งกลไกการสังเคราะห์ PHBV จากกลูโคส และ
กรดไพรูวิกอนิกแสดงได้ดังรูปที่ 2.2

บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต [(3HB)] จะถูกผลิตขึ้นจากอะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) ซึ่งได้
จากแหล่งคาร์บอนคือกลูโคส ทั้งนี้การเปลี่ยนอะซิติลโคเอไปเป็น 3HB จะอาศัยเอนไซม์ 3
ชนิดคือ 3-คีโตไซโอเลส (3-ketothiolase) อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (acetoacetyl-CoA
reductase) และ พีเอชเอซินเทส (PHA synthase) (Braunegg, และคณะ 1998) ซึ่งการ
สังเคราะห์จะเริ่ม

จากการควบแน่นอะซิติลโคเอ 2 โมเลกุลที่ได้จากกลูโคส เพื่อปลดปล่อยโคเอนไซม์เออิสระ (CoASH) ได้อะซีโอะซิติลโคเอ (acetoacetyl-CoA) ด้วยเอนไซม์ 3-ทีโตรีโอเลส ซึ่งอะซีโอะซิติลโคเอ จะถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์อะซีโอะซิติลโคเอรีดักเตส ได้เป็น อาร์-3-ไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอ (R-3-Hydroxybutyryl-CoA) ซึ่งอาร์-3-ไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอจะเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ด้วยเอนไซม์ พีเอชเอซินเทส จนได้เป็น 3HB สำหรับบีตา-ไฮดรอกซีวาลเอเรต [(3HV)] กระบวนการสังเคราะห์จะเริ่มจากจูลินทรีย์ทำการเปลี่ยนกรดโพรพิโอนิกให้เป็น โพรพิโอนิลโคเอ (Propionyl-CoA) โดยอาศัยโคเอนไซม์เออิสระ และโพรพิโอนิลโคเอ 1 โมเลกุลจะควบแน่นกับอะซิติลโคเอ 1 โมเลกุล ด้วยเอนไซม์ 3-ทีโตรีโอเลส ไปเป็น 3-ทีโรวาลเอเรตโคเอ (3-ketovaleryl-CoA) ซึ่ง 3-ทีโรวาลเอเรตโคเอ จะถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์อะซีโอะซิติลโคเอรีดักเตส ได้เป็น อาร์-3-ไฮดรอกซีวาลเอเรตโคเอ (R-3-Hydroxyvaleryl-CoA) ซึ่ง อาร์-3-ไฮดรอกซีวาลเอเรตโคเอจะเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ด้วยเอนไซม์ พีเอชเอซินเทส จนได้เป็น 3HV

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



หมายเหตุ

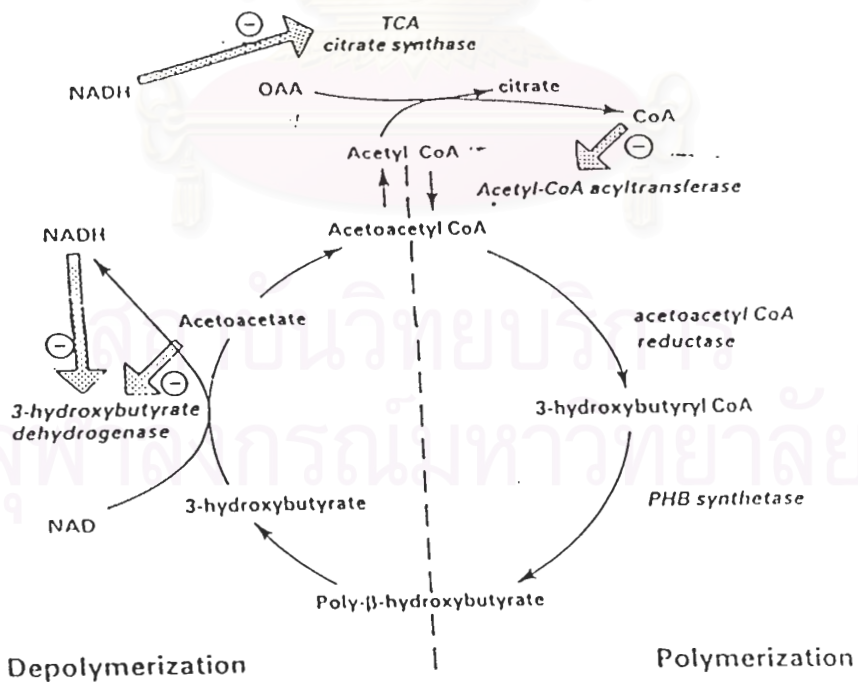
- (1) 3-คีโตไซโอเลส (3-ketothiolase)
- (2) อะซิโตอะซิลโคเอรีดักเตส (Acetoacetyl-CoA reductase)
- (3) พีเอชเอซินเทส (PHA synthase)

รูปที่ 2.2 กลไกการสังเคราะห์ PHBV จากกลูโคสและกรดโพรพิโอนิก

(Braunegg และคณะ 1998)

ในกรณีที่จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีสารอาหารต่างๆสมดุลกัน อะซิติลโคเอนไซม์จะผ่านเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (Kreb's or tricarboxylic acid cycle or TCA cycle) เพื่อสร้างพลังงานและสังเคราะห์กรดอะมิโน ซึ่งการที่ความเข้มข้นของโคเอนไซม์เออิสระสูงนี้จะเป็นผลให้การสังเคราะห์ PHA ถูกยับยั้งไปด้วย

Byrom (1987) ศึกษาการย่อยสลายของ PHB โดยพบว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโซ่พอลิเมอร์ ดังรูป 2.3 ซึ่งแสดงการสังเคราะห์และการย่อยสลาย PHB ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป โดยพบว่าเอนไซม์ 3-คีโตไฮโอเรส จะถูกยับยั้งด้วยโคเอนไซม์เออิสระ (free coenzyme A) ที่มีความเข้มข้นสูงภายใต้การสมดุลกับ CoASH ทำให้การสร้าง PHB ถูกยับยั้ง ซึ่งกระบวนการสร้างและสลาย PHA พบว่าจะเชื่อมโยงกับวัฏจักรเครปส์ในเซลล์จุลินทรีย์ทั่วไป



รูปที่ 2.3 วัฏจักรการสังเคราะห์และการสลาย PHB (Byrom, 1987)

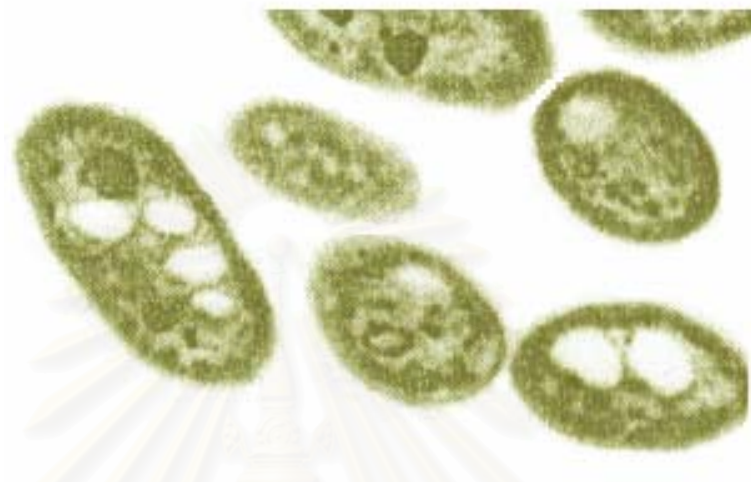
2.1.3 เชื้อจุลินทรีย์และสารอาหาร

มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสร้างและสะสม PHAs ได้ โดยจะพบ PHAs ในลักษณะของเกรนูล (granule) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2 ถึง 0.5 ไมโครเมตร (Lee,1996) ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ (รูปที่ 2.3) โดยจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างและสะสม PHAs สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 2.2

สำหรับอาหารที่จุลินทรีย์ใช้ในการผลิต PHAs มีหลายชนิด เช่น เมทานอล ก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์โบไฮเดรต กรดอินทรีย์และเอทานอลซึ่งชนิดของสารอาหารโดยทั่วไปจะเป็นตัวกำหนดชนิดของโมโนเมอร์ในPHAs(Doi,1990) ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สร้างและสะสม PHAs (Byrom, 1987)

<i>Alcaligenes</i>	<i>Methylobacterium</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Bergerinckia</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Rhodospillum</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Dexia</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Hemophilus</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Lampropaedia</i>	<i>Zoogloea</i>



รูปที่ 2.4 ภาพตัดขวางของเซลล์ *A.eutrophus* จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดง PHB

แกรนูลภายในเซลล์ (Doi,Y., 1990)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 ปริมาณการสะสมและองค์ประกอบในโคพอลิเมอร์ของ PHAs ในจุลินทรีย์

P. oleovorans เมื่อใช้สารอาหารต่างๆกัน (Doi, Y.,1990)

Substrate	PHA Content (wt%)	PHA Composition (mol% of 3HA Unit)						
		C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
3-Hydroxybutyrate	1.2	-	-	22	-	57	-	21
Butyrate	0.6	-	-	-	-	33	-	67
Pentanoate	0.7	95	-	-	-	35	-	65
Hexanoate	3.3	-	100	5	-	-	-	-
Heptanoate	2.3	8	-	-	-	-	-	-
Octanoate	8.7	-	35	91	65	1	-	-
Nonanoate	9.1	8	-	-	-	-	-	-
Decanoate	12.5	-	28	75	59	17	-	-
Undecanoate	9.8	6	-	-	-	-	13	-
Dodecanoate	6.6	-	32	57	48	32	-	5
Tridecanoate	5.4	7	-	-	-	5	14	-
Tetradecanoate	10.6	-	32	59	47	30	-	4
Pentadecanoate	5.3	8	-	-	-	8	13	-
Hexadecanoate	3.4	-	-	50	-	30	-	12
Heptadecanoate	No growth							
Octadecanoate	No growth							
Hexane	2	100	-	-	-	-	-	-
Heptane	11.4	-	100	-	-	-	-	-
Octane	25.3	11	-	89	-	-	-	-
Nonane	24.3	-	37	-	63	-	-	-
Decane	21.9	10	-	66	-	24	-	-
Undecane	14.3	-	23	-	63	-	14	-
Dodecane	5.8	2	-	31	-	36	-	31

ตารางที่ 2.4 สรุปการผลิต PHA จากเชื้อจุลินทรีย์และสารอาหารชนิดต่างๆ

ชนิดของเชื้อ จุลินทรีย์	PHA	วิธีการผลิต	สารอาหาร	เวลาที่ใช้ในการ ผลิต (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของ เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ PHA (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHA (%)	อัตราผลผลิต (กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง)	เอกสารอ้างอิง
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Fed batch	Glucose + Pentanoic acid	48	9.8	6.4	65	0.13	Doi , (1990)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Glucose control fed batch	Glucose	49	124	92	74	1.87	Kim และคณะ, (1994)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Glucose control fed batch	Glucose	50	164	121	76	2.42	Kim และคณะ, (1994)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Recycled gas Culture system	CO ₂ /H ₂	40	85	61.5	72	1.54	Ishizaki และ Tanaka, (1992)*
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Two-stage continuous	CO ₂ /H ₂	-	-	20	-	0.9	Ishizaki และ Tanaka, (1992)*
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Fed batch	Ethanol	50	63.5	47	74	0.94	Alderete และคณะ ,(1993)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB-co-3HV)	Glucose control fed batch	Glucose + Propionic acid	46	158	117	74	2.55	Kim และคณะ, (1994)

* ข้อมูลจาก Lee, S. Y., 1996

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	PHA	วิธีการผลิต	สารอาหาร	เวลาที่ใช้ในการผลิต (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ PHA (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHA (%)	อัตราผลผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	เอกสารอ้างอิง
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB-co-3HV)	Glucose control fed batch	Glucose + Propionic acid	39	113	64	56.5	1.64	Kim และคณะ, (1994)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Batch	CO ₂ , H ₂ , O ₂	40	91.3	61.9	67.6	1.55	Tanaka และ Ishizaki (1995) *
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Fed Batch	กลูโคส	74	281	232	80	3.14	Ryu และคณะ (1997) *
<i>Alcaligenes latus</i>	P(3HB)	Fed Batch	Sucrose	D=0.16 h ⁻¹	-	162	-	2.6	Yamane (1996)
<i>Alcaligenes latus</i>	P(3HB-co-3HV)	One-Stage Continuous	Sucrose + Propionic acid	D=0.15 h ⁻¹	4.65	2	43	0.3	Ramsay และคณะ (1990)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	P(3HB)	Glucose control fed batch	Glucose + Fish peptone	47	40.1	32	79.8	0.68	Page (1993)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	P(3HB-co-3HV)	Fed batch	Beet molasses+ Pentanoic acid	-	-	19-22	59-71	-	Page (1992)

* ข้อมูลจาก Lee, S. Y., 1996

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	PHA	วิธีการผลิต	สารอาหาร	เวลาที่ใช้ในการผลิต (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ PHA (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHA (%)	อัตราผลผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	เอกสารอ้างอิง
<i>Haloferax Mediterrani</i>	P(3HB-co-3HV)	Continuous	Starch	D=0.02 h ⁻¹	-	1.5	-	0.03	Garcia และ Rodriguez (1990) *
<i>Klebsiella Aerogenes</i>	P(3HB)	Fed batch	Molasses	32	37	24	65	0.75	Zhang และคณะ (1994) *
<i>Paracoccus denitrificans</i>	P(3HB-co-3HV)	Fed batch	Methanol + n-amyl alcohol	120	9	2.34	26	0.02	Ueda และคณะ (1992) *
<i>Protomonas extorquens</i>	P(3HB)	Fully automatic Fed batch	Methanol	121	223	136	61	1.12	Suzuki และคณะ (1986)
<i>Recombinant Escherichia-Coli</i>	P(3HB)	Fed batch	molasse	-	-	-	80	4	Lee, (1999)

* ข้อมูลจาก Lee, S. Y., 1996

2.2 การพัฒนากระบวนการหมัก

ส่วนใหญ่กระบวนการผลิต PHAs สามารถแบ่งออกได้เป็นสองขั้นตอนใหญ่ คือ การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้มีปริมาณและการสะสม PHAs มากจนเพียงพอ จากนั้นนำเข้าสู่ขั้นตอนที่สองคือการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิต PHBV มีหลายวิธีคือ

2.2.1 การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

Senior และคณะ (1972) ได้ศึกษาการผลิต PHB ด้วย *Azotobacter beijerinckii* ในการเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่าเมื่อใช้สารเริ่มต้นที่มีกลูโคสเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v) จะเกิดการสะสม PHB ในช่วงปลายของระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ โดยจุลินทรีย์สามารถสะสม PHB ได้ถึงร้อยละ 35 ของน้ำหนักเซลล์แห้งภายในเวลา 22 ชั่วโมง หลังจากนั้นกลูโคสจะถูกใช้หมดไปและปริมาณ PHB ที่ถูกสะสมอยู่จะลดลงเหลือเพียงร้อยละ 17.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์สามารถใช้ PHB ที่เป็นแหล่งพลังงานสำรองเพื่อยังชีพได้

Doi และคณะ (1988) ได้ทำการศึกษาการผลิต PHBV จากกรดบิวทีริก และกรดเพนทาโนอิก ด้วย *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 ในการเพาะเลี้ยงโดยปราศจากแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่โดยพบว่าร้อยละ โดยน้ำหนักของกรดเพนทาโนอิก จะมีผลต่อร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ โดยที่เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรดบิวทีริกเพียงอย่างเดียวพบว่าจะได้ไฮโมพอลิเมอร์ของ 3HB แต่เพียงอย่างเดียว แต่เมื่อร้อยละโดยน้ำหนักของกรดเพนทาโนอิกเป็น 50

จะได้ร้อยละ โดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์เป็น 26 และเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรดเพนทาโนอิกเพียงอย่างเดียวพบว่าได้ร้อยละ โดยโมลของ 3HV สูงถึงร้อยละ 85 ทั้งนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 3 ถึง 10 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยงด้วยกรดบิวทีริก หรือ กลูโคส ที่มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร จะพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยกรดบิวทีริกพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะปราศจากไนโตรเจนจะได้ PHB 4 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไนโตรเจนเป็น 0.5 กรัมต่อลิตรจะได้ PHB เป็น 5 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไนโตรเจนสูงกว่า 0.5 กรัมต่อลิตรพบว่าจะได้ PHB ลดลงจนมีค่าคงที่ที่ 2.5 กรัมต่อลิตรเมื่อความเข้มข้นของไนโตรเจนสูงกว่า 4 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคสเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะปราศจากไนโตรเจนจะได้ PHB สูงสุดเป็น 5 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อมีไนโตรเจนจะได้ PHB ลดลงจนไม่มีการผลิต PHB เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตสูงกว่า 3 กรัมต่อลิตร

Lee และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และการสะสม PHB ของ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 ในการเพาะเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่าเมื่ออัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่าง ๆ กัน มีผลให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลดลง แต่เซลล์สามารถสะสม PHB ได้มากขึ้น และที่อัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 32.8 เซลล์จะสามารถสะสม PHB ได้สูงถึงร้อยละ 90 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 32 ชั่วโมง

2.2.2 การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

Suzuki และคณะ (1986) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Pseudomonas* sp. โดยใช้เมทานอลในสภาวะที่มีการจำกัดไนโตรเจน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยเมทานอลในช่วง 0.1 ถึง 20 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยเมทานอล 0.5 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นของเมทานอลเพิ่มขึ้นอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจะมีแนวโน้มลดลง

Kim และคณะ (1991) ศึกษาการผลิต PHB และ PHBV จาก *R. eutropha* ด้วยกลูโคสที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10 ถึง 20 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 50 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตเซลล์ได้ 164 กรัมต่อลิตร โดยมี PHB เป็นร้อยละ 76 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ด้วยอัตราการผลิต PHB เป็น 2.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Kim และคณะ (1994) ศึกษาการผลิต PHBV จาก *R. eutropha* ด้วยวิธีการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องโดยควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสและกรดโพรพิโอนิก พบว่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์จะเพิ่มขึ้นจาก 4.3 เป็น 14.3 เมื่ออัตราส่วนโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่อกลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 0.17 เป็น 0.52 โมลโพรพิโอนิกต่อโมลกลูโคส แต่อัตราการผลิต PHBV ลดลงจาก 2.55 เป็น 1.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ต่อกรดโพรพิโอนิกลดลงจาก 0.33 เป็น 0.28 โมล 3HV ในโคพอลิเมอร์ต่อโมลกรดโพรพิโอนิก

Koyama และ Doi (1993) ศึกษาการผลิต PHBV จาก *Alcaligenes eutrophus* จากกรดบิวทีริก และกรดเพนทานอิก ในสภาวะที่มีอัตราส่วนโดยโมลคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 40 พบว่าที่เวลา

ในการเพาะเลี้ยง 30 ชั่วโมง สามารถผลิต PHBV ได้ 13.5 กรัมต่อลิตร ที่ร้อยละโดยโมล 3HV เป็น 27 โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงโดยการลดค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน จะพบว่าเป็นการยับยั้งการผลิตพอลิเมอร์ แต่กลับทำให้ได้ร้อยละ 3HV ในโคพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น

Ramsay, B, A., และคณะ (1990) ศึกษาการผลิต PHBV ด้วย *Alcaligenes eutrophus* ATCC 29714 ในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่องขึ้นตอนเดียว ในสภาวะที่มีการจำกัดสารอาหารด้วยไนโตรเจน โดยควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสในถังหมักให้อยู่ระหว่าง 5 ถึง 16 กรัมต่อลิตรด้วยการเติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 50 % W/V พบว่าสามารถผลิต PHB ได้ 24 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิต PHB สูงสุด 2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการผลิต PHB จำเพาะเป็น 0.14 ต่อชั่วโมง และเมื่อทำการเติมด้วยสารละลายกรดโพรฟิโอนิกเข้มข้น 1.8 % W/V และสารละลายกลูโคสเข้มข้น 13.2 % W/V โดยต้องป้อนสารละลายกรดโพรฟิโอนิกให้มีความเข้มข้นน้อยกว่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่าสามารถผลิต PHBV ได้ 17 กรัมต่อลิตร ได้ร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์เป็น 5 และอัตราการผลิต PHBV เป็น 0.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้อัตราการผลิต PHBV จำเพาะเป็น 0.05 ต่อชั่วโมง โดยผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรฟิโอนิกมีค่าเป็น 0.1 กรัม 3HV ต่อกรัมกรดโพรฟิโอนิก

Braunegg และคณะ (1995) ศึกษาการผลิต PHBV ด้วย *Alcaligenes latus* ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ด้วยกลูโคสและโพรฟิโอนेट พบว่าภายในเวลาการหมัก 33.75 ชั่วโมง สามารถผลิต PHBV ได้ 6.6 กรัม คิดเป็นร้อยละ 72 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์เป็น 28

Lee และคณะ (1994) ศึกษาการผลิต PHBV ด้วย *A. eutrophus* NCIMB11599 ด้วยโพรพิโอเนต และ กลูโคส และศึกษาอัตราการปลดปล่อยไพรูเวทในจุลินทรีย์ *A. eutrophus* NCIMB11599 ที่ความเข้มข้นของกลูโคสและโพรพิโอเนตต่างกัน พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโพรพิโอเนตมีค่าสูงขึ้น จุลินทรีย์จะปลดปล่อยไพรูเวทเพิ่มขึ้น ทำให้ผลได้ของPHBV ต่อโพรพิโอเนตจะลดลง โดยที่เมื่อความเข้มข้นของโพรพิโอเนตคงที่ ปริมาณร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์จะลดลงจาก 26 เป็น 15 เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสขึ้น แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* NCIMB11599 ด้วยโพรพิโอเนตเพียงอย่างเดียวจะพบว่าจุลินทรีย์จะสะสมพอลิเมอร์ในรูป 3HB มากกว่า 3HV เนื่องจากโพรพิโอนิลโคเอ จะเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) โดยเปลี่ยนไปเป็น อะซีทิลโคเอ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต 3HB

Lee และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์อะซิลโคเอซินเทส (Acyl-CoA syntase) ในการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* NCIMB11599 ด้วยโพรพิโอเนต และ วาเลอเรต พบว่าสำหรับการเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคสร่วมกับโพรพิโอเนตนั้นเมื่อความเข้มข้นของโพรพิโอเนตสูงจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์อะซิลโคเอซินเทส จะมีค่าเพิ่มขึ้น และเนื่องจาก 3-คีโตไซโอเรสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการควบแน่นของโพรพิโอนิลโคเอ กับอะซีทิลโคเอ และอะซีติลโคเอ 2 โมเลกุล ให้เป็น 3-คีโตวาลาริลโคเอ และ อะซีโตอะซีติลโคเอ ตามลำดับ จะมีความจำเพาะเจาะจงกับอะซีติลโคเอมากกว่าโพรพิโอนิลโคเอด้วยเหตุนี้โพรพิโอนิลจึงพร้อมที่จะเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันเพื่อกลายเป็นอะซีติลโคเอในขณะที่วาลาเรตนั้นเมื่อทำปฏิกิริยาจนได้วาลาริลโคเอแล้วจะสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อเป็น3-คีโตเพนตะโน

อิลโคเอ (3-ketopentanoyl-CoA) โดยผ่านเอนไซม์โคเอดีไฮโดรจีเนส (Acyl-CoA dehydrogenase) โดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ 3-คีโตไซโอเลส จึงทำให้อัตราโดยโมลของ 3HV เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ในวาลูเอเรตจึงมีค่าสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในโพพีโอเนต

Shimizu, H., และคณะ (1998) ได้ศึกษาการผลิต PHBV ด้วย *A. eutrophus* H16 (ATCC17699) ด้วยกรดบิวทิริก และ กรดวาลาริกในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยศึกษาผลของ อัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) และ อัตราโดยโมลของกรดวาลาริก พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะลดลงเมื่อ อัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้น และพบว่าเมื่อ C/N น้อยกว่า 20 ค่าอัตราการผลิต PHBV จำเพาะ ผลได้ของ PHBV ต่อสารอาหาร จะมีค่าลดลงเนื่องจากกรดอินทรีย์ถูกใช้ในการผลิตเซลล์และพลังงาน แต่เมื่อ C/N ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ($20 \leq C/N \leq 200$) พบว่าค่าอัตราการผลิต PHBV จำเพาะ ผลได้ของ PHBV ต่อสารอาหาร จะมีค่าเพิ่มขึ้น โดยพบว่า C/N ที่เหมาะสมที่สุดคือ 75 และเมื่อ $C/N > 75$ ค่าผลได้ของ PHBV ต่อสารอาหารจะเพิ่มขึ้น แต่ค่าอัตราการผลิต PHBV จะลดลง เนื่องจากประสิทธิภาพของเอนไซม์ต่างๆในกระบวนการบีตาออกซิเดชัน (β -Oxidation) และในกระบวนการผลิต PHAs จะลดลงเมื่อมีการขาดแหล่งไนโตรเจน

2.2.3 การหมักแบบต่อเนื่อง

Ramsay, B, A., และคณะ (1990) ศึกษาการผลิต PHBV ในถังหมักแบบต่อเนื่องขึ้น

ตอนเดียวของจุลินทรีย์ *A.latus* ATCC29714 ด้วยซูโครสและกรดโพรพิโอนิก ด้วยอัตราเจือจาง (dilution rate) เป็น 0.15 ต่อชั่วโมง พบว่าเมื่อป้อนสารอาหารด้วยกลูโคสเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวพบว่าเซลล์จะสะสม PHB เป็นร้อยละ 40 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ

24

เมื่อป้อนสารอาหารด้วยกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรร่วมกับกรดโพรพิโอนิกตั้งแต่ 0 ถึง 5 กรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์จะสะสม PHBV โดยมีร้อยละโดยโมลของ 3HV ตั้งแต่ 0 ถึง 20

Koyama และ Doi (1995) ศึกษาการผลิต PHBV ด้วยจุลินทรีย์ *R.eutropha* จากฟรุกโตส และกรดเพนทาโนอิก ที่อัตราเจือจางและความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในกระแสน้ำวนต่างกัน พบว่าอัตราการผลิต PHBV สูงสุดเป็น 0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยร้อยละของ 3HV ในโพลิเมอร์สามารถเพิ่มได้ถึงร้อยละ 41 และเซลล์สามารถสะสมโพลิเมอร์ได้ถึงร้อยละ 42 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

สำหรับในงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาอิทธิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกที่มีต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโต และการผลิต PHBV ด้วย *A.eutrophus* NCIMB11599 โดยอาศัยหลักการออกแบบการทดลอง โดยงานวิจัยนี้มีจุดเด่นคือผลการทดลองที่ได้จะแสดงในรูปแบบการความสัมพันธ์ระหว่างค่าตัวแปรที่สนใจ (ค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิก) กับค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโต และการผลิต PHBV ซึ่งขอบเขตของค่าตัวแปรที่สนใจคือค่า C/N ระหว่าง 4 ถึง 200 และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกระหว่าง 0 ถึง 100 ทั้งนี้สมการที่ได้จะถูกตรวจสอบความเชื่อมั่นของสมการโดยอาศัยหลักทางสถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA analysis) เพื่อหาว่าสมการความสัมพันธ์ที่ได้จะมีความน่าเชื่อมั่นมากน้อยเพียงใด

บทที่ 3

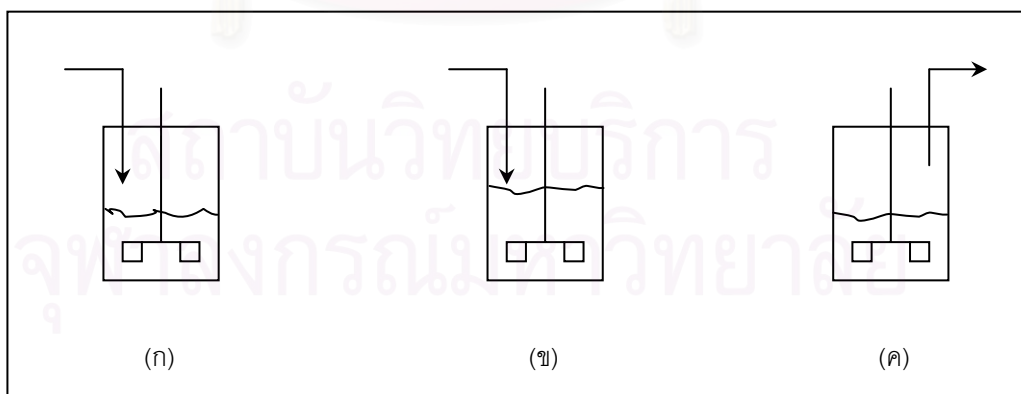
ทฤษฎี

3. การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

3.1 ลักษณะโดยทั่วไป

วิธีการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารเข้าสู่ถังหมักในระหว่างกระบวนการหมัก โดยไม่มีการดึงเอาของเหลวภายในถังหมักออกไปทำให้ปริมาตรของเหลวในถังหมักเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (ดังรูปที่ 3.1) การหมักแบบกึ่งต่อเนื่องนี้เป็นวิธีการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการหมักในกรณีต่างๆดังต่อไปนี้คือ

1. กรณีที่มีสภาวะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จากสารอาหารที่มีความเข้มข้นสูงโดยควบคุมอัตราการเติมสารอาหารที่จะทำให้การเพาะเลี้ยงอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตหรือผลิตภัณฑ์ตลอดเวลา เช่นการใช้เมทานอล หรือเอทานอลเป็นสารอาหารซึ่งเมื่อใช้สารอาหารในปริมาณสูงจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตช้าลงจึงจำเป็นต้องค่อยๆป้อนสารเข้าสู่ถัง



รูปที่ 3.1 กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (ก) เริ่มต้นการหมัก (ข) ระหว่างการหมัก

จะมีการเติมสารอาหาร (ค) สิ้นสุดการหมัก (Michael, L. S., 1992)

หมักอย่างช้าๆ เพื่อป้องกันมิให้มีการสะสมของปริมาณสารอาหารเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่ยับยั้งการเจริญเติบโต (สาโรจน์ ศิริคັນสนียกุล และคณะ, 2544)

2. กรณีที่เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาย่อยสลายสารอาหาร (catabolic repression)

เนื่องจากการใช้สารอาหารที่ย่อยสลายได้ง่ายกว่า เช่น มีกลูโคสอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง จะมีผลให้เกิดการหยุดการสร้างเอนไซม์หลายชนิดขึ้น

3. กรณีที่ต้องการลดความหนืดของอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งเกิดจากการผลิตผลิตภัณฑ์ เช่น ในกระบวนการผลิต เดกซ์แทรน (dextran) หรือแซนแทนกัม (Xanthan gum) เป็นต้น

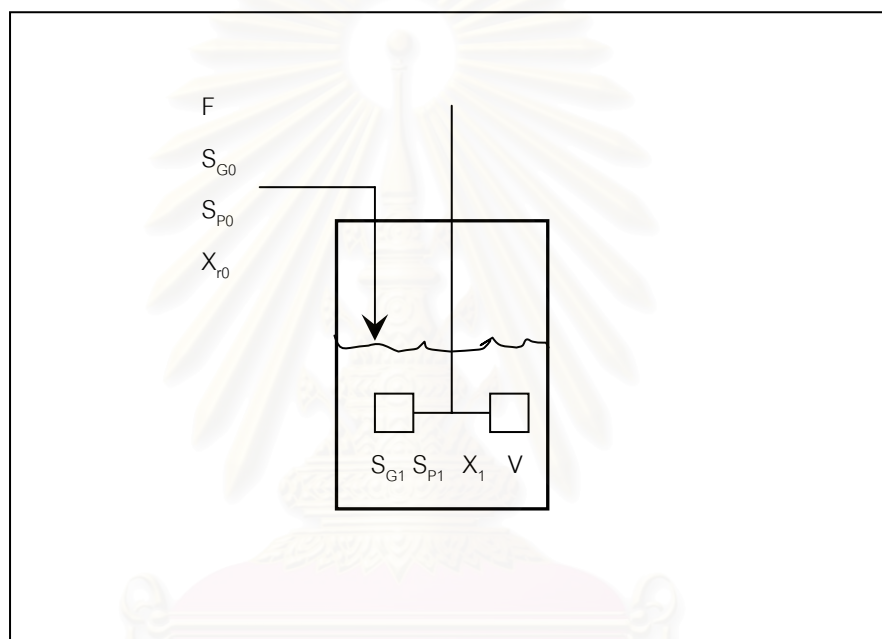
การหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเมื่อแบ่งตามการควบคุมการเพาะเลี้ยงแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ (สาโรจน์ ศิริคັນสนียกุล และคณะ, 2544)

1. การควบคุมแบบย้อนกลับ (feedback control) เป็นการควบคุมอัตราการเติมสารอาหารด้วยระบบอัตโนมัติ ซึ่งอาจเป็นการควบคุมด้วยการวัดความเข้มข้นของสารอาหารโดยตรง หรือเป็นการควบคุมทางอ้อมโดยอาศัยตัวแปรของระบบต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตและการใช้สารอาหาร เช่น ปริมาณออกซิเจนละลาย (DO) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นต้น

2. การควบคุมแบบธรรมดา (without feed back control) อาจเป็นการเติมสารอาหารแบบอัตราคงที่ (constant rate) เติมอาหารเป็นระยะ (intermittent addition) หรือเติมด้วยอัตราแบบเอกซ์โปเนนเชียล (exponential rate) เป็นต้น

3.2 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

กำหนดให้ถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการผสมกันอย่างสมบูรณ์ และมีการป้อนสารอาหารแบบเติมสารอาหารเป็นระยะ โดยไม่มีการดึงน้ำหมักออกระหว่างการเพาะเลี้ยง ยกเว้นการดึงน้ำหมักออกเพื่อการเก็บตัวอย่างเท่านั้น



รูปที่ 3.2 กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

สมการสมดุลเชิงชีวมวล (biomass)

$$\begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{เปลี่ยนแปลง} \\ \text{ของเซลล์} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{เจริญเติบโต} \\ \text{ของเซลล์} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{เข้าของ} \\ \text{เซลล์} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{ออกของ} \\ \text{เซลล์} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{ตายของ} \\ \text{เซลล์} \end{bmatrix}$$

$$\frac{d(X_r V)}{dt} = \mu X_r V + F X_{rf} - F_{out} X_{ro} - \gamma X_{ro} \quad (3.1)$$

โดยมีสมมติฐานดังนี้

1. อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มากกว่าอัตราการตายของเซลล์ ($\mu >> \gamma$) ดังนั้นสามารถละเลยพจน์สุดท้ายของสมการ (3.1) ได้
2. ไม่มีการถ่ายของเหลวออกจากถังหมัก ($F_{out} = 0$)
3. ไม่มีเซลล์ในกระแสป้อน

จะได้

$$\frac{d(X_r V)}{dt} = \mu X_r V \quad (3.2)$$

สมการสมดุลเชิงสารอาหาร (nutrient)

$$\begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{เปลี่ยนแปลง} \\ \text{ของสารอาหาร} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{ใช้} \\ \text{สารอาหาร} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{เข้าของ} \\ \text{สารอาหาร} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{ออกของ} \\ \text{สารอาหาร} \end{bmatrix}$$

$$\frac{d(S_i V)}{dt} = - \left[\frac{\mu V X_r}{Y_{X/S_i}} + m V X_r + v_i X_r V \right] + F S_{i1} - F_{out} S_{i2} \quad (3.3)$$

โดยมีสมมติฐานดังนี้

1. อัตราการใช้สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และเพื่อยังชีพน้อยมากเมื่อเทียบกับอัตราการใช้สารอาหารเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์
2. ไม่มีการถ่ายของเหลวออกจากถังหมัก ($F_{out} = 0$)

สมการสมดุลเชิงผลิตภัณฑ์

$$\begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{เปลี่ยนแปลง} \\ \text{ผลิตภัณฑ์} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{สร้าง} \\ \text{ผลิตภัณฑ์} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{เข้าของ} \\ \text{ผลิตภัณฑ์} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{ออกของ} \\ \text{ผลิตภัณฑ์} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{สลายของ} \\ \text{ผลิตภัณฑ์} \end{bmatrix}$$

$$\frac{d(PV)}{dt} = \rho_P V X_r + Y_{P/X} F X_{rf} - Y_{P/X} F_{out} X_{ro} - Y_{P/X} \gamma V X_{ro} \quad (3.4)$$

โดยมีสมมติฐาน

1. ในระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ มีการสร้างผลิตภัณฑ์มากกว่าการย่อยสลายผลิตภัณฑ์
ดังนั้นสามารถละเลยพจน์สุดท้ายของสมการ (3.4) ได้
2. ไม่มีการเข้าของผลิตภัณฑ์
3. ไม่มีการถ่ายของเหลวออกจากถังหมัก ($F_{out} = 0$)

จะได้

$$\frac{d(PV)}{dt} = \rho_P X_r V \quad (3.5)$$

สมการสมดุลเชิงปริมาตร (volume)

$$\begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{เปลี่ยนแปลง} \\ \text{ปริมาตร} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{เติม} \\ \text{สารอาหาร} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{เติม} \\ \text{กรด-เบส} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \text{อัตราการเติม} \\ \text{สารป้องกัน} \\ \text{การเกิดฟอง} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \text{อัตราการ} \\ \text{ระเหยของ} \\ \text{น้ำหมัก} \end{bmatrix}$$

$$\frac{dV}{dt} = F + F_{\text{acid-base}} + F_{\text{antifoam}} - F_{\text{evap}} \quad (3.6)$$

โดยมีสมมติฐาน

1. อัตราการเติม กรด-เบส อัตราการเติมสารป้องกันการเกิดฟอง และอัตราการระเหยของน้ำหมักน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเติมอาหาร ดังนั้นสามารถละเลยพจน์ที่ 2 ถึง 4 ของสมการ (3.6) ได้

จะได้

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (3.7)$$

บทที่ 4

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

4.1 อุปกรณ์

1. หม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น AMA240S ของบริษัท Astell ,Germany.
2. ตู้ถ่ายเชื้อแบบไหลราบเรียบ(Laminarflow) รุ่น VS-124 ของบริษัท ISSCO, USA.
3. ถังหมักขนาด 2 ลิตรรุ่นBiostat[®] EDของ บริษัท B.Braun BiotechInternation, Germany.
4. ปั๊มรีด (Peristaltic pump) รุ่น Watson-Marlow 505U ของบริษัทWatson-Marlow Limited, England.
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง(pHmeter) รุ่น MP220 ของบริษัทMettlerToledo, Switzerland
6. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography) รุ่น 1022 ของบริษัท Perkin Elmer, U.S.A.
7. คอลัมน์แก๊สโครมาโตกราฟี แบบ Packed column ชนิด Carbowax 20M
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Instruments, USA.
9. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Immufuge II ของบริษัท Baxter, U.S.A.
10. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Orbital shaker ของบริษัท Stuart scientific, U.K.

11. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Shel Lab 1265 ของบริษัท Sheldon,
U.S.A.
12. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Hot Air Oven) รุ่น ULM 500 บริษัท Memmert,
Germany.

4.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดซัลฟิวริก [H_2SO_4] ของบริษัท Merck, Germany.⁽¹⁾
2. กรดไดไนโตรซาลิไซลิก [$C_7H_4N_2O_7$] ของบริษัท Fluka, Switzerland.⁽¹⁾
3. กรดไฮโดรคลอริก 35.4% [HCl] ของบริษัท Merck, Germany.⁽¹⁾
4. กลูโคส [$C_6H_{12}O_6$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.⁽²⁾
5. คลอโรฟอร์ม [$CHCl_3$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.⁽¹⁾
6. คอปเปอร์ซัลเฟต [$CuSO_4 \cdot 5H_2O$] ของบริษัท Carloerba, Italy.⁽²⁾
7. แคลเซียมคลอไรด์ [$CaCl_2 \cdot 5H_2O$] ของบริษัท Merck, Germany.⁽²⁾
8. ซิงค์ซัลเฟต [$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.⁽²⁾
9. โซเดียมเตตราโบเรต [$Na_2B_4O_7 \cdot 7H_2O$] ของบริษัท AJAXCHEMICAL, Australia.⁽²⁾
10. โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ [Sodium nitroprusside] ของบริษัท Fluka, Switzerland.⁽¹⁾
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] ของบริษัท Merck, Germany.⁽²⁾
12. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$] ของบริษัท AJAX
CHEMICAL, Australia.⁽²⁾
13. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [KH_2PO_4] ของบริษัท AJAX CHEMICAL,
Australia.⁽²⁾

14. ฟีนอล [Phenol] ของบริษัท Merck, Germany.⁽¹⁾
15. เฟอร์รัสซัลเฟต [$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.⁽²⁾
16. แมงกานีสซัลเฟต [$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.⁽²⁾
17. แมกนีเซียมซัลเฟต [$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.⁽²⁾
18. เอทานอล 99.8% [$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$] ของบริษัท Carlo elba. Italy.⁽¹⁾
19. เมทานอล 99.8% [CH_3OH] ของบริษัท Carlo elba. Italy.⁽¹⁾
20. แอมโมเนียมซัลเฟต [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.⁽²⁾
21. แอมโมเนียมโมลิบเดต [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$] ของบริษัท AJAX CHEMICAL, Australia.⁽²⁾
22. อาหารแข็ง NA (Nutrient Agar) บริษัท Difco laboratories, U.S.A.
23. อาหารเหลว NB (Nutrient Broth) บริษัท Difco laboratories, U.S.A.
24. เปปโตน Difco laboratories, U.S.A.
25. สารสกัดจากเนื้อ Difco laboratories, U.S.A.
26. สารสกัดจากยีสต์ Difco laboratories, U.S.A.
27. กลีเซอรอล

น้ำที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดเป็นน้ำกลั่น

(ความบริสุทธิ์ของสารเคมี (1) ระดับ AR grade (2) ระดับห้องปฏิบัติการ)

4.3 เชื้อจุลินทรีย์

ในการทดลองใช้เชื้อ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 (*Alcaligenes eutrophus* TISTR 1335) ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

4.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.4.1 อาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ ใช้อาหารนิวเทรียนเอคาร์แบบแข็งเลี้ยง

4.4.2 อาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ ใช้อาหารนิวเทรียนบรอกแบบเหลว

4.4.3 อาหารเหลวสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น

ใช้อาหารสูตรสมบูรณ์ (rich medium) ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

- เปปโตน	10	กรัม
- สารสกัดจากยีสต์	10	กรัม
- สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	5	กรัม

4.4.4 อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมัก

ใช้อาหารสูตรเกลือแร่ (mineral salts medium : MSM) ในสารละลาย 1 ลิตร

ประกอบด้วย (Kim และคณะ 1994)

- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $[\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$	9	กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$	1.5	กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต $[\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$	0.2	กรัม

- สารละลายเกลือ (Salt solution) 1 มิลลิลิตร

ซึ่งในสารละลายเกลือ 1 ลิตรประกอบด้วย

กรดไฮโดรคลอริก 35.4% [HCl]	10	มิลลิลิตร
คอปเปอร์ซัลเฟต [CuSO ₄ ·5H ₂ O]	1	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ [CaCl ₂ ·5H ₂ O]	2	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต [ZnSO ₄ ·7H ₂ O]	2.25	กรัม
โซเดียมเตตราโบเรต [Na ₂ B ₄ O ₇ ·7H ₂ O]	0.23	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต [FeSO ₄ ·7H ₂ O]	10	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต [MnSO ₄ ·5H ₂ O]	0.5	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต [(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄]	0.1	กรัม

ในการเตรียมอาหารสูตรเกลือแร่นี้ ต้องทำการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากไอน้ำที่ความดัน 1.5 บาร์ เป็นเวลา 20 นาที โดยต้องแยกกลูโคสและแมกนีเซียมซัลเฟตออกจากกันก่อนทำการฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นจึงนำสารทั้งหมดมาผสมกันด้วยวิธีปลอดเชื้อ แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 6.8

4.5 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

วิธีการเก็บรักษาแบบระยะยาว

เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการแช่แข็งด้วยกลีเซอรอล 50 % (W/V) ด้วยการแช่แข็งลงในอาหารแข็งเยิงนิวเทรียนเอการ์ (NA) ในหลอดฝาเกลียวขนาด 5 มิลลิลิตร จำนวนเท่าใดก็ได้ตามต้องการ โดยโคโลนีที่ได้มีลักษณะกลมเรียบ มีสีเหลืองปนขาว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำละลายเชื้อด้วยอาหารเหลวนิวเทรียนบรอก (NB) ใน

หลอดฝากลีเยวขนาด 5 มิลลิลิตร ใช้พาสเจอร์ไปเปตที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หยดใส่ขวด Vial มีฝากลีเยวขนาด 2 มิลลิลิตรที่มีกลีเซอรอล 50 % (W/V) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอยู่ โดยวิธีการทำทั้งหมดจะต้องทำในสภาวะปลอดเชื้อ เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

4.6 ขั้นตอนการทดลอง

4.6.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บไว้ดังหัวข้อ 4.5 จำนวน 1 ขวด Vial ซึ่งมีจุลินทรีย์กระจายอยู่ 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารนิเวศแบบเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มปริมาณและบำรุงเซลล์ให้แข็งแรง จากนั้นปิเปตจุลินทรีย์ที่ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในอาหารสูตรสมบูรณ์ (ในหัวข้อ 4.4.3) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวนเท่าใดก็ได้ตามความต้องการของแต่ละการทดลอง จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง



รูปที่ 4.1 แสดงเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารนิวเทรียนเอการ์แบบแข็งเอียง



รูปที่ 4.2 แสดงหัวเชื้อตั้งต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรสมบูรณ์ (ในหัวข้อ 4.3.3)
ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

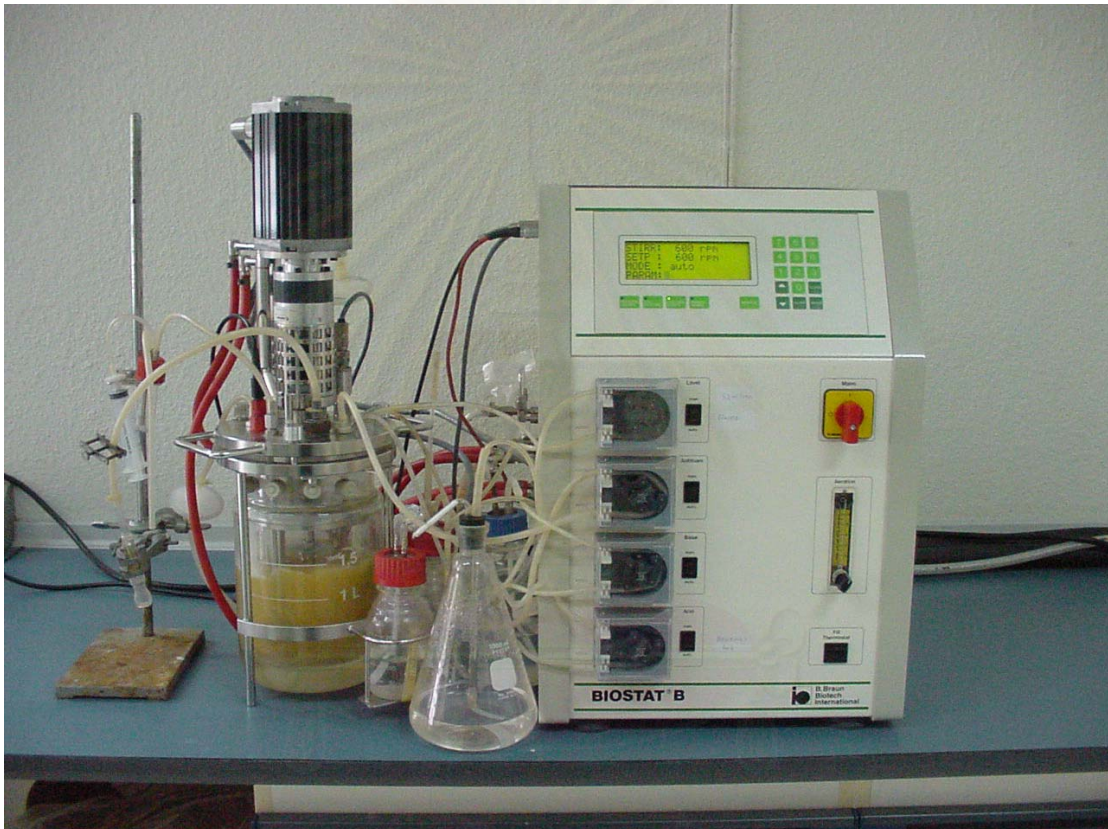
4.6.2 การเก็บเกี่ยวหัวเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นในอาหารสูตรสมบูรณ์เป็นเวลา 21 ชั่วโมงแล้ว จะต้องทำการเก็บเกี่ยวหัวเชื้อจุลินทรีย์โดยถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์ลงในขวดที่ใช้กับเครื่องหมุนเหวี่ยงในสภาวะปลอดเชื้อ ทำการหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เติสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วล้างจุลินทรีย์ด้วยน้ำเกลือ (0.85 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตรของโซเดียมคลอไรด์) ทำซ้ำ 2 ครั้งเพื่อล้างอาหารสูตรสมบูรณ์ออกจากจุลินทรีย์ทั้งหมด แล้วกระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 300 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อที่ได้ลงถังหมัก

4.6.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (ดังรูปที่ 4.3) โดยถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์ (ตามวิธีในหัวข้อ 4.6.2) ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลวสูตรเกลือแร่ปริมาตร 700 มิลลิลิตร ที่มีกลูโคส กรดโพธิโธนิค และแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณตามที่ได้จากการออกแบบการทดลอง โดยคิดปริมาตรสารดังกล่าวโดยรวมของเหลวหัวเชื้อจุลินทรีย์แล้ว ทั้งนี้เมื่อถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์ลงในถังหมักแล้วจะมีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ควบคุมปริมาณกลูโคส กรดโพธิโธนิค และ แอมโมเนียมซัลเฟต ด้วยสารละลายกลูโคสเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร สารละลายกรดโพธิโธนิค 25 กรัมต่อลิตร และสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต 100 กรัมต่อลิตร ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายให้อิ่มตัวเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างทุก 1.5 ชั่วโมงก่อนเติมอาหารเพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารอาหารต่างๆเพื่อเป็น

ข้อมูลในการเติมสารอาหาร และเก็บตัวอย่างหลังเติมอาหารเพื่อวัดปริมาณเซลล์ กลูโคส ไนโตรเจน กรดโพรพิโอนิก และ PHBV ทุก 2 ชั่วโมง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.3 ถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่องขนาด 2 ลิตร

4.7 การวัดการเจริญของเชื้อ

4.7.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

เก็บตัวอย่างน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 ใน ถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่องทุกๆ 3 ชั่วโมง ปริมาตร 15 มิลลิลิตร บีบน้ำหมักที่ได้ 10 มิลลิลิตร มาทำการปั่นแยกและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ทำละลายเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายเซลล์ที่ได้ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว จากนั้นนำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส จนเซลล์แห้งใช้เวลาประมาณ 18 ชั่วโมงแล้วนำมาทำให้เย็นใน โถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกระทั่งได้น้ำหนักเซลล์คงที่

4.7.2 การวัดค่าความขุ่น

ปั่นแยกเซลล์จากน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นกระจายเซลล์ที่ได้ในน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้หาปริมาณ น้ำหนักเซลล์แห้งจากกราฟมาตรฐาน

4.8 การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส (Dobois, 1956)

บีบน้ำหมักที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ออกแล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร แล้วเติมกรด ซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตรลงไปอย่างรวดเร็ว ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที เขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิระหว่าง 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

ประมาณ 10 ถึง 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง คำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \times 1,000}$$

หมายเหตุ วิธีการเตรียมสารละลายฟินอลทำได้โดยชั่งฟินอล 5 กรัมเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม

4.9 การหาปริมาณไนโตรเจน (Weatherburn, 1967)

ปิเปตน้ำหมักที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ออกมาแล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเอ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลาย บี 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร ปริมาณไนโตรเจนในสารละลายตัวอย่างหาได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \times 1,000}$$

หมายเหตุ วิธีเตรียมสารละลายเอ และบี

สารละลายเอ ประกอบด้วยฟินอล 10 กรัม และไซเตียมไนโตรพรัสไซด์ 50 มิลลิกรัม ทำละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายบี ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 กรัมต่อลิตร และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 8.4 มิลลิลิตรต่อลิตร บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.10 วิธีหาปริมาณกรดโพธิอินิค

ปิเปตน้ำหมักที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานภายใน 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดโพธิอินิคด้วยเครื่องกาซโครมาโตกราฟี

ตารางที่ 4.1 สภาวะที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณกรดโพธิอินิค

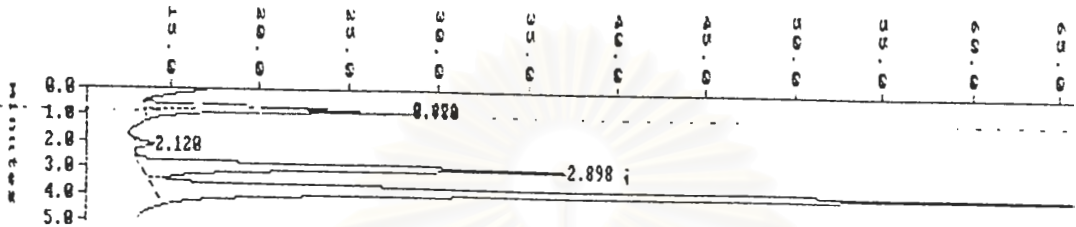
ชนิดของคอลัมน์	Carbowax 20M
ความยาวคอลัมน์	3 เมตร
ตัวนำพา	ก๊าซฮีเลียม 40 Psi
เครื่องตรวจวัด	Frame ionization detector
อุณหภูมิเครื่องตรวจวัด	230 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิ injector	200 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิ คอลัมน์	160 องศาเซลเซียส
ปริมาตรที่ฉีด	1 ไมโครลิตร

หมายเหตุ วิธีการเตรียมสารมาตรฐานภายใน 1

สารมาตรฐานภายใน 1 ประกอบด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และ กรดอะซิติกเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

กรดโพธิอินิค มีค่า Retention time 3.7 นาที

กรดอะซิติก มีค่า Retention time 2.8 นาที



รูปที่ 4.4 แกสโครมาโตแกรมของกรดโพทิโอนิก และกรดอะซิติก

4.11 วิธีหาปริมาณ PHBV

4.11.1 วิธีการสกัดแยก PHBV (Braunegg และคณะ 1978)

ซึ่งเซลล์ที่อบแห้งจนทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดมีฝาเกลียว เติมสารละลายมาตรฐานภายใน 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง โดยระหว่างการบ่มให้เขย่าเป็นบางครั้ง จากนั้นทำให้เย็นในตู้เย็นเป็นเวลา 20 นาที เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าอย่างรุนแรง 10 นาที ใช้พาสเจอร์รี่เปิดดูเอาสารละลายส่วนล่างใส่ลงในหลอดทดลองมีฝาเกลียวที่บรรจุน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าอย่างรุนแรง 10 นาที ใช้พาสเจอร์รี่เปิดดูเอาสารละลายส่วนล่างใส่ในขวดมีฝาเกลียวที่ทนต่อ

คอลโรฟอร์ม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องกาซ

โครมาโตกราฟี

ตารางที่ 4.2 สภาวะที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ PHBV

ชนิดของคอลัมน์	Carbowax 20M
ความยาวคอลัมน์	3 เมตร
ตัวนำพา	ก๊าซฮีเลียม 40 Psi
เครื่องตรวจวัด	Frame ionization detector
อุณหภูมิเครื่องตรวจวัด	230 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิ injector	200 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิ คอลัมน์	160 องศาเซลเซียส
ปริมาตรที่ฉีด	1 ไมโครลิตร

หมายเหตุ วิธีการเตรียมสารมาตรฐานภายใน 2

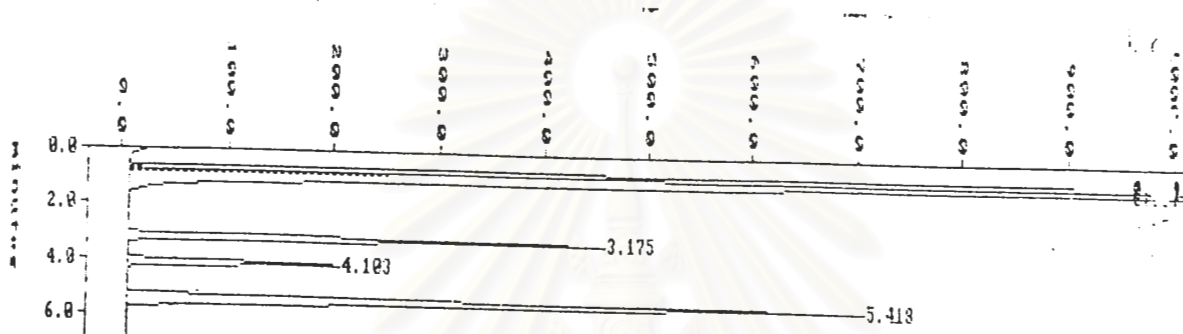
สารมาตรฐานภายใน 2 ประกอบด้วยกรดเบนโซอิก 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของอะซิติลเมทานอล ซึ่งเตรียมได้โดยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100

มิลลิลิตรด้วยเมทานอล

3HB มีค่า Retention time 3.2 นาที

3HV มีค่า Retention time 4.1 นาที

กรดเบนโซอิก มีค่า Retention time 5.4 นาที



รูปที่ 4.5 ก๊าซโครมาโตกราฟของ 3HB 3HV และกรดเบนโซอิก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

ผลการทดลอง และวิเคราะห์ผลการทดลอง

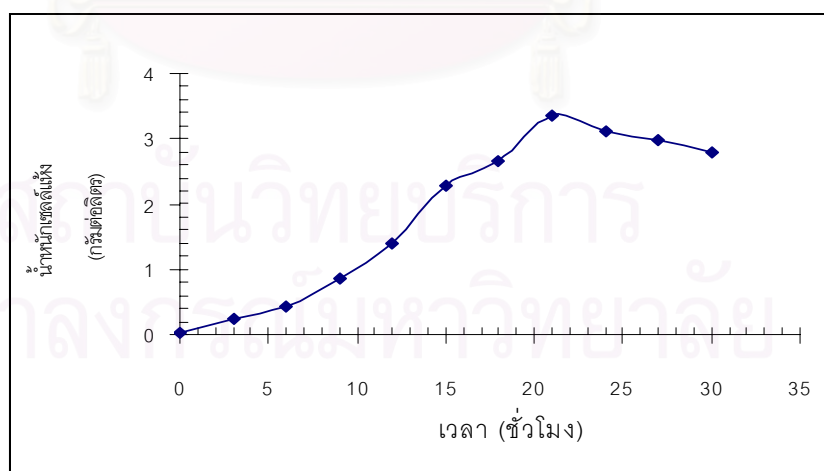
การศึกษาการผลิต PHBV ด้วย *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องในงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกศึกษาถึงรูปแบบของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่เพื่อสร้างชีวมวลในระยะเจริญเติบโต (growth stage) ให้เพียงพอระดับหนึ่งก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงต่อไปในถังปฏิกรณ์แบบกึ่งต่อเนื่อง ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้อาศัยการออกแบบการทดลอง (Experimental Design) มาช่วยในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิคต่อค่าพารามิเตอร์ต่างๆทางจลนพลศาสตร์ ซึ่งได้แก่

- อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
- อัตราการผลิต 3HB จำเพาะ
- อัตราการผลิต 3HV จำเพาะ
- ร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์
- ร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์
- อัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ
- อัตราการใช้กรดโพรพิโอนิคจำเพาะ
- อัตราการใช้ไนโตรเจนจำเพาะ
- ผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส
- ผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรพิโอนิค

5.1 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 ในขวดรูปชมพู่

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในหัวข้อนี้เพื่อเป็นการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 เพื่อเป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับถ่ายลงถึงปฏิกรณ์ชีวภาพต่อไป โดยทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งในกลีเซอรอล 50% W/V ลงในอาหารสูตรสมบูรณ์ (ในหัวข้อ 4.4.3) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ทุก 3 ชั่วโมงโดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ควบคู่ไปกับการวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง

รูปที่ 5.1 แสดงให้เห็นการเจริญของ เชื้อจุลินทรีย์ *A.eutrophus* NCIMB 11599 โดยเข้าสู่ระยะคงที่(stationary phase) ที่เวลา 21 ชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง 3.37 กรัมต่อลิตร) และมีระยะกึ่งกลางการเจริญแบบทวีคูณที่เวลา 15 ชั่วโมง (น้ำหนักเซลล์แห้ง 2.28 กรัมต่อลิตร)



รูปที่ 5.1 การเจริญเติบโตของ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 ในอาหารสูตรสมบูรณ์

จากผลการทดลองที่ได้ ทำให้ทราบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารสูตรสมบูรณ์ควรเป็น 21 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นสูงที่สุด

5.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *A.eutrophus* NCIMB 11599 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกึ่ง

ต่อเนื่อง

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และร้อยละโดยโมลของกรดโพธิอินิคต่อค่าพารามิเตอร์ต่างๆทางจลนพลศาสตร์ โดยอาศัยการออกแบบการทดลอง ซึ่งประกอบด้วย การทดลองแบบแฟคทอเรียล การทดลองล้อมรอบจุดศูนย์กลาง และการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลาง ดังแสดงรายละเอียดในภาคผนวก ก (ตาราง ก1) ซึ่งการออกแบบการทดลองที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้มีประโยชน์หลายประการดังต่อไปนี้

- สามารถบ่งชี้ความสำคัญและอิทธิพลของตัวแปรดำเนินการซึ่งในที่นี้คือค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และ ร้อยละโดยโมลของกรดโพธิอินิค ที่มีต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ต่างๆของกระบวนการ
- เป็นการนำวิธีการทางสถิติมาใช้ควบคู่กับการทดลองอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการทางสถิติ ทำให้ผลการทดลองมีความน่าเชื่อถือ

5.2.1 ผลการเพาะเลี้ยง *A.eutrophus* NCIMB 11599 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

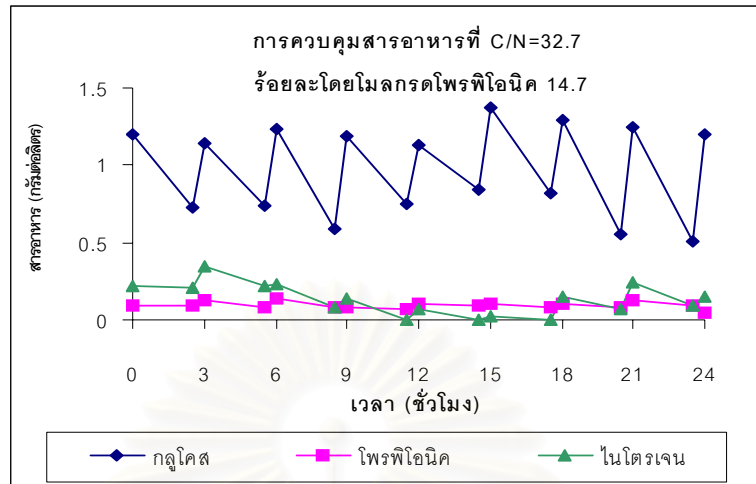
ในหัวข้อนี้จะแสดงตัวอย่างวิธีการควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง จุลินทรีย์ *A.eutrophus* NCIMB 11599 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เท่ากับ 32.7 และ ร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโธนิคเป็น 14.7 ที่ตำแหน่งรหัสโค้ดเท่ากับ -1 , -1

รูปที่ 5.2 แสดงตัวอย่างการเพาะเลี้ยง *A.eutrophus* NCIMB 11599 และการควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารที่ค่า C/N = 32.7 ร้อยละโดยโมลกรดโพธิโธนิค 14.7 ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของสารอาหารที่ต้องควบคุมเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณความเข้มข้นในถังปฏิกรณ์เป็นดังตารางที่ 5.1

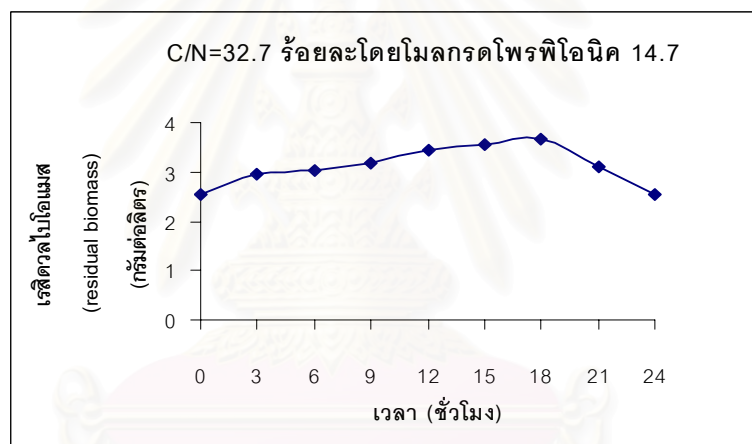
ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารอาหารที่ต้องควบคุม กับความเข้มข้นเฉลี่ยในถังปฏิกรณ์

สารอาหาร	ความเข้มข้นควบคุม (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นในถังปฏิกรณ์ (กรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความ ผิดพลาด
กลูโคส	1.17	0.974	-20
กรดโพธิโธนิค	0.082	0.074	-11
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.164	0.132	-24

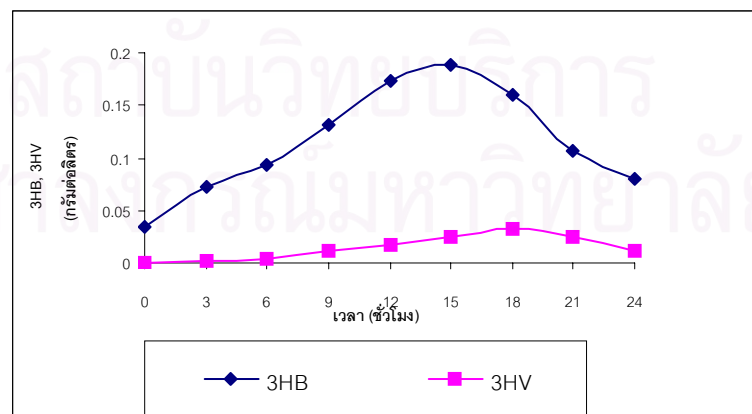
ซึ่งคิดความเข้มข้นของสารอาหารในถังปฏิกรณ์เฉลี่ยคิดเป็นค่า C/N เท่ากับ 40 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพธิโธนิคเท่ากับ 12



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 5.2 ผลการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* NCIMB 11599 ที่ตำแหน่ง -1,-1

จากผลการทดลองในรูปที่ 5.2 จะสังเกตเห็นว่าความเข้มข้นของเรลิตดวลไบโอแมส และผลิตภัณฑ์ (3HB และ 3HV) มีแนวโน้มลดลงหลังจากเวลาในการหมักผ่านไปประมาณ 15 - 18 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเกิดจากปัจจัยต่างๆหลายประการเช่น อาจเกิดจากปริมาณไซโตเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ถูกเติมลงไปในถังปฏิกรณ์มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่ง Ryu และคณะ (1997) และพิมพ์ชนก (2542) พบว่าจะเป็นที่ขัดต่อเซลล์และเป็นสาเหตุให้ปริมาณเซลล์ลดลง ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่าพบในการทดลองที่มีการเติมไซโตเดียมไฮดรอกไซด์เป็นปริมาณมาก หรืออาจเกิดจากปริมาณของน้ำหมักมากขึ้นเมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากการเติมสารอาหารทำให้เกิดการเจือจางจุลินทรีย์

5.2.2 ตัวแปรดำเนินการ

ในงานวิจัยนี้ศึกษาถึงอิทธิพลของตัวแปรดำเนินการซึ่งประกอบด้วย ค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และ ร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโอนิค โดยกำหนดให้ภาวะอื่นๆของกระบวนการคงที่ดังต่อไปนี้ (Kim และคณะ, 1994)

- ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.8 (ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยไซโตเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไฮโดรคลอริก 1โมลาร์)
- อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
- ความเร็วรอบใบกวน 400 รอบต่อนาที
- อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที โดยมีปริมาณออกซิเจนละลายไม่ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ในทุกการทดลอง

ซึ่งความสำคัญของตัวแปรดำเนินการในงานวิจัยนี้ต่อการเจริญเติบโตและการผลิต

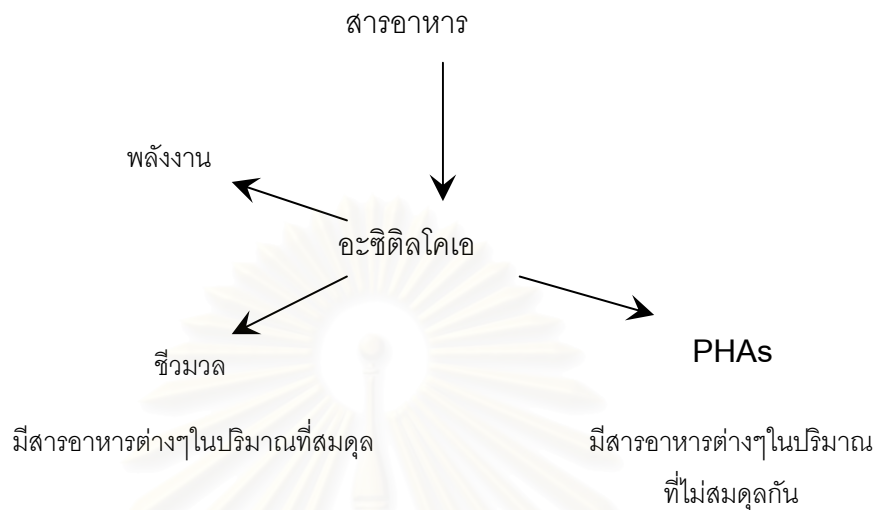
PHAs ของ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 เป็นดังต่อไปนี้

5.2.2.1 ค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

คาร์บอน และ ไนโตรเจน เป็นธาตุองค์ประกอบที่มีความสำคัญยิ่งของเซลล์ เช่นใน *Alcaligenes latus* DSM 1123 มีค่าอัตราส่วนเชิงโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบ ของเซลล์เป็น 8 (Yamane และคณะ 1995) ด้วยเหตุนี้อัตราส่วนโดยโมลที่เหมาะสมของคาร์บอนต่อไนโตรเจนจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการกำหนดวิถีการดำรงชีวิต การผลิต ผลิตภัณฑ์ และการทำกิจกรรมอื่นๆของเซลล์ ทั้งนี้จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะสามารถผลิต PHAs ได้เมื่อมีการจำกัดสารไนโตรเจนแต่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินไป เช่น *Alcaligenes eutrophus* *Azotobacter* *Chromatium vinosum* *Ectothiorhodopira* และ *P. oleovorans* เป็นต้น (Lee , 1995) โดยแหล่งคาร์บอนจะถูกเปลี่ยนเป็น อะซิติกโคเอ และอนุพันธ์ของอะซิติกโคเอ โดยเมื่อขาดแหล่งไนโตรเจนอะซิติกโคเอก็จะเข้าสู่กลไกการผลิต PHAs แต่ถ้ามีแหล่งไนโตรเจนมากเกินไปพออะซิติกโคเอก็จะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานและชีวมวล (รูปที่ 5.3)

แต่อย่างไรก็ดียังมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถผลิต PHAs ได้แม้ไม่มีการจำกัดไนโตรเจน เช่น *A.latus* (Hrabak , 1992) และ เซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ของ *Azotobacter vinelandii* (Page และคณะ , 1989) เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของคาร์บอน และ ไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิต PHBV ของ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 ในรูปของค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N)



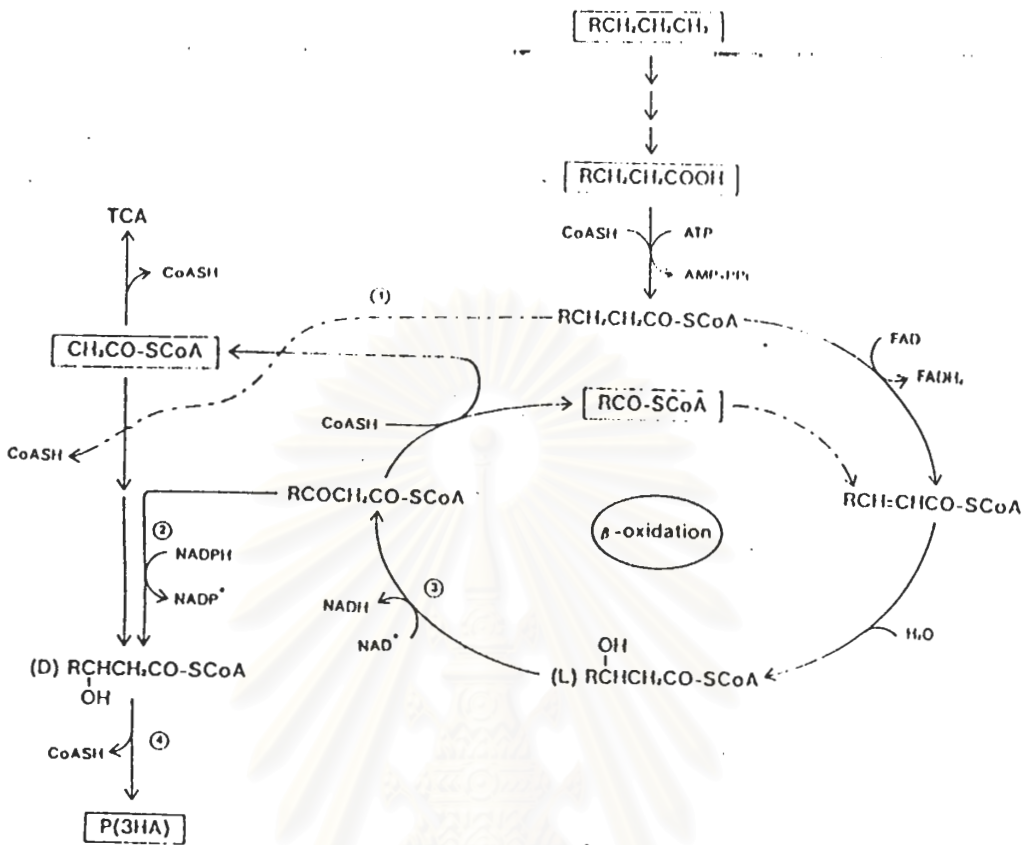
รูปที่ 5.3 แสดงผลิตภัณฑ์จากอะซิติกโคเอในภาวะที่มีสารอาหารสมดุล และในภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล แบบมีคาร์บอนมากเกินไป (Byrom, 1987)

5.2.2.2 คาร์บอนโดยโมลของกรดโพรพิโอนิก

กรดโพรพิโอนิก และ กรดอินทรีย์อื่นๆ สามารถเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตหน่วยของโมโนเมอร์ที่ประกอบกันเป็น PHAs ที่เป็นโฮโมพอลิเมอร์ และโคพอลิเมอร์ โดยกรดโพรพิโอนิกจะถูกใช้เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิต 3HB และ 3HV นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังสามารถใช้กรดโพรพิโอนิกเพื่อผลิตชีวมวลและพลังงานเพื่อการดำรงชีวิตโดยผ่านวิถีสังเคราะห์พีตา-ออกซิเดชัน (β -oxidation) ซึ่งจะควบคู่ไปกับกระบวนการสังเคราะห์ PHAs และวัฏจักรเครปส์ ดังแสดงใน รูปที่ 5.4 แต่อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของ *Alcaligenes eutrophus* จะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกสูงกว่า 3 กรัมต่อลิตร (Ramsay และคณะ , 1990) ซึ่งจากการที่เซลล์จะ

ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกสูงกว่า 3 กรัมต่อลิตรนี้จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ในการทดลองที่มีร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกเป็น 100 จะมีความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกได้ไม่เกิน 3 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากการปฏิบัติการจะเป็นแบบกึ่งต่อเนื่องที่จะต้องมีการเติมสารอาหารเป็นช่วงๆ ซึ่งหากมีการเติมกรดโพรพิโอนิกจนมีความเข้มข้นเกิน 3 กรัมต่อลิตรก็จะทำให้เซลล์เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นในการทดลองที่มีการควบคุมความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 100 โมลเปอร์เซ็นต์ จึงกำหนดให้ความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกในถังปฏิกรณ์เป็น 2 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในแต่ละการทดลองจะต้องควบคุมให้ปริมาณโมลคาร์บอนรวม (total mole carbon) มีค่าเท่ากันซึ่งเท่ากับ 0.081 โมลคาร์บอนต่อลิตร (คำนวณจากความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร) ในงานวิจัยนี้ศึกษาผลของกรดโพรพิโอนิก ในรูป ร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิก ที่มีต่อการเจริญเติบโต และการผลิต PHBV ของ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599

ส่วนรายละเอียดเรื่องวิธีการสังเคราะห์ PHBV จากกรดโพรพิโอนิกและกลูโคสได้กล่าวรายละเอียดแล้วในหัวข้อ 2.1.2



รูปที่ 5.4 การเชื่อมโยงของกระบวนการสังเคราะห์ PHAs

วิธีสังเคราะห์ปีตา-ออกซิเดชัน และวัฏจักรเครปส์ (Doi, Y.,1990)

(1)=3-คีโตโทโอเลส (2),(3)=อะซิโตอะซีติลโคเอรีดักเตส (4)=พีเอชเอซินเทส

5.2.3 อิทธิพลของตัวแปรดำเนินการต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์

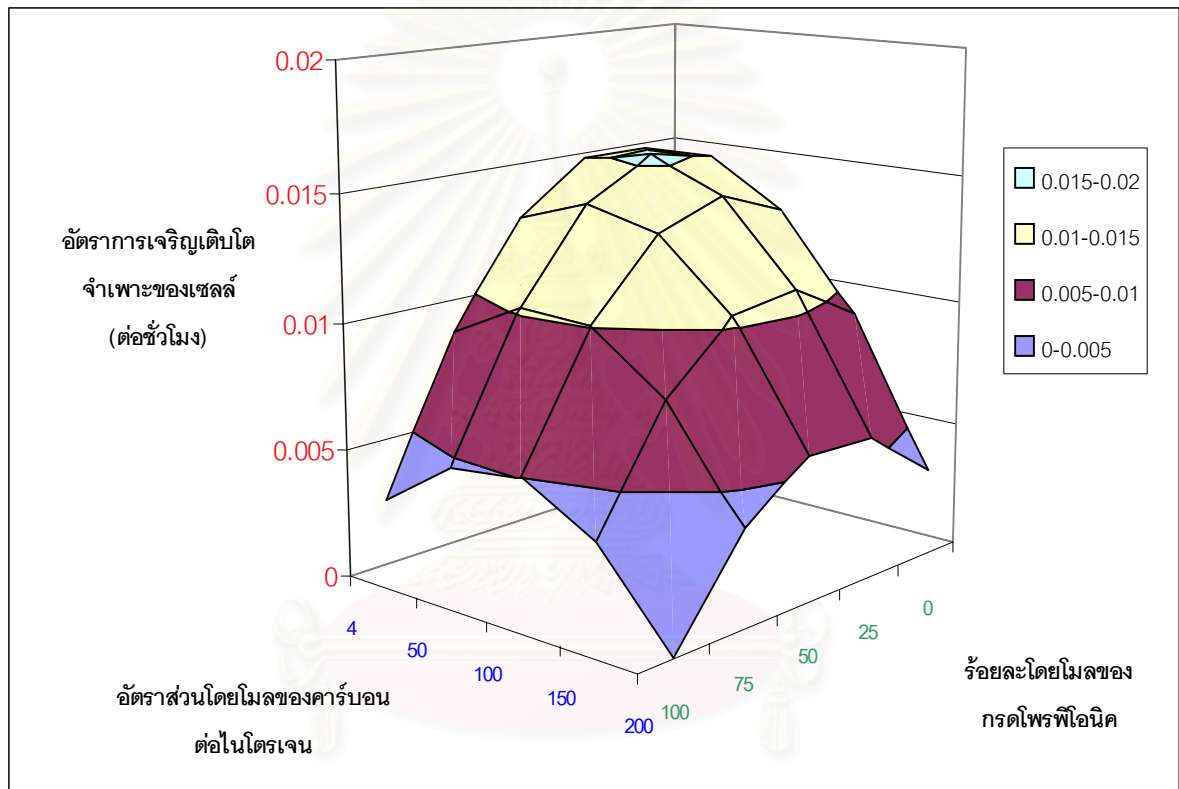
อิทธิพลของตัวแปรดำเนินการร่วมในที่นี้คือ ค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และ ร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโอนิก ที่มีผลต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์

ซึ่งค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ต่างๆคำนวณจากเรสิดวลไบโอแมส (residual biomass) ทั้งสิ้นยกเว้นการคำนวณร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์ที่คำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งนี้สามารถแยกประเด็นตามค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

5.2.3.1 อิทธิพลที่มีต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์

รูปที่ 5.5 แสดงอิทธิพลร่วมของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิก ต่อ

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599



รูปที่ 5.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์

ทั้งนี้เมื่อพิจารณาอิทธิพลของ C/N ต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ จะพบว่าค่า C/N

ที่เหมาะสมที่สุดคือ 50 ซึ่งจากงานวิจัยของ Shimizu และคณะ (1998) ซึ่งผลิต PHBV

จาก *Alcaligenes eutrophus* H16 ด้วยกรดบิวทีริก และกรดวาลาริก โดยพบว่าที่ ร้อยละโดยโมลของกรดวาลาริกเท่ากับ 50 ค่า C/N ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะอยู่ในช่วง 4 ถึง 8 โดยสอดคล้องกับอัตราส่วนขององค์ประกอบของเซลล์ *Alcaligenes eutrophus* H16 ที่มีค่า C/N ประมาณ 8

แต่จากผลการทดลองพบว่าค่า C/N ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ สอดคล้องกับค่า C/N ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ โดยจากการทดลองสังเกตเห็นว่าอัตราการ เจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์จะมีค่าเพิ่มขึ้นในช่วง 7 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์เมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้น จาก 4 เป็น 50 ซึ่งจากงานวิจัยของพิมพ์ชนก (2542) พบว่าปริมาณไนโตรเจนที่มากเกินไป (ที่ C/N เท่ากับ 20 25 และ 30) กลับทำให้การเจริญของจุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 ลดลงและเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากแท่งสั้นกลายเป็นสายยาว ซึ่งใน งานวิจัยของ Lee และคณะ (1994) พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ *E.coli* เมื่อทำการ เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวในสารอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนมากเช่นกัน โดยที่ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 น่าจะมีองค์ประกอบอยู่ในช่วง C/N ระหว่าง 4 – 8 (พิจารณาอ้างอิงจากองค์ประกอบของเซลล์โดยทั่วไป และจาก Yamane และคณะ 1995 ซึ่ง รายงานองค์ประกอบของ *Alcaligenes latus* DSM1123 ว่าองค์ประกอบของเซลล์มีค่า C/N ประมาณ 8) โดยจากรายงานผลงานวิจัยของคณะนักวิจัยต่างๆ (Shimizu และคณะ 1998, Peter A. และ Henri R. 1996) พบว่าค่า C/N ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตมีค่าระหว่าง 4 – 8 ซึ่งเป็นค่าที่สอดคล้องกับองค์ประกอบทางเคมีของจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนั้นๆทั้งสิ้น แต่อย่างไรก็ดีจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยดังกล่าวไม่ได้รายงานการเกิดการ

เปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะความเข้มข้นของไนโตรเจนสูง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ค่า C/N ที่ให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้สูงสุดมีค่าเป็น 50 แทนที่จะเป็นที่ 8 ซึ่งเป็นค่า C/N ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์

ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า การเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์จากแท่งสั้นเป็นสายยาวที่ C/N ในช่วง 4 ถึง 30 จะมีผลทำให้ค่า C/N ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตแตกต่างจากค่า C/N ในองค์ประกอบเซลล์ดังที่พบในงานวิจัยของท่านอื่นๆ

จากผลการทดลองสังเกตเห็นว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจะลดลงเมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิคลดลงจาก 25 เป็น 0 (กลูโคส 100%) ที่ทุกๆค่า C/N แต่จะเห็นผลชัดเจนที่สุดที่ค่า C/N = 200 ทั้งนี้เป็นที่น่าประหลาดใจเพราะกลูโคสน่าจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ง่ายที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งผู้วิจัยยังไม่สามารถคาดคะเนสาเหตุที่แน่ชัดได้เนื่องจากยังไม่พบรายงานวิจัยใดที่เกี่ยวข้อง

แต่เมื่อเพิ่มกรดโพรฟิโอนิคขึ้นจาก 25 ถึง 100 โมลเปอร์เซ็นต์ จะพบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจะลดลงอย่างต่อเนื่องที่ทุกๆค่า C/N โดยมีค่าลดลงในช่วงประมาณ 60 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อเพิ่มปริมาณกรดโพรฟิโอนิคจาก 25 เป็น 100 โมลเปอร์เซ็นต์ ที่ภาวะ C/N เป็น 50 และ 200 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 สามารถเจริญเติบโตด้วยกลูโคสได้ดีกว่าด้วยกรดโพรฟิโอนิค ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (1994) ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์จะปลดปล่อยไพโรเวทออกจากเซลล์มากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยโพรฟิโอนิตความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้ไพโรเวทที่เข้าสู่วัฏจักรเครปส์เพื่อผลิตพลังงานและชีวมวลจะมีปริมาณลดลงทำให้อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลดลง

ผลงานวิจัยนี้พบภาวะการหมักที่ $C/N = 50$ และกรดโพธิโอินิค 25 โมลเปอร์เซ็นต์ ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดซึ่งเท่ากับ 0.015 ต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าต่ำกว่ารายงานผลการวิจัยของ Kim และคณะ (1994) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยง *R.eutropha* ในถังหมักแบบกึ่งต่อเนื่องด้วยกลูโคสเข้มข้นระหว่าง 10 ถึง 20 กรัมต่อลิตร โดยควบคุมอัตราส่วนโมลกรดโพธิโอินิคต่อโมล กลูโคสในกระแสบ้อนระหว่าง 0.17 ถึง 0.52 โดยจะได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ระหว่าง 0.18 ถึง 0.27 ต่อชั่วโมง ซึ่งในงานวิจัยนี้มีความจำเป็นต้องควบคุมระดับปริมาณโมลคาร์บอนที่ 0.081 โมลคาร์บอนต่อลิตร ในขณะที่งานวิจัยของ Kim และคณะ (1994) ควบคุมระดับปริมาณโมลคาร์บอนที่ประมาณ 0.91 ถึง 1.18 ซึ่งต่างจากงานวิจัยนี้ประมาณ 12 ถึง 15 เท่าซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณคาร์บอนที่ควบคุมจะมีผลต่อการเจริญเติบโต และการสะสม PHAs ของจุลินทรีย์

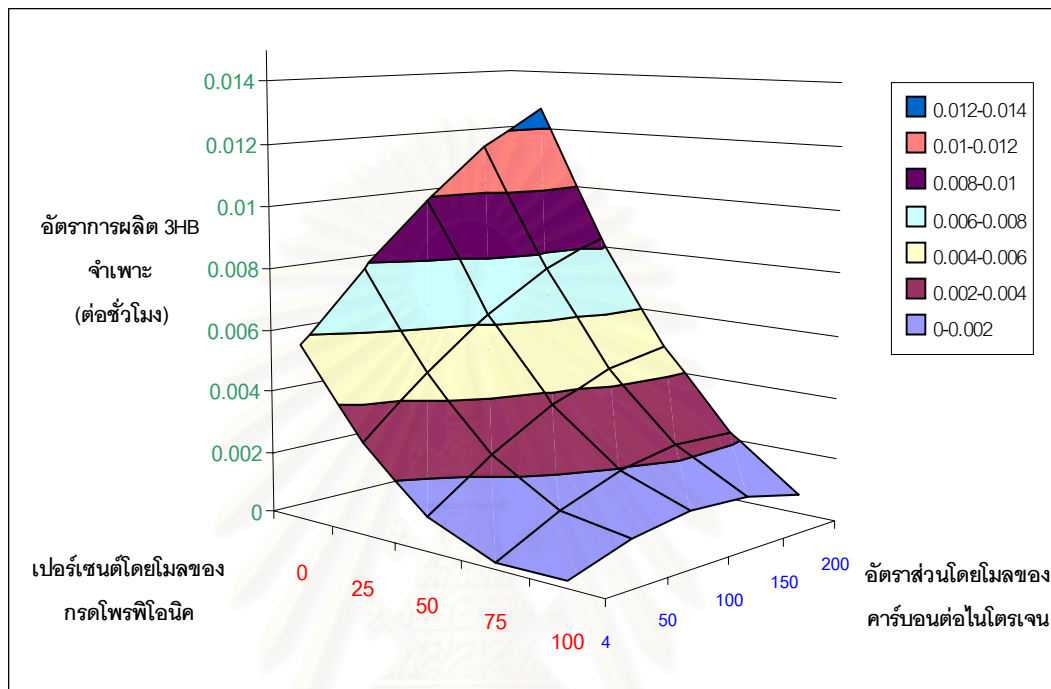
ส่วนสภาวะที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำสุด (0.004 ต่อชั่วโมง) เป็นภาวะการหมักที่ $C/N = 200$ และกรดโพธิโอินิค 100 โมลเปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เพราะที่ค่า $C/N = 200$ จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโต ดังนั้นอะซิติกโคเอซึ่งถูกเปลี่ยนแปลงมาจากโพธิโอินิคโคเอจะเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ลดลง โดยอาจเปลี่ยนจากวิถีสังเคราะห์เซลล์มาเป็นวิถีการสังเคราะห์ PHBV เพื่อเป็นการเก็บสะสมคาร์บอนส่วนเกินสำหรับใช้ในสภาวะขาดแคลนแหล่งคาร์บอนต่อไป ดังนั้นที่ภาวะ C/N สูงเช่นนี้จึงควรให้อัตราการผลิต PHBV สูงด้วยเช่นกัน ซึ่งจะรายงานผลในส่วนต่อไปของงานวิจัยนี้

5.2.3.2 อิทธิพลที่มีต่ออัตราการผลิต 3HB จำเพาะ

รูปที่ 5.6 แสดงอิทธิพลร่วมของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดไพรูวิกต่ออัตราการผลิต 3HB จำเพาะ

ทั้งนี้เมื่อพิจารณาอิทธิพลของค่า C/N ต่ออัตราการผลิต 3HB จำเพาะ จะพบว่าค่า C/N ที่เหมาะสมต่อการผลิต 3HB คือที่ค่า C/N เป็น 200 กล่าวคือที่ค่า C/N ดังกล่าวจะให้อัตราการผลิต 3HB จำเพาะสูงสุด โดยที่อัตราการผลิต 3HB จำเพาะจะเพิ่มขึ้นระหว่าง 55 และ 45 เปอร์เซ็นต์เมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้นจาก 4 เป็น 200 ที่ค่าร้อยละโดยโมลของกรดไพรูวิกเป็น 0 และ 75 ตามลำดับ ซึ่งแนวโน้มที่ค่า C/N ดังกล่าวจะเป็นตลอดที่ทุกค่าของร้อยละโดยโมลของกรดไพรูวิก ยกเว้นที่ค่าร้อยละโดยโมลของกรดไพรูวิกสูงกว่า 75 ซึ่งที่ 100 โมลเปอร์เซ็นต์กรดไพรูวิกพบว่าอัตราการผลิต 3HB จำเพาะจะมีค่าสูงสุดอยู่ที่ค่า C/N เป็น 100 ไม่ใช่ที่ C/N เท่ากับ 200 เช่นในกรณีอื่นๆ

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของร้อยละโดยโมลของกรดไพรูวิกต่ออัตราการผลิต 3HB จำเพาะจะพบว่า อัตราการผลิต 3HB จำเพาะจะลดลงถึงร้อยละ 80 ถึง 95 เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดไพรูวิกเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 100 ตามลำดับ ซึ่งจากการลดลงของอัตราการผลิต 3HB จำเพาะแสดงให้เห็นว่าการผลิต 3HB จะผลิตได้จากกลูโคสมากกว่าผลิตจากกรดไพรูวิก ทั้งนี้เมื่อพิจารณาร่วมกับวิถีสังเคราะห์ PHAs จะพบว่าในสภาวะที่มีการจำกัดไนโตรเจน กลูโคสจะเกิดปฏิกิริยาไกลโคไลซิส (glycolysis) จนได้เป็นอะซีติลโคเอซึ่งจะเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ 3HB ในขณะที่กรดไพรูวิกจะเปลี่ยนเป็นไพรูวิกอินดิโคเอ ซึ่งบางส่วนของไพรูวิกอินดิโคเอจะ



รูปที่ 5.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

และเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพธิโอนิค ต่ออัตราการผลิต 3HB จำเพาะ

เปลี่ยนเป็น 3HV และบางส่วนจะผ่านวิถีสังเคราะห์บีตา-ออกซิเดชันได้เป็นอะซิติลโคเอเพื่อผลิต 3HB ชีวมวล และพลังงาน ดังนั้นจึงทำให้การผลิต 3HB ด้วยกลูโคสจึงมีปริมาณมากกว่าการผลิตด้วยกรดโพธิโอนิค

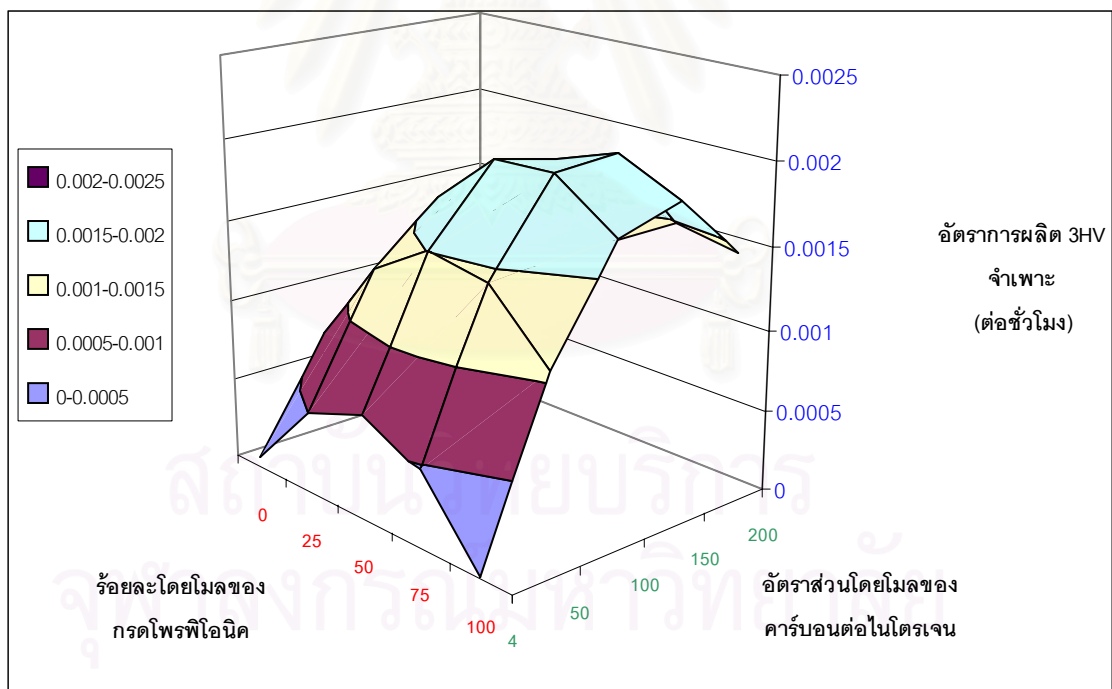
เมื่อพิจารณาสภาวะที่ให้การผลิต 3HB สูงสุด พบว่าเป็นสภาวะที่มีค่า $C/N = 200$ และร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโอนิคเท่ากับ 0 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (1993) ซึ่งพบว่าเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose-6-phosphate

dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนกลูโคสให้เป็นสารตั้งต้นที่เข้าสู่กระบวนการผลิต 3HB จะไม่ขึ้นกับค่า C/N ในขณะที่เอนไซม์ 3-คีโตไฮโอเรส จะมีกิจกรรม (activity) สูงขึ้นทันทีที่ปริมาณไนโตรเจนลดลง จึงทำให้ค่า C/N เป็น 200 จะผลิต 3HB สูงสุด

5.2.3.3 อิทธิพลที่มีต่ออัตราการอัตราการผลิต 3HV จำเพาะ

รูปที่ 5.7 แสดงอิทธิพลร่วมของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิก ต่ออัตราการผลิต 3HV จำเพาะ

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของค่า C/N ต่ออัตราการผลิต 3HV จำเพาะ จะพบว่าอัตราการผลิต 3HV จำเพาะจะเพิ่มร้อยละ 27 ถึง 38 เมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้นจาก 4 ถึง 100 ที่ร้อยละโดยโมล



รูปที่ 5.7 แสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

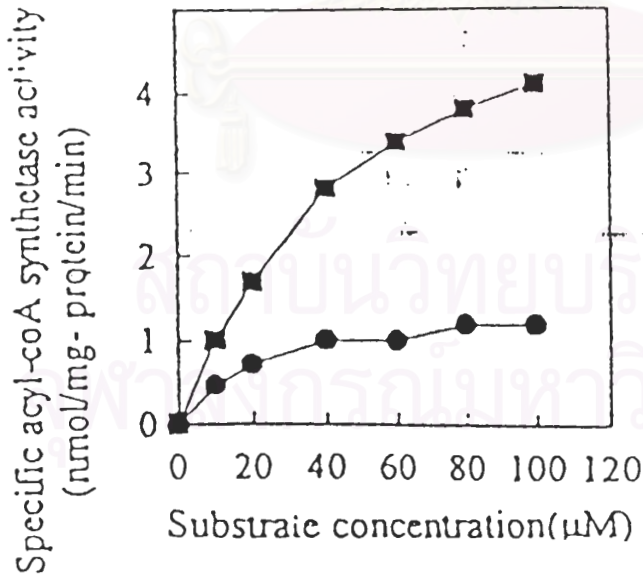
และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่ออัตราการผลิต 3HV จำเพาะ

ของกรดโพรพิโอนิกเป็น 25 และ 100 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องเอนไซม์ 3-คีโตไฮโดรเลส จะมีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้น จึงทำให้โพรพิโอนิลโคเอเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ 3HV เพิ่มขึ้น

แต่เมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้นจาก 100 ถึง 200 พบว่าอัตราการผลิต 3HV จำเพาะจะมีแนวโน้มลดลงประมาณ 49 และ 22.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกเป็น 25 และ 100 ตามลำดับ ซึ่งอิทธิพลของค่า C/N ต่ออัตราการผลิต 3HV จำเพาะในช่วง C/N ดังกล่าว Shimizu และคณะ (1998) กล่าวว่าเกิดจากปริมาณของไนโตรเจนที่จำกัดมากเกินไป (ที่ค่า C/N สูงกว่า 100) จนทำให้เอนไซม์ต่างๆในวิถีสังเคราะห์เบตา-ออกซีเคชันมีกิจกรรม ที่ลดลงโดยสามารถพบได้ที่ทุกช่วงของร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิก

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่ออัตราการผลิต 3HV จำเพาะ จากการทดลองพบว่าเมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0 เป็นร้อยละ 50 อัตราการผลิต 3HV จำเพาะจะเพิ่มขึ้นร้อยละ 50 และ 62 ที่ค่า C/N เป็น 50 และ 150 ตามลำดับ แต่เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกสูงกว่าร้อยละ 50 อัตราการผลิต 3HV จำเพาะจะมีค่าลดลงร้อยละ 29 และ 27 ที่ค่า C/N เป็น 50 และ 150 ตามลำดับ ซึ่งจากงานวิจัยของ Lee และคณะ (1994) ซึ่งศึกษาการผลิต PHBV โดย *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 ด้วยโพรพิโอเนตพบว่าเมื่อความเข้มข้นของโพรพิโอเนตมีค่าสูงกว่า 2 กรัมต่อลิตร จุลินทรีย์จะสะสมพอลิเมอร์ในรูป 3HB มากกว่า 3HV เนื่องจากโพรพิโอนิลโคเอจะเกิดปฏิกิริยา ดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) โดยเปลี่ยนไปเป็นอะซีทิลโคเอ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต 3HB ได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์จะปลดปล่อยไพลูเวทออกมาภายนอกเซลล์มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโพรพิโอเนตเพิ่มขึ้น

ต่อมาในปี ค.ศ.1995 Lee และคณะ ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เอซิลโคเอซินเทส (Acyl-CoA synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนกรดไพรูวอิกให้เป็นไพรูวอิลโคเอเพื่อผลิตอะซิติลโคเอ และพลังงานโดยผ่านวิถีสังเคราะห์เบตา-ออกซิเดชันในการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 ด้วยไพรูวอเนต หรือ วาเลอเรต (รูปที่ 5.4 แสดงวิถีสังเคราะห์ บีตา-ออกซิเดชัน กระบวนการสังเคราะห์ PHAs และวัฏจักรเครปส์) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ เอซิลโคเอซินเทส จะแปรตามความเข้มข้นของไพรูวอเนต (รูปที่ 5.8) ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าว จะสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้ โดยที่เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดไพรูวอิกต่ำกว่า 50 พบว่าอัตราการผลิต 3HV จำเพาะมีค่าเพิ่มขึ้นที่ทุกค่า C/N เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์เอซิลโคเอซินเทสที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดไพรูวอิกสูงขึ้น แต่เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดไพรูวอิกสูงกว่า 50 จะพบว่าไพรูวอิลโคเอจะเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันเพิ่มขึ้นจึงทำให้อัตราการผลิต 3HV จำเพาะลดลง

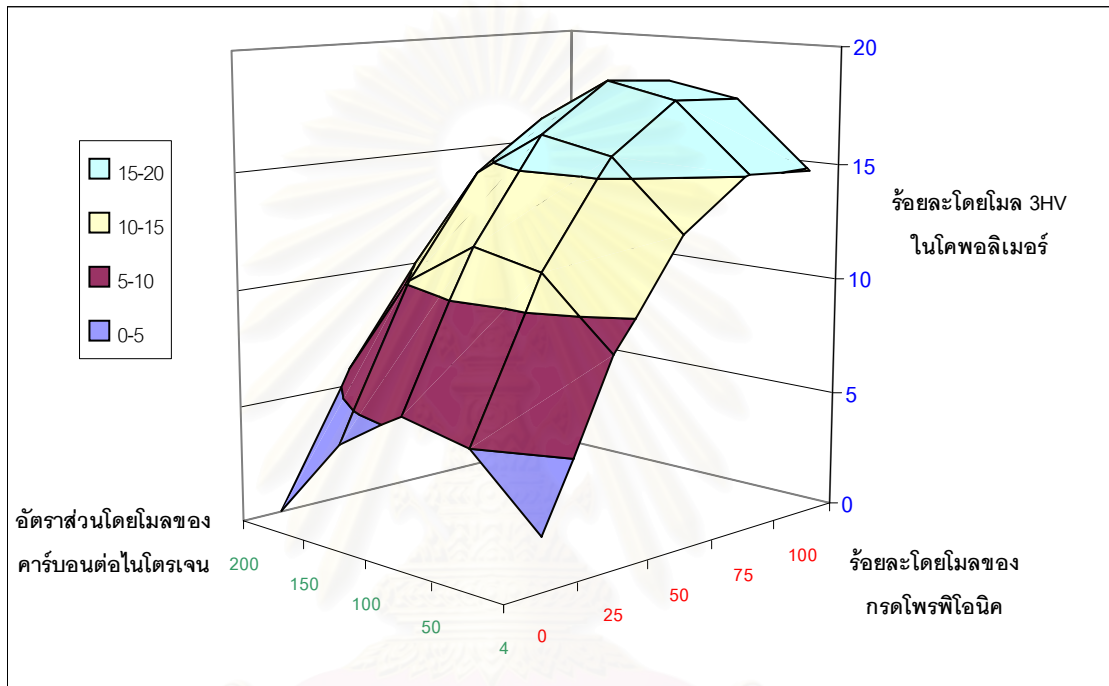


รูปที่ 5.8 ผลของความเข้มข้นของไพรูวอเนต และวาเลอเรตในการสะสม PHBV ใน *A.eutrophus* NCIMB11599 ต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์เอซิลโคเอซินเทส

(●) วาเลอเรต (□) ไพรูวอเนต (Lee และคณะ, 1995)

5.2.3.4 อิทธิพลที่มีต่อร้อยละ 3HV ในโคพอลิเมอร์

รูปที่ 5.9 แสดงอิทธิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิค ต่อร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์

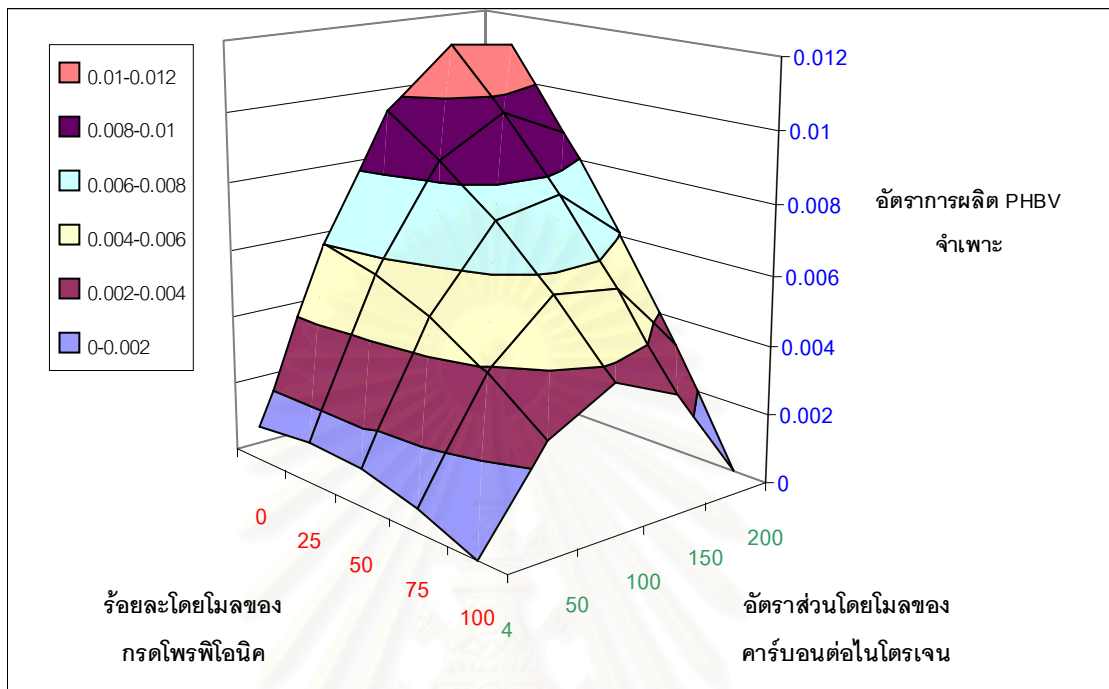


รูปที่ 5.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิคต่อร้อยละ 3HV ในโคพอลิเมอร์

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของค่า C/N ต่อร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์จะพบว่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์จะมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 17.84 และ 18.43 ที่ค่า C/N เท่ากับ 50 ถึง 100 และร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิคเท่ากับ 75 ซึ่งต่างจากผลงานวิจัยของ Shimizu และคณะ (1998) ซึ่งพบว่าที่ C/N ในช่วง 4 ถึง 12 จะให้ค่าร้อยละโดย

โมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์สูงสุด และงานวิจัยของ Doi, Y., (1990) ซึ่งพบว่าในการเพาะเลี้ยงด้วยฟรุกโตสและกรดเพนทาโนอิกพบว่าค่าร้อยละ 3HV ในโคพอลิเมอร์จะไม่ขึ้นกับค่า C/N โดยเมื่อพิจารณาผลการทดลองนี้ที่ค่า C/N เท่ากับ 4 จะมีค่าอัตราการใช้กรดโพธิโอนิกจำเพาะสูงกว่าที่ C/N เท่ากับ 50 และ 100 แต่ในทางตรงข้ามที่ค่า C/N เท่ากับ 4 กลับให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงกว่าที่ C/N เป็น 50 และ 100 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่ C/N เป็น 4 กรดโพธิโอนิกจะถูกใช้ในการผลิต ซึ่งมวลมากกว่าที่จะนำไปผลิตเป็น 3HV ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้กรดโพธิโอนิกซึ่งต่างไปจากงานวิจัยของ Shimizu และคณะ (1998) ที่ใช้กรดบิวทีริกและวาเลอริก และต่างไปจากงานวิจัยของ Doi, Y., (1990) ซึ่งใช้ฟรุกโตสและกรดเพนทาโนอิก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากรดอินทรีย์แต่ละชนิดจะมีผลต่อกระบวนการผลิตชีวมวล และกระบวนการผลิต PHAs ที่แตกต่างกัน

แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าในงานวิจัยของ Shimizu และคณะ (1998) พบว่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์จะมีค่ามากที่สุดที่ค่า C/N ในช่วง 4 ถึง 12 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า C/N ที่ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (ที่ C/N ในช่วง 4 – 8) โดยในงานวิจัยนี้พบว่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์จะมีค่ามากที่สุดที่ค่า C/N ในช่วง 50 – 100 ซึ่งเป็นค่า C/N ที่ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะที่ให้อัตราการผลิต PHBV จำเพาะที่มีค่าสูง (รูปที่ 5.10) คือค่า C/N ประมาณ 100 ถึง 150 ซึ่งที่ C/N ดังกล่าวในงานวิจัยพบว่าให้ร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์สูงสุด ซึ่งจะเป็นข้อดี กล่าวคือสามารถผลิตด้วยอัตราการผลิต PHBV จำเพาะ และร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ที่มีค่าสูงไปได้พร้อมกัน ซึ่งการที่ร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ที่มีค่าสูงนี้จะทำให้คุณสมบัติทางฟิสิกส์ของพอลิเมอร์ที่ดีขึ้นดังที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.1



รูปที่ 5.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนไดออกไซด์ในไตรเจน และร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิก ต่ออัตราการผลิต PHBV จำเพาะ

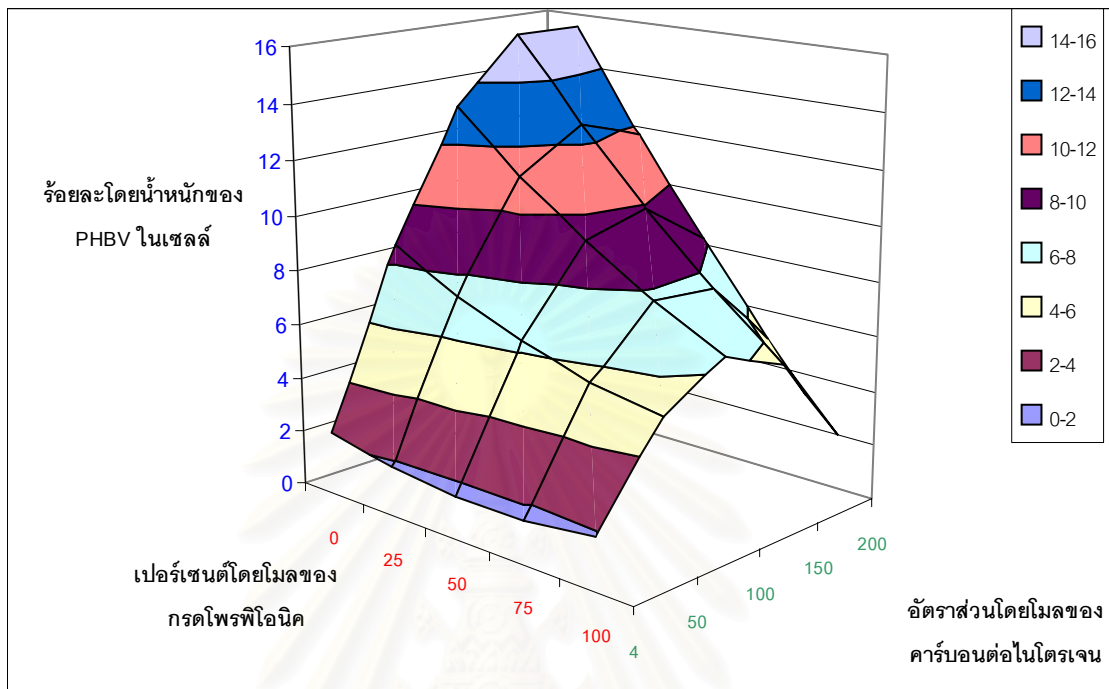
เมื่อพิจารณาอิทธิพลของค่าร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิกต่อร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ จะพบว่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ จะมีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 85 และ 77 เปอร์เซ็นต์ เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิกเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 75 ที่ค่า C/N เท่ากับ 4 และ 150 ตามลำดับ แต่เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิกสูงกว่า 75 พบว่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์จะมีค่าใกล้เคียงกับที่ร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิกเป็น 75 ซึ่งคาดว่าเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์เอสซิลโคเอที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดโพรฟิโอนิกเพิ่มขึ้นซึ่งทำให้โพรฟิโอนิลโคเอจะเข้าสู่กระบวนการผลิตอะซิติกโคเอ

ชีวมวล และ พลังงานเพิ่มขึ้น ทำให้ได้หน่วยของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ลดลงดังอธิบายไว้ในหัวข้อ 5.2.3.3 ดังนั้นเมื่อต้องการ เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 ให้ได้ปริมาณร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์สูงสุดจึงควรเพาะเลี้ยงในสภาวะค่า C/N เท่ากับ 100 และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 75 โดยไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงในกรดโพรพิโอนิกแต่เพียงอย่างเดียว ซึ่งนอกจากจะให้ค่าร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกใกล้เคียงกันแล้ว ยังจะได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์สูงกว่าถึงร้อยละ 50 ที่ C/N เท่ากับ 100 นี้

เมื่อพิจารณาผลการทดลองพบว่าให้ค่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์สูงสุดประมาณร้อยละ 18 โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ C/N = 100 และร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 75 ซึ่งจากงานวิจัยของ Byrom, D., (1987 , 1992 และ 1994) พบว่าจะได้ร้อยละโดยโมลของ 3HV สูงสุดประมาณร้อยละ 24 ถึง 30 เมื่อเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ด้วยกรด โพรพิโอนิกเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ในขณะที่ Doi ,Y., (1990) พบว่าจะได้ร้อยละโดยโมลของ 3HV สูงสุดประมาณร้อยละ 40 เมื่อเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ด้วยกรดโพรพิโอนิก ที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง

5.2.3.5 อิทธิพลที่มีต่อร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์

รูปที่ 5.11 แสดงอิทธิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิก ต่อร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์



รูปที่ 5.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อ

ไนโตรเจน และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิก ต่อร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์

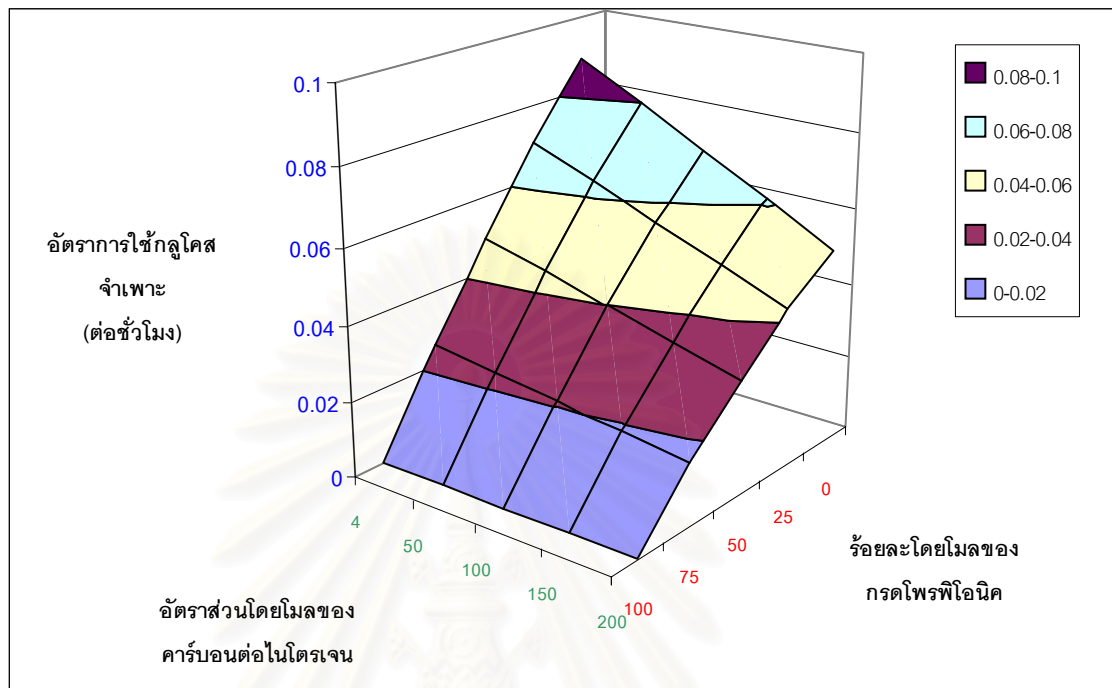
เมื่อพิจารณาอิทธิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่อร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์ จากการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคสแต่เพียงอย่างเดียว พบว่าค่าร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้น โดยจะเพิ่มขึ้นประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์เมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้นจาก 4 เป็น 200 แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีกรดโพรพิโอนิกเพิ่มสูงขึ้นจะพบว่าค่า C/N ที่ให้ค่าร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์จะเปลี่ยนไปกล่าวคือในช่วงร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่ำกว่า

พบว่าค่า C/N ที่ให้ร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์สูงสุดคือที่ 150 และในช่วงร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโธนิคสูงกว่า 50 พบว่าค่า C/N ที่ให้ค่าร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์สูงสุดคือที่ C/N เท่ากับ 100 โดยที่ C/N เท่ากับ 200 จะให้ค่าร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ต่ำสุด ซึ่งในสภาวะดังกล่าวจุลินทรีย์จะมีการเจริญเติบโตต่ำที่สุดและจากงานวิจัยของ Shimizu และคณะ (1998) ซึ่งพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีการจำกัดไนโตรเจนมากเกินไป (C/N มากกว่า 100) พบว่าเอนไซม์ต่างๆในวิถีสังเคราะห์บีตา-ออกซิเดชัน และกระบวนการสังเคราะห์ PHAs จะมีกิจกรรมที่ลดลง จึงทำให้เมื่อค่า C/N สูงขึ้นร้อยละของโคพอลิเมอร์ในเซลล์จึงมีค่าลดลง

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโธนิคต่อร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์ พบว่าร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์จะมีค่าลดลงประมาณ 35 และ 85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโธนิคเพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 100 ที่ค่า C/N เท่ากับ 50 และ 100 ตามลำดับ ซึ่งจากงานวิจัยของ Lee และคณะ (1994) พบว่าร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์จะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของโพธิโธเนตเพิ่มขึ้น

5.2.3.6 อิทธิพลที่มีต่ออัตราการอัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ

รูปที่ 5.12 แสดงอิทธิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโธนิค ต่ออัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ



รูปที่ 5.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิก ต่ออัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของค่า C/N ต่ออัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ ซึ่งจากการทดลองพบว่าอัตราการใช้กลูโคสจำเพาะจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อค่า C/N ลดลง โดยอัตราการใช้กลูโคสจำเพาะจะเพิ่มขึ้นประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์เมื่อ C/N ลดลงจาก 200 เป็น 4 ซึ่งในการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงจะพบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจะมีค่าสูง (รูปที่ 5.5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่ปริมาณไนโตรเจนสูงนี้กลูโคสจะถูกนำไปใช้สำหรับการผลิตชีวมวลมากกว่าการนำไปผลิตเป็น PHBV (รูปที่ 5.10)

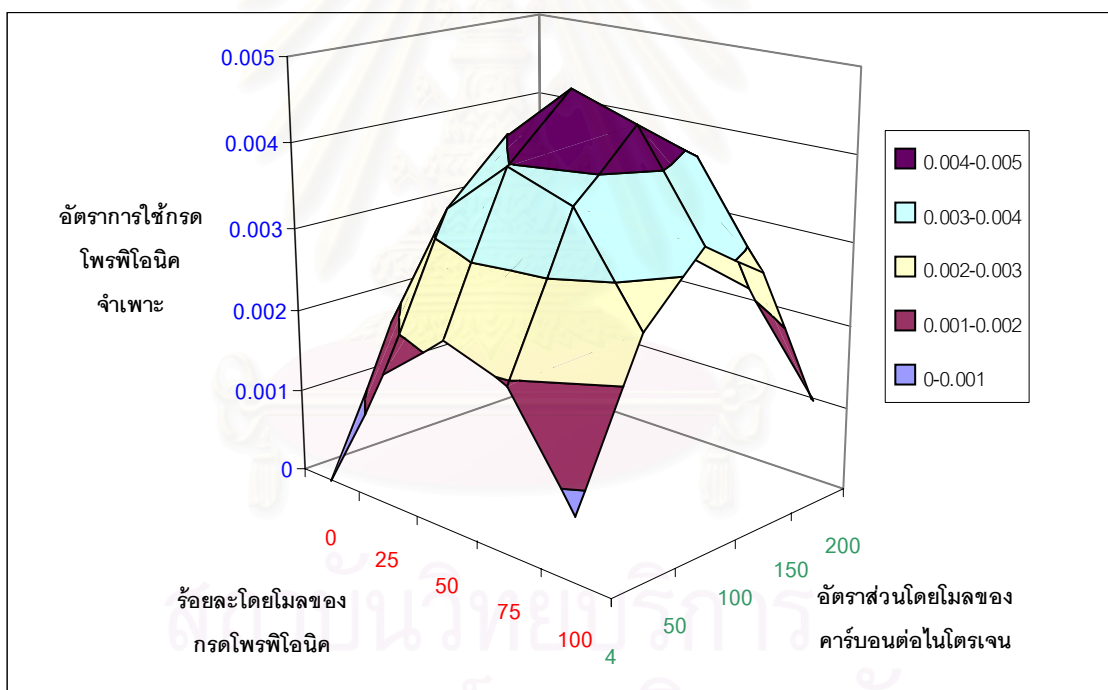
เมื่อพิจารณาอิทธิพลของร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิคต่ออัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ จากการทดลองพบว่าเมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิคเพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 100 พบว่าอัตราการใช้กลูโคสจำเพาะจะลดลงอย่างเป็นเส้นตรง โดยจะลดลงประมาณ 84 และ 98 เปอร์เซ็นต์ที่ค่า C/N เป็น 4 และ 200 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าอัตราการใช้กลูโคสจำเพาะจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของกลูโคสในถังหมัก

นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่าอัตราการใช้กลูโคสจำเพาะจะมีค่าสูงสุดที่สภาวะ C/N เท่ากับ 4 และเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพรพิโอนิคเท่ากับ 0 โดยพบว่าค่าอัตราการใช้กลูโคสจำเพาะที่สภาวะดังกล่าวจะมีค่าสูงกว่าที่สภาวะ $C/N = 50$ ที่เปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพรพิโอนิคค่าเดียวกันซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตสูงสุด โดยจะมีค่าอัตราการใช้กลูโคสจำเพาะสูงกว่าประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่สภาวะ C/N เท่ากับ 4 และเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพรพิโอนิคเท่ากับ 0 อาจเป็นไปได้ว่าเมื่อจุลินทรีย์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากแท่งสั้นไปเป็นสายยาวอาจจะต้องการกลูโคสจำนวนมากกว่ากลูโคสที่ใช้ในการเจริญเติบโตในกรณีที่เป็นแท่งสั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2.3.7 อิทธิพลที่มีต่ออัตราการใช้กรดโพรฟิโอนิคจำเพาะ

รูปที่ 5.13 แสดงอิทธิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิค ต่ออัตราการใช้กรดโพรฟิโอนิคจำเพาะเมื่อพิจารณาอิทธิพลของค่า C/N ต่ออัตราการใช้กรดโพรฟิโอนิคจำเพาะพบว่าจะคล้ายกับอิทธิพลของค่า C/N ต่ออัตราการใช้กรดโพรฟิโอนิคซึ่งจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นประมาณ 13 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้นจาก 4 ถึง 100 ที่ร้อยละโดยโมลของ



รูปที่ 5.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิค ต่ออัตราการใช้กรดโพรฟิโอนิคจำเพาะ

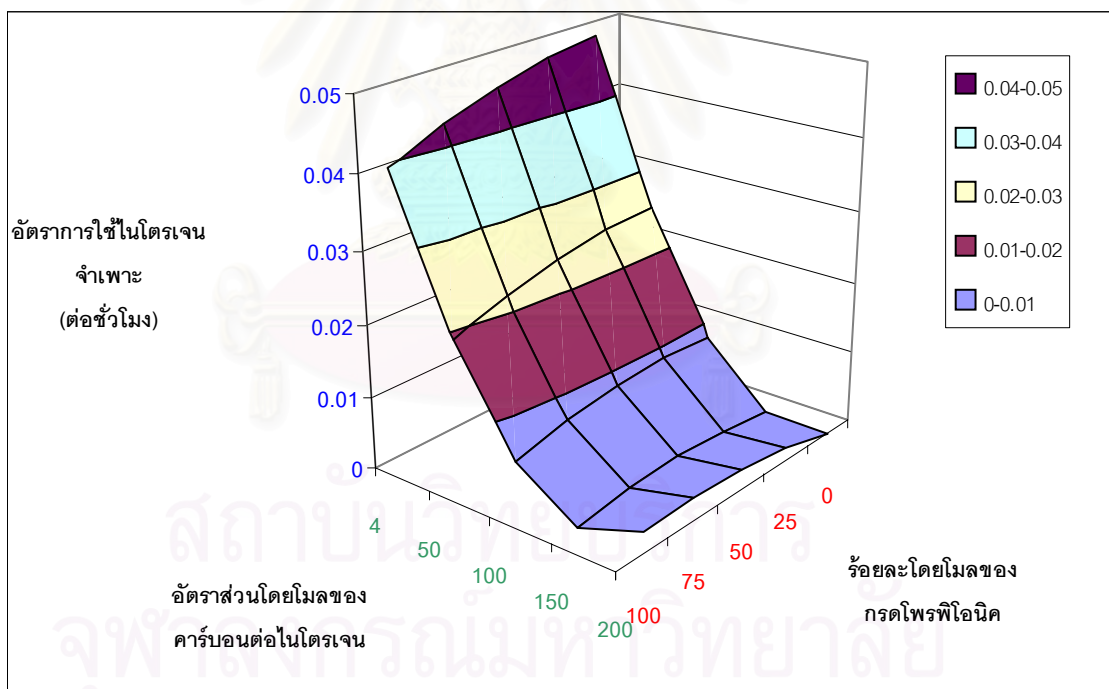
กรดโพธิโชนิกเท่ากับ 25 และ 100 ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าสอดคล้องกับอัตราการผลิต 3HV จำเพาะเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราการผลิต 3HV จำเพาะ จะขึ้นกับอัตราการใช้กรดโพธิโชนิกจำเพาะ นอกจากนี้อิทธิพลของค่า C/N ต่ออัตราการใช้กรดโพธิโชนิกจำเพาะยังสามารถยืนยันงานวิจัยของ Shimizu และคณะ (1998) ได้ว่าไนโตรเจนในวิถีสังเคราะห์ใบตาออกซีเดชันจะมีกิจกรรมลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการขาดแคลนไนโตรเจนมากเกินไป

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโชนิกต่ออัตราการใช้กรดโพธิโชนิกจำเพาะ จะพบว่าคล้ายคลึงกับอิทธิพลของค่า C/N ต่ออัตราการผลิต 3HV จำเพาะเช่นกัน โดยอัตราการใช้กรดโพธิโชนิกจำเพาะจะมีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 95 และ 60 เปอร์เซ็นต์เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโชนิกเพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 75 ที่ค่า C/N เท่ากับ 0 และ 200 ตามลำดับ โดยที่ร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโชนิกเท่ากับ 75 จะให้ค่าอัตราการใช้กรดโพธิโชนิกจำเพาะสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการผลิต 3HV จำเพาะที่จะให้ค่าสูงสุดที่ร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโชนิกเท่ากับ 75 ด้วยเช่นกัน แต่เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโชนิกสูงกว่า 75 กลับพบว่าค่าอัตราการใช้กรดโพธิโชนิกจำเพาะจะมีค่าลดลงประมาณ 60 และ 35 เปอร์เซ็นต์เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโชนิกเพิ่มขึ้นจาก 75 ถึง 100 ซึ่งจากงานวิจัยของหยาดฝน (2542) พบว่าอัตราการใช้สารอาหารคาร์บอนของจุลินทรีย์จะขึ้นกับอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณของจุลินทรีย์ ซึ่งในสภาวะดังกล่าวจะเป็นสภาวะที่มีอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณ จุลินทรีย์ต่ำสุด จึงทำให้จุลินทรีย์ต้องการใช้กรดโพธิโชนิกที่ลดลงด้วย

5.2.3.7 อิทธิพลที่มีต่ออัตราการใช้ในโทรเจนจำเพาะ

รูปที่ 5.14 แสดงอิทธิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิค ต่ออัตราการใช้ในโทรเจนจำเพาะ

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของค่า C/N ต่ออัตราการใช้ในโทรเจนจำเพาะพบว่าที่ $C/N = 4$ จะให้อัตราการใช้ในโทรเจนสูงสุด โดยอัตราการใช้ในโทรเจนจำเพาะจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้นโดยลดลงประมาณ 73 และ 90 เปอร์เซ็นต์เมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้นจาก 4 เป็น 200 ที่เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 5.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อ

ไนโตรเจน และร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิค ต่ออัตราการใช้ในโทรเจนจำเพาะ

โดยโมลของกรดโพรพิโอนิกเป็น 0 และ 50 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอัตราการใช้นิโตรเจนจำเพาะขึ้นกับความเข้มข้นของไนโตรเจนที่อยู่ในถังปฏิกรณ์ โดยไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปในการทำกิจกรรมต่างๆของเซลล์จะมีปริมาณที่แตกต่างกัน เช่นที่ $C/N = 50$ เซลล์จะใช้แหล่งคาร์บอนไปในการผลิตชีวมวล มากกว่าการผลิต PHAs ดังแสดงในผลการทดลองรูปที่ 5.5 เมื่อพบว่าที่ C/N เท่ากับ 50 จุลินทรีย์ *A.eutrophus* NCIMB11599 จะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด โดยคาดว่าในกระบวนการผลิตชีวมวลจำเป็นต้องใช้นิโตรเจนเป็นปริมาณสูงจึงทำให้ที่ C/N ดังกล่าวมีค่าอัตราการใช้นิโตรเจนจำเพาะสูง แต่ที่เมื่อเซลล์ใช้แหล่งคาร์บอนไปในการผลิต PHAs ซึ่งในกระบวนการดังกล่าวต้องจำกัดปริมาณไนโตรเจน จึงทำให้อัตราการใช้นิโตรเจนจำเพาะมีค่าต่ำลงไปด้วย

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของค่าร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่ออัตราการใช้นิโตรเจนจำเพาะ จากการทดลองพบว่าเมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกมีค่าสูงขึ้นพบว่าอัตราการใช้นิโตรเจนจำเพาะจะมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้พบว่ามีค่าลดลงประมาณ 35 และ 70 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปอร์เซ็นต์โดยโมลกรดโพรพิโอนิกเพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 100 ที่ค่า C/N เป็น 4 และ 200 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นเหตุผลหนึ่งที่สนับสนุนว่ากรดโพรพิโอนิกจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์นำไปใช้ได้ยากกว่ากลูโคส กล่าวคือที่ค่า C/N เท่ากับ 4 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคสแต่เพียงอย่างเดียว พบว่าจุลินทรีย์จะใช้นิโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโตในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกรดโพรพิโอนิคร่วมกับกลูโคส ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อ 5.2.3.1

จากการทดลองพบว่าอัตราการใช้นิโตรเจนจำเพาะจะมีค่าสูงสุดที่สภาวะ C/N เท่ากับ 4 และเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 0 โดยพบว่าค่าอัตราการใช้นิโตรเจน

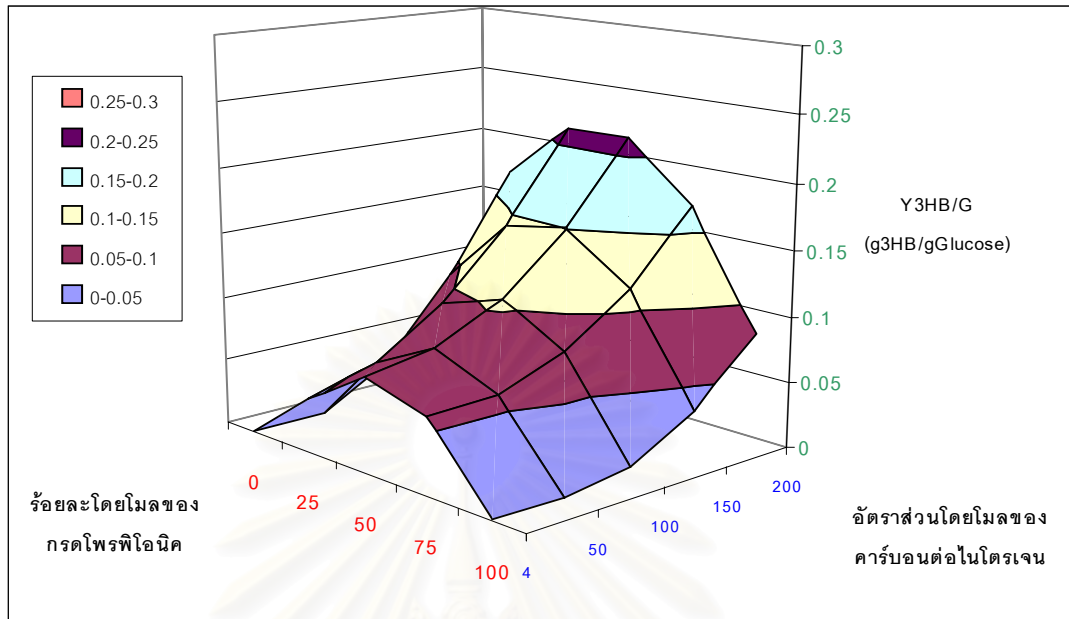
จำเพาะที่สภาวะดังกล่าวจะมีค่าสูงกว่าที่สภาวะ $C/N = 50$ ที่เปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพรฟิโอนิคค่าเดียวกันซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตสูงสุด โดยจะมีค่าอัตราการใช้น้ำไนโตรเจนจำเพาะสูงกว่าประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะพบว่าเป็นเช่นเดียวกับกลูโคส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่สภาวะ C/N เท่ากับ 4 และเปอร์เซ็นต์โดยโมลของกรดโพรฟิโอนิคเท่ากับ 0 ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากแท่งสั้นไปเป็นสายยาวจะต้องการไนโตรเจนจำนวนมากกว่าไนโตรเจนที่ใช้ในการเจริญเติบโตแบบแท่งสั้นตามปกติ

เมื่อพิจารณาที่ร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิคเท่ากับ 100 และค่า C/N ระหว่าง 100 ถึง 200 พบว่าจะให้ค่าอัตราการใช้น้ำไนโตรเจนต่ำที่สุด ทั้งนี้ที่สภาวะดังกล่าวควรจะให้อัตราการผลิต PHBV จำเพาะสูงสุด แต่กลับพบว่าไม่ได้ให้ค่าอัตราการผลิต PHBV จำเพาะสูงสุด โดยที่สภาวะที่ให้อัตราการผลิต PHBV จำเพาะสูงสุดคือที่ $C/N = 150$ ร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิคเท่ากับ 0 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าอัตราการผลิต PHBV จำเพาะนอกจากจะขึ้นกับค่า C/N แล้ว ยังต้องพิจารณาร่วมกับร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิคด้วย

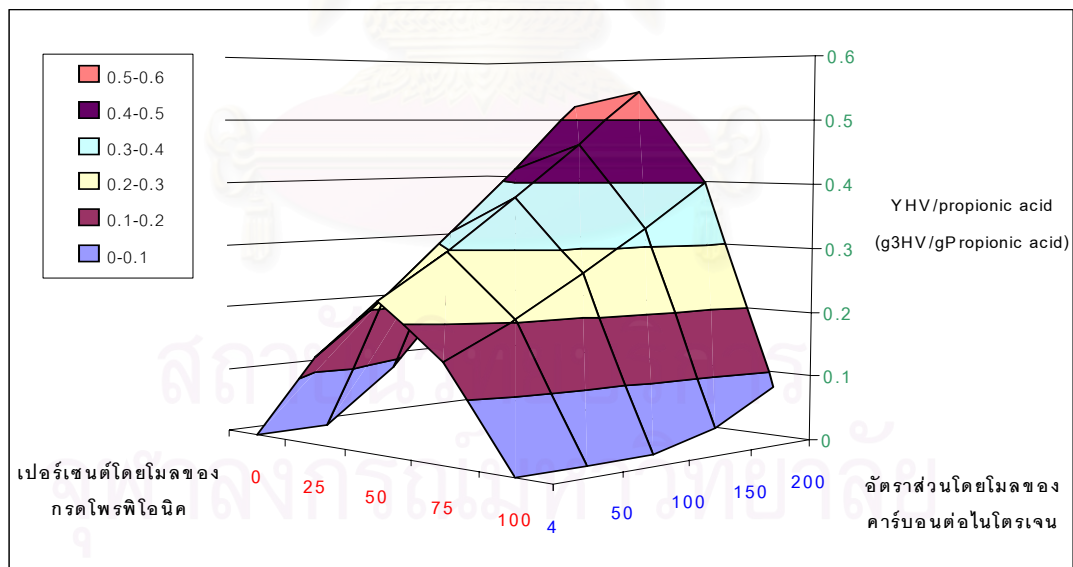
5.2.3.8 อิทธิพลที่มีต่อผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส และผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรฟิโอนิค

รูปที่ 5.15 และ 5.16 แสดงอิทธิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิค ต่อผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส และต่อผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรฟิโอนิค ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของค่า C/N ต่อผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส และต่อผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรฟิโอนิค จากการทดลองพบว่าเมื่อ C/N เพิ่มขึ้น ผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส และผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรฟิโอนิคจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคสจะเพิ่มขึ้นประมาณ 80 และ 95 เปอร์เซ็นต์เมื่อ C/N เพิ่มขึ้นจาก 4 เป็น 200 ที่ร้อยละ



รูปที่ 5.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนไดออกไซด์ไนโตรเจน และร้อยละโดยโมลของกรดไพรูวิก ต่อ ผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส



รูปที่ 5.16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนไดออกไซด์ไนโตรเจน และร้อยละโดยโมลของกรดไพรูวิก ต่อ ผลได้ของ 3HV ต่อกรดไพรูวิก

โดยโมลของกรด โพรพิโอนิกเป็น 25 และ 75 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้นอะซิติกโคเอ ที่เกิดจากกลูโคสจะเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ 3HB มากกว่าเข้าสู่กระบวนการผลิตชีวมวลซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 5.5 และ 5.6 ซึ่งพบว่าที่ค่า C/N เท่ากับ 200 จะมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุด แต่จะมีอัตราการผลิต 3HB จำเพาะสูงที่สุด และเมื่อพิจารณาผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรพิโอนิก พบว่าเมื่อ C/N เพิ่มขึ้นผลได้ของ 3HV ต่อ กรดโพรพิโอนิกจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกันซึ่งสอดคล้องกับอัตราการผลิต 3HV จำเพาะที่เพิ่มขึ้นเมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้น โดยผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรพิโอนิกจะเพิ่มขึ้นประมาณ 70 และ 62 เปอร์เซ็นต์ เมื่อ C/N เพิ่มขึ้นจาก 4 เป็น 200 ที่ร้อยละโดยโมลของกรด โพรพิโอนิกเป็น 25 และ 75 ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shimizu และคณะ (1998) ซึ่งพบว่าที่ค่า C/N สูงกว่า 75 ค่าผลได้ของ PHBV ต่อกรดอินทรีย์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

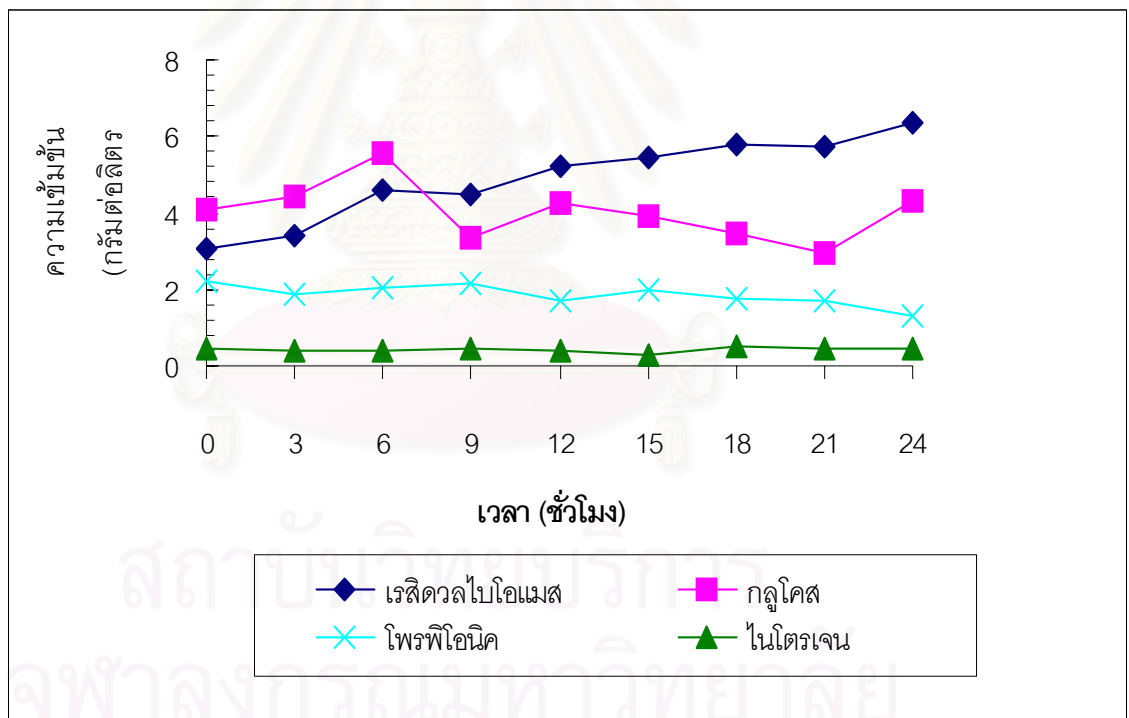
เมื่อพิจารณาอิทธิพลของร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่อผลได้ของ 3HB ต่อ กลูโคสพบว่าในช่วงร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่ำกว่า 50 ผลได้ของ 3HB ต่อ กลูโคสจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นประมาณ 40 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อร้อยละโดยโมลของกรด โพรพิโอนิกเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 50 ที่ค่า C/N เป็น 4 และ 200 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโพรพิโอนิกโคเอจะเข้าสู่กระบวนการผลิต 3HB ด้วยตลอดที่ทุกค่า C/N เนื่องจาก ปริมาณของกลูโคสจะลดต่ำลงเมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกเพิ่มขึ้น แต่ในขณะที่ 3HB ที่ได้จากอะซิติกโคเอที่ได้จากกลูโคส และการเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของโพรพิ โอนิกโคเอ ยังคงมีค่าสูงอยู่ดังนั้นจึงทำให้เสมือนว่าผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคสจึงมีแนวโน้ม เพิ่มขึ้น และเมื่อร้อยละโดยโมลของกรด

โพรฟิโอนิคสูงกว่า 50 พบว่าผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคสจะมีแนวโน้มลดลง โดยเมื่อพิจารณา ร่วมกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการผลิต 3HB จำเพาะ และอัตราการใช้กลูโคส จำเพาะ จะพบว่าค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ต่างๆดังกล่าวจะมีแนวโน้มลดลงที่สภาวะ ดังกล่าวด้วยเช่นกัน อาจเป็นไปได้ว่าเมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิคสูงกว่า 50 กรดโพรฟิโอนิคจะถูกใช้เพื่อการดำรงชีพมากขึ้นโดยจุลินทรีย์จำเป็นต้องนำกรดโพรฟิโอนิคมาผลิตเป็นพลังงานโดยการผ่านวิถีสังเคราะห์พีตา-ออกซิเดชัน ทั้งนี้พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (1993) และ (1994) ซึ่งพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *A.eutrophus* NCIMB11599 ด้วย โพรฟิโอนิคความเข้มข้นสูงเอนไซม์เอซิลโคเอซินเทสจะมีกิจกรรมสูงขึ้นทำให้เกิดการสังเคราะห์พลังงานโดยผ่านวิถีสังเคราะห์พีตา-ออกซิเดชัน และวัฏจักรเครปส์มากขึ้น

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิคต่อผลได้ของ 3HV ต่อกรด โพรฟิโอนิค จากการทดลองพบว่าในช่วงร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิคต่ำกว่า 50 ผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรฟิโอนิคจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นประมาณ 40 และ 56 เปอร์เซ็นต์ เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิคเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 50 ที่ค่า C/N เป็น 4 และ 200 ตามลำดับ เนื่องจากโพรฟิโอนิคโคเอจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นและเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ 3HV เพิ่มขึ้น แต่เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิคสูงกว่า 50 พบว่าผลได้ของ 3HV ต่อกรด โพรฟิโอนิคจะมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกับผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส เนื่องจากอิทธิพลของกิจกรรมของเอนไซม์เอซิลโคเอซินเทสที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดโพรฟิโอนิคเพิ่มสูง ทำให้กรดโพรฟิโอนิคถูกใช้นำมาผลิตเป็นพลังงานเพื่อความอยู่รอดของเซลล์โดยผ่านวิถีสังเคราะห์พีตา-ออกซิเดชันและ วัฏจักรเครปส์เพิ่มขึ้นดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว

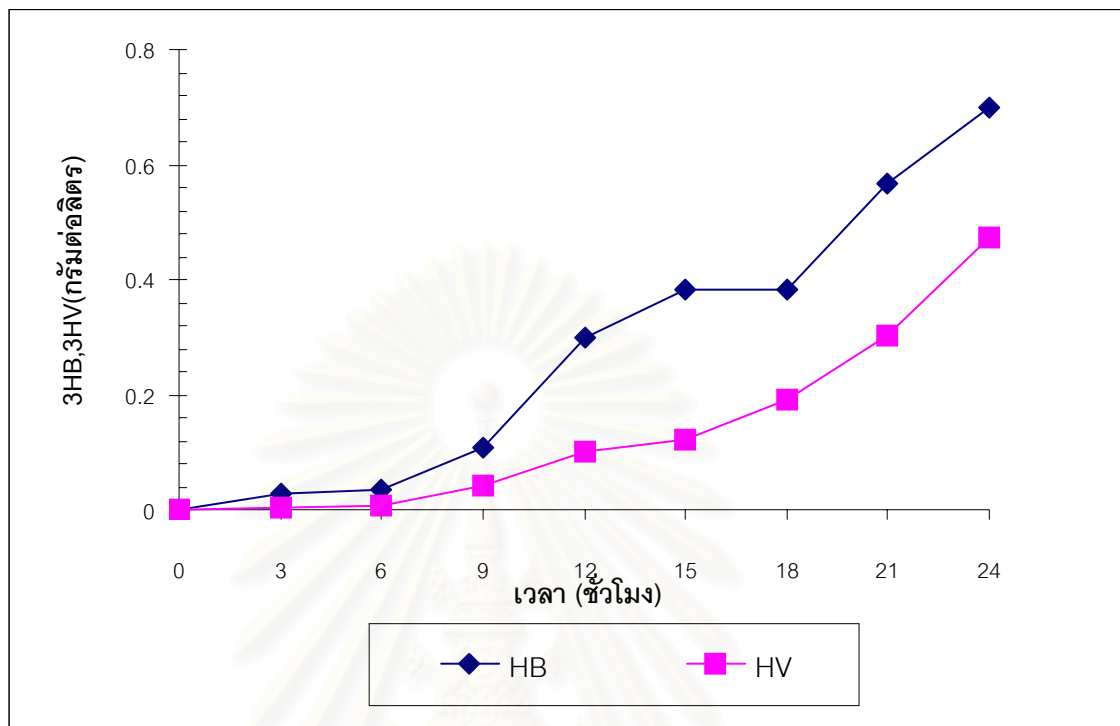
5.3 อิทธิพลของโมลอะตอมคาร์บอนต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นการเปรียบเทียบอิทธิพลของปริมาณโมลอะตอมคาร์บอนทั้งหมด (total mole carbon) ที่มีต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องที่สภาวะที่มีโมลอะตอมคาร์บอนทั้งหมดในถังหมักเพิ่มขึ้นจากเดิมที่มีค่าโมลอะตอมคาร์บอนเท่ากับ 0.081 กรัมโมลอะตอมคาร์บอนต่อลิตร เป็นที่ 0.44 กรัมโมลอะตอมคาร์บอนต่อลิตร โดยควบคุมได้ค่า C/N เท่ากับ 70 และร้อยละโดยโมลกรดโพธิ์อินิกเท่ากับ 45 ดังแสดงในรูปที่ 5.17 (ก) และ 5.17 (ข)



รูปที่ 5.17(ก) ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 ในอาหารสูตร

สังเคราะห์ที่มีโมลอะตอมคาร์บอนเท่ากับ 0.44



รูปที่ 5.17(ข) ผลการเพาะเลี้ยง *A.eutrophus* NCIMB11599 ในอาหารสูตรสังเคราะห์
ที่โมลอะตอมคาร์บอนเท่ากับ 0.44

ตารางที่ 5.2 แสดงการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางจุลณพลศาสตร์ที่ได้จากการ
เพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 ในอาหารสูตรสังเคราะห์ที่โมลอะตอม
คาร์บอนเท่ากับ 0.44 ที่สภาวะ C/N เท่ากับ 70 และร้อยละโดยโมลของกรดโพธิอินิคเท่ากับ
45 กับค่าพารามิเตอร์ทางจุลณพลศาสตร์ที่ได้จากสมการความสัมพันธ์ที่โมลอะตอมคาร์บอน
เท่ากับ 0.081 ที่สภาวะ C/N เท่ากับ 70 และ ร้อยละโดยโมลของกรดโพธิอินิคเท่ากับ

ตารางที่ 5.2 เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A.eutrophus* NCIMB11599

ที่โมลอะตอมคาร์บอน 0.081 และ 0.44

ค่าพารามิเตอร์	ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการทดลอง ที่โมลอะตอมคาร์บอน 0.44 ⁽ⁿ⁾	ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการ พยากรณ์ที่ โมลอะตอมคาร์บอน 0.081 ^(m)
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ	0.0285	0.14
อัตราการผลิต 3HB จำเพาะ	0.0059	0.0034
อัตราการผลิต 3HV จำเพาะ	0.0036	0.0017
ร้อยละ 3HV ในโคพอลิเมอร์	23.5	15.65
ร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์	18.51	8.04

ความเข้มข้นเฉลี่ย

(ก) กลูโคส 4.04 กรัมต่อลิตร กรดไพรูวิก 1.86 กรัมต่อลิตร ไนโตรเจน 0.423 กรัมต่อลิตร

ค่า C/N เท่ากับ 70 ร้อยละโดยโมลกรดไพรูวิก 45

(ข) พยากรณ์ที่ค่า C/N เท่ากับ 70 และร้อยละโดยโมลกรดไพรูวิก 45

ทั้งนี้พบว่าค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ที่โมลอะตอมคาร์บอนเท่ากับ 0.44 จะให้

ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์สูงกว่าที่โมลอะตอมคาร์บอนเท่ากับ 0.081 ดังนี้

- อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เพิ่มขึ้นประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์
- อัตราการผลิต 3HB จำเพาะ เพิ่มขึ้นประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์
- อัตราการผลิต 3HV จำเพาะ เพิ่มขึ้นประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์
- ร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ เพิ่มขึ้นประมาณ 23.5 เปอร์เซ็นต์
- ร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์ เพิ่มขึ้นประมาณ 16 เปอร์เซ็นต์

ทั้งนี้พบว่าค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโต และการผลิต PHBV ของ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 นอกจากจะขึ้นกับค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกแล้ว ยังพบว่าจะขึ้นกับค่าโมลอะตอมคาร์บอนอีกด้วย

5.4 สภาวะที่ให้ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์สูงสุด (การหาค่าสูงสุดอยู่ในภาคผนวก ข6)

5.4.1 สภาวะที่ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด

ค่า C/N เท่ากับ 37.7

ร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 17

5.4.2 สภาวะที่ให้ค่าอัตราการผลิต 3HB จำเพาะสูงสุด

ค่า C/N เท่ากับ 200

ร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 0

5.4.3 สภาวะที่ให้ค่าอัตราการผลิต 3HV จำเพาะสูงสุด

ค่า C/N เท่ากับ 124

ร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 68.7

5.4.4 สภาวะที่ให้ค่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์สูงสุด

ค่า C/N เท่ากับ 86.7

ร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 85.4

5.5 บทสรุปการวิเคราะห์ผลการทดลอง

จากการทดลองทั้งสิ้นจำนวน 13 การทดลองที่ได้จากการกำหนดค่าตัวแปรที่สนใจอันได้แก่ค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโพนิก ในตำแหน่งของการทดลองที่ได้จากวิธีการออกแบบการทดลอง (Experimental design) แล้วนั้น เมื่อนำวิธีเซอร์เฟสเรสปอนส์ (Surface response) มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวแปรที่สนใจต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ในรูปสมการความสัมพันธ์แบบควอดราติกอันดับ 2 และในรูปแบบกราฟ จะทำให้สามารถวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรที่สนใจต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ได้อย่างครอบคลุมและสามารถพยากรณ์สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิต PHBV ได้

5.5.1 อิทธิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโพนิกต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ในทางทฤษฎี

5.5.1.1 อิทธิพลของค่า C/N ต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ในทางทฤษฎี

1. ค่า C/N ที่ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์สูงสุดจะมีค่าประมาณค่า C/N ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ (ค่า C/N ที่เป็นองค์ประกอบเซลล์ของ *Alcaligenes eutrophus* มีค่าประมาณ 4 ถึง 8)
2. เมื่อทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีค่า C/N ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าสูง ในขณะที่อัตราการผลิต 3HB จำเพาะมีค่าต่ำเนื่องจากอะซิติลโคเอนเข้าสู่วัฏจักรเครปส์เพื่อผลิตพลังงาน และชีวมวล จึงทำให้ผลได้ของ 3HB ต่อกลูลโคส ร้อยละโดยน้ำหนักของ

โคพอลิเมอร์ในเซลล์มีค่าต่ำ แต่จะให้ร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์มีค่าสูง

3. เมื่อทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีค่า C/N ที่เหมาะสมต่อการผลิต

PHAs (ค่า C/N มากกว่า 100) อะซิติกโคเอที่เข้าสู่วัฏจักรเครปส์ลดลง คาร์บอนฟลักซ์ (carbon flux) จึงเข้าสู่วิถีสังเคราะห์ PHAs จึงทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าต่ำใน ขณะที่อัตราการผลิต 3HB จำเพาะจะมีค่าเพิ่มขึ้น และ อัตราการผลิต 3HV จำเพาะยังคงมีค่าเท่าเดิม จึงทำให้ในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัดผลได้ของ 3HB ต่อกลูลโคส และร้อยละโดยน้ำหนักของโคพอลิเมอร์ในเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้น และร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์จึงมีค่าลดลง

5.5.2 อิทธิพลของร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิคต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ในทางทฤษฎี เป็นดังต่อไปนี้

ในทางทฤษฎีแล้วค่าร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิคจะมีผลต่อคาร์บอนฟลักซ์ ที่เข้าสู่วิถีสังเคราะห์ 3HV ทั้งนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีกรดโพรพิโอนิคแต่เพียงอย่างเดียว ควรจะให้ค่าอัตราการผลิต 3HV จำเพาะ ผลได้ของ 3HV ต่อกกรดโพรพิโอนิคและร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์มีค่าสูงสุดเนื่องจากกรดโพรพิโอนิคจะเกิดปฏิกิริยากลายเป็นโพรพิโอนิลโคเอซึ่งเนื่องจากเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ 3HV

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับทฤษฎีดังกล่าวข้างต้นจะพบว่าอิทธิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิคที่มีอิทธิพลต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์จะพบว่ามีความสอดคล้องและแตกต่างกันดังนี้

1. ค่า C/N ที่ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดของ *A.eutrophus* NCIMB11599 คือ C/N เท่ากับ 37.7 ซึ่งไม่สอดคล้องกับค่า C/N ในองค์ประกอบของเซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากในสภาวะที่มีไนโตรเจนในน้ำหมักมากเกินไป (C/N ต่ำกว่า 30) จะทำให้จุลินทรีย์เปลี่ยนรูปร่างจากแท่งสั้นกลายเป็นสายยาว
2. ค่า C/N ที่ให้ค่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์สูงสุดคือที่ C/N ระหว่าง 50 ถึง 100 ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีในแง่ ค่า C/N ที่ให้ค่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ใน โคพอลิเมอร์สูงสุดจะมีค่าใกล้เคียงกับค่า C/N ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์
3. อิทธิพลของค่าร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิคต่ออัตราการผลิต 3HV จำเพาะ และร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์จะไม่สอดคล้องกับทฤษฎีโดยจากการทดลองพบว่าเมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิคสูงกว่าร้อยละ 75 ค่าอัตราการผลิต 3HV จำเพาะ และร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์จะมีค่าลดลง เนื่องจากในรายงานการวิจัยของ Lee และคณะ (1994) พบว่าอาจเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของโพรพิโอนิคโคเอเจนกลายเป็นอะซีติลโคเอ จึงทำให้อัตราการผลิต 3HB จำเพาะ และร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์มีค่าลดลง

5.5.3 การพยากรณ์สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHBV

การพยากรณ์สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHBV นับเป็นสิ่งที่สำคัญเนื่องจากสามารถนำสมการความสัมพันธ์มาใช้พยากรณ์ได้ว่าเมื่อต้องการการผลิต PHBV ที่มีค่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ตามที่ต้องการ (คุณสมบัติทางฟิสิกส์ของ PHBV จะขึ้นกับ

ร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ดังที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 2.1) จะต้องทำการเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 ด้วยค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรด โพรพิโอนิกเป็นเช่นใด โดยจะได้ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์เป็นอย่างไร ซึ่งสามารถ นำเอาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ดังกล่าวมาใช้ในการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้ เหมาะสมต่อการผลิตได้ ซึ่งตารางที่ 5.3 แสดงตัวอย่างการนำสมการความสัมพันธ์ที่ได้จาก การออกแบบการทดลองมาใช้พยากรณ์หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHBV ที่มีค่าร้อยละ โดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ต่างๆกัน

ตารางที่ 5.3 ตัวอย่างการนำสมการความสัมพันธ์มาใช้พยากรณ์หาสภาวะที่เหมาะสมในการ ผลิต PHBV ที่มีค่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ต่างๆกัน

ร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์	ค่า C/N	ร้อยละโดยโมลของ กรดโพรพิโอนิก
0	50	0
5	150	25
10	200	25
15	200	50

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

1. อิทธิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

สามารถสรุปได้ดังนี้

1.1 ค่า C/N ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 37.7 โดยแตกต่างจากค่า C/N ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ซึ่งอาจเกิดจากในสภาวะที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนในน้ำหมักสูงมากเกินไปจะทำให้จุลินทรีย์เปลี่ยนรูปร่างจากแท่งสั้นไปเป็นสายยาว

1.2 *Alcaligenes eutrophus* NCIMB11599 สามารถเจริญเติบโตในกลูโคสได้ดีกว่าในกรดโพรพิโอนิก

2. อิทธิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่ออัตราการผลิต 3HB จำเพาะ อัตราการผลิต 3HV จำเพาะ อัตราการผลิต PHBV จำเพาะ และ ร้อยละโดยโมลของ 3HV

ในโคพอลิเมอร์ สามารถสรุปได้ดังนี้

2.1 อัตราการผลิต 3HB จำเพาะเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคสแต่เพียงอย่างเดียวจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อ C/N เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส ของ *A. eutrophus* NCIMB11599 ไม่ขึ้นกับค่า C/N แต่เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกเพิ่มขึ้นพบว่าอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะต่างๆ

และร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ ในช่วงแรกจะมีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากการจำกัดไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้เกิดการสังเคราะห์ PHAs ได้ แต่ถ้ามีการจำกัดไนโตรเจนมากเกินไปกลับเป็นการทำให้เอนไซม์ในวิถีสังเคราะห์พีตา – ออกซิเดชัน และกระบวนการสังเคราะห์ PHAs มีกิจกรรมลดลง ดังนั้นจึงทำให้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะต่างๆ และร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์มีค่าลดลง

2.2 อัตราการผลิต 3HB จำเพาะและอัตราการผลิต PHBV จำเพาะมีแนวโน้มลดลงเมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกเพิ่มขึ้น แต่อัตราการผลิต 3HV จำเพาะและ ร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อร้อยละโดยโมลของกรด โพรพิโอนิกเพิ่มขึ้น แต่เมื่อร้อยละของกรดโพรพิโอนิกสูงกว่า 75 จะพบว่าอัตราการผลิต 3HV จำเพาะจะลดลง และร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์จะมีค่าค่อนข้างคงที่ ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์เอซิลโคเอซินเทสของ *A.eutrophus* NCIMB11599 จะมีค่าสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกเพิ่มสูงขึ้น แต่โพรพิโอนิลโคเอกลับเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันกลายเป็นอะซิติลโคเอมากขึ้น

3 อิทธิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิกต่ออัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ อัตราการใช้กรดโพรพิโอนิกจำเพาะและอัตราการใช้ไนโตรเจนจำเพาะสามารถสรุปได้ดังนี้

3.1 อัตราการใช้กลูโคสจำเพาะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อค่า C/N ลดลง แสดงให้เห็นว่า

ปริมาณกลูโคสที่ใช้ในการผลิตชีวมวลจะมากกว่าปริมาณกลูโคสที่ใช้ในการสังเคราะห์ PHAs และอัตราการใช้กลูโคสจำเพาะจะลดลงเป็นเส้นตรงเมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโอนิคเพิ่มขึ้น

3.2 อัตราการใช้กรดโพธิโอนิคจำเพาะจะสอดคล้องกับอัตราการผลิต 3HV จำเพาะและร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์

3.3 อัตราการใช้ไนโตรเจนจำเพาะจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อค่า C/N ลดลง และอัตราการใช้ไนโตรเจนจำเพาะจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อค่าร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโอนิคเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าอัตราการใช้ไนโตรเจนจำเพาะจะขึ้นกับอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

4 อธิพิพลของค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโอนิคต่อผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคสและผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพธิโอนิค สามารถสรุปได้ดังนี้

4.1 ผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้นเนื่องจากเมื่อมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนจะทำให้อะซิติกโคเอจากกลูโคสเข้าสู่กระบวนการผลิต 3HB ได้มากขึ้น และในช่วงร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโอนิคต่ำกว่า 50 พบว่าผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคสจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอยู่ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในสภาวะดังกล่าวโพธิโอนิคโคเอจะเข้าสู่กระบวนการผลิต 3HB ในขณะที่กลูโคสที่ใช้ในการหมักมีปริมาณที่ลดลง แต่เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโอนิคสูงกว่า 50 พบว่าโพธิโอนิคโคเอจะเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ 3HV เพิ่มมากขึ้นจึงทำให้ผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคสมีค่าลดลง

4.2 ผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรพิโอนิคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อค่า C/N เพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนจะทำให้โพรพิโอนิลโคเอจากกลูโคส เข้าสู่กระบวนการผลิต 3HV ได้มากขึ้น และในช่วงร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิคต่ำกว่า 50 พบว่าผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรพิโอนิคจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งสภาวะดังกล่าวโพรพิโอนิลโคเอจะมีปริมาณมากขึ้นทำให้เข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ 3HV ได้มากขึ้น แต่เมื่อร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิคสูงกว่า 50 พบว่าผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรพิโอนิคจะมีแนวโน้มลดลงเนื่องจากอิทธิพลของเอนไซม์เอซิลโคเอซินเทสที่เพิ่มขึ้นทำให้โพรพิโอนิลโคเอเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันกลายเป็นอะซีติลโคเอได้มากขึ้น

6.2 ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* NCIMN11599 เพื่อผลิต PHBV นอกจากค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิคจะเป็นตัวแปรที่สำคัญแล้ว ผู้วิจัยยังพบว่าปริมาณโมลอะตอมคาร์บอนยังเป็นตัวแปรที่สำคัญอีกตัวแปรหนึ่งด้วย ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปควรจะคำนึงถึงปริมาณโมลอะตอมคาร์บอนด้วย
2. การออกแบบการทดลองที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรพิโอนิคต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้จะช่วยประหยัดเวลาและทรัพยากรในการทำงาน อีกทั้งยังทำให้การรวบรวมข้อมูลทำได้อย่างครอบคลุมยิ่งขึ้น แต่จะเห็นว่าวิธีการออก

แบบการทดลองและการตรวจสอบความถูกต้องยังมีความยุ่งยากอยู่บ้าง แต่
ปัจจุบันมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่สามารถช่วยลดความยุ่งยากในการใช้งานการ
ออกแบบการทดลอง ทำให้สามารถใช้งานการออกแบบการทดลองได้สะดวกและลด
ความยุ่งยากไปได้มากนอกจากนี้ยังควรเพิ่มจุดการทดลองให้มากขึ้นซึ่งจะทำให้
สมการความสัมพันธ์ที่ได้จะมีความถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

พิมพ์ชนก นาคราช. การผลิตพอลิ-ปีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรตจาก *Alcaligenes eutrophus*

NCIMB11599 โดยการหมักแบบสองขั้นตอน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2542.

สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, วรสิทธิ์ ไทจำปา และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. วิศวกรรมเคมีชีวภาพ

พื้นฐาน 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544.

หยาดฝน มหาทรัพย์ไพบุลย์. จลนพลศาสตร์การผลิตพอลิปีตาไฮดรอกซีบิวทีเรตโดย

Alcaligenes eutrophus DSM 545. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542.

อรรถกร ปาละสุวรรณ. การสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ จากอาหารที่มีกลูโคสและ

ออกตาโนเอต โดย *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347. วิทยานิพนธ์ปริญญา

มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์

มหาวิทยาลัย, 2541.

ภาษาอังกฤษ

Alderete, J. E., Karl, D. W. and Park, C. H. Production of poly(hydroxybutyrate)

homopolymer and copolymer from ethanol and propanol in a Fed-

batch culture. Biotechnol. Prog. 9 (1993) : 520-525.

Braunegg, G., Lefebvre, G., Renner, G., Zeiser, A., Haage, G. and Loidl-Lanthaler, K.

Kinetics as a tool for polyhydroxyalkanoate production optimization. J. Microbiol. 41 (Suppl.1) (1995) : 239-248.

Braunegg, G., Lefebvre, G. and Genser, K. F. Review article Polyhydroxyalkanoates, Biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspect. J. Biotechnol. 65 (1998) : 127-161.

Byrom, D., 1987. Polymer Synthesis by Microorganism. Technology and Economic. Trends Biotechnol. 5 : 246-250.

Byrom, D., 1992. Production of poly- β -hydroxybutyrate : poly- β -hydroxyvalerate Copolymers. FEMS Microbiol. Rev. 103, 247-250.

Dobois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal. Chem. 28(3) : 350-356.

Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M., Soga, K., 1988b. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 330-334

Doi, Y. Microbial polyesters, Japan : VCH Publishers, Inc., (1990), New York.

Doi, Y., Kanesawa, Y., Kunioka, M., Saito, T., 1990b. Biodegradation of microbial copolyester : poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). Macromolecules. 23, 26-31.

- Gostomski, P. A. and Bungay, H. R. Effect of Glucose and NH_4^+ Levels on Poly(β -hydroxybutyrate) Production and Growth in a continuous Culture of *Alcaligenes eutrophus*. Biotechol. Prog. 12 (1996) : 234 – 239
- Hrabak, O., 1992. Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate. FEMS Microbiol. Rev. 103 : 251-255
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K. and Woo, S. I. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. Biotechnol. Bioeng. 43 (1994) : 892-898.
- Koyama, N., Doi, Y., 1993. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) From various carbon sources by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*. J. Environ. Polym. Degrad. 3 , 235-240.
- Koyama, N., Doi, Y., 1995. Continuous production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol. Lett. 17 , 281-284.
- Leaversuch, R. Industry weights the need to make polymer degradable. Mod. Plastics. 64 (1987) : 52-55.
- Lee, B., Pometto h, A. L., Fratzke, A., Bailey, T. B. 1991. Biodegradation of degradable Plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 678-685.

- Lee, L. Y., Nam, S. W., Choi, E. S. Chang, H. N. and Park, Y. H. Production of Poly- β -Hydroxybutyrate and Measurement of Related Enzyme Activities in *Alcaligenes eutrophus*. J. Ferment Bioeng. 76 (1993) : 416-418
- Lee, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Biotechnol. Bioeng. 49 (1995) : 1-14.
- Lee, S. Y., Choi, J. I. and Wong, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate Production by bacterial fermentation: mini-review. Int. J. Biol. Macromol. 25 (1999) : 31-36
- Myers, R.H. In 'Response Surface Methodology'. Eds:Allyn and Bacon. 1971. 27-175. Inc. Boston.
- Page, W. J., Manchak, J. and Rudy, B.,Production of poly- β -Hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD in media containing sugars and complex Nitrogen sources. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38(1992) : 117-121.
- Page, W. J. and Cornish, A., Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish Peptone medium and simplified extraction of poly- β -Hydroxybutyrate. Appl. Environ. Microbiol. 59(1993) : 4236-4244.
- Ramsay, B. A., Kanda L., Claude, C., Brigitte, D., Pierre, B. and Juliana A. R. Production of Poly(β -Hydroxybutyric-Co- β -Hydroxyvaleric) Acids. App. And Env. Micro. July (1990) : 2093-2098.
- Ryu, H. W., Hahn, S. K., Chang, Y. K., and Chang, H. N. Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by High Cell Density Fed-Batch Culture of *Alcaligenes*

- Eutrophus* with Phosphate Limitation. Biotechnol. Bioeng. 55 (1997) : 28-32.
- Senior, P. J., Beech, G.A., Ritchie, G.A.F., Dawes, E.A., 1972. The role of oxygen Limitation in the formation of poly- β -Hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. Biochem. J. 128, 1193-1201.
- Shimizu, H., Kozaki, Y., Kodama, H., Shioya, S., 1998, Maximum Production Strategy For Biodegradable Copolymer P(HB-co-HV) in Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus*. Biotechnol. Bioeng. 55 (1998) : 28-32.
- Suzuki, T., Yamane, Y. and Shimizu. S. Mass Production of poly- β -Hydroxybutyric Acid By Fed-Batch Culture with Controlled Carbon/Nitrogen Feeding. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24 (1986) : 370-374
- Suzuki, T., Yamane, Y. and Shimizu. S. Kinetics and Effect of Nitrogen Source Feeding on Production of poly- β -Hydroxybutyric Acid by Fed-Batch Culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23 (1986) : 366-369
- Weatherburn, M. W. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. Analytical Chemistry. 8(1967) : 971-974
- Yamane, T., Fukunaga, M. and Lee, Y. W. Increase PHB Productivity by High-Cell-Density Fed-Batch Culture of *Alcaligenes Latus*, a Growth-Associated PHB Producer. Biotechnol. Bioeng. 50 (1996) : 197-202.



ภาคผนวก ก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก1 กระบวนการวางแผนและออกแบบการทดลอง (Experimental Design)

การวางแผนและออกแบบการทดลองมีประโยชน์ในการช่วยลดจำนวนการทดลอง อีกทั้งยังทำให้การรวบรวมข้อมูลทำได้อย่างครอบคลุมยิ่งขึ้น วิธีการทางสถิติที่นำมาใช้ในการออกแบบและวิเคราะห์ผลการทดลองเป็นวิธีที่เรียกว่าเรสปอนส์เซอร์เฟซ (response surface) โดยข้อมูลจะอยู่ในรูปของสมการความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระที่สนใจ ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ ตัวแปรอิสระที่สนใจประกอบด้วย ค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (ξ_1) และ ค่าร้อยละโดยโมลของกรดโพธิอินิค (ξ_2) โดยผลของข้อมูลคือพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ที่สนใจเช่น อัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ (Y_1) อัตราการผลิต 3HB จำเพาะ (Y_2) และอัตราการผลิต 3HV จำเพาะ (Y_3) เป็นต้น ซึ่งในการทดลองนี้กำหนดช่วงของค่าตัวแปรอิสระของค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็น 4 ถึง 200 และค่าร้อยละโดยโมลของกรดโพธิอินิคเป็น 0 ถึง 100 เพื่อความสะดวกต่อการคำนวณ กำหนดค่าตัวแปรอิสระเป็น -1.414 ถึง 1.414 โดยอาศัยสมการที่ (ก1)

$$X_n = \frac{\xi_n - a}{b} \quad (\text{ก1})$$

เมื่อ X_n เป็นค่าของตัวแปรอิสระแต่ละตัว

ξ_n เป็นค่าจริงของตัวแปรอิสระ

a เป็นจุดกึ่งกลางของตัวแปรอิสระ

b เป็นช่วงกว้างที่ทำการทดสอบในแต่ละตัวแปร

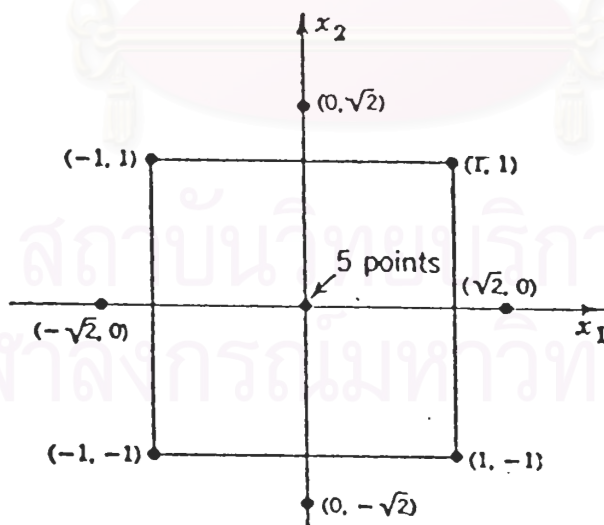
ดังนั้นสามารถแสดงค่าของตัวแปรอิสระของค่าอัตราส่วนโดยโมลของคาร์บอนต่อ

ไนโตรเจน และค่าร้อยละโดยโมลของกรดโพธิโธนิคได้เป็น

$$x_1 = \frac{\xi_1 - 102}{69.3} \quad (n2)$$

$$x_2 = \frac{\xi_2 - 50}{35.4} \quad (n3)$$

ทำการออกแบบการทดลองดังแสดงในตารางที่ ก1 เป็นการทดลองแบบแฟกเตอร์รี
ยลมีจำนวนการทดลอง 2^2 ครั้ง (2^2 factorial) การทดลองกระจาย 4 ครั้ง (star) และการ
ทดลองที่ศูนย์กลาง (center) จำนวน 3 ถึง 5 การทดลอง ในการทดลองนี้ทำการทดลองที่
ศูนย์กลาง 5 การทดลองเพื่อหาค่าความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการทดลอง แสดงดังรูปที่ ก1



รูปที่ ก1 แสดงการออกแบบการทดลอง 13 การทดลองจากสองตัวแปร

ตัวอย่างการแสดงผลการหาสมการแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระทั้งสองตัวที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ จากจำนวนการทดลองทั้งสิ้น 13 การทดลอง นำมาคำนวณหาสมการอันดับสอง และทำนายผลการทดลองด้วยสมการ

$$Y_1 = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon \quad (ก4)$$

โดยที่ $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{12}$ และ ε คือค่าสัมประสิทธิ์ของสมการอันดับสอง และค่าความผิดพลาดจากการทดลอง (experimental error) ตามลำดับ ซึ่งการประมาณค่า $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{12}$ จะใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (Least Square Method) ซึ่งเป็นการหาค่าของ $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{12}$ ที่ทำให้ $L = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \varepsilon' \varepsilon$ มีค่าน้อยที่สุด (Myer, 1971)

นั่นคือ

$$L = (Y - X\hat{\beta})' (Y - X\hat{\beta}) \quad (ก5)$$

การหาค่า L ที่ทำให้ผลต่างกำลังสองน้อยที่สุดหาได้จาก

$$\frac{\partial L}{\partial \hat{\beta}} = -2X'Y + 2(X'X)\hat{\beta} = 0 \quad (ก6)$$

ดังนั้นจะได้

$$(X'X)\hat{\beta} = X'Y$$

หรือ

$$\hat{\beta} = (X'X)^{-1}X'Y \quad (ก7)$$

ซึ่งสามารถแสดงค่าสมการให้อยู่ในรูปเมตริกเพื่อความสะดวกในการคำนวณ โดยสำหรับการ

วิเคราะห์การทดลองแบบ 2 ตัวแปร จะได้

$$Y = \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ Y_{13} \end{bmatrix} \quad \hat{\beta} = \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \beta_2 \\ \beta_{11} \\ \beta_{22} \\ \beta_{12} \end{bmatrix}$$

$$X = \begin{bmatrix} 1 & X_{11} & X_{21} & X_{11}^2 & X_{21}^2 & X_{11}X_{21} \\ 1 & X_{12} & X_{22} & X_{12}^2 & X_{22}^2 & X_{12}X_{22} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 1 & X_{1n} & X_{2n} & X_{1n}^2 & X_{2n}^2 & X_{1n}X_{2n} \end{bmatrix}$$

ค่าของ X_{ij} แสดงได้ของตัวแปรที่ค่า i และ j ต่างๆกัน

โดยที่ i คือแสดงชนิดของตัวแปรประกอบด้วยค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพรฟิโอนิน

คซึ่งเป็นตัวเลข 1 และ 2 ตามลำดับ

และ j แสดงชุดการทดลองตั้งแต่ 1 ถึง 13 การทดลอง

การคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของสมการอันดับสองอาศัยการแก้สมการที่แสดงไว้ใน

สมการ (ก6) และ (ก7) โดยต้องหาค่าอินเวอร์สของเมตริก ($X'X$) คู่กับค่าเมตริก ($X'Y$)

แสดงขั้นตอนการคำนวณดังนี้

$$X'X = \begin{bmatrix} n & \sum X_{1j} & \sum X_{2j} & \dots & \sum X_{nj} \\ \sum X_{1j}^2 & \sum X_{1j}X_{2j} & \dots & \sum X_{1j}X_{nj} \\ & \sum X_{2j}^2 & \dots & \sum X_{2j}X_{nj} \\ & & \dots & \dots \\ \text{Sym.} & & & \sum X_{nj}^2 \end{bmatrix}$$

ซึ่งในการทดลองนี้เมตริกอินเวอร์สของ ($X'X$) คือ

$$X'X = \begin{bmatrix} 13 & 0 & 0 & 8 & 8 & 0 \\ 0 & 8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 8 & 0 & 0 & 0 \\ 8 & 0 & 0 & 12 & 4 & 0 \\ 8 & 0 & 0 & 4 & 12 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 4 \end{bmatrix}$$

ตัวอย่างการหาค่า $X'Y$ และ β ของอัตราการใช้เงินเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Y_1) จะ
ได้

$$X'Y_1 = \begin{bmatrix} \sum Y_1 \\ \sum X_1 Y_1 \\ \sum X_2 Y_1 \\ \sum X_1^2 Y_1 \\ \sum X_2^2 Y_1 \\ \sum X_1 X_2 Y_1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.138 \\ -0.02 \\ -0.022 \\ 0.073 \\ 0.072 \\ 0.004 \end{bmatrix}$$

ดังนั้นค่าของสัมประสิทธิ์ของสมการอันดับสอง คือ

$$\beta = (X'X)^{-1} X'Y = \begin{bmatrix} 0.013 \\ -0.00248 \\ -0.00279 \\ -0.00188 \\ -0.00203 \\ 0.00108 \end{bmatrix}$$

ดังนั้นสมการแสดงผลอัตราการใช้เงินเติบโตจำเพาะของเซลล์ โดยมีตัวแปรคือค่า
ของค่า C/N และค่าของค่าร้อยละโดยโมลของกรดโพธิอินิค ซึ่งมีค่าตั้งแต่ -1.414 ถึง 1.41
ได้ความสัมพันธ์ดังต่อไปนี้คือ

$$Y_1 = 0.013 - 0.00248X_1 - 0.00279X_2 - 0.00188X_1^2 - 0.00203X_2^2 + 0.00108X_1X_2 \quad (ก8)$$

เมื่อทำการแทนค่าตัวแปรของ X_1 และ X_2 ตามรหัสโค้ดในชุดการทดลองที่ 1 ถึง 13 ที่แสดงไว้ในตารางที่ ก1 จะได้ผลในตารางที่ ก2



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ก1 แสดงค่าการออกแบบการทดลองและผลของค่าตัวแปรกระบวนการที่ได้จากการทดลอง

ชุดการทดลอง	ได้ของตัวแปร		ค่าของตัวแปร		Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	Y11
	X1	X2	C/N	mol%P											
1	-1	-1	32.7	14.7	0.0137	0.0036	0.0005	0.0047	8.34	0.0554	0.003	0.0518	0.0675	0.166	10.26
2	1	-1	171.3	14.7	0.0078	0.0073	0.0011	0.0081	5	0.0465	0.0025	0.0049	0.151	0.4577	0.138
3	-1	1	32.7	85.4	0.0074	0.0007	0.0004	0.0012	13.34	0.0202	0.0018	0.0074	0.0148	0.0254	4.03
4	1	1	171.3	85.4	0.0058	0.0011	0.0009	0.0015	14.4	0.016	0.0026	0.0015	0.0372	0.1758	1.76
5	-1.41	0	4	50	0.014	0.0018	0.0007	0.0016	17.38	0.0615	0.0028	0.0412	0.0518	0.2333	3.17
6	1.41	0	200	50	0.0053	0.0063	0.0016	0.0088	10.79	0.0195	0.0016	0.0018	0.2584	0.5559	15.1
7	0	-1.41	102	0	0.0143	0.0122	0	0.0127	0	0.0864	0	0.006	0.0848	0	3.67
8	0	1.414	102	100	0.0044	0.0011	0.0026	0.0029	20.92	0	0.0054	0.0022	0.0664	0.0791	10.34
9	0	0	102	50	0.0096	0.0052	0.0018	0.0097	12.04	0.0493	0.0044	0.0014	0.069	0.5084	11.02
10	0	0	102	50	0.0106	0.0037	0.0026	0.0098	11.72	0.0391	0.0042	0.0078	0.1131	0.5791	12.42
11	0	0	102	50	0.0152	0.0044	0.0019	0.007	14.99	0.041	0.0055	0.0062	0.1041	0.1872	7.88
12	0	0	102	50	0.0134	0.0019	0.0025	0.005	22.92	0.0519	0.0041	0.0027	0.0324	0.3954	10.52
13	0	0	102	50	0.0162	0.0033	0.0014	0.0049	17.87	0.022	0.0058	0.008	0.2207	0.2359	4.91

เมื่อทำการแทนค่าตัวแปรของ X_1 และ X_2 ตามรหัสโค้ดในชุดการทดลองที่ 1 ถึง 13 ที่แสดงไว้ในตารางที่ ก1 จะได้ผลในตารางที่ ก2

ตารางที่ ก2 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ได้จากสมการที่ (ก8)

การทดลองที่	X1	X2	อัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์		เปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด
			การทดลอง	คำนวณ	
1	-1	-1	0.0137	0.01544	3.5
2	1	-1	0.0078	0.00832	20
3	-1	1	0.0074	0.0077	21.43
4	1	1	0.0058	0.0049	33.78
5	-1.414	0	0.014	0.0127479	23.21
6	1.414	0	0.0053	0.0057344	64.16
7	0	-1.414	0.0143	0.0128863	23.3
8	0	1.414	0.0044	0.0049962	-28.11
9	0	0	0.0096	0.013	-35.4
10	0	0	0.0106	0.013	-22.6
11	0	0	0.0152	0.013	14.5
12	0	0	0.0134	0.013	2.98
13	0	0	0.0162	0.013	19.7

หมายเหตุ หน่วยของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (ต่อชั่วโมง)

ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลอง (ANOVA) ในการวิเคราะห์สมการ (ก)

8) ได้ดังตารางที่ ก3 ดังนี้

ตารางที่ ก3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการอัตราการผลิตของเซลล์ (ก8)

แหล่งความแปรปรวน	Sum of squares (SSQ)	DF	Mean squares (MS)	F
(1) การวิเคราะห์				
Linear	0.001621541	2	0.000810771	
Quadratic and interaction	0.00016298	3	5.43268E-05	
(2) การวิเคราะห์ lack-of-fit ⁽³⁾	8.32889E-06	3	2.7763E-06	0.341069
(3) การวิเคราะห์ error ⁽¹⁾	3.256E-05	4	8.14E-06	
(4) การวิเคราะห์ total ⁽²⁾	0.000203869	12		

⁽¹⁾ ผลบวกกำลังสองของความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นจากการทดลอง

(Sum of square of experiment)

$$\begin{aligned} \text{SSE} &= 0.0096^2 + 0.0106^2 + 0.0152^2 + 0.0134^2 + 0.0162^2 - (0.065^2/5) \\ &= 3.256 \times 10^{-5} \end{aligned}$$

⁽²⁾ ผลบวกกำลังสองของความคลาดเคลื่อนทั้งหมด (Pure error sum of square)

$$\begin{aligned} \text{SSPE} &= (0.0137^2 + 0.0078^2 + 0.0074^2 + 0.0058^2 + 0.014^2 + 0.0053^2 + 0.0143^2 + \\ &\quad 0.0044^2 + 0.0096^2 + 0.0106^2 + 0.0152^2 + 0.0134^2 + 0.0162^2) \\ &\quad - ((0.0137 + 0.0078 + 0.0074 + 0.0058 + 0.014 + 0.0053 + 0.0143 + 0.0044 \\ &\quad + 0.0096 + 0.0106 + 0.0152 + 0.0134 + 0.0162)/13) \\ &= 0.000203869 \end{aligned}$$

(3) ผลบวกกำลังสองของความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากความไม่เหมาะสมของสมการ

ความถดถอย (Sum of Square lack of fit)

$$\begin{aligned} \text{SSLF} &= 0.000203869 - 0.00016298 - 3.256 \times 10^{-5} \\ &= 8.32 \times 10^{-6} \end{aligned}$$

พิจารณาค่า F วิกฤตที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ จะได้ค่าของ F วิกฤต ณ จุด $F_{0.05 (3,4)}$ มีค่าเป็น 16.69 ซึ่งค่า F ที่คำนวณได้มีค่าเป็น 0.34 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่า F วิกฤตที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสมการอัตราการผลิตโพลีเอทิลีนของเซลล์ที่ได้มีความเชื่อได้ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

สำหรับค่าตัวแปรกระบวนการอื่นๆ สามารถแสดงสมการที่ได้เป็นดังต่อไปนี้

อัตราการผลิต 3HB จำเพาะ

$$\begin{aligned} Y_2 &= 0.0037 + 0.00131X_1 - 0.0031X_2 - 0.00037X_1^2 + \\ &\quad 0.00093X_2^2 - 0.00083X_1X_2 \end{aligned} \quad (\text{ก9})$$

อัตราการผลิต 3HV จำเพาะ

$$\begin{aligned} Y_3 &= 0.001952 + 0.000219X_1 + 0.000256X_2 - 0.000503X_1^2 \\ &\quad - 0.000302X_2^2 + 0.000195X_1X_2 \end{aligned} \quad (\text{ก10})$$

อัตราการผลิต PHBV จำเพาะ

$$\begin{aligned} Y_4 &= 0.00724 + 0.0018X_1 - 0.00214X_2 - 0.00183X_1^2 \\ &\quad - 0.00275X_2^2 - 0.00126X_1X_2 \end{aligned} \quad (\text{ก11})$$

ร้อยละของ 3HV ในโคพอลิเมอร์

$$Y_5 = 16.35 - 1.057X_1 + 4.477X_2 - 2.413X_1^2 - 2.225X_2^2 - 0.011X_1X_2 \quad (\text{ก}12)$$

อัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ

$$Y_6 = 0.0396 - 0.0065X_1 - 0.0248X_2 - (6 \times 10^{-8})X_1^2 - 0.0022X_2^2 + 0.0046X_1X_2 \quad (\text{ก}13)$$

อัตราการใช้กรดไพรูวอิกจำเพาะ

$$Y_7 = 0.0047 + (3.9 \times 10^{-5})X_1 + 0.0003X_2 - 0.0012X_1^2 - 0.00093X_2^2 + (2.77 \times 10^{-5})X_1X_2 \quad (\text{ก}14)$$

อัตราการใช้กรดไนโตรเจนจำเพาะ

$$Y_8 = 0.00788 - 0.0149X_1 - 0.00099X_2 + 0.00804X_1^2 - 0.0007X_2^2 + 0.00144X_1X_2 \quad (\text{ก}15)$$

ผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส

$$Y_9 = 0.10786 + 0.04975X_1 - 0.00908X_2 + 0.01699X_1^2 - 0.04396X_2^2 - 0.01528X_1X_2 \quad (\text{ก}16)$$

ผลได้ของ 3HV ต่อกรดโฟรฟิโอนิค

$$\begin{aligned}
 Y_{10} = & 0.3812 + 0.11228X_1 - 0.03883X_2 + 0.00399X_1^2 \\
 & - 0.17354X_2^2 - 0.03533X_1X_2
 \end{aligned}
 \tag{ก17}$$

ร้อยละโดยน้ำหนักของ PHBV ในเซลล์

$$\begin{aligned}
 Y_{11} = & 9.35 + 2.34734X_1 - 2.46296X_2 - 2.23688X_1^2 \\
 & + 0.27313X_2^2 + 1.6275X_1X_2
 \end{aligned}
 \tag{ก18}$$

ทั้งนี้การเปรียบเทียบค่าตัวแปรของกระบวนการที่ได้จากการทดลอง และที่ได้จากสมการ

(ก9) ถึง (ก17) และการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแต่ละสมการจะแสดงอยู่ในตารางที่ ก3

ถึง ก22

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก4 เปรียบเทียบอัตราการผลิต 3HB จำเพาะที่ได้จากสมการที่ (ก9)

การทดลองที่	X1	X2	อัตราการผลิต3HBจำเพาะ		เปอร์เซ็นต์ความ ผิดพลาด
			การทดลอง	คำนวณ	
1	-1	-1	0.0036	0.00598	-49.1429
2	1	-1	0.0073	0.00502	18.1034
3	-1	1	0.0007	0.00144	-13.3333
4	1	1	0.0011	-0.00284	-49.0909
5	-1.414	0	0.0018	0.00481256	38.4509
6	1.414	0	0.0063	0.00110788	22.378
7	0	-1.414	0.0122	0.00622396	15.7387
8	0	1.414	0.0011	-0.00254284	-6.91257
9	0	0	0.0052	0.0037	28.8462
10	0	0	0.0037	0.0037	0
11	0	0	0.0044	0.0037	15.9
12	0	0	0.0019	0.0037	-94.7
13	0	0	0.0033	0.0037	-12.12

หมายเหตุ หน่วยของอัตราการผลิต 3HB จำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

ตารางที่ ก5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการอัตราการผลิต 3HB จำเพาะ (ก9)

แหล่งความแปรปรวน	Sum of squares (SSQ)	DF	Mean squares (MS)	F
(1) การวิเคราะห์				
Linear	0.00031382	2	0.00015691	
Quadratic and interaction	0.000100992	3	3.36639E-05	
(2) การวิเคราะห์ lack-of-fit	1.55605E-05	3	5.18682E-06	3.379038
(3) การวิเคราะห์ error	6.14E-06	4	0.000001535	
(4) การวิเคราะห์ total	0.000122692	12		

ตารางที่ ก6 เปรียบเทียบอัตราการผลิต 3HV จำเพาะที่ได้จากสมการที่ (ก10)

การทดลองที่	X1	X2	อัตราการผลิต 3HV จำเพาะ		เปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด
			การทดลอง	คำนวณ	
1	-1	-1	0.0005	0.000225	21.1818
2	1	-1	0.0011	0.000875	49.1667
3	-1	1	0.0004	0.001115	-9.88889
4	1	1	0.0009	0.001665	-0.94444
5	-1.414	0	0.0007	0.000476144	62.5507
6	1.414	0	0.0016	0.001324544	68.6008
7	0	-1.414	0	0.000446422	-9.5776
8	0	1.414	0.0026	0.001634182	69.9971
9	0	0	0.0018	0.00204	55.6364
10	0	0	0.0026	0.00204	21.5
11	0	0	0.0019	0.00204	-7.37
12	0	0	0.0025	0.00204	18.4
13	0	0	0.0014	0.00204	-45.7

หมายเหตุ หน่วยของอัตราการผลิต 3HV จำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

ตารางที่ ก7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการอัตราการผลิต 3HV จำเพาะ (ก10)

แหล่งความแปรปรวน	Sum of squares (SSQ)	DF	Mean squares (MS)	F
(1) การวิเคราะห์				
Linear	3.05667E-05	2		
Quadratic and interaction	5.64359E-06	3		
(2) การวิเคราะห์ lack-of-fit	2.48134E-06	3	8.27112E-07	3.269218
(3) การวิเคราะห์ error	0.000001012	4	2.53E-07	
(4) การวิเคราะห์ total	9.13692E-06	12		

ตารางที่ ก8 เปรียบเทียบอัตราการผลิต PHBV จำเพาะที่ได้จากสมการที่ (ก11)

การทดลองที่	X1	X2	อัตราการผลิต PHBV จำเพาะ		เปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด
			การทดลอง	คำนวณ	
1	-1	-1	0.0047	0.00913	-22.83
2	1	-1	0.0081	0.00721	23.09
3	-1	1	0.0012	0.00471	31.67
4	1	1	0.0015	-0.00033	-16.67
5	-1.414	0	0.0016	0.00634139	59.41
6	1.414	0	0.0088	0.00142067	40.73
7	0	-1.414	0.0127	0.0107081	8.478
8	0	1.414	0.0029	0.00225238	66.88
9	0	0	0.0097	0.00728	0.274
10	0	0	0.0098	0.00728	25.7
11	0	0	0.007	0.00728	-4
12	0	0	0.005	0.00728	-45.6
13	0	0	0.0049	0.00728	-48.57

หมายเหตุ หน่วยของอัตราการผลิต PHBV จำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

ตารางที่ ก9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการอัตราการผลิต PHBV จำเพาะ (ก11)

แหล่งความแปรปรวน	Sum of squares (SSQ)	DF	Mean squares (MS)	F
(1) การวิเคราะห์				
Linear	0.000585264	2	0.000292632	
Quadratic and interaction	0.000118463	3	3.94877E-05	
(2) การวิเคราะห์ lack-of-fit	2.08182E-05	3	6.93941E-06	1.199139
(3) การวิเคราะห์ error	0.000023148	4	5.787E-06	
(4) การวิเคราะห์ total	0.000162429	12		

ตารางที่ ก10 เปรียบเทียบร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ ที่ได้จากสมการที่ (ก12)

การทดลองที่	X1	X2	ร้อยละโดยโมล 3HV ในโคพอลิเมอร์		เปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด
			การทดลอง	คำนวณ	
1	-1	-1	8.34	8.32341	0.707
2	1	-1	5	3.22385	-23.78
3	-1	1	13.34	17.11863	-29.36
4	1	1	14.4	16.41907	-5.007
5	-1.414	0	17.38	15.13458185	25.09
6	1.414	0	10.79	11.03460401	7.036
7	0	-1.414	0	1.687067137	0
8	0	1.414	20.92	17.23430822	39.06
9	0	0	12.04	15.908	-35.8
10	0	0	11.72	15.908	-35.7
11	0	0	14.99	15.908	-6.12
12	0	0	22.92	15.908	30.59
13	0	0	17.87	15.908	10.98

ตารางที่ ก11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการร้อยละ 3HV ในโคพอลิเมอร์ (ก12)

แหล่งความแปรปรวน	Sum of squares (SSQ)	DF	Mean squares (MS)	F
(1) การวิเคราะห์				
Linear	2558.236238	2	1279.118119	
Quadratic and interaction	342.7374607	3	114.2458202	
(2) การวิเคราะห์ lack-of-fit	43.09218242	3	14.36406081	0.665303
(3) การวิเคราะห์ error	86.36108	4	21.59027	
(4) การวิเคราะห์ total	472.1907231	12		

ตารางที่ ก12 เปรียบเทียบอัตราการใช้วัสดุโคงสจำเพาะที่ได้จากสมการที่ (ก13)

การทดลองที่	X1	X2	อัตราการใช้วัสดุโคงสจำเพาะ		เปอร์เซ็นต์ความ ผิดพลาด
			การทดลอง	คำนวณ	
1	-1	-1	0.0554	0.06955	-29.8014
2	1	-1	0.0465	0.05379	-10.6022
3	-1	1	0.0202	0.02495	-11.8317
4	1	1	0.016	0.00447	57.3125
5	-1.414	0	0.0615	0.049651994	19.2651
6	1.414	0	0.0195	0.024030314	-23.2324
7	0	-1.414	0.0864	0.072741058	15.809
8	0	1.414	0	0.006339618	0
9	0	0	0.0493	0.04066	17.5254
10	0	0	0.0391	0.04066	-4.09
11	0	0	0.041	0.04066	0.73
12	0	0	0.0519	0.04066	21.6
13	0	0	0.022	0.04066	-85

หมายเหตุ หน่วยของอัตราการใช้วัสดุโคงสจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

ตารางที่ ก13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการอัตราการใช้วัสดุโคงสจำเพาะ (ก13)

แหล่งความแปรปรวน	Sum of squares (SSQ)	DF	Mean squares (MS)	F
(1) การวิเคราะห์				
Linear	0.025013959	2	0.012506979	
Quadratic and interaction	0.00510031	3	0.001700103	
(2) การวิเคราะห์ lack-of-fit	0.000775129	3	0.000258376	1.873202
(3) การวิเคราะห์ error	0.000551732	4	0.000137933	
(4) การวิเคราะห์ total	0.006427171	12		

ตารางที่ ก14 เปรียบเทียบอัตราการใช้กรดโพรฟิโอนิคจำเพาะที่ได้จากสมการที่ (ก14)

การทดลองที่	X1	X2	อัตราการใช้กรดโพรฟิโอนิค		เปอร์เซ็นต์ความ ผิดพลาด
			การทดลอง	คำนวณ	
1	-1	-1	0.003	0.00149	-14.6667
2	1	-1	0.0025	0.00181	2.4
3	-1	1	0.0018	0.00379	-145.556
4	1	1	0.0026	0.00279	-7.03
5	-1.414	0	0.0028	0.002461159	12.14
6	1.414	0	0.0016	0.001980399	-23.75
7	0	-1.414	0	0.001561148	0
8	0	1.414	0.0054	0.003880108	28.1461
9	0	0	0.0044	0.0048	-9.09091
10	0	0	0.0042	0.0048	-14.3
11	0	0	0.0055	0.0048	14
12	0	0	0.0041	0.0048	-17
13	0	0	0.0058	0.0048	17.2

หมายเหตุ หน่วยของอัตราการใช้กรดโพรฟิโอนิคจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

ตารางที่ ก15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสมการอัตราการใช้กรดโพรฟิโอนิคจำเพาะ(ก14)

แหล่งความแปรปรวน	Sum of squares (SSQ)	DF	Mean squares (MS)	F
(1) การวิเคราะห์				
Linear	0.000169967	2	8.49834E-05	
Quadratic and interaction	2.30677E-05	3	7.68922E-06	
(2) การวิเคราะห์ lack-of-fit	1.00431E-05	3	3.3477E-06	5.356325
(3) การวิเคราะห์ error	2.5E-06	4	6.25E-07	
(4) การวิเคราะห์ total	3.56108E-05	12		

ตารางที่ ก16 เปรียบเทียบอัตราการใช้ในโตรเจนจำเพาะที่ได้จากสมการที่ (ก15)

การทดลองที่	X1	X2	อัตราการใช้ในโตรเจน		เปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด
			การทดลอง	คำนวณ	
1	-1	-1	0.0518	0.04506	13.0116
2	1	-1	0.0049	0	152.245
3	-1	1	0.0074	0.01126	-52.1622
4	1	1	0.0015	0.00464	-209.333
5	-1.414	0	0.0412	0.04246838	-3.07859
6	1.414	0	0.0018	0.0041207	-128.928
7	0	-1.414	0.006	0.015302895	-155.048
8	0	1.414	0.0022	0	259.241
9	0	0	0.0014	0.00522	-272.857
10	0	0	0.0078	0.00522	33.0769
11	0	0	0.0062	0.00522	15.8065
12	0	0	0.0027	0.00522	-93.3333
13	0	0	0.008	0.00522	34.75

หมายเหตุ หน่วยของอัตราการใช้ในโตรเจนจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

ตารางที่ ก17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการอัตราการใช้ในโตรเจนจำเพาะ (ก15)

แหล่งความแปรปรวน	Sum of squares (SSQ)	DF	Mean squares (MS)	F
(1) การวิเคราะห์				
Linear	0.004389802	2	0.002194901	
Quadratic and interaction	0.002819001	3	0.000939667	
(2) การวิเคราะห์ lack-of-fit	0.00025222	3	8.40735E-05	9.267359
(3) การวิเคราะห์ error	0.000036288	4	0.000009072	
(4) การวิเคราะห์ total	0.003107509	12		

ตารางที่ ก18 เปรียบเทียบผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส ที่ได้จากสมการที่ (ก16)

การทดลองที่	X1	X2	ผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส		เปอร์เซ็นต์ความ ผิดพลาด
			การทดลอง	คำนวณ	
1	-1	-1	0.0675	0.15002	63.0519
2	1	-1	0.151	0.08108	-2.64901
3	-1	1	0.0148	0.13246	-152.297
4	1	1	0.0372	0.0024	-185.699
5	-1.414	0	0.0518	0.201579	-37.9985
6	1.414	0	0.2584	0.060886	17.8885
7	0	-1.414	0.0848	0.085778	-
8	0	1.414	0.0664	0.017736	89.2659
9	0	0	0.069	0.10786	-56.3188
10	0	0	0.1131	0.10786	4.63307
11	0	0	0.1041	0.10786	-3.61191
12	0	0	0.0324	0.10786	-232.901
13	0	0	0.2207	0.10786	51.1282

หมายเหตุ หน่วยของผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส (กรัม 3HB ต่อ กรัมกลูโคส)

ตารางที่ ก19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการผลได้ของ 3HB ต่อกลูโคส (ก16)

แหล่งความแปรปรวน	Sum of squares (SSQ)	DF	Mean squares (MS)	F
(1) การวิเคราะห์				
Linear	0.156818754	2	0.078409377	
Quadratic and interaction	0.032514951	3	0.010838317	
(2) การวิเคราะห์ lack-of-fit	0.011364074	3	0.003788025	0.75841
(3) การวิเคราะห์ error	0.019978772	4	0.004994693	
(4) การวิเคราะห์ total	0.063857797	12		

ตารางที่ ก20 เปรียบเทียบผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรฟิโอนิค ที่ได้จากสมการที่ (ก17)

การทดลองที่	X1	X2	ผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรฟิโอนิค		เปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด
			การทดลอง	คำนวณ	
1	-1	-1	0.166	0.10287	38.0301
2	1	-1	0.4577	0.39809	13.0238
3	-1	1	0.0254	0.09587	-277.441
4	1	1	0.1758	0.24977	-42.0762
5	-1.414	0	0.2333	0.23041367	1.23718
6	1.414	0	0.5559	0.54794151	1.43164
7	0	-1.414	0	0.08913044	-
8	0	1.414	0.0791	-0.0206808	100
9	0	0	0.5084	0.3812	25.0197
10	0	0	0.5791	0.3812	34.1737
11	0	0	0.1872	0.3812	-103.632
12	0	0	0.3954	0.3812	3.5913
13	0	0	0.2359	0.3812	-61.5939

หมายเหตุ หน่วยของผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรฟิโอนิค (กรัม 3HV ต่อ กรัมกรดโพรฟิโอนิค)

ตารางที่ ก21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสมการผลได้ของ 3HV ต่อกรดโพรฟิโอนิค (ก17)

แหล่งความแปรปรวน	Sum of squares (SSQ)	DF	Mean squares (MS)	F
(1) การวิเคราะห์				
Linear	1.328906105	2	0.664453052	
Quadratic and interaction	0.332426056	3	0.110808685	
(2) การวิเคราะห์ lack-of-fit	0.035967695	3	0.011989232	0.419593
(3) การวิเคราะห์ error	0.11429398	4	0.028573495	
(4) การวิเคราะห์ total	0.482687731	12		

ตารางที่ ก22 เปรียบเทียบร้อยละโดยน้ำหนักของ PHBV ที่ได้จากสมการที่ (ก18)

การทดลองที่	X1	X2	ร้อยละโดยน้ำหนักของ PHBV ในเซลล์		เปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด
			การทดลอง	คำนวณ	
1	-1	-1	4.03	7.275547	-51.8
2	1	-1	0.138	6.361893	-16.4694
3	-1	1	1.76	3.104107	-153.28
4	1	1	3.17	7.492453	-86.5
5	-1.414	0	3.67	1.994547336	64.3627
6	1.414	0	10.34	4.45115458	21.519
7	0	-1.414	15.1	9.971088188	12.1502
8	0	1.414	10.26	7.821186028	29.1211
9	0	0	11.02	9.35	15.7967
10	0	0	12.42	9.35	-103.633
11	0	0	7.88	9.35	26.161
12	0	0	10.52	9.35	-16.3312
13	0	0	4.91	9.35	9.69894

ตารางที่ ก23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการผลได้ 3HV ต่อกรดโพธิ์อินิค (ก18)

แหล่งความแปรปรวน	Sum of squares (SSQ)	DF	Mean squares (MS)	F
(1) การวิเคราะห์				
Linear	780.6495149	2	390.3247574	
Quadratic and interaction	83.22893612	3	27.74297871	
(2) การวิเคราะห์ lack-of-fit	139.5315291	3	46.5105097	5.246947
(3) การวิเคราะห์ error	35.4572	4	8.8643	
(4) การวิเคราะห์ total	258.2176652	12		



ภาคผนวก ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข ตัวอย่างการคำนวณผลการทดลอง

แสดงตัวอย่างการคำนวณหาค่าตัวแปรของกระบวนการที่ได้จากการทดลอง
เพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มี ค่า C/N เป็น
32.7 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพธิ์อินค เป็น 14.7 ที่ตำแหน่งรหัสโค้ด 1 , -1

ตาราง ข1 แสดงตัวอย่างผลการทดลองของการทดลองที่ 1

เวลา	น้ำหนัก เซลล์ (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพธิ์อินค (กรัม)		ไนโตรเจน (กรัม)		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	5.0078	1.07	1.204	0.094	0.094	0.216	0.216	0.070449	0.001732
3	5.7466	0.729	1.148	0.089	0.127	0.208	0.347	0.144851	0.005112
6	5.7782	0.743	1.236	0.078	0.139	0.217	0.235	0.186779	0.007019
9	5.957	0.584	1.19	0.079	0.085	0.084	0.136	0.263589	0.022334
12	6.3241	0.753	1.13	0.068	0.107	0	0.074	0.347407	0.032899
15	6.4237	0.845	1.37	0.095	0.102	0	0.023	0.377111	0.048939
18	6.6215	0.82	1.29	0.084	0.099	0	0.153	0.321159	0.065303
21	5.6061	0.552	1.25	0.078	0.122	0.075	0.238	0.213586	0.049662
24	4.5857	0.508	1.2	0.097	0.045	0.098	0.15	0.158734	0.022911

ข1 การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (Specific growth rate of cell , μ)

จากสมดุลมวลสารของเซลล์ (Cell mass balance) ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

$$\frac{dX_r V}{dt} = F X_r^f + \mu X_r V \quad (ข1)$$

เมื่อ	X_r	=	ความเข้มข้นของ Residual biomass (กรัมต่อลิตร)
	X_r^f	=	ความเข้มข้นของ Residual biomass ในกระแสบีคอน (กรัมต่อลิตร)
	F	=	อัตราการป้อนสารอาหาร (ลิตรต่อชั่วโมง)
	t	=	เวลา (ชั่วโมง)
	μ	=	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (ต่อชั่วโมง)
	V	=	ปริมาตรของน้ำหมัก (ลิตร)

พิจารณากระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องที่ไม่มีเซลล์อยู่ในกระแสบีคอน จะได้

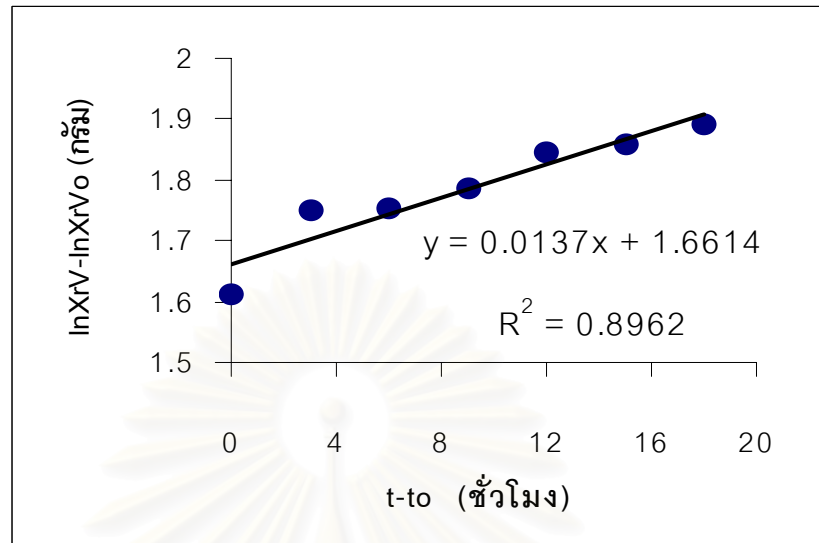
$$\frac{dX_r V}{dt} = \mu X_r V \quad (ข2)$$

จัดรูปสมการที่ (ข2) แล้วทำการอินทิเกรตจะได้

$$\int_{X_{r0}}^{X_r} \frac{1}{X_r} dX_r = \mu \int_{t_0}^t dt$$

$$\ln X_r - \ln X_{r0} = \mu(t - t_0) \quad (ข3)$$

จากสมการ (ข3) เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง t กับ $\ln(X_r V)$ จะได้กราฟที่มีแนวโน้มเป็นเส้นตรง ซึ่งแสดงดังรูปที่ ข1 ความชันของกราฟที่ได้คืออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (μ)



รูปที่ ข1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln XrV - \ln XrV_0$ และ $t-t_0$

ข2 การคำนวณอัตราการผลิต 3HB จำเพาะ (Specific production rate of 3HB, ρ_{3HB})

จากสมการมวลสารของ 3HB ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

$$\frac{dC_{3HB}V}{dt} = FC_{3HB}^f + \rho_{3HB}X_rV \quad (ข4)$$

เมื่อ ρ_{3HB} = อัตราการผลิต 3HB จำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

C_{3HB} = ความเข้มข้นของ 3HB (กรัมต่อลิตร)

พิจารณากระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องที่ไม่มี 3HB อยู่ในกระแสน้ำเข้า จะได้

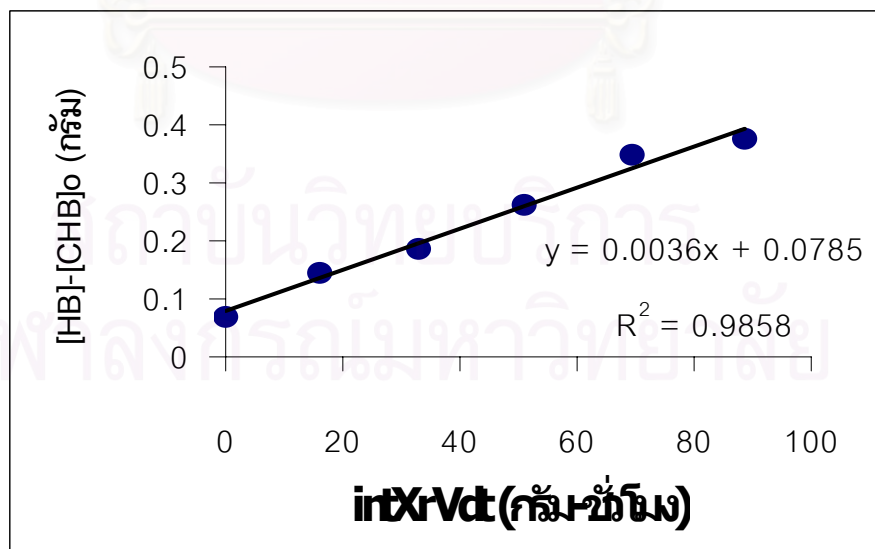
$$\frac{dC_{3HB}V}{dt} = \rho_{3HB}X_rV \quad (15)$$

จัดรูปสมการที่ (15) แล้วทำการอินทิเกรตจะได้

$$\int_{C_{3HB0}V}^{C_{3HB}V} dC_{3HB}V = \rho_{3HB} \int_{t_0}^t X_r V dt$$

$$(C_{3HB}V - C_{3HB0}V) = \rho_{3HB} \int_{t_0}^t X_r V dt \quad (16)$$

จากสมการ (16) เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $[HB] - [HB]_0$ กับ $\int X_r V dt$ จะได้กราฟที่มีแนวโน้มเป็นเส้นตรง ซึ่งแสดงดังรูปที่ ๒ ความชันของกราฟที่ได้คืออัตราการผลิต 3HB จำเพาะ



รูปที่ ๒ กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $C_{3HB} - C_{3HB0}$ และ $\int X_r V dt$

ข3 การคำนวณอัตราการผลิต 3HV จำเพาะ (Specific production rate of 3HV , ρ_{3HV})

จากสมการสมดุลสารของ 3HV ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

$$\frac{dC_{3HV}V}{dt} = FC_{3HV}^f + \rho_{3HV} X_r V \quad (ข7)$$

เมื่อ ρ_{3HV} = อัตราการผลิต 3HV จำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

C_{3HV} = ความเข้มข้นของ 3HV (กรัมต่อลิตร)

พิจารณากระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องที่ไม่มี 3HV อยู่ในกระแสน้ำออก จะได้

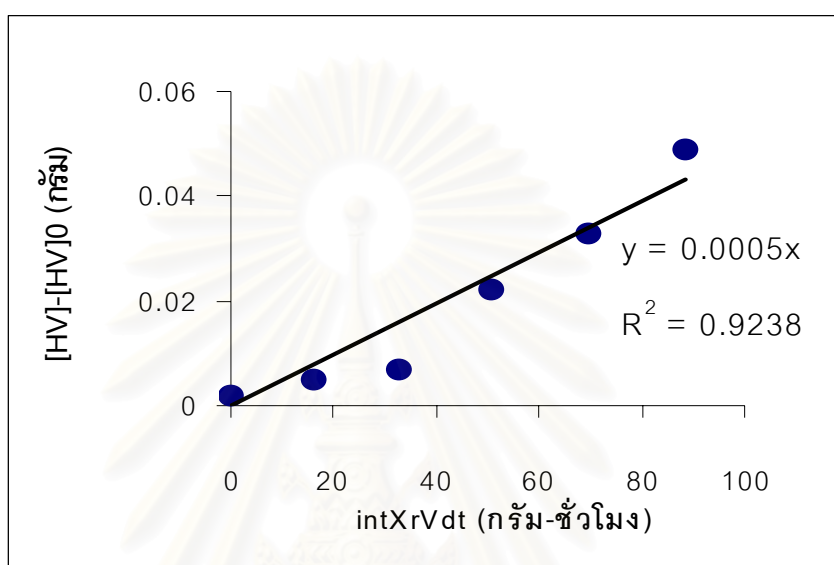
$$\frac{dC_{3HV}V}{dt} = \rho_{3HV} X_r V \quad (ข8)$$

จัดรูปสมการที่ (ข8) แล้วทำการอินทิเกรตจะได้

$$\int_{C_{3HV0}V}^{C_{3HV}V} dC_{3HV}V = \rho_{3HV} \int_{t_0}^t X_r V dt$$

$$(C_{3HV}V - C_{3HV0}V) = \rho_{3HV} \int_{t_0}^t X_r V dt \quad (ข9)$$

จากสมการ (๗9) เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $C_{3HV} - C_{3HV0}$ กับ $\int C_{3HV} dt$ จะได้กราฟที่มีแนวโน้มเป็นเส้นตรง ซึ่งแสดงดังรูปที่ ๓3 ความชันของกราฟที่ได้คืออัตราการผลิต 3HV



จำเพาะ

รูปที่๓3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $C_{HV}-C_{HV0}$ และ $\int C_{3HV} dt$

๗4 การคำนวณอัตราการผลิต PHBV จำเพาะ (Specific production rate of PHBV , ρ_{PHBV})

ความสัมพันธ์ระหว่าง PHBV กับ 3HB และ 3HV เป็นดังสมการ

$$C_{PHBV}V = C_{3HB}V + C_{3HV}V \quad (๗10)$$

จากสมการมวลสารของ PHBV ในกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

$$\frac{dC_{\text{PHBV}}V}{dt} = FC_{\text{PHBV}}^f + \rho_{\text{PHBV}}X_rV \quad (\text{ข11})$$

เมื่อ ρ_{PHBV} = อัตราการผลิต PHBV จำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

C_{PHBV} = ความเข้มข้นของ PHBV (กรัมต่อลิตร)

พิจารณาระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องที่ไม่มี PHBV อยู่ในกระแสป้อน จะได้

$$\frac{dC_{\text{PHBV}}V}{dt} = \rho_{\text{PHBV}}X_rV \quad (\text{ข12})$$

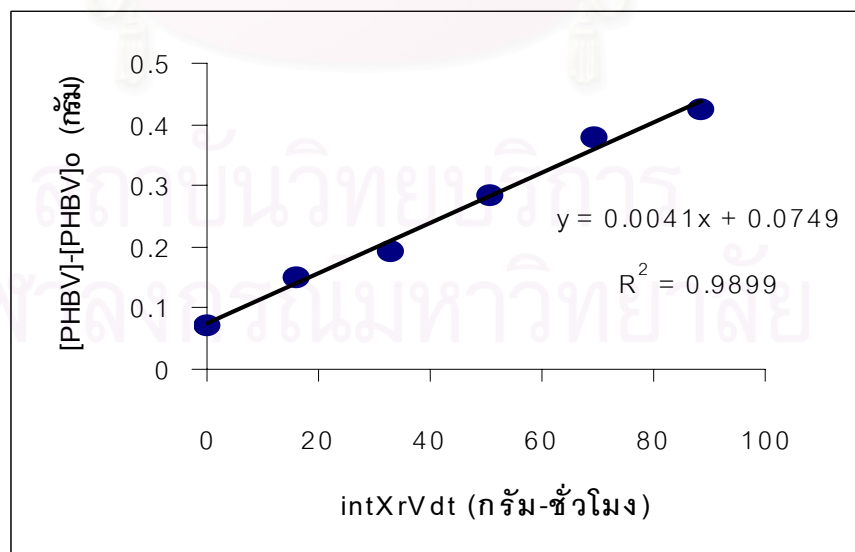
จัดรูปสมการที่ (ข8) แล้วทำการอินทิเกรตจะได้

$$\int_{C_{\text{PHBV}0}V}^{C_{\text{PHBV}}V} dC_{\text{PHBV}}V = \rho_{\text{PHBV}} \int_{t_0}^t X_rV dt$$

$$(C_{\text{PHBV}}V - C_{\text{PHBV}0}V) = \rho_{\text{PHBV}} \int_{t_0}^t X_rV dt \quad (\text{ข13})$$

จากสมการ (ข13) เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $C_{\text{PHBV}} - C_{\text{PHBV}0}$ กับ จะได้กราฟที่มี

เป็นเส้นตรงซึ่งแสดงดังรูปที่ 4 ความชันของกราฟที่ได้คืออัตราการผลิต PHBV จำเพาะ



รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $C_{\text{PHBV}} - C_{\text{PHBV}0}$

ข5 การคำนวณร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์

เนื่องจากปริมาณ 3HV จะแปรตามเวลา ดังนั้นการคำนวณค่าร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์จะเป็นการเฉลี่ยตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งร้อยละโดยโมลของ 3HV ในโคพอลิเมอร์ที่เวลาใดๆสามารถแสดงได้ด้วยสมการ

$$\text{mol\%HV} = \frac{\frac{\text{น้ำหนัก3HV}}{100}}{\frac{\text{น้ำหนัก3HV}}{100} + \frac{\text{น้ำหนัก3HB}}{86}} \times 100 \quad (\text{ข14})$$

ข6 การคำนวณหาสภาวะที่ให้ค่าพารามิเตอร์สูงสุด

จากสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า C/N และร้อยละโดยโมลของกรดโพธิ์อินิคต่อ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

$$Y_1 = 0.013 - 0.00248X_1 - 0.00279X_2 - 0.00188X_1^2 - 0.00203X_2^2 + 0.00108X_1X_2 \quad (\text{ข15})$$

ดิฟเฟอเรนเชียลเทียบกับตัวแปร X_1 และ X_2 ตามลำดับ แล้วให้มีค่าเท่ากับ 0 จะได้

$$\frac{\partial Y_1}{\partial X_1} = -0.00248 - 0.00376X_1 + 0.00108X_2 = 0 \quad (\text{ข16})$$

$$\frac{\partial Y_1}{\partial X_2} = -0.00279 - 0.00108X_1 + 0.00406X_2 = 0 \quad (\text{ข17})$$

แก้สมการ (ข16) และ (ข17) จะได้

$$X_1 = 0.93, \quad X_2 = 0.93$$

ซึ่งเป็นค่า C/N เท่ากับ 37.7 และร้อยละโดยโมลกรดโพธิ์อินิคเท่ากับ 17



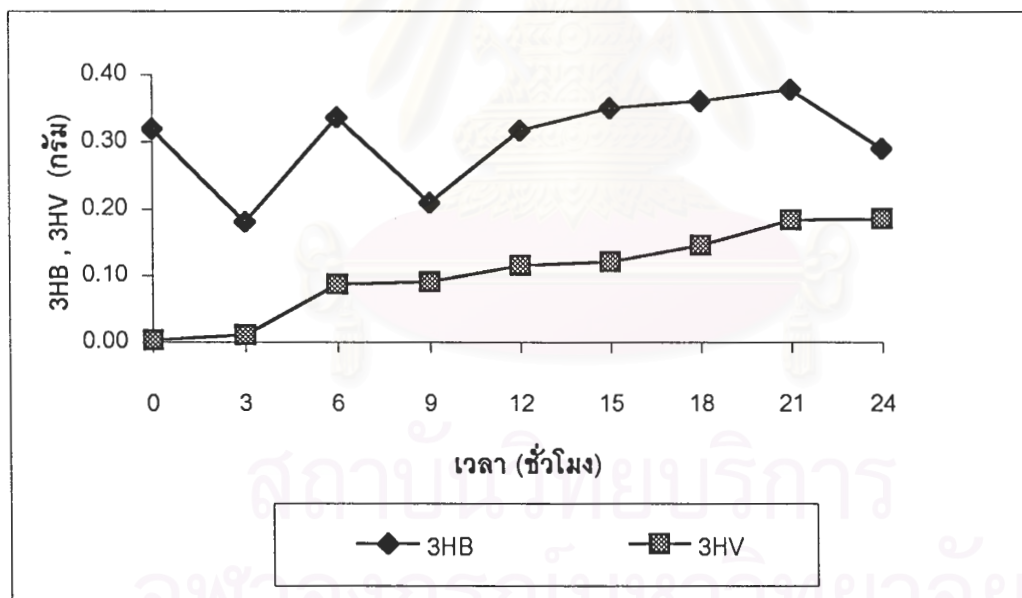
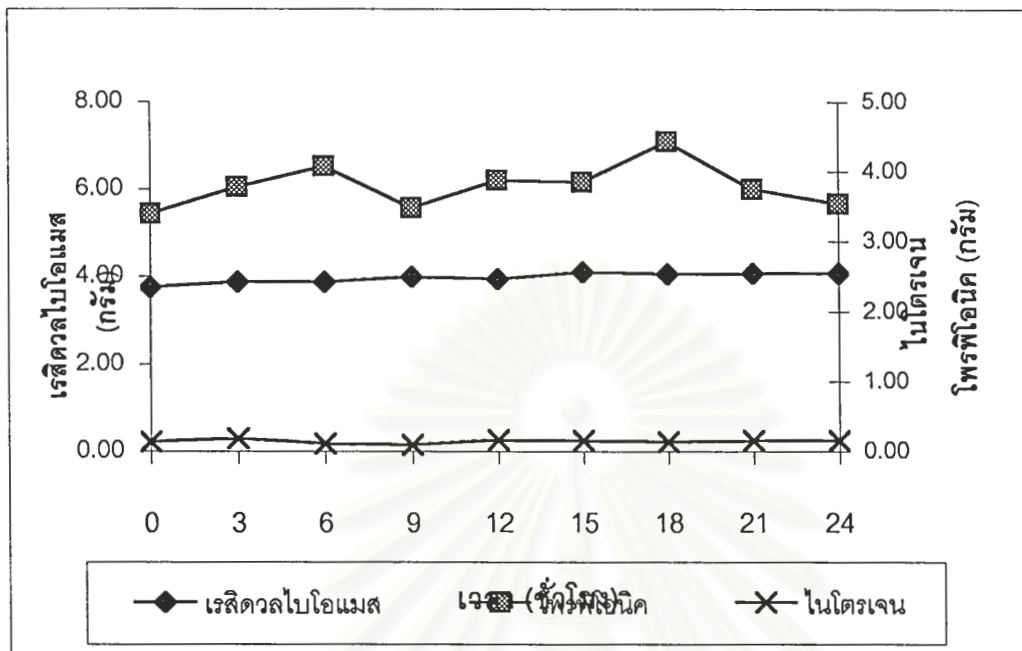
ภาคผนวก ค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ค1 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรฟิโอนิค เป็น 100

ชั่วโมงที่	เรสิดวลไบโอแมส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพรฟิโอนิค		ไนโตรเจน		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	3.75	0	0	3.39	3.39	0.14	0.14	0.32	0.00
3	3.88	0	0	3.33	3.78	0.12	0.18	0.18	0.01
6	3.87	0	0	3.70	4.07	0.08	0.11	0.34	0.09
9	3.98	0	0	3.99	3.47	0.07	0.09	0.21	0.09
12	3.95	0	0	3.45	3.87	0.06	0.16	0.32	0.11
15	4.10	0	0	3.39	3.85	0.14	0.15	0.35	0.12
18	4.06	0	0	3.60	4.43	0.13	0.14	0.36	0.15
21	4.08	0	0	3.47	3.74	0.09	0.15	0.38	0.18
24	4.07	0	0	0.00	3.54	0.00	0.16	0.29	0.19

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

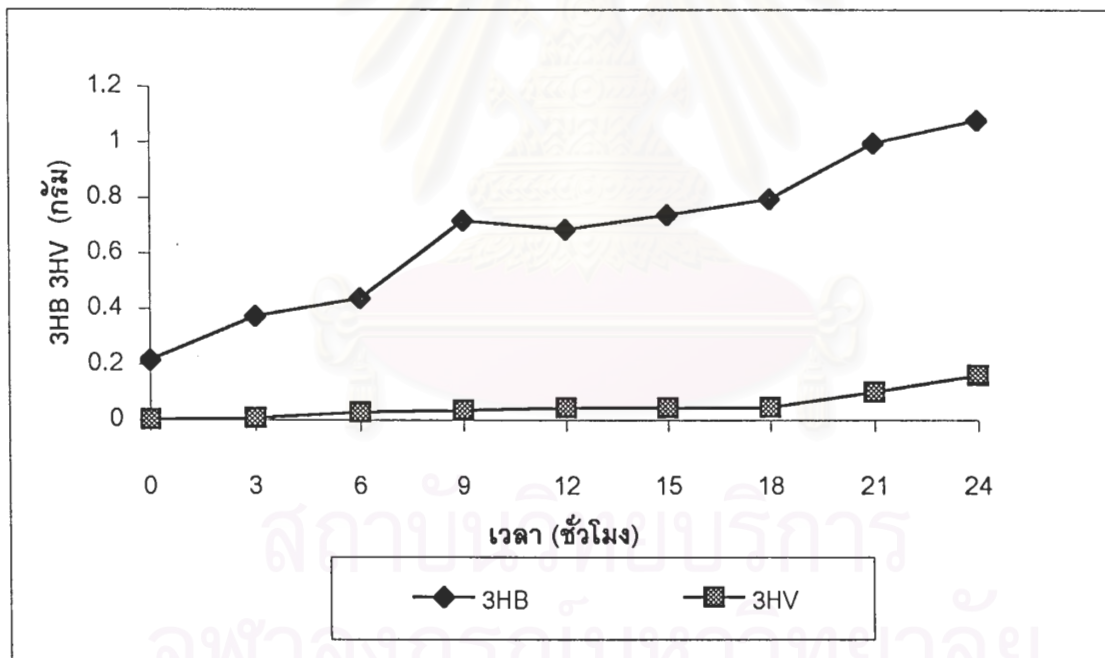
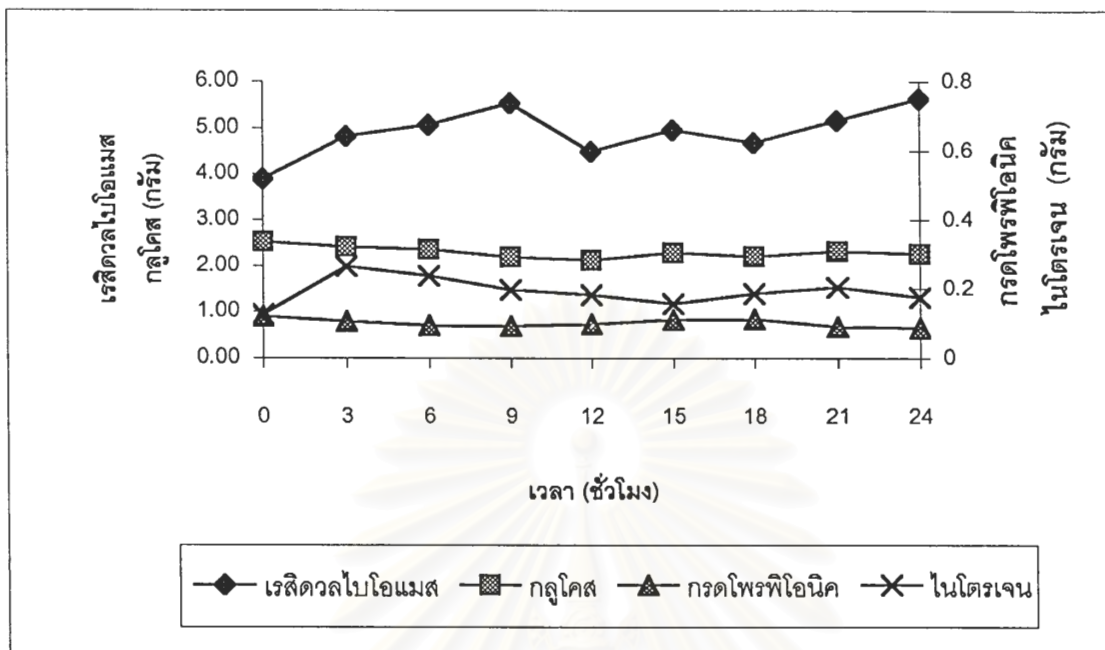


รูปที่ ค1 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 100

ตาราง ค2 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 171.3 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 14.7

ชั่วโมงที่	เรสิดวลไบโอแมส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพรพิโอนิก		ไนโตรเจน		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	3.90	2.52	2.52	0.12	0.12	0.124	0.124	0.215031	0.00173
3	4.82	1.96	2.414	0.086	0.104	0.056	0.264	0.372834	0.006668
6	5.06	1.62	2.36	0.076	0.094	0.236	0.236	0.436751	0.026535
9	5.54	1.46	2.19	0.082	0.092	0.196	0.196	0.716019	0.033319
12	4.49	1.56	2.126	0.078	0.098	0.142	0.182	0.685514	0.043177
15	4.95	1.38	2.28	0.026	0.11	0.11	0.156	0.736644	0.044122
18	4.68	1.64	2.196	0.08	0.112	0.046	0.186	0.793673	0.045448
21	5.15	1.9	2.31	0.056	0.09	0.076	0.204	0.997073	0.101391
24	5.63	1.74	2.26	0.044	0.086	0.104	0.174	1.079266	0.159392

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

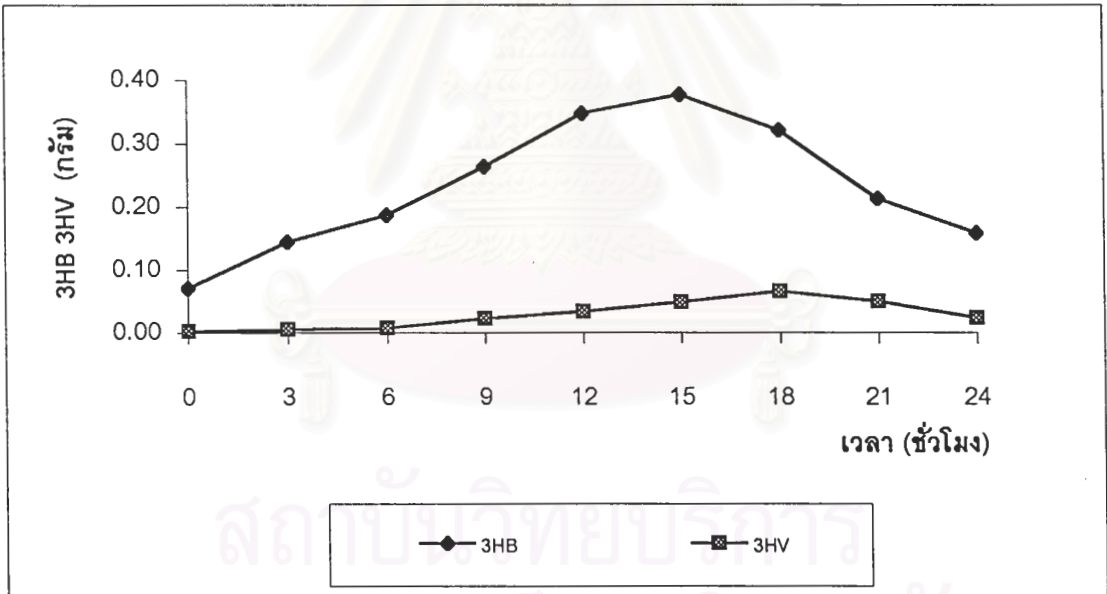
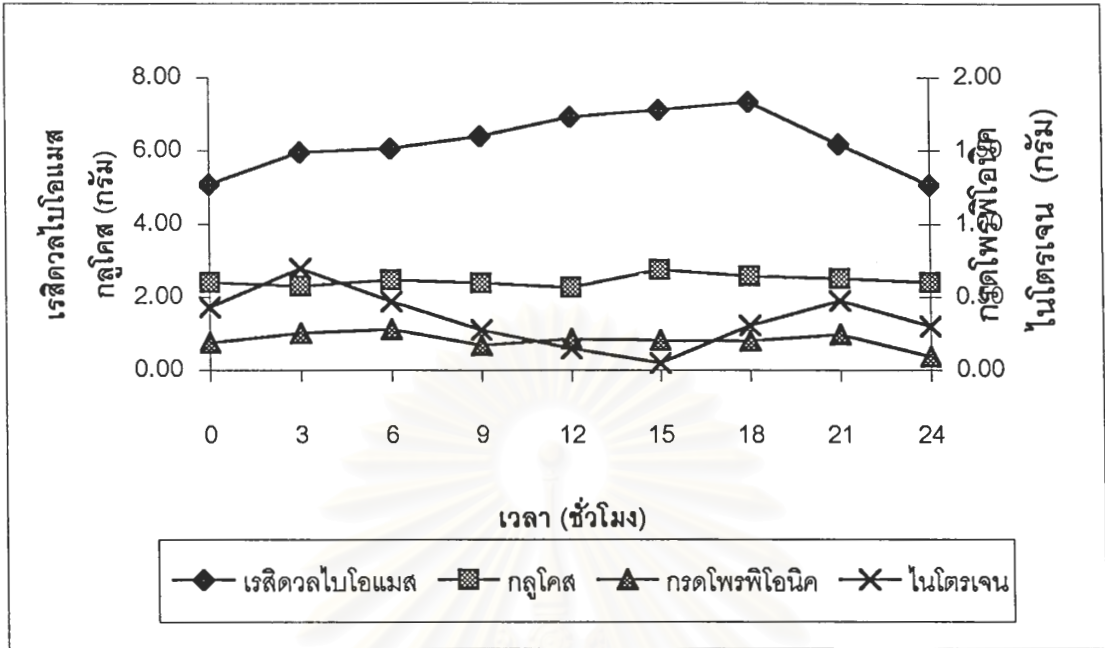


รูปที่ ค2 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 171.3 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพธิโธนิค เป็น 14.7

ตาราง ค3 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 32.7 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรฟิโอนิก เป็น 14.7

ชั่วโมงที่	เรสิดวลไบโอแมส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพรฟิโอนิก		ไนโตรเจน		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	5.08	2.14	2.41	0.19	0.19	0.43	0.43	0.07	0.00
3	5.94	1.46	2.30	0.18	0.25	0.42	0.69	0.14	0.01
6	6.06	1.49	2.47	0.16	0.28	0.43	0.47	0.19	0.01
9	6.38	1.17	2.38	0.16	0.17	0.17	0.27	0.26	0.02
12	6.90	1.51	2.26	0.14	0.21	0.00	0.15	0.35	0.03
15	7.10	1.69	2.74	0.19	0.20	0.00	0.05	0.38	0.05
18	7.32	1.64	2.58	0.17	0.20	0.00	0.31	0.32	0.07
21	6.18	1.10	2.50	0.16	0.24	0.15	0.48	0.21	0.05
24	5.06	1.02	2.40	0.19	0.09	0.20	0.30	0.16	0.02

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

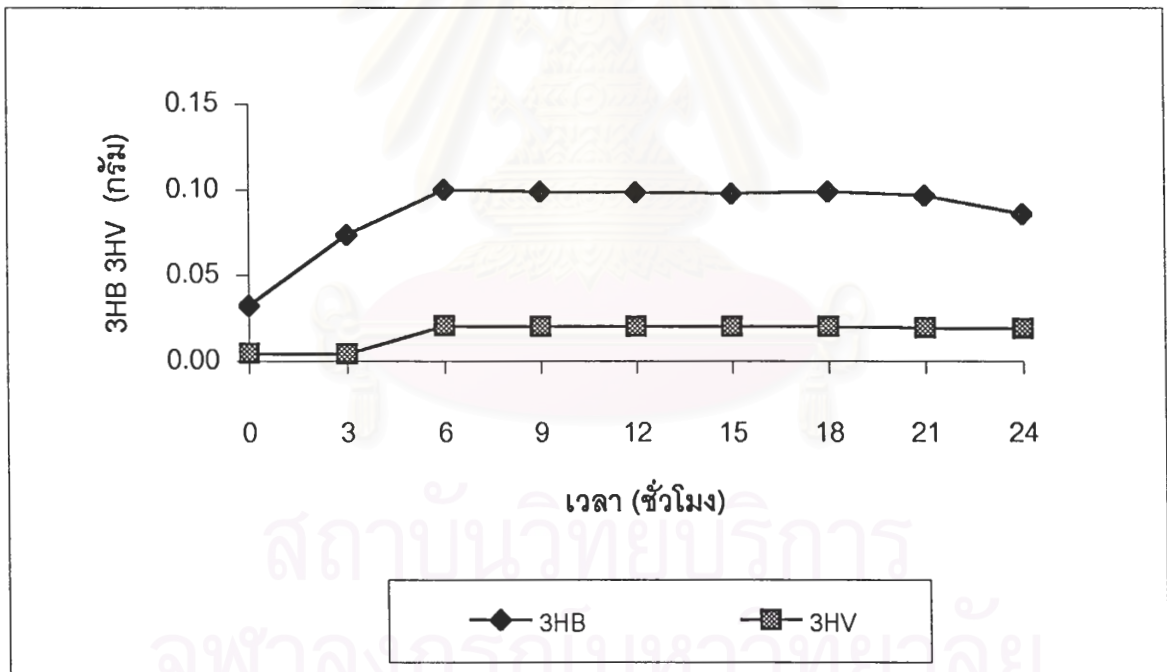
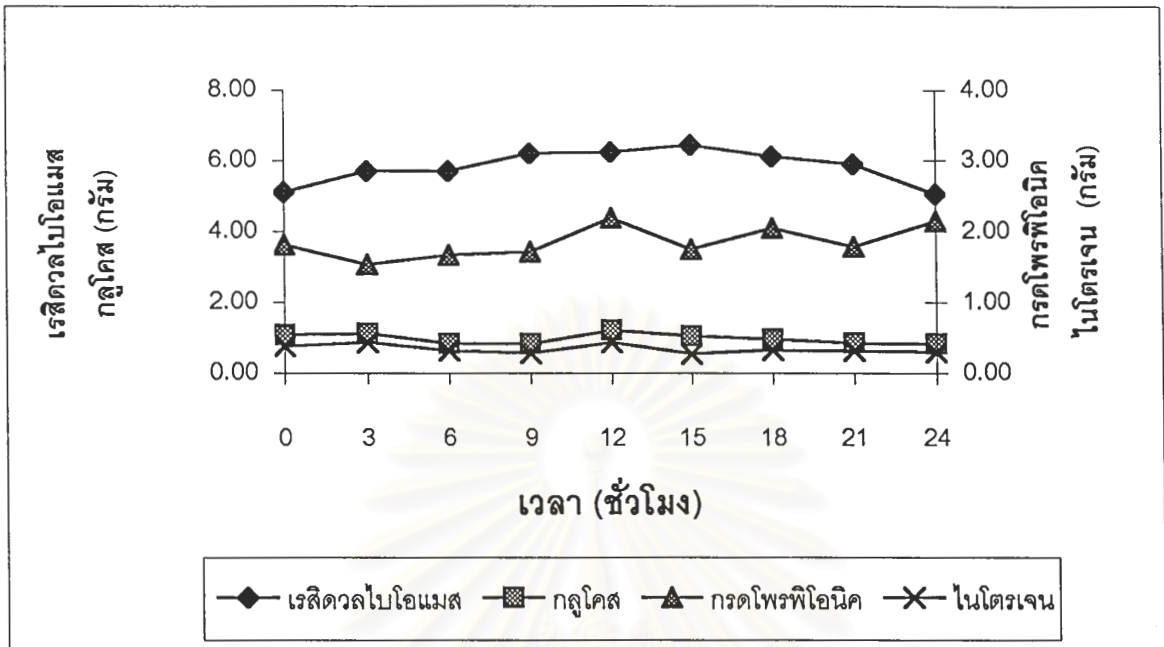


รูปที่ ค3 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 32.7 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพธิโอินิค เป็น 14.7

ตาราง ค4 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 32.7 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 85.4

ชั่วโมงที่	เรสิดวลไปโอแมส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพรพิโอนิก		ไนโตรเจน		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	5.10	0.98	1.07	1.81	1.81	0.37	0.37	0.03	0.00
3	5.70	0.04	1.12	1.50	1.53	0.23	0.43	0.07	0.00
6	5.70	0.73	0.83	1.52	1.66	0.31	0.31	0.10	0.02
9	6.20	0.45	0.82	1.52	1.71	0.27	0.28	0.10	0.02
12	6.24	0.84	1.20	1.74	2.18	0.16	0.43	0.10	0.02
15	6.44	0.68	1.04	1.99	1.74	0.03	0.27	0.10	0.02
18	6.12	0.94	0.94	2.02	2.04	0.33	0.33	0.10	0.02
21	5.90	0.66	0.85	2.14	1.78	0.32	0.32	0.10	0.02
24	5.06	0.72	0.83	1.42	2.14	0.23	0.30	0.09	0.02

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

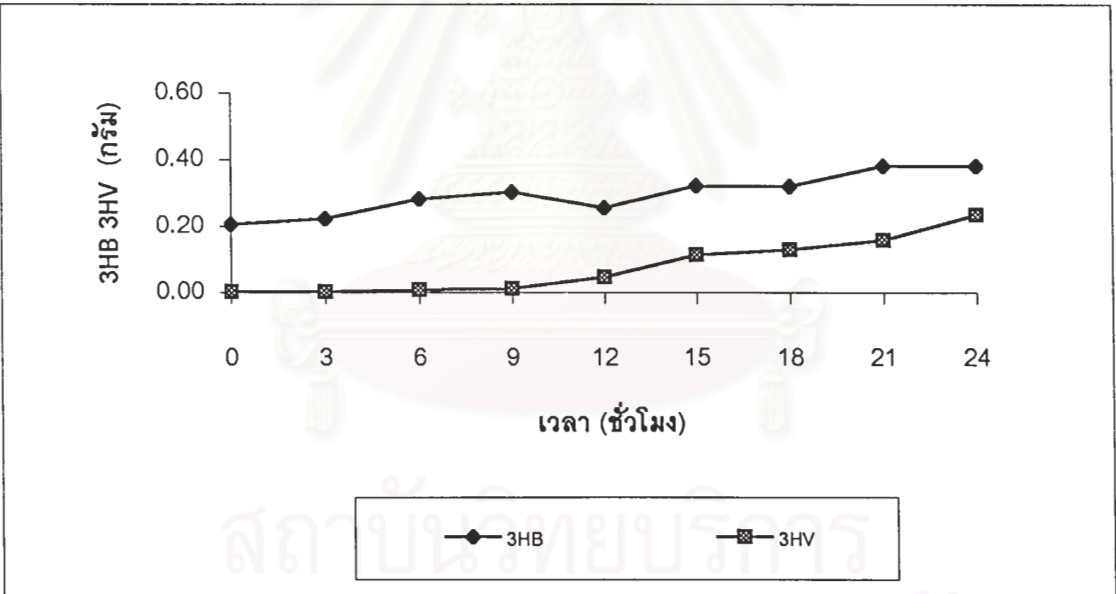
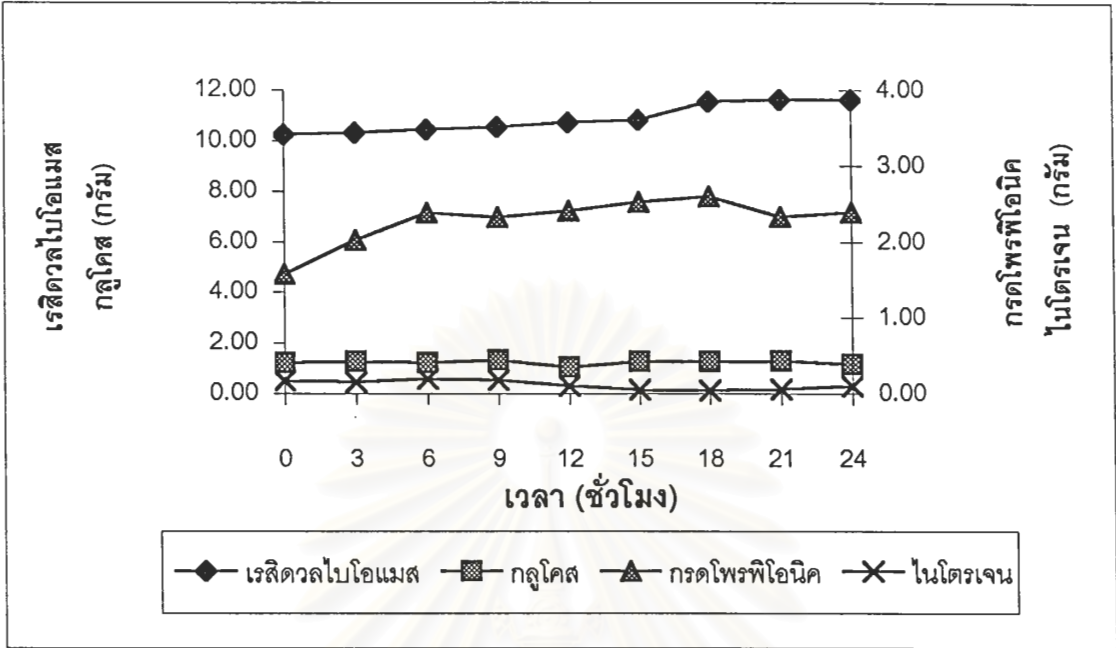


รูปที่ ค4 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 32.7 และ ร้อยละโดยโมลกรดโปรตีนเป็น 14.7

ตาราง ค5 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่าC/N เป็น 171.3 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 85.4

ชั่วโมงที่	เรสิดวลไบโอแมส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพรพิโอนิก		ไนโตรเจน		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	10.23	0.72	1.22	1.57	1.57	0.16	0.16	0.21	0.00
3	10.31	0.77	1.27	1.47	2.02	0.08	0.15	0.22	0.00
6	10.44	0.81	1.21	1.94	2.38	0.09	0.19	0.28	0.01
9	10.53	1.02	1.30	2.28	2.33	0.17	0.17	0.30	0.01
12	10.71	0.82	1.02	2.27	2.41	0.10	0.10	0.25	0.05
15	10.82	0.79	1.25	2.16	2.52	0.05	0.05	0.32	0.11
18	11.54	0.77	1.26	2.28	2.60	0.00	0.04	0.32	0.13
21	11.61	0.00	1.28	2.44	2.33	0.00	0.06	0.38	0.16
24	11.63	0.00	1.14	0.00	2.39	0.00	0.10	0.38	0.23

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

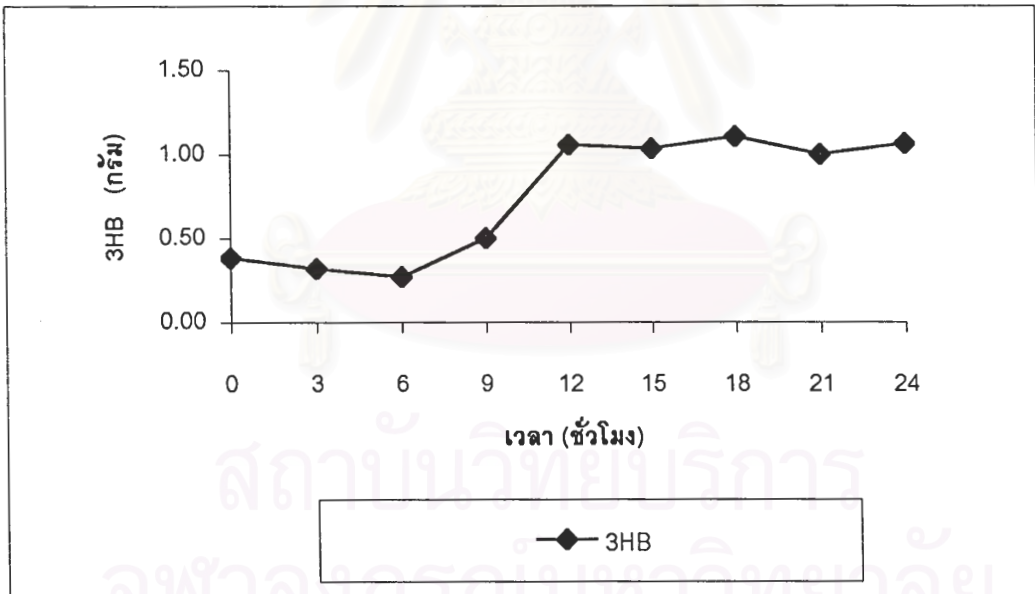
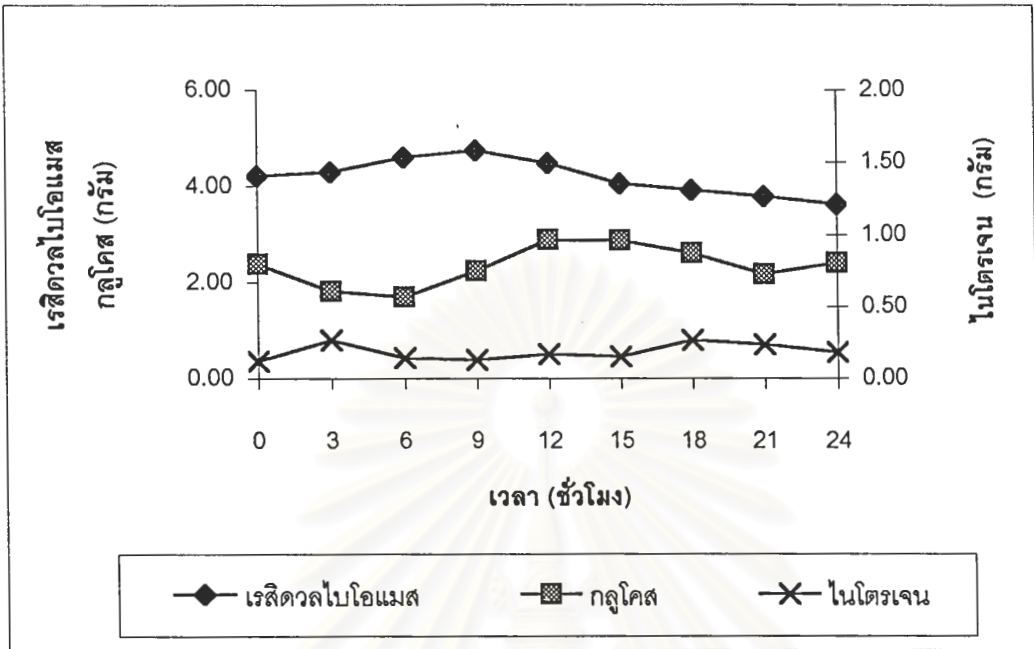


รูปที่ ค5 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 171.3 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพธิโอินิค เป็น 85.4

ตาราง ค6 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 0

เวลา	เรสิดวลไบโอแมส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพรพิโอนิก		ไนโตรเจน		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	4.21	2.38	2.38	0.00	0.00	0.12	0.12	0.38	0.00
3	4.29	1.55	1.81	0.00	0.00	0.06	0.26	0.32	0.00
6	4.60	1.24	1.70	0.00	0.00	0.09	0.14	0.27	0.00
9	4.75	1.18	2.24	0.00	0.00	0.11	0.13	0.50	0.00
12	4.48	1.00	2.89	0.00	0.00	0.10	0.17	1.06	0.00
15	4.05	1.36	2.87	0.00	0.00	0.09	0.15	1.03	0.00
18	3.92	1.16	2.61	0.00	0.00	0.13	0.26	1.10	0.00
21	3.78	1.00	2.18	0.00	0.00	0.17	0.23	1.00	0.00
24	3.63	0.00	2.41	0.00	0.00	0.00	0.18	1.06	0.00

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

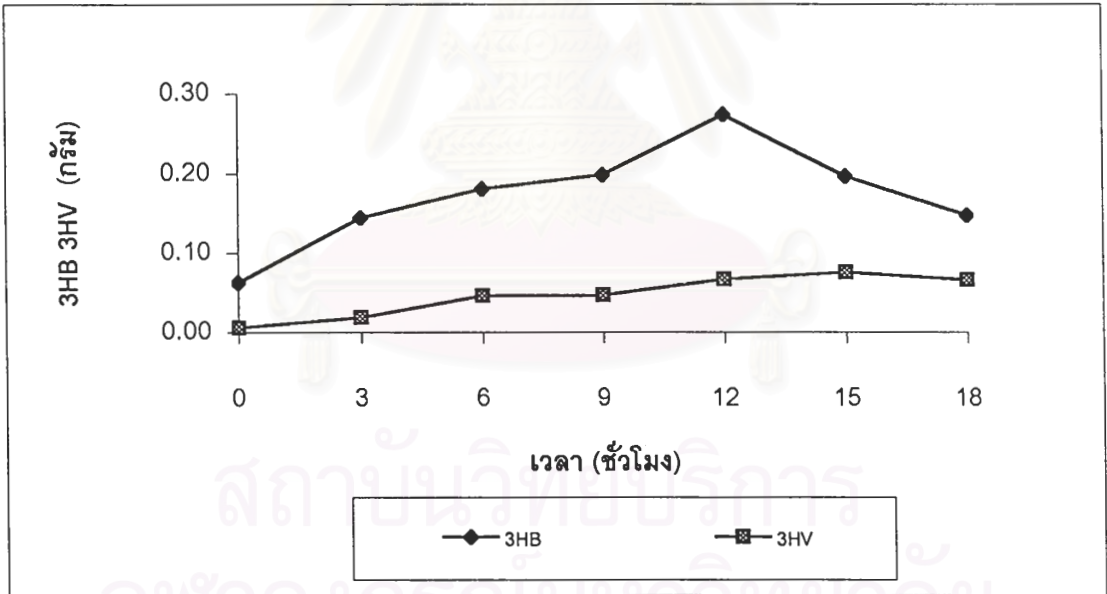
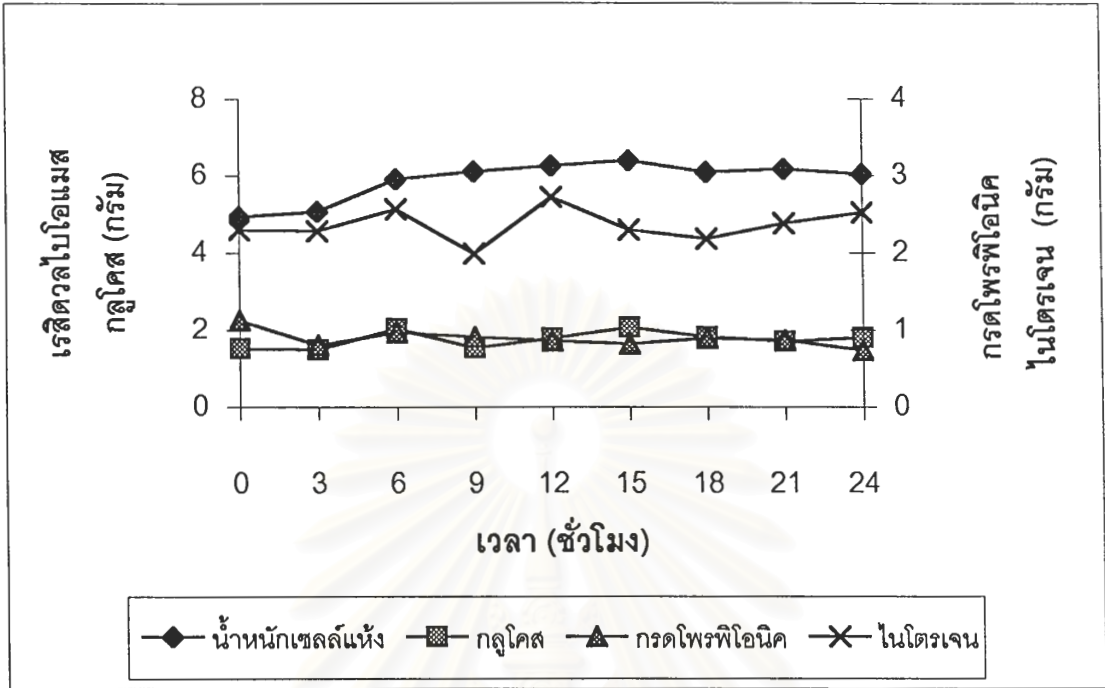


รูปที่ ค6 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 0

ตาราง ค7 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 4 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรฟิโอนิก เป็น 50

เวลา (ชั่วโมง)	เรสิดวลไบโอแมส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพรฟิโอนิก		ไนโตรเจน		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	4.92	1.52	1.52	1.13	1.13	2.30	2.30	0.06	0.01
3	5.06	0.96	1.48	1.05	0.80	1.10	2.28	0.14	0.02
6	5.90	0.78	2.04	0.76	0.97	1.38	2.56	0.18	0.05
9	6.10	0.77	1.54	0.88	0.91	1.46	1.99	0.20	0.05
12	6.24	0.66	1.78	0.88	0.86	0.84	2.72	0.27	0.07
15	6.38	0.69	2.06	0.84	0.82	1.18	2.30	0.20	0.08
18	6.08	0.75	1.82	0.79	0.90	1.52	2.18	0.15	0.07
21	6.16	0.57	1.70	0.87	0.86	1.90	2.38		
24	6.04	0.00	1.79	0.75	0.73	0.00	2.52		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

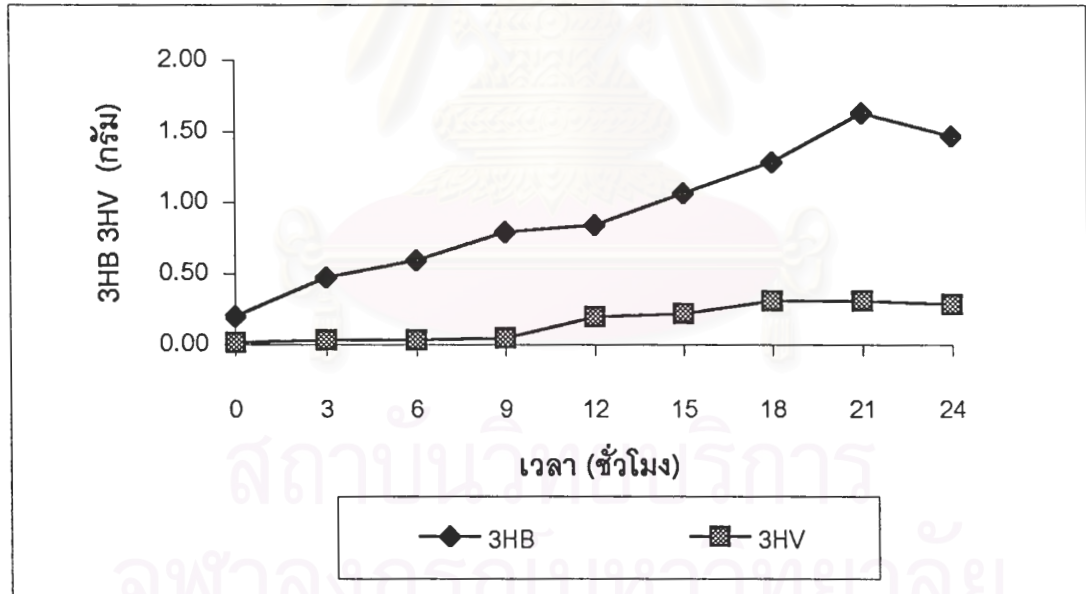
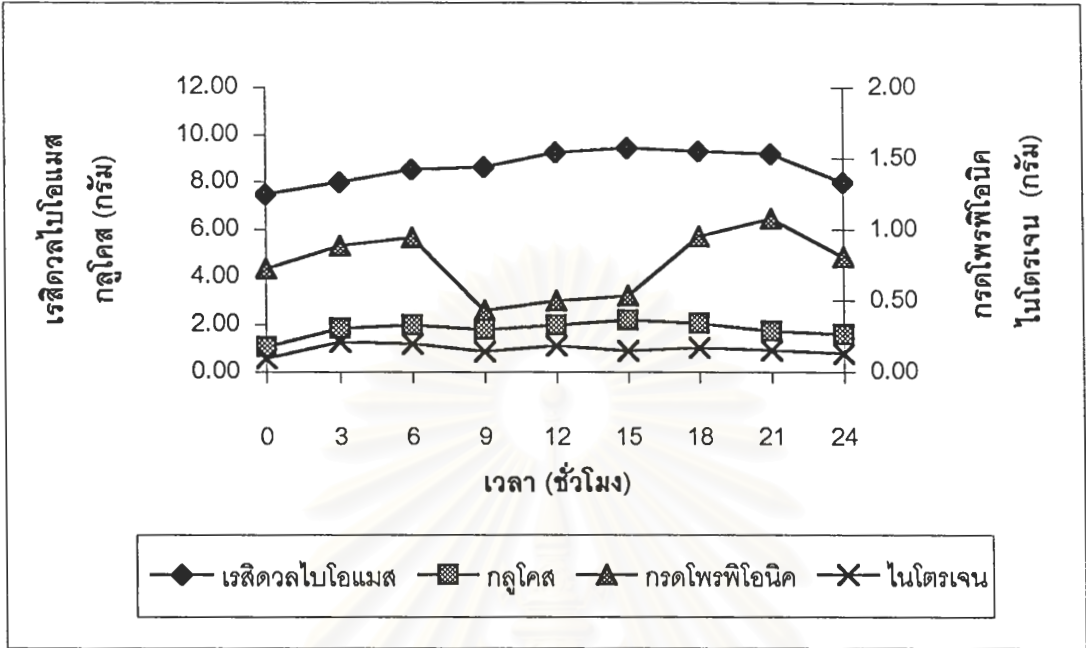


รูปที่ ค7 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 4 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพธิโธนิค เป็น 50

ตาราง ค8 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 200 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 50

เวลา	เรสิดวลไบโอแมส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพรพิโอนิก		ไนโตรเจน		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	7.46	1.03	1.03	0.72	0.72	0.10	0.10	0.20	0.01
3	7.98	0.66	1.82	0.68	0.88	0.15	0.21	0.47	0.03
6	8.50	0.60	1.97	0.86	0.94	0.20	0.20	0.59	0.03
9	8.60	1.84	1.77	0.80	0.43	0.13	0.14	0.79	0.05
12	9.25	1.41	1.97	0.42	0.50	0.03	0.18	0.84	0.19
15	9.41	1.65	2.18	0.47	0.53	0.00	0.15	1.06	0.21
18	9.29	1.39	2.03	0.52	0.95	0.00	0.17	1.28	0.31
21	9.18	1.42	1.72	0.94	1.07	0.00	0.15	1.63	0.30
24	7.97	0.00	1.58	0.58	0.80	0.00	0.13	1.47	0.28

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

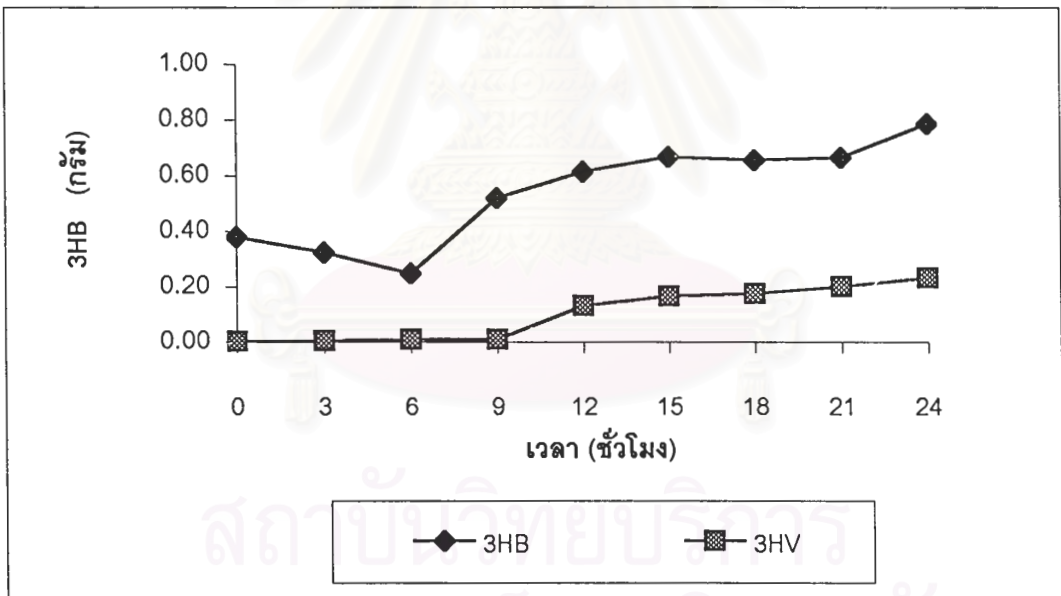
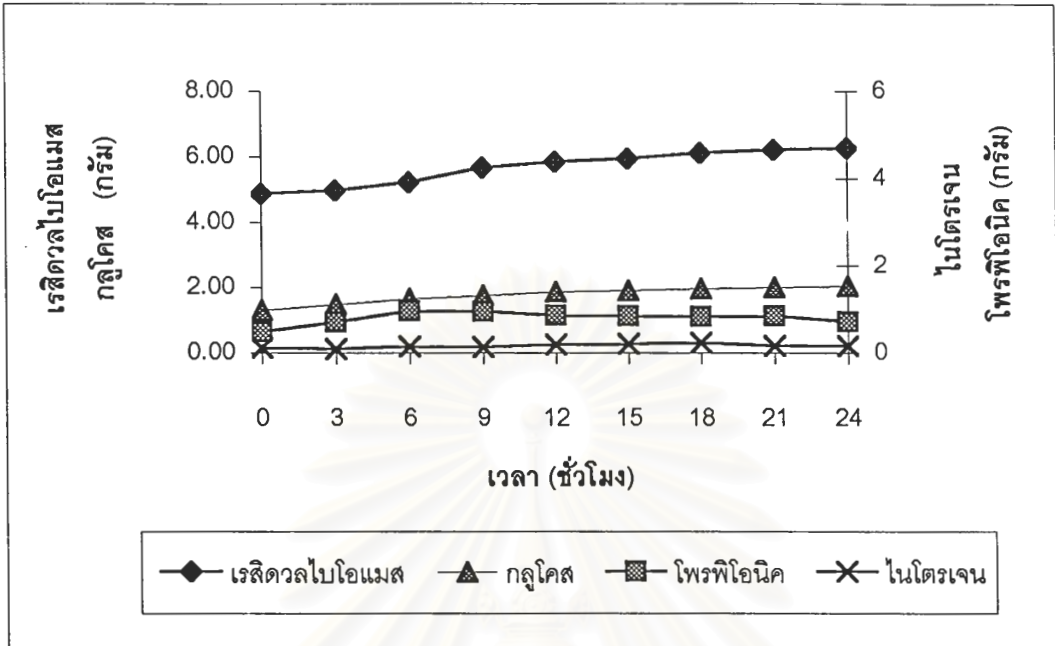


รูปที่ ค8 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 200 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพธิอินิค เป็น 50

ตาราง ค9 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพธิ์อินิค เป็น 50

เวลา	เรลิตวลไบโอแมส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพธิ์อินิค		ไนโตรเจน		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	4.86	1.3	1.3	0.48	0.48	0.124	0.124	0.38	0.00
3	4.96	0.96	1.48	0.46	0.7	0.076	0.088	0.32	0.00
6	5.22	1.22	1.66	0.66	0.96	0.05	0.146	0.25	0.01
9	5.67	1.06	1.76	0.84	0.954	0.062	0.128	0.52	0.01
12	5.85	0.96	1.86	0.82	0.86	0.084	0.186	0.61	0.13
15	5.94	0.82	1.9	0.84	0.84	0.096	0.21	0.67	0.17
18	6.11	0.92	1.96	0.836	0.836	0.062	0.236	0.65	0.17
21	6.21	1.1	2.014	0.754	0.854	0.154	0.154	0.66	0.20
24	6.27	0	2.048	0	0.72	0	0.164	0.79	0.23

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

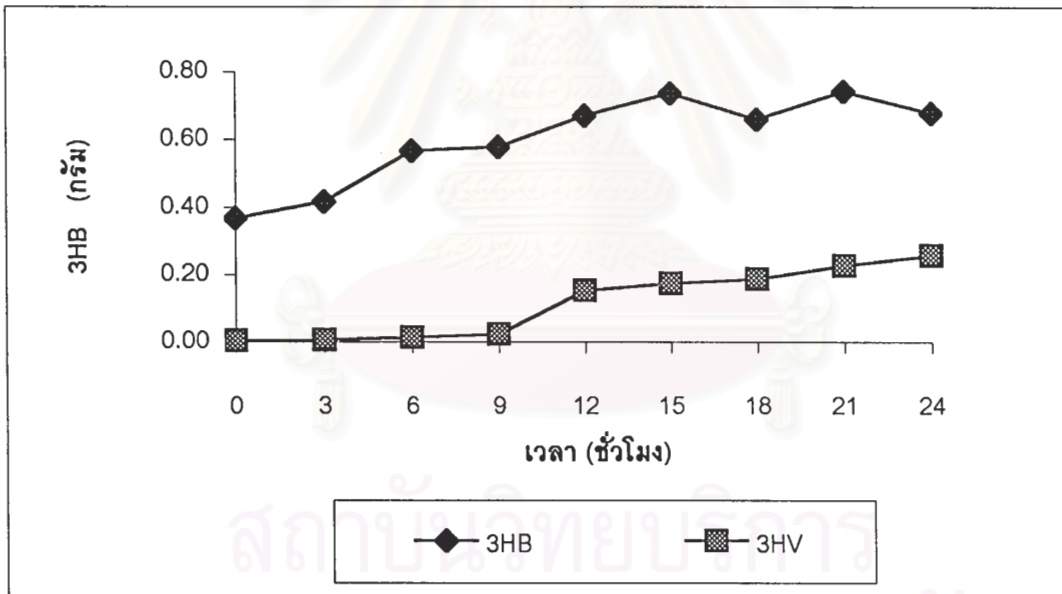
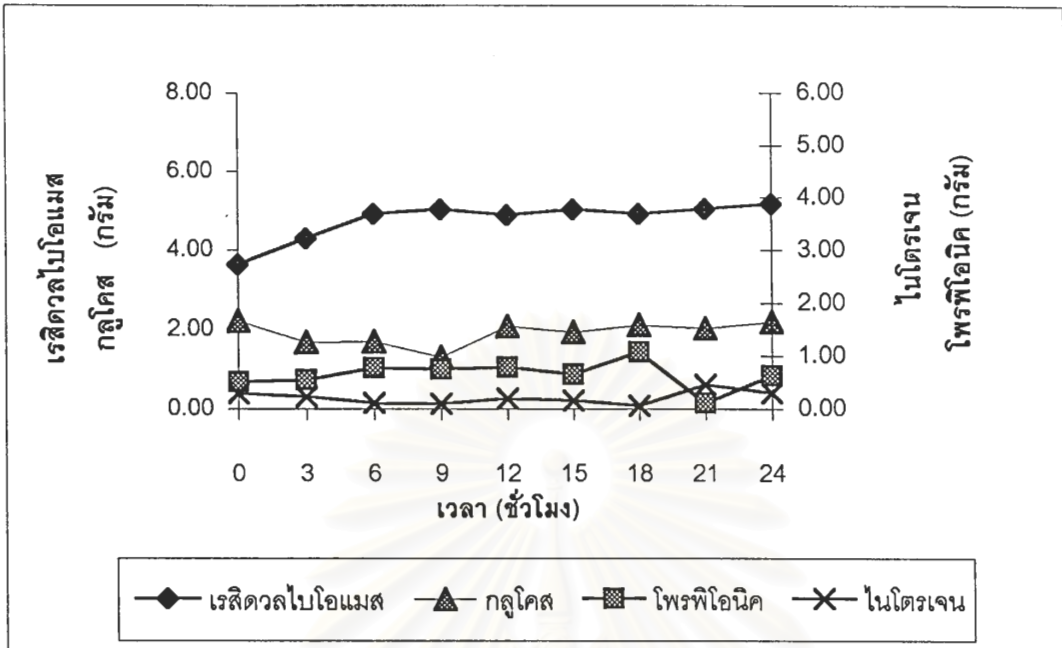


รูปที่ ค9 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ รัยยะโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 50

ตาราง ค10 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 50

เวลา	เรสิดวลไบโอมแอส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพรพิโอนิก		ไนโตรเจน		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	3.62	2.21	2.21	0.51	0.51	0.29	0.29	0.37	0.00
3	4.29	1.50	1.68	0.48	0.54	0.20	0.23	0.42	0.01
6	4.92	1.40	1.70	0.51	0.78	0.06	0.11	0.57	0.01
9	5.03	1.00	1.31	0.65	0.75	0.08	0.10	0.58	0.02
12	4.89	1.25	2.08	0.67	0.79	0.07	0.20	0.67	0.15
15	5.03	1.57	1.93	0.78	0.66	0.08	0.16	0.74	0.17
18	4.92	1.42	2.12	0.62	1.08	0.02	0.06	0.66	0.19
21	5.05	1.48	2.03	0.98	0.11	0.02	0.46	0.74	0.23
24	5.18	0.00	2.20	0.00	0.63	0.00	0.30	0.68	0.26

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

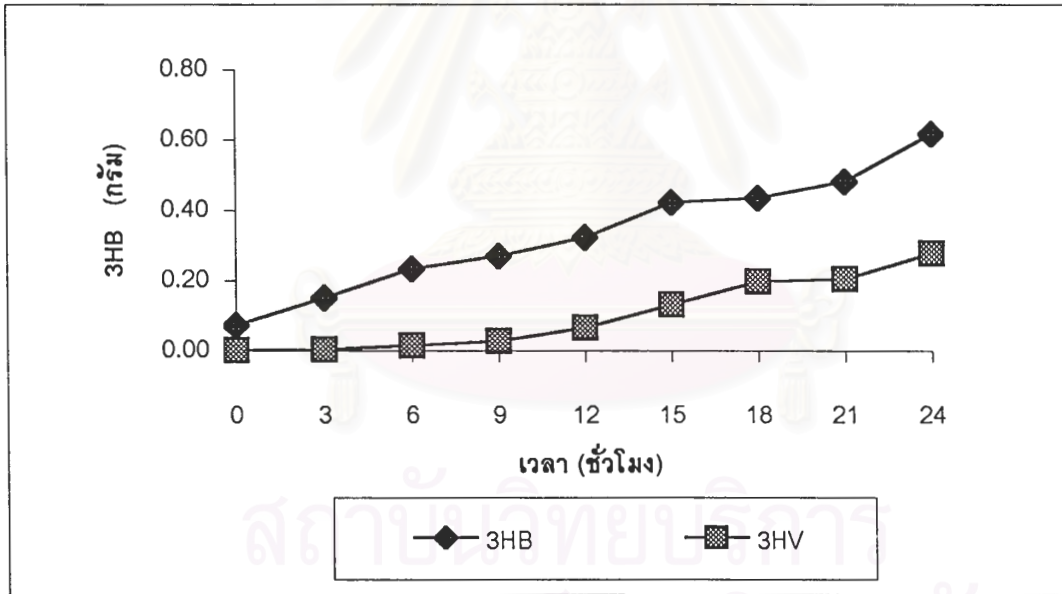
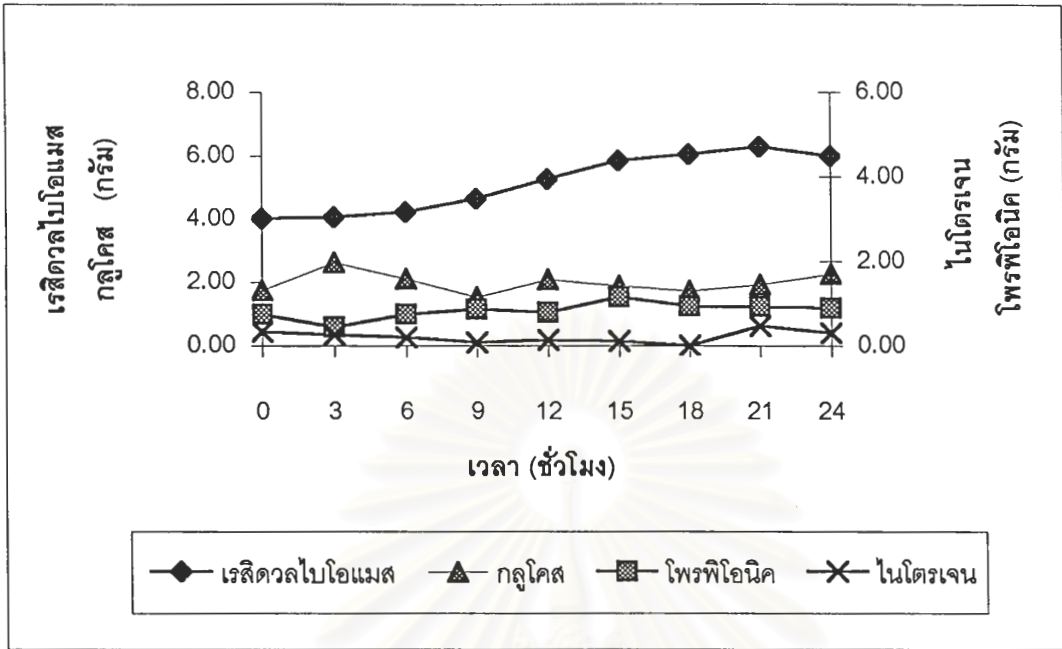


รูปที่ ค10 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 50

ตาราง ค11 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 50

เวลา	เรสิดวลไบโอมแอส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพรพิโอนิก (กรัม)		ไนโตรเจน (กรัม)		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	4.01	1.73	1.73	0.74	0.74	0.33	0.34	0.07	0.00
3	4.06	1.42	2.62	0.42	0.43	0.23	0.26	0.15	0.00
6	4.22	1.64	2.10	0.71	0.73	0.11	0.19	0.23	0.01
9	4.64	1.50	1.51	0.69	0.86	0.06	0.08	0.27	0.03
12	5.26	1.41	2.08	0.73	0.77	0.04	0.14	0.32	0.06
15	5.85	1.39	1.88	0.76	1.15	0.09	0.10	0.42	0.13
18	6.05	1.42	1.72	0.82	0.93	0.00	0.00	0.43	0.20
21	6.28	1.53	1.92	0.86	0.92	0.00	0.46	0.48	0.20
24	6.00	0.00	2.26	0.00	0.88	0.00	0.30	0.62	0.28

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

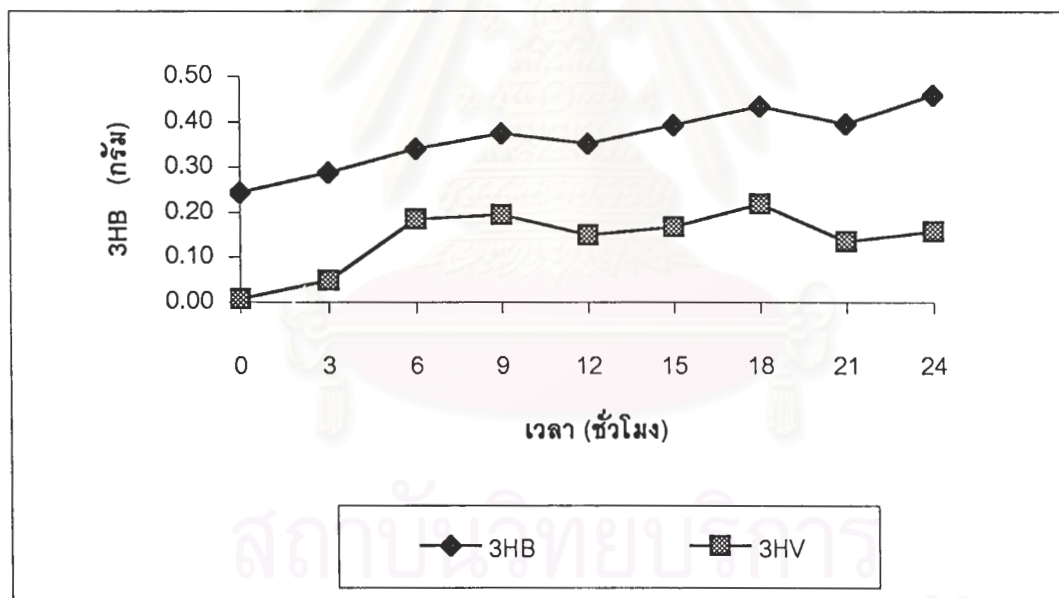
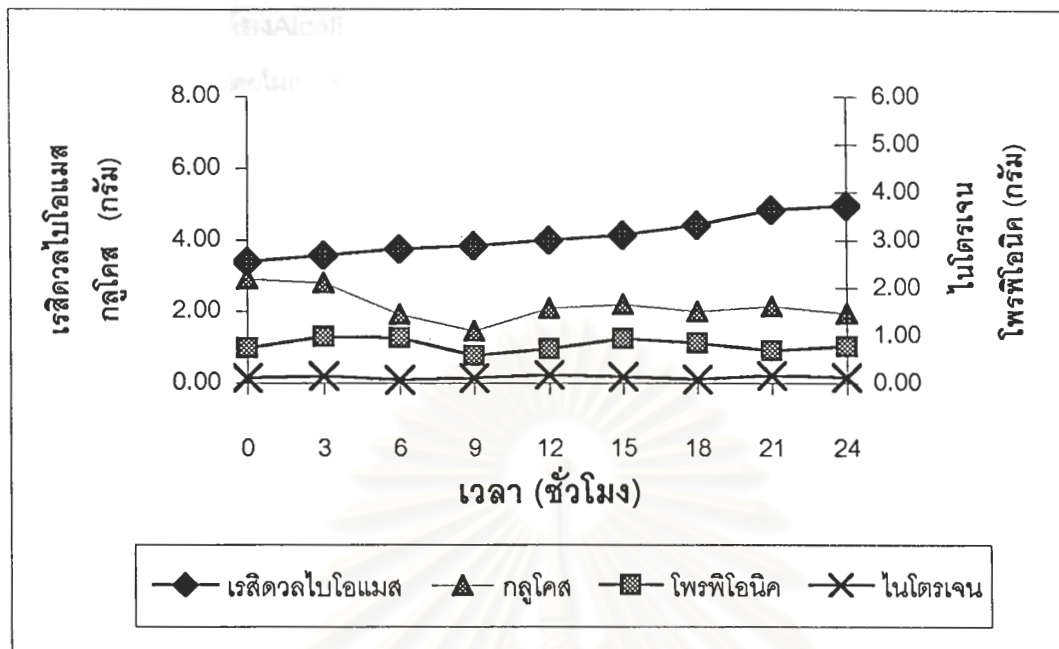


รูปที่ ค11 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 50

ตาราง ค12 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 50

เวลา	เรสิดวลไบโอแมส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพรพิโอนิก		ไนโตรเจน		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	3.38	2.91	2.91	0.74	0.74	0.10	0.10	0.24	0.01
3	3.56	2.04	2.80	0.71	0.98	0.09	0.15	0.29	0.05
6	3.75	1.60	1.92	0.91	0.95	0.06	0.06	0.34	0.18
9	3.83	1.40	1.46	0.67	0.57	0.06	0.10	0.37	0.19
12	3.99	1.02	2.10	0.70	0.72	0.10	0.17	0.35	0.15
15	4.14	1.75	2.20	0.68	0.94	0.13	0.13	0.39	0.17
18	4.42	1.48	2.00	0.90	0.84	0.08	0.09	0.43	0.22
21	4.85	1.60	2.15	0.83	0.68	0.12	0.16	0.39	0.13
24	4.97	0.00	1.95	0.00	0.77	0.00	0.12	0.46	0.16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

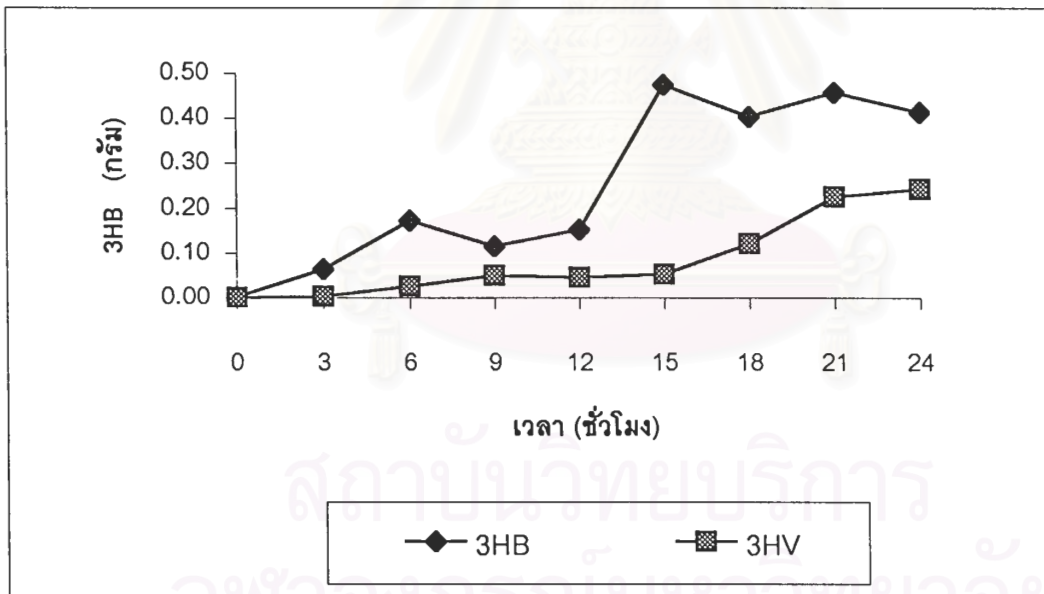
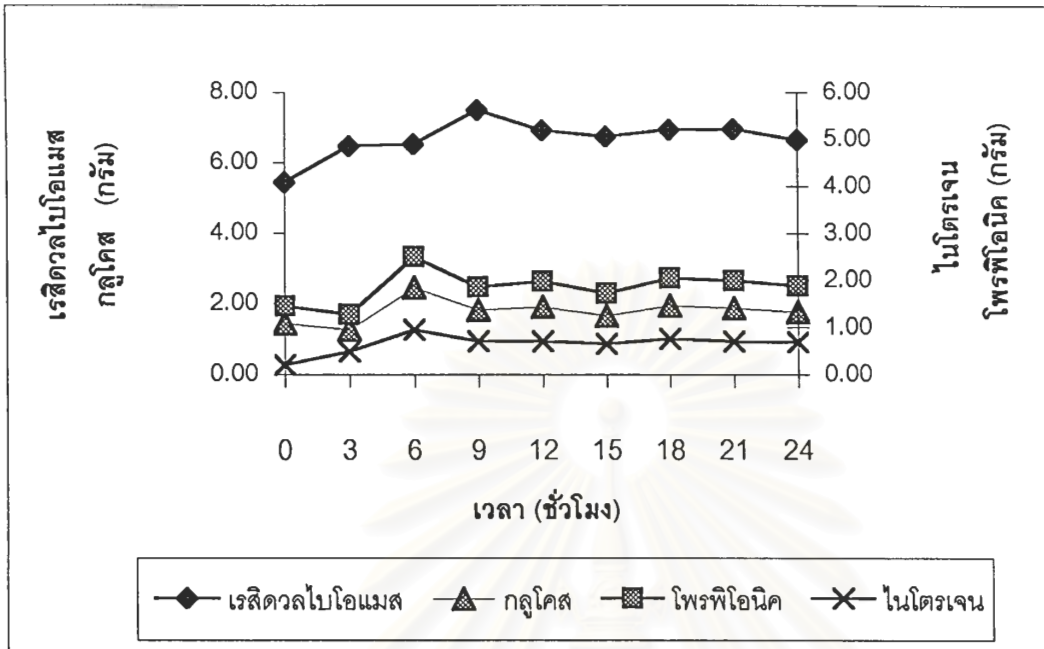


รูปที่ ค12 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรทรีโอนิค เป็น 50

ตารางที่ ค13 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพธิอินิค เป็น 50

ชั่วโมง ที่	เรสิดวลไบโอแมส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพธิอินิค		ไนโตรเจน		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	5.44	1.45	1.45	1.45	1.45	0.21	0.21	0.00	0.00
3	6.46	1.15	1.26	1.20	1.27	0.20	0.48	0.06	0.00
6	6.52	1.26	2.45	1.22	2.49	0.30	0.95	0.17	0.03
9	7.50	1.88	1.82	2.32	1.86	0.68	0.71	0.12	0.05
12	6.92	1.62	1.92	1.78	1.98	0.67	0.71	0.15	0.05
15	6.74	1.59	1.65	1.95	1.72	0.62	0.64	0.47	0.05
18	6.94	1.42	1.95	1.61	2.04	0.61	0.76	0.40	0.12
21	6.96	1.41	1.88	1.85	1.99	0.64	0.70	0.46	0.23
24	6.64	1.32	1.77	1.63	1.89	0.52	0.69	0.41	0.24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

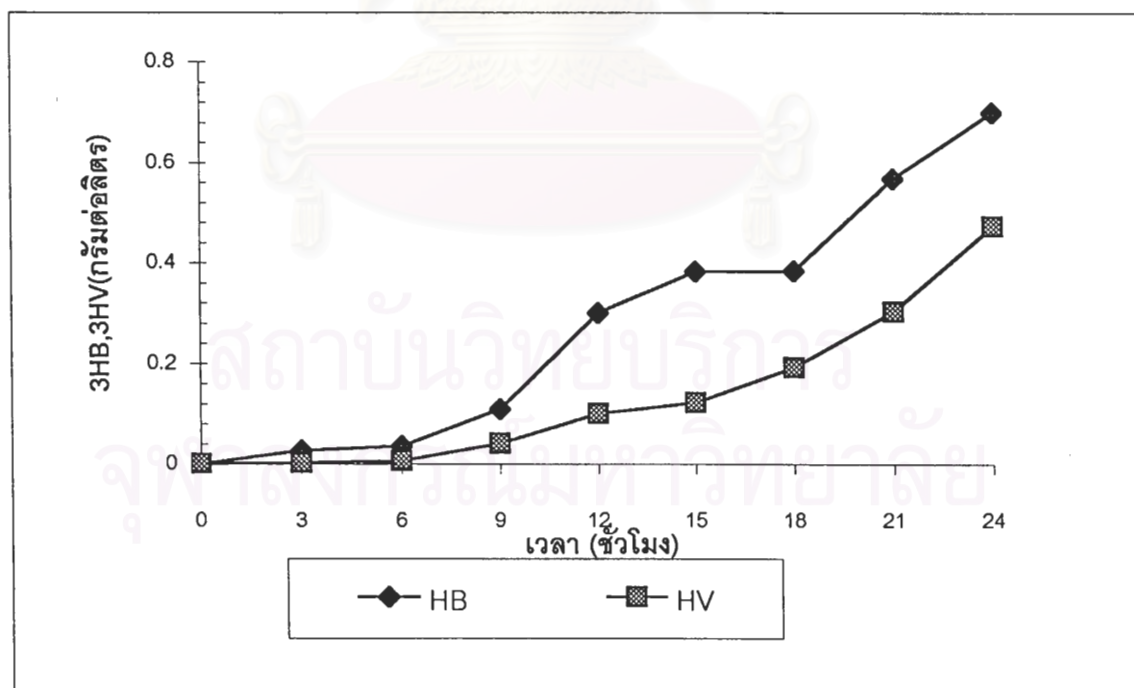
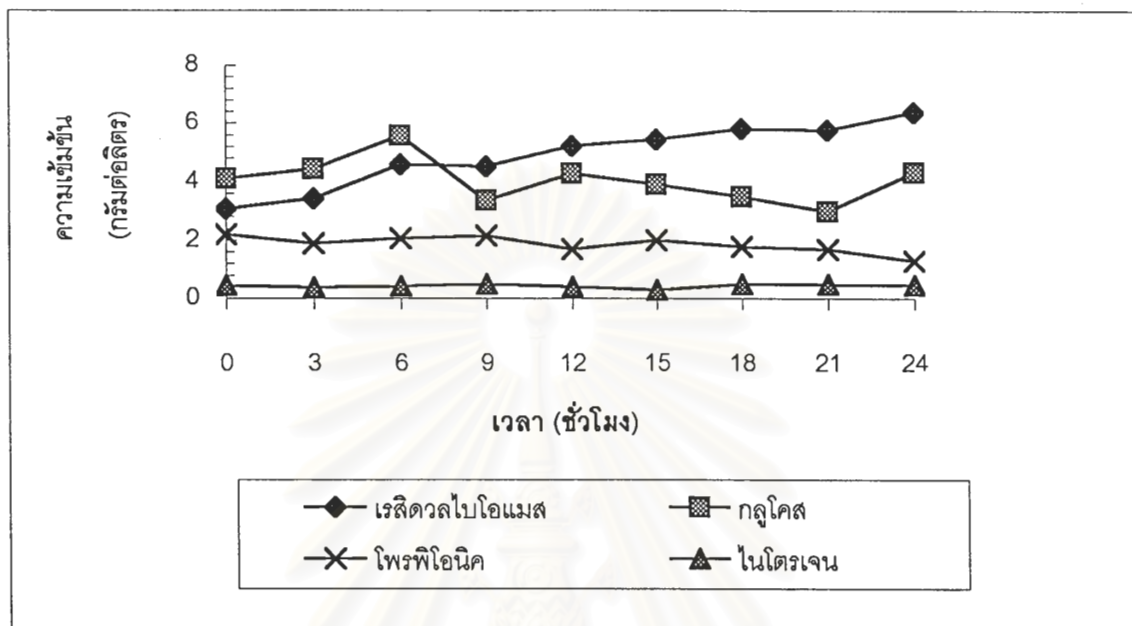


รูปที่ ค13 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 102 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิก เป็น 50

ตารางที่ ค14 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N
ที่ 0.44 โมลอะตอมคาร์บอนต่อลิตร

ชั่วโมง ที่	เรสิดวลไบโอแมส (กรัม)	กลูโคส (กรัม)		โพรพิโอนิค		ไนโตรเจน		3HB (กรัม)	3HV (กรัม)
		ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม	ก่อนเติม	หลังเติม		
0	6.15	4.09	4.09	2.20	2.20	0.44	0.44	0.00	0.00
3	6.86	3.28	4.43	0.55	1.87	0.12	0.37	0.03	0.00
6	9.16	2.12	5.56	1.04	2.05	0.29	0.42	0.04	0.01
9	9.01	2.09	3.35	1.67	2.15	0.11	0.47	0.11	0.04
12	10.42	1.88	4.27	0.98	1.69	0.25	0.39	0.30	0.10
15	10.86	0.79	3.90	0.42	1.99	0.18	0.29	0.38	0.12
18	11.63	1.12	3.48	0.36	1.77	0.05	0.49	0.38	0.19
21	11.51	0.54	2.97	0.58	1.70	0.24	0.48	0.57	0.30
24	12.76	0.46	4.31	0.27	1.30	0.31	0.46	0.70	0.47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

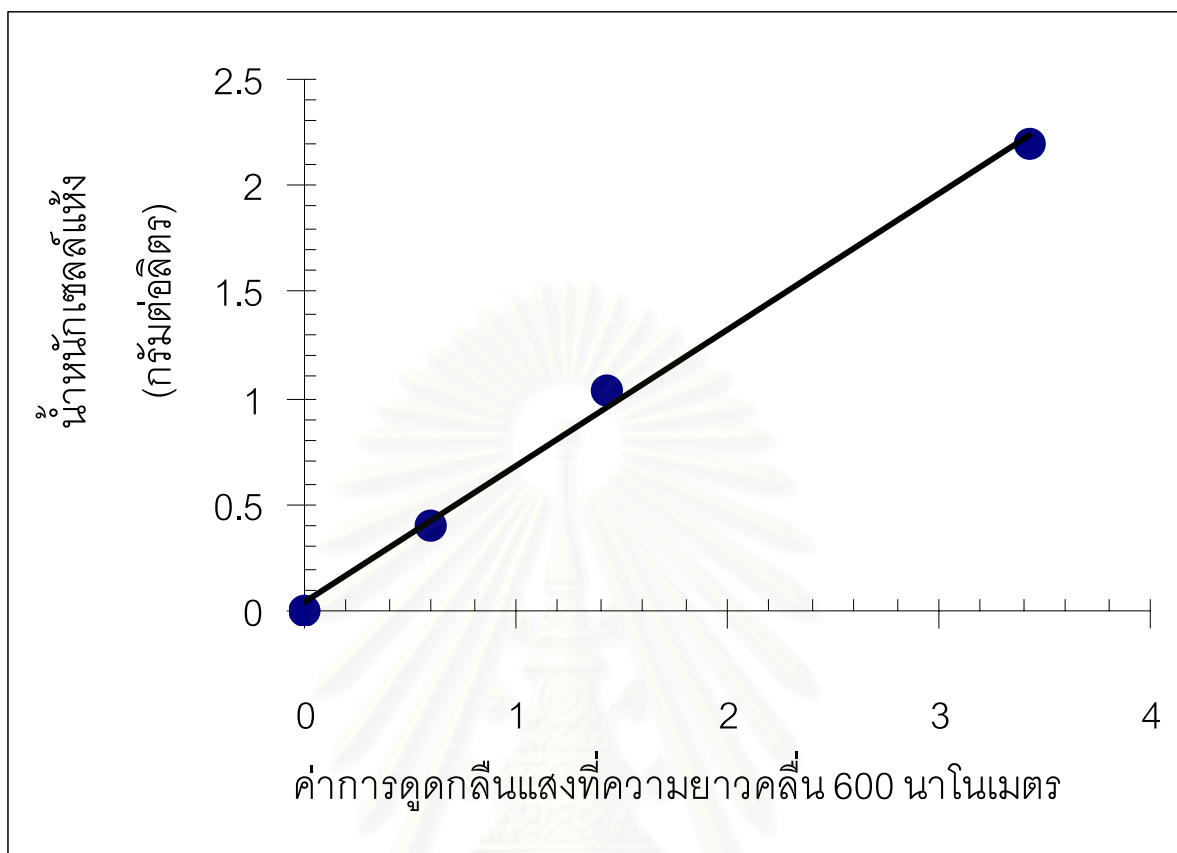


รูปที่ ค14 ผลการเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 บนอาหารสังเคราะห์ที่มีค่า C/N เป็น 70 และ ร้อยละโดยโมลกรดโพรพิโอนิค เป็น 45 ที่ 0.44 โมลอะตอมคาร์บอน



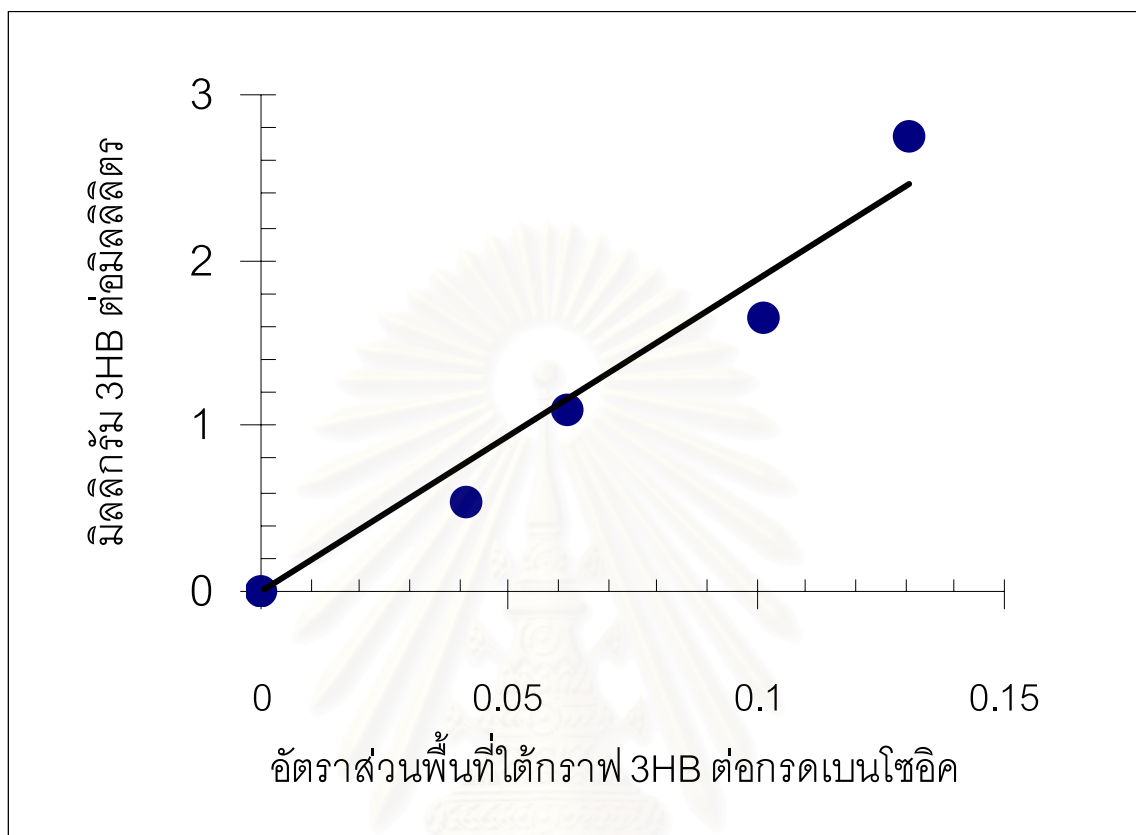
ภาคผนวก ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



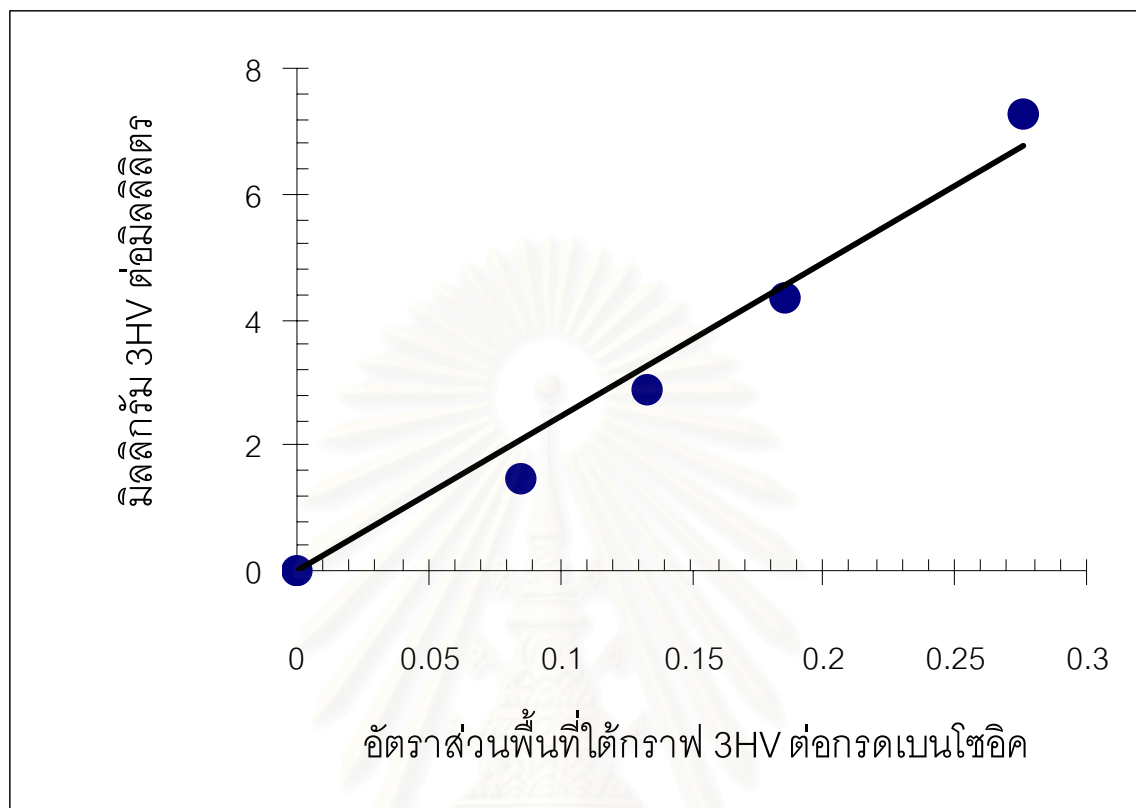
รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำหนักเซลดส์แห้ง

สถาบันนวัตยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



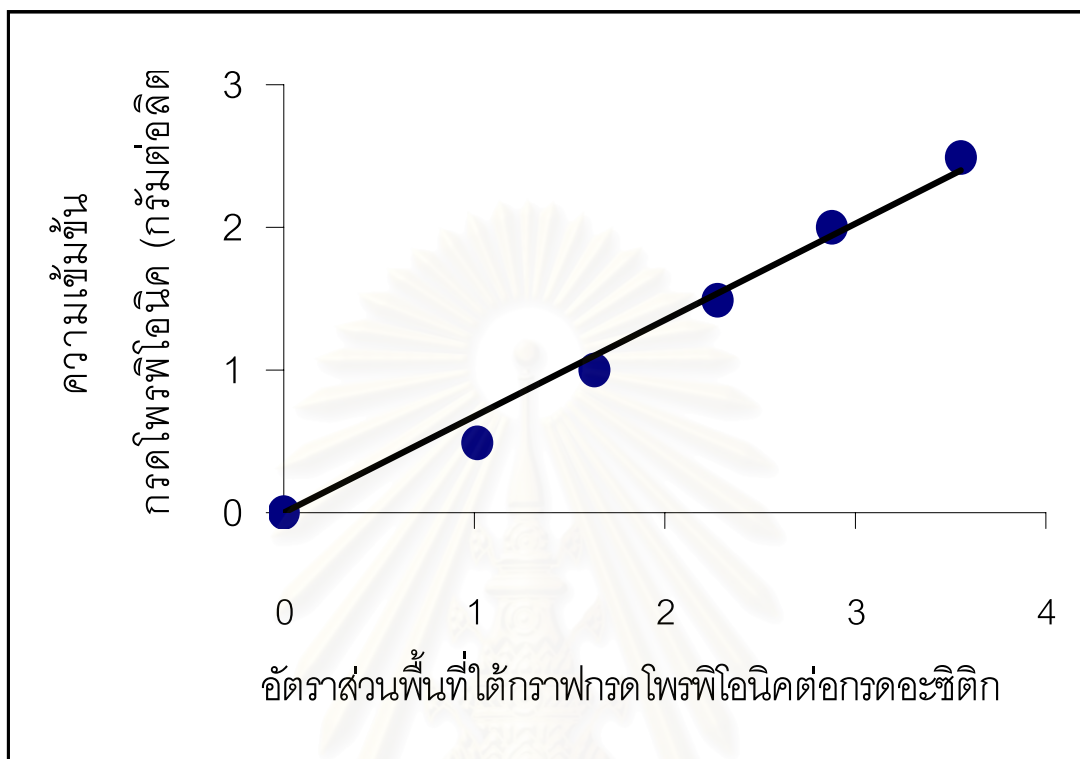
รูปที่ 2 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ 3HB

สถาบันวิจัยพิษวิทยา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



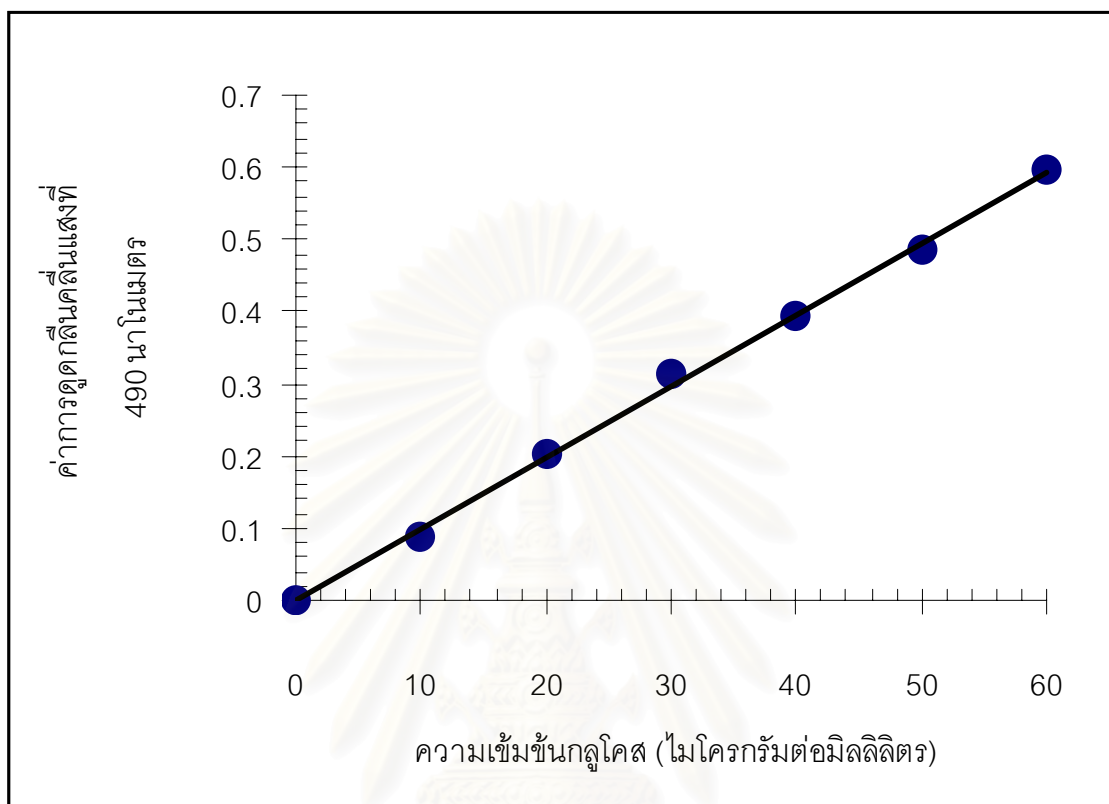
รูปที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ 3HV

สถาบันนวัตยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



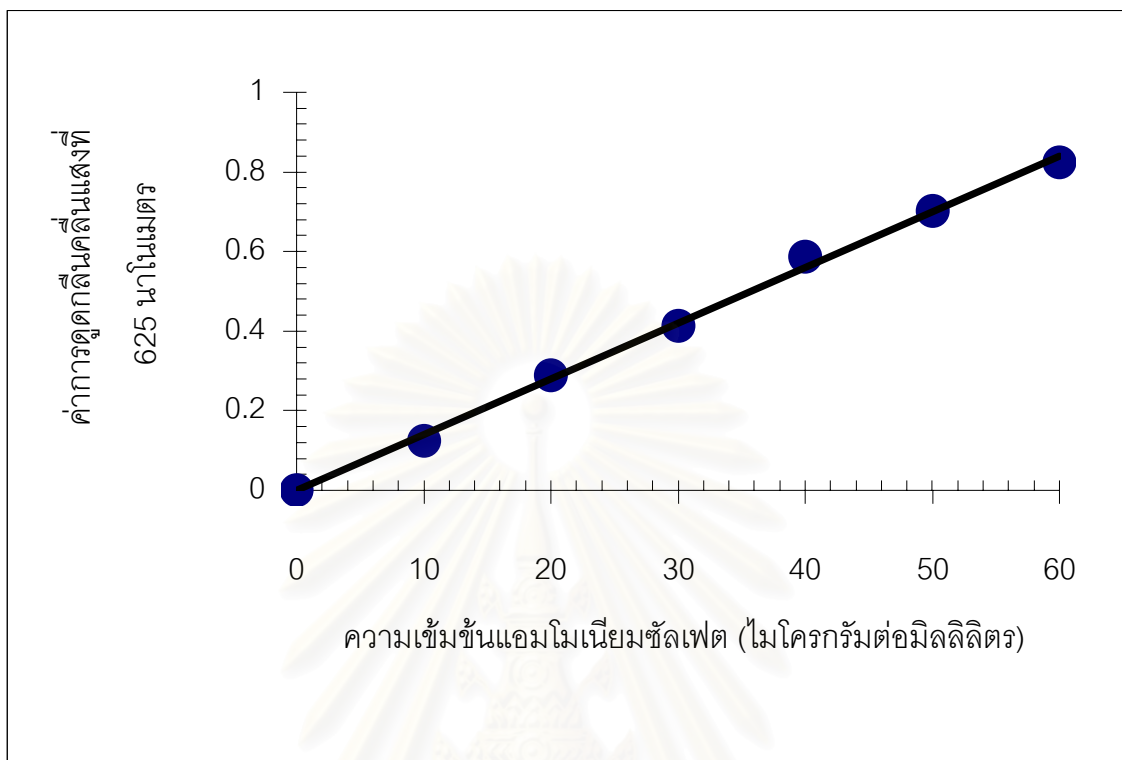
รูปที่ 4 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรดโพรพิโอนิค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.5 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกลูโคส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ๖.6 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายกิตติพล กสิภรณ์ เกิดวันที่ 6 สิงหาคม พ.ศ. 2518 ที่อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2540 หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย