รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเพิ่มศักยภาพการผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่มพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปโฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์จากแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ที่คัดเลือกจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย

ผศ. ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

ดร.สมจิตต์ ปาละกาศ

ผศ.ปราณี นิมิตบุตร

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙

รหัสโครงการ

สัญญาเลขที่ ๙๖/๒๕๕๙

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเพิ่มศักยภาพการผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่มพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปโฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์จากแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ที่คัดเลือกจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ผศ. ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้วิจัย

ดร.สมจิตต์ ปาละกาศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผศ.ปราณี นิมิตบุตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมาย เพื่อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารอาหารต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอับคาโนเอตจากเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ โดยการได้รับ 2-AA และ Acrifavin ตามลำดับ เปรียบเทียบกับเชื้อดั้งเดิม ผลการศึกษาพบว่า การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที ด้วยสารอาหารที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน น้ำตาลฟรุกโตสร่วมกับการใช้ผงชูรสความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนแอมโมเนียมคลอไรค์และแอมโมเนียมซับเฟต สามารถผลิตพลาสติกพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงที่สุดเท่ากับ 2.63 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 75.79 โดยมีมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 3.47 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่าสูงกว่าการเลี้ยงในแหล่งไนโตรเจนทดแทนที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมคลอไรค์ต่อผงชูรสในอัตราส่วน 0.25 : 2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตพลาสติกพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ 2.43 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 52.83 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง แต่สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุด 4.60 กรัมต่อลิตร

ABSTRACT

This work aimed to explore the optimum nutrient conditions for poly-β-hydroxybutyrate (PHB) production by wild type *Alcaligenes latus* TISTR 1403 and its mutaned derived from exposed successfully with 2-AA and Acrifavin. The results revealed that cultured at 30 C on shaker at 150 rpm in modified medium contrained 40 g/L of soybean oil as carbon source instead of fructose and 0.5 g/L of monosofium glutamate as nitrogen source instead of ammonium chioride and ammonium sulfate produced maximum polyhydroxyalcanoates to 2.63 g/L or 75.79 % of cell dry weight (3.47 g/L). This production rate was also higher than the culturing of this strain in medium contrained ammonium chloride and monosodium glutamate (02.25 : 2 g/L) that produced 2.43 g/L of polyhydroxyalcanoates or 52.83 % of cell dry weight Z4.60 g/L)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๙๔/๒๕๕๙ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติเป็นอย่างสูง ที่เป็นผู้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัยแบบต่อเนื่อง สำหรับทุนวิจัยปีแรกในปีงบประมาณ ๒๕๕๙ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์ และต้องขอขอบคุณในความอนุเคราะห์ของห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ทำให้การดำเนินการวิจัยร่วมกันดำเนินด้วยดีตลอด

ผศ.ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

กิตติกรรมประกาศ

สารบัญ

บทนำ 1

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำงานวิจัย 18

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 20

กรอบโครงการวิจัย 20

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 21

การดำเนินการวิจัย 22

รายละเอียดในการดำเนินการวิจัย 22

ผลและอภิปรายผลการวิจัย 28

สรุปการวิจัย 43

บรรณานุกรม 45

ภาคผนวก 56

บทที่ 1

บทนำ

1. กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

กรอบแนวความคิดในการทำงานวิจัยนี้เป็นการต่อยอดเพื่อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดการผลิตพลาสติกชีวภาพทั้งในรูปของโฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์ โดยการปรับชนิดและสัดส่วนของสารอาหาร การศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวพลาสติกชีวภาพชนิด PHAs จากเชื้อ *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์กลายและกลายซ้ำที่คัดเลือกได้และให้ผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งเป็นงานวิจัยได้จากการรับการเงินอุดหนุนการทำวิจัย ในงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2555-2557อย่างต่อเนื่อง

ตารางที่1 การเปรียบเทียบการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการกลายและการกลายซ้ำด้วยรังสีและสารเคมี

สายพันธุ์แบคทีเรีย	**CDW (g/l)**	**PHB (g/l)**	**PHB (%)**
A. latus parent	1.50	0.60	40.00
A. latus /γ-2AA	0.85	0.25	29.41
A. latus /γ-2AA/ UV-2AA(1)	2.55±0.07	1.57±0.15	61.57
A. latus /γ-2AA/UV-2AA(2)	3.10±0.10	1.97±0.12	63.55
A. latus /γ-2AA/UV-2AA(2)/UV-Acriflavin	5.25±0.07	3.05±0.07	58.10
A. latus /γ-2AA/UV-2AA(2)/UV-5-bromourasil	5.30±0.10	3.30±0.10	62.26
A. latus /γ-2AA/UV-2AA(2)/Acriflavin	5.45±0.14	3.50±0.00	64.22

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาได้เน้นเรื่องการปรับปรุงพันธุ์เป็นหลักใหญ่และได้ทดลองเลี้ยงในอาหารและในถังหมัก ตรวจสอบลักษณะทางสรีระวิทยาโดยการส่องภายใต้กล้องทั้งในระบบ SEM และ TEM และตรวจสอบชนิดและปริมณของ PHAs ที่ได้โดยใช้ GC-MS พบว่าให้ปริมาณ PHB คิดเป็น 0.70 กรัมต่อกรัมของมวลเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในสารอาหารราคาถูก

พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้หรือพลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) เป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ ผลิตได้จากแหล่งวัตถุดิบที่สามารถผลิตขึ้นมาทดแทนได้ (renewable resource) ใน

กระบวนการผลิตโดยให้พลาสติกที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงหรือเทียบเท่าพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี แต่มีข้อดีคือสามารถย่อยสลายได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยลดปัญหาของขยะพลาสติกได้สูง สำหรับพลาสติกชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีหลายชนิดที่ได้รับความสนใจได้แก่ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate, PHAs) และพอลิแลคไทด์ (Poly lactide, PLA) โดยเฉพาะกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตหรือเรียกโดยทั่วไปว่า พลาสติก PHAs ได้รับความสนใจสูง เนื่องจากผลิตภัณฑ์เม็ดพลาสติกที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นภายในเซลล์สามารถทนความร้อนได้ดีเมื่อนำมาขึ้นรูปและใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ในกลุ่มของพอลิโพรไพลีน (Polypropylene, PP) (Ojumu, et.al., 2004) ส่วนพลาสติกชนิดพอลิแลคไทด์ พบว่ามีคุณสมบัติของฟิล์มเหมาะสำหรับใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ชนิดพอลีเอสทิลีน (PE) และ พอลิเอทธิลีนเทเรฟทาเลต (Polyethylene terephthalate, PET) ได้

พลาสติกชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์กลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates) หรือ PHAs เป็นอะลิฟาติกพอลิเมอร์ธรรมชาติที่จุลินทรีย์ผลิตและเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสำรองจะเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่สมดุลของสารอาหารในการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะการมีปริมาณสารอาหารที่จำเป็น (essential nutrient) เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส หรือแมกนีเซียม เป็นต้น อยู่ในปริมาณน้อย แต่มีปริมาณสารอาหารคาร์บอนสูง จึงเป็นผลให้เกิดการสะสมสารพลังงานสูงอยู่ในรูปพอลิเมอร์ (Salehizadeh & Van Loosdrecht, 2004) ที่เกิดจากการสังเคราะห์โดยทางกระบวนการทางชีวภาพ โดยกลุ่ม PHAs ได้มีการแบ่งหมวดหมู่ตามความยาวของเส้นสายของกรดไฮดรอกซีอัลคาโนอิต (hydroxyalkanoic acids) คือ พอลิเมอร์สายสั้น ซึ่งจะประกอบด้วยหมู่อัลคิลที่มีคาร์บอนสองอะตอมหรือเรียกว่าพลาสติกชนิดโฮโมพอลิเมอร์ ตัวอย่าง เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (polyhydro xybutyrate, PHB) พอลิไฮดรอกซีวาเลอเรต (polyhydroxy -valerate, PHV) และ พลาสติกโคพอลิเมอร์ของพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตกับไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxy butyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV) (Chien et al., 2007) ส่วนกลุ่มพอลิเมอร์ที่มีสายปานกลางซึ่งจะประกอบด้วยหมู่อัลคิลไม่น้อยกว่า 3 อะตอม ได้แก่พอลิไฮดรอกซีออกตาโนเอต (poly-3-hydroxyoctanoate, PHO) พอลิไฮดรอกซีโนนาโนเอต (poly-3-hydroxynonanoate, PHN) เป็นต้น ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพลาสติก PHAs มีมากมายหลายกลุ่มเช่น แบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* มีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์สายสั้นได้สูง (Lenz & Marchessault, 2005) ในขณะที่ *Pseudomonas oleovorans* และ *Pseudomonads sensu* จะผลิตพอลิเมอร์สายปานกลางได้ดี (Timm & Steinbüchel, 1990) คุณสมบัติของพลาสติก PHAs แต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับการรวมกันของชนิดและปริมาณหน่วยย่อยของโมโนเมอร์ของ 3-hydrooxy-acid (Ha) เช่น poly-3-hydroxybutyrate (PHB) ซึ่งพบว่ามีหน่วยย่อย HAs มีมากกว่า 80 ชนิด เป็นสารประกอบของ

PHAs โดยในการผลิตหน่วยย่อยจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และแหล่งคาร์บอนเป็นหลัก (Madison & Huisman, 1999 ; Hazer & Steinbüchel, 2007)

พลาสติกในกลุ่ม PHAs ได้รับความสนใจในวงการอุตสาหกรรมพลาสติกมากเนื่องจากมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างพลาสติกชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตหรือเรียกกันทั่วไปว่า พลาสติก PHB ซึ่งมีคุณสมบัติสังเคราะห์ใกล้เคียงกันกับพลาสติกสังเคราะห์พอลิโพรพิลีน (polypropylene, PP) โดยพลาสติก PHB มีความสามารถทนอุณหภูมิสูงโดยมีจุดหลอมเหลวสูงถึง 180 องศาเซลเซียส และมีคุณสมบัติเป็นฟิล์มกันน้ำและความชื้นได้ดี แต่พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาดน้อยกว่าพลาสติกพอลิโพรพิลีนมาก แต่มีข้อดีที่น่าสนใจ คือสามารถย่อยสลายได้ง่ายเป็นผลทำให้พลาสติกชนิดนี้ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในภาคอุตสาหกรรมและนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยต่างๆ ทางการแพทย์ และการเกษตร (Zhang et al., 2004) จากรายงานการศึกษาจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้เพื่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตได้แก่ *Alcaligenes* sp., *Azobacter* sp., *Pseudomonas* sp., และ *Cupriavidus* sp. (Chee etal., 2010) สำหรับ *Alcaligenes* sp. เป็นแบคทีเรียประเภทแกรมลบมีรูปร่างเป็นท่อนกลมหรือรูปร่างกลมขนาด 0.5-1.0 x 0.5-2.6 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา 1-8 เส้น โคโลนีมีลักษณะไม่มีสี สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน แต่มีบางสายพันธุ์ที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส พบได้ทั้งในน้ำและบนบก (Holt et al., 1994) จากรายงานของ Khandenavis และคณะ (2007) ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิต PHB จากตะกอนในอุตสาหกรรมนมและอุตสาหกรรมอาหาร โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาทดลองผลิต PHB ในอาหารที่ประกอบด้วยกรดซิตริก พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณร้อยละ 40 ของน้ำหนักเซลล์แห้งส่วนการเลี้ยงเชื้อ *Ralstonia eutropha* สายพันธุ์ NRRL B14690 โดยใช้ฟรุคโตสเข้มข้น 10 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตมวลเซลล์ได้สูงสุดเท่ากับ 3.25 กรัมต่อลิตร และผลิต PHB ได้เท่ากับ 1.4 กรัมต่อลิตร และการเติมยีสต์สกัดสามารถเพิ่มผลผลิตของ PHB ได้สูงยิ่งขึ้น (Khanna & Srivastana, 2005) นอกจากนี้มีรายงานพบว่านอกจากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* และ *Alcaligenes latus* จะสามารถสร้าง PHB ได้ในปริมาณสูงแล้ว เชื้อทั้งสองยังสามารถสังเคราะห์พลาสติกชนิด P(3HB-co-3HV) ซึ่งเป็นพลาสติกชนิดทนร้อน (Thermoplastic) ที่มีคุณภาพดีกว่าพลาสติก PHB แต่มีกระบวนการผลิตด้วยเทคนิคพิเศษและมีต้นทุนในการผลิตสูงกว่าได้อีกด้วย (Lee, 1995) ส่วนรายงานของ Ramsay และคณะ (1990) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Alacaligenes latus และ Alcaligenes eutrophus* บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิต P(HB-co-HV) ได้ในปริมาณร้อยละ 43 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากเชื้อแบคทีเรีย *Alacaligenes latus และ Alcaligenes eutrophus* นิยมนำมาใช้ในการศึกษาแล้ว พบว่าเชื้อ *Cupriavidus* sp. สามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณสูง

และถูกนำมาใช้ศึกษาเพื่อผลิต PHB แล้วในปัจจุบัน (Yu,2008 ; Lee et al., 2008 ; Cavalheiro et al., 2009)

ในการผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates) หรือ PHAs มีการใช้สารอาหารหลากหลายชนิดที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนสูงในการผลิต เช่น ใช้แป้งและรำข้าว (Huanget al., 2006) น้ำตาลกลูโคส (Van Wegen et al., 1998) หรือน้ำมันพืชและน้ำมันถั่วเหลือง (Choi & Lee, 1997; Park & Kim, 2011) เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสร้างผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนอีกด้วย เช่น หางนมจากโรงงานผลิตเนยแข็ง (Akiyama et al., 2003) กากน้ำตาลจากอ้อย (Gouda, et al., 2001) กลีเซอรอลจากโรงงานผลิตน้ำมันต่างๆ (Ashby et al., 2004; Cavalheiro et al, 2009; Shrivastav et al., 2010; Zhu et al., 2010; Mothes et al., 2007; Kawata et al., 2010; Ashby et al., 2011 ; Hassan, et al., 1996) วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหาร (Yu, et al., 1998) น้ำทิ้งจากโรงงานแป้ง (Haas, et al., 2008) วัสดุเหลือทิ้งจากการสกัดน้ำมันมะกอก (Martinez, et al., 1995) น้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำมันมะกอก (Dionisi, et al., 2005) และน้ำทิ้งโรงงานปาล์มน้ำมัน (Alias & Tan, 2005) และกลีเซอรอลเหลือจากการผลิตน้ำมันดีเซล (Posada, et al., 2011; Palmeri et al., 2012) รำข้าวสาลี (Koutinas et al., 2007 ; Xu et al., 2010) เป็นต้น ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตลง เนื่องจากพบว่าในการผลิตพลาสติก PHAs นั้นมีต้นทุนของวัตถุดิบและค่าใช้จ่ายในการทำให้บริสุทธิ์สูง อีกทั้งยังมีรายงานการวิจัยในการคัดเลือกและปรับปรุงจุลินทรีย์ให้มีความสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้สูงและใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก เพื่อลดค่าใช้จ่ายให้ต่ำที่สุด ทั้งนี้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญ ทำให้สร้างผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความแตกต่างกัน มีสารอาหารเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญและมีผลต่อการสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดของจุลินทรีย์ด้วย เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน วิตามินและเกลือแร่ รวมทั้งสารบางชนิดที่สามารถเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ กลุ่มโคเอนไซม์หรือโคแฟคเตอร์ และสารเสริมการสังเคราะห์ เป็นต้น

ในการศึกษาปัจจัยทางกายภาพพบว่า เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ เช่น อุณหภูมิในการหมัก ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ การให้อากาศ และการกวน เป็นต้น โดยทั่วไปส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์มีผลโดยตรงต่อชนิดและปริมาณการสร้างผลิตภัณฑ์ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ต้องมีส่วน ประกอบสำคัญ 4 ส่วน คือ 1) เป็นอาหารที่มีแร่ธาตุและสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและให้พลังงาน 2) เป็นอาหารที่มีความสมดุลย์ของธาตุอาหารเพื่อความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 3) เป็นอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ และ 4) มีสารเหนี่ยวนำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นได้ดี (Wiseman, 1995)

สำหรับการสังเคราะห์พลาสติก PHAs ซึ่งเป็นกลุ่มสารพอลิเอสเทอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ (R)-3HA ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในรูป R-Configuration ซึ่งมีความจำเพาะของสเตอริโอไอโซเมอร์ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของเอนไซม์ PHA synthase (Sudesh et al., 2000) ซึ่งในการสังเคราะห์ PHAs ชนิดต่าง ๆ จะมีเอนไซม์ PHA synthase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนโดยในการสะสมพลาสติก PHAs ในเซลล์นั้นจะมีเอนไซม์อยู่รอบ ๆ พื้นผิวของ PHA granule นอกจากนี้ยังมีโปรตีน phasin เป็นตัวควบคุมแบบจำเพาะ (specific regulator protein) ซึ่งมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พลาสติกโดยตรง ในการสังเคราะห์จะมีเอนไซม์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความหลากหลาย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยมียีนมากกว่า 60 ชนิด ที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พลาสติกกลุ่ม PHAs ซึ่งในการสังเคราะห์พลาสติกชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตหรือเรียกกันทั่วไปว่า PHB จะเกี่ยวข้องกับตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ โดยเริ่มจากอะซิติลโคเอนไซม์เอ (acetyl-co A) ถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ (acetoacetyl-co A) และไฮดรอกซีบัวทิริลโคเอนไซม์เอ (hydroxybuacetyl-co A) โดยการทำงานของเอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลส (β-ketothiolase enzyme) และเอนไซม์อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (aceto acetyl-coA reductase enzyme) จากนั้นจึงเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) ไฮดรอกซีบัวทิริลโคเอนไซม์เอเปลี่ยนไปเป็นพอลิ ไฮดรอกซีบิวทีเรตโดยเอนไซม์ PHB synthase (Sudesh et al., 2000) ในกรณีที่มีปริมาณของอะซิติลโคเอนไซม์เอมากเกินไป ซึ่งจะส่งผลทำให้การสังเคราะห์ลดลง รวมถึงสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมก็เป็นสาเหตุสำคัญต่อชนิดของ PHAs ที่สังเคราะห์ได้เช่นเดียวกัน (Luengo et al., 2003)

ปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบและปริมาณการผลิตพลาสติกชีวภาพได้แก่ แหล่งคาร์บอน พบว่าในธรรมชาติ มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน จุลินทรีย์ที่มีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตขึ้นภายในเซลล์พบมากในกลุ่มแบคทีเรีย (Holmes, 1985; Verlinden et al., 2007) ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและคุณภาพของผลผลิต ที่ได้แตกต่างกันโดยแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้คือ *A. eutrophus* หรือที่รู้จักกันในชื่อ *Ralstonia eutropha* (Fatemeh & Ebrahim, 2002) เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายและสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ในปริมาณสูงถึงร้อยละ 80 ของมวลเซลล์แห้ง (Mercan et al., 2002) นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* สามารถในการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงถึงร้อยละ 87 ในระหว่างการเจริญในสภาวะที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจนซึ่งสูงกว่าในสภาวะปกติที่ไม่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 50 (Wang & Lee, 1997) นอกจากจะสามารถผลิตพลาสติกชนิดโฮโมพอลิมอร์ได้แล้ว พบว่า เชื้อทั้งสองชนิด ยังสามารถผลิตพลาสติกชนิดโคพอลิเมอร์ได้อีกด้วย แต่ทั้งนี้ต้อง

อาศัยสารเสริมการสังเคราะห์ กรดอะมิโน วิตามิน หรือกรดไขมันบางชนิด เป็นต้น สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพของจุลินทรีย์ได้แก่

แหล่งคาร์บอน แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์และการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยพบว่าการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นสูงหลังจากแบคทีเรียมีการเจริญและเข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) และภายใต้สภาวะที่สารอาหารไม่สมดุล นั่นคือ มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ แต่มีการจำกัดปัจจัยอื่น เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และออกซิเจน เป็นต้น ดังนั้น ในการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจะทำให้ผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ ในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น โดยแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตมีอยู่หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการทำงานวิจัยในปี 2555 –2557 ซึ่งได้เปรียบเทียบการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *Alcaligenas latus* ที่ผ่านการกลายและกลายซ้ำกับการรายงานวิจัยอื่น ๆ ซึ่งพบว่าให้ค่าสูงรองลงมาจากการเลี้ยง *Ralstronia eutropha* ซึ่งใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน (Park & Kim, 2011)

จากรายงานการวิจัยที่น่าสนใจเมื่อมีการเติมเอทานอลร้อยละ 1 สามารถเพิ่มผลผลิตได้ของการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtillis* โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ผ่านการทรีตด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่าสามารถผลิต PHAs ได้ร้อยละ 54.1 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นได้ทำการปรับปรุงสูตรอาหารโดยการเติมเอทานอลร้อยละ 1 ร่วมกับการเติมแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด คือแอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรทอย่างละ 1 กรัมต่อลิตร เป็นผลทำให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 62.21 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (Gomaa, 2014) ส่วนในการผลิต PHB จากแบคทีเรีย *Vibrio spp* ที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเลจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ M11, M14, M20 และ M31 โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน และความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า สายพันธุ์ M11 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้โซเดียมอะซิเตตเข้มข้นสูงถึง 7.8 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิต PHB ได้มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 30.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนการใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสายพันธุ์ M14 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 12.3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงที่สุด คิดเป็นร้อยละ 45.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สำหรับสายพันธุ์ M20 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 15.5 กรัมต่อลิตร โดยผลิต PHB ได้สูงสุดร้อยละ 42.8 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ M31 ที่เจริญได้ดีเมื่อใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 14.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน แต่ผลิต PHB ได้ปริมาณต่ำคิดเป็นร้อยละ 24.0 ของ

น้ำหนักเซลล์แห้ง (Chien, et al., 2007) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กัน มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงได้แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและแหล่งคาร์บอนที่ใช้

สายพันธุ์จุลินทรีย์	**แหล่งคาร์บอน**	**ปริมาณ PHB (g/l)**	**แหล่งอ้างอิง**
Alcaligenes australica	Sucrose	6.24	Gahlawat & Srivastava. (2013)
Alcaligenes latus	Sucrose	3.55	Wang et al. (2012)
Ralstronia eutropha	Soybean oil	13.00	Park & Kim (2011)
Alcaligenes eutrophus	Sugarcane juice	1.28	Waranya et al. (2011)
Alcaligenes eutropha ATCC 17696	Glucose	0.81	El-Sayed et al. (2009)
Alcaligenes latus ATCC 29712		4.94	
Alcaligenes eutrophus TISTR 1095	Sweet sorghum juice	0.03	Tanamool et al. (2008)
Alcaligenes latus ATCC 29714		0.68	
Alcaligenes latus/γ-2AA (เชื้อสายพันธุ์กลาย)	Molasses	6.67	**งานวิจัยงบประมาณประจำปี 2555-2557**
Alcaligenes latus/γ-2AA/UV-2AA(2) /Acriflavin(เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ)		**9.73**	

ในการผลิต PHB ของเชื้อ *Halomonas boliviensis* ได้สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 56 เมื่อใช้แป้งที่ผ่านการย่อยสลาย (starch hydrolysate) เป็นแหล่งคาร์บอน (Quillaguaman, et al., 2005) ส่วนในการเลี้ยง *Burknolderia megaterium* ด้วยกากน้ำตาลอ้อย พบว่าเชื้อสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับร้อยละ 46.2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงด้วยน้ำแช่ข้าวโพด (Mona, et al.,2001) และการเลี้ยง *Cupriavidus necator (Ralstonia eutropha)* โดยใช้น้ำมันพืชที่ผ่านการทอดมาเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าให้ปริมาณ PHAs ได้ใกล้เคียงกับการเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสคือ 1.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงด้วยน้ำมันบริสุทธิ์และน้ำมันที่ผ่านความร้อนซึ่งให้ปริมาณ PHAs 0.62 และ 0.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Verlinden et al. 2011) ส่วนการนำเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยสลาย (cellulose hydrolysate) มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHA จากเชื้อ *Burknolderia cepacia* และ *Burknolderia sacchari* พบว่าสามารถ PHA ได้ปริมาณสูงร้อยละ 53 และ 62 ตามลำดับ (Silva, et al., 2004) ส่วนการศึกษาของ Mona Azza & Sanna (2001) พบว่า *B. megaterium* สามารถเจริญในกากน้ำตาลอ้อย (Cane sugar molasses) ได้ดีกว่าในน้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor) โดยสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตได้มากสุดเท่ากับร้อยละ 46.2 ของมวลเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้นร้อยละ 2 ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Chaijumrus &

Udpuay (2008) เชื้อ *B. megaterium* ATCC 6748 โดยใช้กากน้ำตาล และน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 ชั่วโมง พบว่า หลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 45 ชั่วโมง การใช้ปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 4 และน้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 4 สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด คือ 7.2 กรัมต่อลิตร และมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 16.74 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 43 ของมวลเซลล์แห้ง จากรายงานของ Yezza และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตจากเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenas latus* ATCC 29714 ด้วยการใช้น้ำตาลเมเปิลเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมไดแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.8 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร และธาตุอาหารรองปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 33±1 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 27 ชั่วโมง พบว่ามีมวลเซลล์ 4.4±0.5 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตคิดเป็นร้อยละ 77.6±1.5 ของมวลเซลล์แห้ง

แหล่งไนโตรเจน จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนได้แตกต่างกันซึ่งมักอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ เช่น แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) ยีสต์สกัด (Yeast extract) เคซีน (Casein) เนื้อสกัด (Beef extract) และทริปโตน (Tryptone) ส่วนสารประกอบอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมไนเตรต (Ammonium nitrate) ยูเรีย (Urea) แอมโมเนียมออกซาเลต (Ammonium oxalate) และแอมโมเนียมอะซิเตท (Ammonium acetate) (Grothe et al., 1999; Khanna & Srivastava, 2005) ดังตัวอย่างเช่น Montaser และคณะ (2011) ศึกษาการเลี้ยง *Azotobacter Beijerinckii* DSMZ 1041 เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยใช้สูตรอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.5, 1 และ 2 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การใช้กลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 6.5 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 2.95 กรัมต่อลิตร ส่วน Wang และคณะ (2013) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ATCC 29714 โดยใช้น้ำตาลหัวบีทความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.97 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่า มีมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 10.30±1.01 กรัมต่อลิตร ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 4.01±0.95 กรัมต่อ

ลิตร คิดเป็นร้อยละ 36.66±7.28 ของมวลเซลล์แห้ง และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.22±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในการเลี้ยงด้วยแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนของ Grothe และคณะ (1999) ซึ่งได้ศึกษาเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรีย *A. latus* ATCC 29714 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรีย พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.4 กรัม สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 4.6 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ได้มีการศึกษาแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเปรียบเทียบกับอนินทรีย์ไนโตรเจนจากรายงานการวิจัยของ Khannafari และคณะ (2006) ได้ทำการเลี้ยง *Azotobacter chroococum* โดยใช้โปรตีนในหางนม (Milk whey) เป็นส่วนประกอบของอาหารแล้วเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แบคโตเปปโตน เคซีน ยีสต์สกัด เนื้อสกัด โปรทิเอชเปปโตน และทริป โตน เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ในอัตราเร็ว 122 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่า การเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นเนื้อสกัดจะผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุดในปริมาณร้อยละ 75 ของมวลเซลล์แห้ง มีรายงานวิจัยความสำคัญของสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนก็มีผลต่อการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยพบว่าการใช้จุลินทรีย์ระบบตะกอนเร่งโรงงานผลิตอาหารความเข้มข้นตะกอนเริ่มต้นเท่ากับ 3.15 กรัมต่อลิตร ซึ่งเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 500 ถึง 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 24, 96, 120, 144 และ 168 (โมลต่อโมล) ตามลำดับ พบว่า เมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น ชุดการทดลองที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 144 มีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดร้อยละ 33 (Kumar, 2004) ส่วนรายงานของ Khanna และ Srivastava (2006) ซึ่งทำการศึกษาความเหมาะสมในการเติมความเข้มข้นของไนโตรเจน และระยะเวลาของการเติมโดยทำการเลี้ยงเชื้อ *R.eutropha* NRRL B14690 ในถังปฏิกรณ์ โดยทำการเติมไนโตรเจน (7 กรัมต่อลิตร) ที่อัตราการเติม 70 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 50 เชื้อ *R. euthopha* มีการผลิตมวลเซลล์ได้มากถึง 32 กรัมต่อลิตร มีปริมาณ PHB 14 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงพบว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน จะทำให้ได้ปริมาณของพลาสติกแตกต่างกันด้วย

แหล่งแร่ธาตุอาหารอื่นๆ ในการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจะเกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ เป็นต้น พบว่า ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และซัลเฟอร์นั้นจัดเป็นแร่ธาตุหลักที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณที่มากพอ โดยเฉพาะฟอสฟอรัสและแมกนีเซียม เนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้างและการถ่ายเทพลังงานต่อจุลินทรีย์และพลังงานในเซลล์ โดยอยู่ในรูปของพอลิเมอร์ในการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซี

บิวทีเรตของแบคทีเรียเกิดขึ้น เมื่อมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอแต่มีการกำจัดปริมาณของฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอื่นๆ เพื่อให้เหมาะสมกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต เช่น รายงานการศึกษาของ Ryu และคณะ (1997) ในการเลี้ยง *A. eutrophus* ในสภาวะกึ่งกะที่มีการจำกัดปริมาณฟอสเฟต มีการควบคุมความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.8 อุณหภูมิในการหมัก 34 องศาเซลเซียส ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการศึกษาที่ความเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.2, 3.1, 4.3 และ 5.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นสูงขึ้นสามารถผลิตเซลล์และพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตได้สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตเริ่มต้น 5.5 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณของเซลล์และพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตได้สูงสุดเท่ากับ 2.81 และ 2.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน Grothe และคณะ (1999) ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลการเติมและไม่มีการเติมธาตุอาหารเสริมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *A. latus* โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าการเติมธาตุอาหารเสริมที่ประกอบด้วย $C_6H_{11}O_7FeNO_7$ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร H_3BO_3 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร $CoCl_2{\cdot}H_2O$ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร $MnCl_2{\cdot}4H_2O$ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร $Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร $NiSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงขึ้นถึง 3.2 กรัมต่อลิตร

ความสำคัญสารเสริมการเจริญ (Growth factor) ในการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพพบว่าสารเสริมการเจริญมีบทบาทในการสังเคราะห์ชนิดของพลาสติกชีวภาพที่ต้องการได้ ซึ่งสารเหล่านี้ ได้แก่ สาร precursor กรดไขมัน กรดอะมิโนบางชนิด และแร่ธาตุต้องการปริมาณน้อยบางชนิด ซึ่งที่ผลต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่ม PHAs ที่ได้รับความสนใจมากคือ poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy vale rate [P(3HB-co-HV)] และ poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] หรือใช้ชื่อเรียกว่า PHB อีกด้วย สาเหตุที่พลาสติกสองชนิดนี้ได้รับความนิยมมาก (Chen 2009). เนื่องจาก PHB มีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ ส่วน P(3HB-co-HV) จัดเป็นพลาสติกทนร้อน (Thermoplastic) ที่มีคุณภาพดีกว่าพลาสติก PHB ซึ่งเชื้อ *Alcaligenes* สามารถสังเคราะห์ได้ทั้งสองตัว โดยพบว่าการที่จะทำให้ได้พลาสติกชนิด P(3HB-co-HV) ในปริมาณสูงต้องเติมกรดชนิดต่าง ๆ ส่วนการเติม Propionate เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ทำให้สัดส่วนการผลิต PHAs ชนิด PHV สูงถึงร้อยละ 97 โดยสัดส่วนของชนิดของ PHAs จะมีเปอร์เซ็นต์แตกต่างกันตามชนิดและสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนและกรดไขมัน โดยพบว่า การสังเคราะห์ P(3HB-*co*-3HV) เกิดขึ้นได้สูง เมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนที่มีทั้งน้ำตาลกลูโคสและโพรพิโอเนต (Jingnan et al., 2009) เช่นเดียวกับ รายงานการผลิตโคพอลิเมอร์ในรูป P(3HB-*co*-3HV) จะเกิดขึ้นเมื่อในแหล่งคาร์บอนนั้นมีกรดวาเลอริค (valeric acid) และกรดโพริโอนิค (propionic acid) ซึ่งถูกใช้เป็น precursors

(Rodrigues, et al., 1995 ; Rodrigues, et al., 2000) ส่วนการผลิต PHAs ชนิดสายโซ่ปานกลาง (medium-chain-length polyhydroxyalkanoates, mcl-PHAs) พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างได้ดีเมื่อเติมกรดไขมันชนิด Octanoic acid ลงไปในแหล่งคาร์บอนด้วย (Le Meur et al., 2012) ในขณะที่ Saika และคณะ (2011) พบว่าการผลิตโคพอลิเมอร์ชนิด 3-hydroxy-4-methylvalerate (3H4MV) ให้ได้ปริมาณสูงจะต้องเติม precursors คือกรดอะมิโนชนิดลิวซีน (leucine) ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของ ลิวซีนคล้ายกับ 3H4MV จากการศึกษาของ Chanprateep และคณะ(2010) รายงานว่าการใช้คาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่อัตรา 200 ต่อ 1 และใช้น้ำตาลฟรุตโตสเป็นสาร precursor ในการผลิต 3-hydroxybutyrate (3HB) และใช้ 1,4-butanediol เป็น precursor ในการผลิต 4-hydroxybutyrate (4HB) และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตเจน พบว่าสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้สูงถึงร้อยละ 77 และส่วนของโคพอลิเมอร์ที่ได้จะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของคาร์บอน นอกจากนี้พบว่า 1,4-butanediol มีความจำเป็นอย่างมากในการสังเคราะห์ 4-hydroxybutyrate (4HB) ของจุลินทรีย์ บางครั้งพบว่ามีการใช้ C-hyroxy butyrate มาทดแทน แต่มีราคาสูงกว่า และมีข้อควรระวังคือ 1,4-butanediol จะเป็นพิษต่อเซลล์ถ้าใช้ในปริมาณสูงเกินไป เช่นเดียวกันมีรายงานการวิจัยพบว่า การใช้กรดโพรพิโอนิคที่ความเข้มข้นสูงทำให้เกิดพิษสูง และส่งผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ขึ้น ซึ่งสามารถลดปัญหาดังกล่าวคือ ควรเติมกรดโพรพิโอนิคความเข้มข้นน้อยๆ และควรจะเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งกะ (Yu et al., 2002) จากรายงานการวิจัยของ Steinbüchel & Lütke-Eversloh (2003) กล่าวว่าในการเลี้ยงเพื่อผลิต 3HV ที่ใช้กรดโพรพิโอนิค ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดอะลิฟาติก (aliphatic fatty acids) เป็นแหล่งคาร์บอน ควรเติมสาร precursor ซึ่งได้แก่ วาเลอลิก (valeric) เฮปตาโนอิค (heptanoic) ลงไปด้วย จากรายงานการเลี้ยงเพื่อต้องการผลิตพลาสติกชนิดโคพอลิเมอร์ชนิด P(3HB-*co*-3HV) ได้มีการเติมสาร precursor ที่แตกต่างกัน ได้แก่ กรด 4-ketovaleric (Valentin & Steinbüchel, 1995) n-pentanol (Yamane et al., 1996) และเติมกรดอะมิโนชนิด วาลีน (valine) ไอโซลิวซีน (isoleucine) ทริโอนิน (threonine) และเมทไทโอนีน (methionine) (Steinbüchel & Lütke-Eversloh, 2003) นอกจากนี้พบว่าการจำกัดสารอาหารในกลุ่มฟอสฟอรัสมีผลทำให้เกิดการสะสม PHAs ได้สูงขึ้น (Ryu et al., 1997) ส่วนการเติมแร่ธาตุคือ $MgSO_4$ และ $CaCl_2$ ซึ่งมีผลต่อการเจริญของเซลล์ แต่ไม่มีผลต่อการผลิต PHAs ของเชื้อ *B. subtilis* และ *E. coli*. เช่นเดียวกันกับการเติม $MgSO_4.7H_2O$ และ trace elements solution (1-20 มิลลิลิตรต่อลิตร) ก็ไม่มีผลต่อการผลิตพลาสติกชนิด PHAs ในอาหารชนิด mineral (Nikel et al., 2005; Jingnan et al., 2009) ส่วนการศึกษาการจำกัดปริมาณโพแตสเซียมในอาหารส่งผลต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ได้มากขึ้น ส่วนการจำกัดซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส และไนโตรเจนจะทำให้การผลิต PHB เพิ่มสูงขึ้น (Singh et al., 2009)

การขยายขนาดเพาะเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในการเพิ่มปริมาณการผลิต PHAs เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงขึ้นในถังหมัก มีปัจจัยที่สำคัญคือการควบคุมสภาวะการเลี้ยงในถังหมัก โดยการควบคุมอุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 7 จะผลิตพลาสติกชีวภาพได้ดี ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาเช่นกัน จากรายงานการศึกษาของ Grothe และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดยการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes latus* พบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB ได้แก่ ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสหรือผันแปรได้ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม คือ 6.5 โดยมีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.075 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณ PHB ร้อยละ 63 ของน้ำหนักเซลล์แห้งนอกจากนี้พบว่าปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHB ด้วย ทั้งนี้เนื่องจากในสภาวะออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซิเตรทซินเทสและไอโซซิเตรทดีไฮโดรตีเนสจะถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิทิบโคเอนไซม์เอไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยเอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลสจึงมีการสะสม PHB แทน (Luego et al., 2003) จากรายงานของ Tripathi และคณะ (2013) ในการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. NCIM 5085 แบบกะ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7.5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่มีกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 34 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 11.0±0.5 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับ 8.58±0.4 กรัมต่อลิตร ผลผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดและความสามารถในการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.78 และ 0.19 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนรายงานการศึกษาของ El-sayed และคณะ (2009) เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Ralstonia eutropha* ATCC 17697 และ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงแบบกะและเติมกะ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิในถังเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7±0.1 และความเร็วของใบพัดเท่ากับ 750 รอบต่อนาที ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 100 ชั่วโมง พบว่า *R. eutropha* ATCC 17697 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 10.18 และ 0.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน *A. latus* ATCC 29714 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 8.73 และ 4.94 กรัมต่อลิตร ตามลำดับและเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 1.2 ลิตร ซึ่งใช้

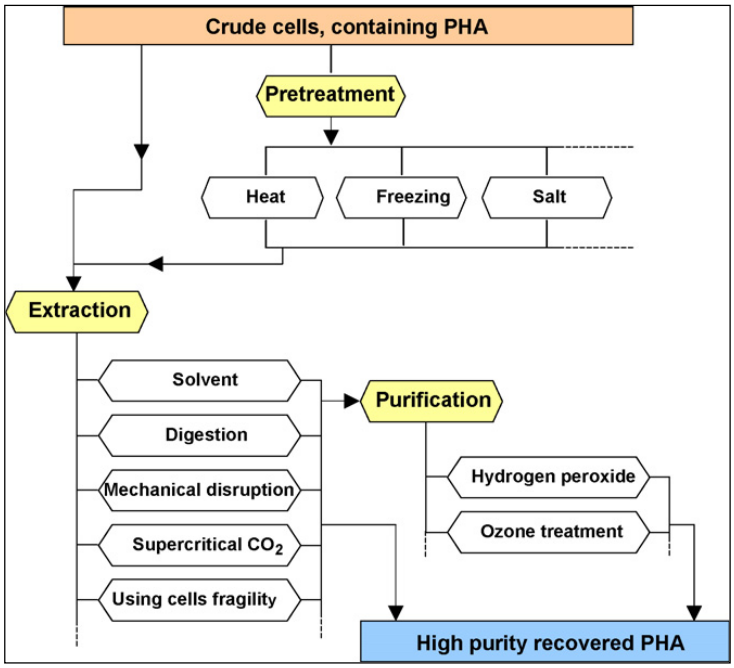
กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมน้ำตาลกลูโคสในชั่วโมงที่ 25 และ 35 พบว่า *R. eutropha* ATCC 17697 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 16.32 และ 10.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน *A. latus* ATCC 29714 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 15.21 และ 8.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Park & Kim (2011) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยเชื้อ *Ralstonia eutropha* KCTC 2662 โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.8 เติมอากาศที่ 1 vvm และปรับความเร็วของใบพัดเท่ากับ 700-1300 รอบต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 100 ชั่วโมง พบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 87 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 13 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 1 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 100 ชั่วโมง และเติมน้ำมันถั่วเหลืองในชั่วโมงที่ 18 และ 50 พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 32 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ส่วน Gahlawat and Srivastava (2013) ศึกษาการเลี้ยง *Azohydromonas australica* เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7 ลิตร ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 33 องศาเซลเซียส และปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่า ผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.71 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 6.24 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 72 ของมวลเซลล์แห้ง และทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 2 ลิตร ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีการเติมสารอาหารตั้งแต่ชั่วโมงที่ 20-35 เป็นเวลา 15 ชั่วโมง และทำการเพาะเลี้ยงจนครบ 38 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 29.71 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 22.65 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 76 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ผลิตได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ 3.6 เท่า ส่วน Jiang และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* A2a5 ซึ่งเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 3 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ

ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้สูตรอาหารที่มีน้ำอ้อย (Sugarcane Liquor) ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และโมโนโซเดียมกลูตาเมตความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด คือ 32 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต 22 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ด้วยสูตรอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ามีมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.80 กรัมต่อลิตร และปริมาณ พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 5.41 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 61.60 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 2.5 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมงโดยเติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 400 กรัมต่อลิตรตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 72.60 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 30.50 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 42.1 ของมวลเซลล์แห้ง (Kulpreecha, et.al., 2009)

การเก็บเกี่ยวพลาสติกชีวภาพ การเลือกวิธีการแยกและการสกัดพอลิเมอร์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรีย มีผลโดยตรงต่อคุณภาพและปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้ อีกทั้งยังมีผลต่อต้นทุนอีกด้วย จากรายงานการศึกษาพบว่าในการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์เพื่อแยกและทำให้บริสุทธิ์ของพอลิเมอร์ซึ่งอยู่ภายในเซลล์แบ่งได้เป็น 3 ส่วน ดังแสดงในภาพที่ 1 (Jacquel, et al., 2008)

ในการเก็บเกี่ยวผลผลิตที่อยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย จะเก็บเกี่ยวเมื่อเซลล์เข้าสู่ในระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) โดยแยกส่วนของน้ำหมักออกจากตัวเซลล์ หลังจากนั้นนำมาเซลล์มีทำให้แตกเพื่อให้ผลิตภัณฑ์หรือพลาสติกถูกปลดปล่อยออกมา โดยจะมีกระบวนการเริ่มต้นจากการเตรียมตัว



ภาพที่ 1 ขั้นตอนในการเก็บเกี่ยวและการแยกบริสุทธิ์ PHAs ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ การเตรียมเซลล์ การสกัดและการแยกบริสุทธิ์ (Jacquel, et al., 2008)

เซลล์ (Pretreatment) ก่อนการสกัดเช่น การทรีตด้วยความร้อน ความเย็นหรือสารละลายเกลือ ก่อนเข้าสู่กระบวนการสกัดและแยกบริสุทธิ์ (Jacquel, et al., 2008) ซึ่งมีรายงานการวิจัยการเตรียมตัวเซลล์หลายวิธี เช่น จากการศึกษาของ Kapitchkoff และคณะ (2006) ได้นำเซลล์ *R.eutropha* DSM545 ซึ่งแขวนลอยในอาหารมาทรีตด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปทำการสกัด ส่วนการศึกษาของ De Koning & Witholt (1997) ได้ทำการทรีตเซลล์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำเซลล์ *Pseudomonas* ไปทำการสกัดพอลิเมอร์นอกจากนี้พบว่ามีการใช้การทรีตด้วยความร้อนร่วมกับการใช้สารอื่นผสมด้วยเช่นกัน ในการศึกษาของ Steinbuchel (1996) ซึ่งได้ใช้ความร้อน 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ร่วมกับการใช้เอนไซม์ PHB depolymerase เพื่อย่อยพอลิเมอร์ภายในเซลล์ของ *R. eutropha* DSM545 ให้หลุดออกมา นอกจากนี้พบว่ามีการใช้ด่าง คือ sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.4 กิโลกรัมต่อกิโลกรัม ในการทรีต *A. latus* เพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยโปรตีนออกมาก่อนใช้เครื่องบดให้เซลล์แตก ซึ่งให้ผลดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เกลือ sodium chloride (Khosravi-Darani et al., 2004 ; Tamer et al., 1998) ส่วนการศึกษาการใช้วิธีการแช่แข็งก่อนนำมาย่อยพบว่าสามารถช่วยย่นระยะเวลาในการย่อยด้วยสาร SDS and NaClO ได้สั้นลง (Dong, & Sun, 2000) แต่พบว่าการเตรียมเซลล์ในสภาพเยือกแข็งแห้ง (freezed-dried) ได้ถูกนำมาใช้ได้ในงานวิจัย (Hahn et al., 1994 ; Chen et al., 2001) แต่ไม่เหมาะในการขยายขนาด โดยพบว่าการใช้การแช่เยือก

แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส (Ghatnekar et al., 2002 ; Linget al., 1997) ซึ่งให้ผลดีกว่าการแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Tamer et al., 1998)

ขั้นตอนในการเก็บเกี่ยวไบโอพอลิเมอร์ด้วยการสกัดโดยใช้วิธีการย่อย (Digestion methods) ซึ่งแบ่งการย่อยได้เป็นการย่อยด้วยสารเคมีและการย่อยด้วยเอนไซม์ ตัวอย่างเช่นจากรายงานการศึกษาของ Kunasundari & Sudesh (2011) พบว่าวิธีได้รับความสนใจมากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลาย ทั้งนี้ในการสารเคมีเพื่อย่อยสลายส่วนใหญ่ เป็นการย่อยส่วนประกอบของเซลล์ที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์เพื่อปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ออกมา ส่วนการสกัดด้วยตัวทำละลายได้รับนิยมสูงในระดับห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและทำได้รวดเร็ว (Kunasundari & Sudesh, 2011) ซึ่งตัวทำละลายที่ถูกนำมาใช้งานมีหลายชนิดเช่น คลอโรฟอร์ม (chloroform),1,2-dichloroethane (Valappil et al., 2007 ; Ramsay, et al., 1994) acetone (Elbahloul & Steinbüchel et al., 2009) 1,2 propylene carbonates และ ethylene carbonates (Fiorese et al., 2009; Lafferty & Heinzle, 1979) และการใช้ตัวทำละลายในรูป non-halogenated solvent ได้แก่ isoamy propionate, propylbutyrate, isoamyl valerat (Mantelatto et al., 2008) ในการศึกษาของ Zinn และคณะ (2003) ใช้ตัวทำละลายเมทิลคลอไรค์ (methylene chloride) ในการสกัดพอลิเมอร์ poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-co-HV) ที่ผลิตโดย *R. eutropha* สามารถให้พอลิเมอร์ที่มีความบริสุทธิ์ได้ถึงร้อยละ 98 จากนั้นเมื่อนำสารสกัดนั้นไปทำการกลั่นและตกตะกอนด้วยเมทานอลเย็นจัดก่อนนำมาตกผลึกอีกครั้ง ส่วนการสกัดด้วยสารเคมีตัวอย่างเช่น การใช้โซเดียมไฮโปคลอไรค์ (sodium hypochlorite) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Hahn et al., 1995) การใช้โซเดียมไฮโปคลอไรค์ร่วมกับสารลดแรงตึงผิว เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) (Ramsay, et al., 1995 ; Chen et al., 1999)การใช้สารลดแรงตึงผิว palmitoyl carnitine โดยใช้ 1mM palmitoyl carnitine ที่ละลายด้วยบัพเฟอร์ 0.1MTris–HCl ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่าสามารถสกัดพอลิเมอร์ *R.eutropha* และ *A. latus* ได้ร้อยละ 70 และมากกว่าร้อยละ 85 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวเพียงอย่างเดียวส่งผลทำให้คุณภาพของ PHAs ที่แยกได้บริสุทธิ์น้อยกว่าการใช้ร่วมกับไฮโปคลอไรค์และโซเดียมไฮดรอกไซค์ (Kim et al., 2003) ส่วน Lu (2006) ได้ใช้สารโซเดียมไฮโปคลอไรค์ร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในการสกัดพลาสติกชีวภาพจาก *Cupriavidus taiwanensis* 184 ได้สูงถึงร้อยละ 94 และมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99 นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาการย่อยโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรค์ร้อยละ 30 ร่วมกันตัวทำละลายคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1: 1 ในการสกัด P(3HB) จาก *R.eutropha* เพื่อแยกส่วนที่ต้องการคือ P(3HB) ละลายอยู่กับคลอโรฟอร์มและส่วนอื่น ๆ ของเซลล์จะแขวนลอยอยู่ในส่วนของโซเดียมไฮโปคลอ

ไรค์ (Hahn et al., 1994 ; Hahn et al., 1993) โดยค่าที่ได้มีความบริสุทธิ์ของ P(3HB) ประมาณร้อยละ 97 เช่นเดียวกับการเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จาก P(3HB) จากเชื้อ *R. eutropha* หลังจากผ่านการทรีตด้วยอะลูมิเนียมและเหล็ก ก่อนนำมาย่อยต่อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรค์และคลอโรฟอร์ม (Ryu et al., 2000)

จากการศึกษาของ Dong&Sun (2000) ในการเก็บเกี่ยว PHAs โดยการใช้ปริมาณเซลล์ 30 กรัมต่อลิตร นำไปทำการแช่เยือกแข็งก่อนนำมาสกัดโดยการเติมสารลดแรงตึงผิวคือ SDS ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำมาเติมสารโซเดียมไฮโปคลอไรค์ร้อยละ30 เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ร่วมกันการใช้สารไฮโปคลอไรค์สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ร้อยละ 86.6 และสารที่ได้มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 98 วิธีนี้มีข้อดีคือ ต้นทุนค่าใช้จ่ายต่ำและลดปัญหาการเสื่อมสภาพของ PHAs ลงได้ ส่วนการย่อยด้วยการใช้สารคีเลต (chelate) ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวพบว่า จะช่วยทำให้สารพอลิเมอร์ PHAs หลุดออกมาเพิ่มขึ้น เมื่อใช้กับแบคทีเรียที่เป็นแกรมลบ คือ *R.eutropha* ซึ่งมีไอออนของแคลเซียมและแมกนีเซียมอยู่ที่ด้านนอกของเมมเบรน โดยพอลิเมอร์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงร้อยละ 98.7 เมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวต่อเซลล์แห้งอัตราส่วน 0.12:1 และใช้เกลือ EDTA disodium ต่อเซลล์แห้งอัตราส่วน 0.08:1 บ่มที่ค่าความเป็นกรดด่าง 13 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งมีข้อดีของการย่อยด้วยวิธีนี้คือ ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดี มีปัญหาหาเรื่องต่อสิ่งแวดล้อมน้อย แต่มีส่วนของเหลวเหลือทิ้งที่ต้องนำเข้าสู่ระบบบำบัดสูง (Chenet al., 2001)

ในการสกัดพอลิเมอร์ด้วยเอนไซม์ย่อยตัวเซลล์ซึ่งได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยบริษัท ไอซีไอ (ICI) โดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) เริ่มต้นจากการให้ความร้อนและตามด้วยการใช้เอนไซม์ย่อยซึ่งได้ถูกจนสิทธิบัตรเรียบร้อยแล้ว (Holmes & Lim, 1990) ในการศึกษาของ Kapritchkoff และคณะ (2006) พบว่าการใช้เอนไซม์โบรมิเลนร้อยละ 2 บ่มที่ค่าความเป็นกรดด่าง 9 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถเก็บเกี่ยว P(3HB) จากเชื้อ *R.eutropha* ได้ร้อยละ 88.8 นอกจากนี้มีรายงานการใช้เอนไซม์อะคาเลส (alcalase) เพื่อย่อยผนังเซลล์ *Pseudomonas putida* ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ PHA คิดเป็นร้อยละ 92.6 (Yasotha, et. al., 2006)

การเก็บเกี่ยวด้วยวิธีทางกล เป็นการย่อยอีกอย่างหนึ่งที่ได้รับความสนใจในการศึกษา โดยสามารถใช้วิธีการได้หลายแบบ เช่น การใช้ลูกปัดบด (Bead mill) มีปัจจัยสำคัญที่ควรทำการศึกษาก่อนนำมาใช้งาน คือ ความเข้มข้นของตัวอย่าง อัตราการใส่ตัวอย่าง ความเร็วของการหมุนของลูกปัดเป็นหลักสำคัญที่ต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานเช่นเดียวการใช้เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (Tamer, et al., 1998) จากรายงานการใช้เครื่องอัลตร้าโซนิค (ultrasonic) เพื่อสกัด PHAs จากเชื้อ *Haloferax mediterranei* ได้ถูกนำเสนอโดย Hwanget al. (2006) พบว่าสามารถใช้ได้ดีในระดับห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ได้มีการใช้หลายวิธีร่วมกันเพื่อสกัดพลาสติกออกจากเซลล์ เช่นการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงร่วมกับการใช้สารเคมีในการเก็บเกี่ยว

P(3HB) (Van Wegen et al, 1998) การใช้การเก็บเกี่ยวด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ก่อนนำมาเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงร่วมกับการใช้สาร sodium hypochlorite ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตที่มีความบริสุทธิ์สูงถึงร้อยละ 96.5 (Ling et al., 1997) รวมทั้งมีได้รายงานการใช้รังสีแกมม่าที่ระดับ 5-40 กิโลเกรย์ ในการทำให้เซลล์แตกและแยกส่วนพลาสติกออกมาได้ (Divyashree &. Shamala, 2008) ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าการเก็บเกี่ยวพลาสติกชีวภาพภายในเซลล์จุลินทรีย์มีวิธีการหลากหลาย ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน (Jacquel et al., 2008)

2. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์พลาสติกได้เข้ามามีบทบาทต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์เป็นอันมาก โดยการนำมาใช้ในการผลิตอุปกรณ์เครื่องใช้ต่างๆ เนื่องจากมีความคงทน แข็งแรง น้ำหนักเบา ราคาถูก และสามารถปรับแต่งให้มีลักษณะตามต้องการได้ เม็ดพลาสติกที่นำมาใช้เป็นส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี สามารถนำมาผลิตได้อย่างรวดเร็วมีปริมาณมากและต้นทุนต่ำจากรายงานประมาณการผลิตพลาสติกทั่วโลกใน 1 ปี มีการผลิตมากกว่า 100 ล้านตัน ซึ่งส่งผลเสียคือทำให้เกิดขยะพลาสติกเป็นจำนวนมาก แม้ว่าขยะพลาสติกบางส่วนสามารถนำมาแปรรูปกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่พบว่ากระบวนการในการนำกลับไปใช้ใหม่นี้ยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากยังต้องใช้พลังงานความร้อนสูงในการนำพลาสติกกลับมาใช้ใหม่อีกทั้งในกระบวนการผลิตจะเกิดการปลดปล่อยสารพิษออกมาด้วย และขยะพลาสติกส่วนที่เหลือก็เป็นปัญหาใหญ่ในการกำจัดเพราะใช้เวลาในการย่อยสลายนาน จึงส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอันมาก โดยเฉพาะการเผาส่งผลต่อภาวะโลกร้อนเช่น ถุงพลาสติก 1 ใบ ต้องใช้เวลาย่อยสลายถึง 450 ปี หากนำไปเผาก็จะทำให้เกิดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดมลภาวะต่อโลก ทำให้โลกร้อนขึ้นดังที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน พลาสติกชีวภาพเป็นพลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบธรรมชาติที่ได้จากการหมักน้ำตาลจากพืชด้วยจุลินทรีย์และคุณสมบัติต่างๆ ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เช่นเดียวกันกับพลาสติกสังเคราะห์ และในปัจจุบันได้ถูกนำมาใช้งานแทน เพื่อลดปัญหาต่างๆ ลง ทั้งนี้เนื่องจากพลาสติกชีวภาพนั้นสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบที่เป็นประเภททรัพยากรทดแทน (renewable resources) ไม่ได้ใช้แล้วหมดไปเหมือนกับปิโตรเคมี พลาสติกชีวภาพแบ่งออกได้หลายชนิด เช่น พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxy alkanoate, PHAs) พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB) พอลิบิวทิวซัคซิเนต (Polybutylsaccinate, PBS) และพอลิแลคไทค์ (Polylactide, PLA) เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลาสติกชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์กลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates) หรือ PHAs เป็นอะลิฟาติกพอลิเมอร์ธรรมชาติที่จุลินทรีย์ผลิตและเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์เพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำรอง โดยการผลิตจะเกิดขึ้นเมื่อสภาวะที่ไม่สมดุลของสารอาหาร (Salehizadeh & Van Loosdrecht, 2004) ปัจจุบันพลาสติกกลุ่มนี้ได้รับความสนใจในการ

นำมาใช้ประโยชน์เป็นอันมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลาสติก PHAs ชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (polyhydroxybutyrate, PHB) และพลาสติกชนิดโคพอลิเมอร์ของพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตกับไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV) ทั้งนี้เนื่องจากมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์พอลิโพรพิลีน (polypropylene) มีความสามารถทนอุณหภูมิสูง มีจุดหลอมเหลวสูง และมีคุณสมบัติเป็นฟิล์มกันน้ำและความชื้นได้ดี และมีข้อดีคือสามารถย่อยสลายได้ง่าย ทำให้พลาสติกชนิดนี้ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง ทั้งในภาคอุตสาหกรรมและนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยต่าง ๆ ทั้งทางการแพทย์ และการเกษตร (Chien et al., 2007)

ในการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพจะเกิดขึ้นได้ง่าย เมื่อมีการจัดการให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม คือมีแบคทีเรียและเอนไซม์เข้ามาย่อยสลาย อีกทั้งไม่ทิ้งสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม จึงมีความสำคัญในการช่วยป้องกันหรือลดอุณหภูมิของโลกลงและเป็นการประหยัดทรัพยากรน้ำมันและเป็นมิตรต่อสุขภาพของผู้บริโภคอีกด้วย ทั้งนี้เนื่องจากพลาสติกชีวภาพจะไม่ปล่อยสารเคมีที่เป็นพิษต่อร่างกาย ซึ่งมักก่อให้เกิดมะเร็งในระยะยาว จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้มีการนำพลาสติกชีวภาพมาใช้กันอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะด้านบรรจุภัณฑ์อาหาร และเพื่อใช้บรรจุสินค้าทางการเกษตร เช่นผักและผลไม้ ถุงใส่ของ กล่องอาหาร รวมทั้งใช้เป็นแคปซูลบรรจุยา เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีปัญหาหลักคือต้นทุนค่าใช้จ่ายสูงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นทุนพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี สำหรับประเทศไทยมีศักยภาพเพียงพอในการผลิตพลาสติกชีวภาพ เนื่องจากมีแหล่งวัตถุดิบมากมายและมีราคาถูก แหล่งวัตถุดิบดังกล่าวอาจได้รับมาจากภาคเกษตรและภาค อุตสาหกรรมเกษตรหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้น เพื่อการผลิตพลาสติกได้ ได้แก่ มันสำปะหลัง อ้อย ปาล์ม หรือของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น กากมันสำปะหลัง กากชานอ้อย กากปาล์ม และส่วนเหลือทิ้งจากขยะชุมชน น้ำมันที่เหลือทิ้งจากการทอด เป็นต้น ซึ่งเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรที่มีอยู่ในประเทศ และการลดปริมาณการนำเข้าวัตถุดิบเพื่อใช้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพจากต่างประเทศลง อีกทั้งเป็นการสร้างเทคโนโลยีที่เกิดขึ้นเองภายในประเทศเพื่อเป็นทางเลือกที่สำคัญในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างอุตสาหกรรมพลาสติกสังเคราะห์เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพซึ่งจะส่งผลต่ออุตสาหกรรมภายในประเทศอีกด้วย ตัวอย่างเช่น อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ อุตสาหกรรมเส้นใยสิ่งทอ อุตสาหกรรมยานยนต์ อุตสาหกรรมพลาสติก ชิ้นส่วนอุปกรณ์ไฟฟ้า และบรรจุภัณฑ์ต่าง ๆ เป็นต้น

สำหรับในการวิจัยครั้งนี้จะมุ่งเน้นการต่อยอดงานวิจัยการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. ที่ถูกปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการกลายและกลายซ้ำ ทำให้ปริมาณของพลาสติกในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Poly hydroxyalkanoate, PHAs) เพิ่มสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม โดยเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำสามารถผลิต

PHB คิดเป็น 3.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์เดิมที่ให้ผลผลิต 0.60 กรัมต่อลิตร และเมื่อพัฒนาความสามารถสูตรอาหารแล้วพบว่าสามารถผลิต PHB ได้เพิ่มสูงขึ้นถึง 9.73 กรัมต่อลิตร แต่เนื่องจากการพัฒนาเบื้องต้นยังใช้สารอาหารบางส่วนที่มีราคาสูงมาก ควรมีการพัฒนาสภาวะในการเลี้ยงด้วยสารอาหารราคาถูกและการเก็บเกี่ยวที่ส่งผลดีทั้งคุณภาพและปริมาณในขั้นตอนต่อไป รวมทั้งสนใจในการพัฒนาการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพทั้งชนิดโฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์ คือ พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต(polyhydroxybutyrate, PHB) หรือ P(3HB) และพลาสติกชนิดโคพอลิเมอร์ของพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตกับไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxybuty rate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่ได้รับความนิยมสูงในปัจจุบัน เนื่องจากทนต่อความร้อนได้ดี และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่สังเคราะห์จากปิโตรเคมีมุ่งเน้นในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงด้วยสารอาหารราคาถูกได้แก่ กลุ่มแป้ง กลุ่มน้ำตาล กลุ่มน้ำมัน วัสดุเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมต่าง ๆ และสิ่งสำคัญคือการปรับสารเสริมการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพของแบคทีเรีย ได้แก่ สาร precursor กรดอะมิโน กรดไขมัน และแร่ธาตุต่างๆ เพื่อส่งเสริมให้จุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์ที่ต้องการได้สูงขึ้นทำการศึกษาวิจัยการควบคุมสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตชนิดของพลาสติกที่ต้องการ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง การให้อากาศ และชนิดของการเลี้ยงในถังหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง ตลอดจนสิ่งที่สำคัญคือการศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวการสกัดและการแยกบริสุทธิ์ เพื่อให้ได้ทั้งผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี

3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อพัฒนาแหล่งของสารอาหาร สารอาหารเสริมprecursor กรดอะมิโน กรดไขมัน และแร่ธาตุที่มีผลต่อการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพชนิดโฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์ของแบคทีเรียที่ผ่านการกลาย

2) เพื่อพัฒนาการเก็บเกี่ยวเริ่มตั้งแต่การเตรียมเซลล์วิธีการสกัด และการแยกบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีมีปริมาณสูง

3) เพื่อปรับปรุงสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตนถังหมัก เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช การให้อากาศ และชนิดของการเลี้ยงในถังหมักการหมักแบบกะ (batch fermentation) และการหมักแบบกึ่งกะ (fed batch fermentation)

4. กรอบแนวความคิดในการต่อยอดงานวิจัย

ในการต่อยอดงานวิจัยในเรื่องของแหล่งสารอาหารและสารอาหารเสริมต่างๆ การควบคุมสภาวะการเลี้ยงและวิธีการเก็บเกี่ยวผลผลิตที่เหมาะสมต่อไป โดยได้วางกรอบวิจัยดังนี้ คือ

1) การพัฒนาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีราคาถูกต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพของแบคทีเรียที่ได้จากการกลายซ้ำโดยจะให้ความสำคัญกับการศึกษาแหล่งคาร์บอนกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่มแป้งมันสำปะหลังและกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย ทั้งในรูปเด็กตริน และน้ำเชื่อม กลุ่มของกากน้ำตาล น้ำตาลที่ผ่านการทรีตด้วยวิธีต่าง ๆ และกลุ่มของน้ำมันและน้ำมันที่ผ่านการใช้แล้ว น้ำมันที่พบทั่วไปในท้องตลาด น้ำมันที่เหลือจากการทอดและน้ำมันที่เหลือจากอุตสาหกรรมต่างๆ ตัวอย่าง เช่น อุตสาหกรรมน้ำมันพืช อุตสาหกรรมผลิตอาหาร อุตสาหกรรมปาล์ม เป็นต้น ชนิดและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนทั้งในรูปอินทรีย์สารและอนินทรีย์สาร ผลของสารเสริมการสังเคราะห์พลาสติก เช่น สาร precursor วิตามิน เอทานอล กรดไขมัน กรดอะมิโน และแร่ธาตุที่ต้องการปริมาณน้อยบางชนิด ที่ส่งผลต่อการสร้างชนิดของพอลิเมอร์ของเซลล์จุลินทรีย์

2) การพัฒนาวิธีการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ เริ่มต้นจากการเตรียมเซลล์ การสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ และการแยกบริสุทธิ์ เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี พร้อมทั้งตรวจสอบชนิดและปริมาณของพลาสติก PHAs ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นด้วยการใช้ GCMS และการตรวจดูสรีระด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั้งชนิด TEM และ SEM

3) การพัฒนาสภาวะอื่นๆ ที่มีผลต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการกลาย ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าพีเอช ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ปริมาณออกซิเจน เป็นต้น เมื่อเลี้ยงในถังหมักทั้งในสภาวะกะ (batch fermentation) และกึ่งกะ (fed batch fermentation) คำนวณจลนพลศาสตร์ของการผลิตได้แก่ ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ที่ได้จากการศึกษามาคำนวณหาค่าดัชนีจลนพลศาสตร์

5.ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

การดำเนินงานวิจัยตามโครงการวิจัยที่เสนอนี้คาดว่าจะมีศักยภาพในการอำนวยประโยชน์ด้านต่างๆ ดังนี้

1) การสร้างองค์ความรู้เพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาการใช้สารอาหารเพื่อสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพของจุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณสูง โดยสามารถเผยแพร่องค์ความรู้ในวารสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้อง และการเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการภายในประเทศ

2) ประโยชน์ด้านการบริการความรู้แก่ประชาชน การบริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ

3) ประโยชน์ด้านการพัฒนาการเรียนการสอนสำหรับนิสิต นักศึกษาที่กำลังศึกษาด้านวิทยาศาสตร์

4) ประโยชน์ด้านการสร้างและพัฒนานักวิจัย ผ่านกระบวนการฝึกหัดทำวิจัยในรายวิชาปัญหาพิเศษสำหรับนิสิตปริญญาตรีและการทำวิจัยประกอบวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตบัณฑิตศึกษา

บทที่ 2

การดำเนินการวิจัย

รายละเอียดในการดำเนินการวิจัย

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 *Alcaligenes latus* TISTR 1403

1.2 *Alcaligenes latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ

2. วัสดุและอุปกรณ์

2.1 ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

2.2 หลอดปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.3 หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร

2.4 ปิเปต (Pipette) ขนาด 10 มิลลิลิตร

2.5 ไมโครปิเปต (Micropiprtte) ขนาด 20-200 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร

2.6 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 25 มิลลิลิตร ขนาด 500 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร

2.7 เครื่องเขย่า (Shaker) NB-101M

2.8 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง OHAUS รุ่น adventurer และ เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

2.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Centrifuge 5415C

2.10 ตู้อบความร้อน (Hot Air Oven) รุ่น SHEL LAB SL 1375 FX

2.11 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) HIRAYAMA รุ่น HA-300 MII

2.12 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) HALO SB-10

2.13 เครื่อง Vortex-genie 2 รุ่น G-560E

2.14 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น SHEL-LAB Model 1256

3. สารเคมี

3.1 ผงชูรส ยี่ห้อ อายิโนะโมะโต๊ะ (ผลิตจากบริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ)

3.2 น้ำมันถั่วเหลือง ยี่ห้อ กุ๊ก (ผลิตจากบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด)

3.3 กรดบอริก (H_3BO_3)

3.4 น้ำตาลฟรุกโตส (Fructose)

3.5 แคลเซียมไดคลอไรด์ ($CaCl_2$)

3.6 คอปเปอร์คลอไรด์ 6 ไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 6H_2O$)

3.7 คอปเปอร์ซัลเฟส 5 ไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

3.8 โคบอลต์คลอไรด์ 6 ไฮเดรต ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)

3.9 โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)

3.10 โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

3.11 โซเดียมโมลิปดินัม 2 ไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)

3.12 ซิงค์ซัลเฟต 7 ไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.13 เฟอริกซิเตรท (Ferric citrate)

3.14 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

3.15 นิเกิลคลอไรด์ 6 ไฮเดรต ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)

3.16 แมกนีเซียมซัลเฟต 7 ไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.17 แมงกานีสคลอไรด์ 4 ไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)

3.18 แมงกานีสซัลเฟส 7 ไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.19 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)

3.20 แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$

3.21 แอมโมเนียมโมลิปเดรต 4 ไฮเดรต $(NH4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$

3.22 tween 80

4. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 DSMZ Catalogue และคณะ (1993)

4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ดัดแปลงมาจาก DSMZ Catalogue และคณะ (1993)

4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 Park and Kim (2011)

โดยมีองค์ประกอบในสูตรอาหารแสดงดังตารางที่ 2

5. วิธีการทดลอง

5.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น

ทำการกระตุ้นเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus*TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำและ *Alcaligenes latus*TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม จำนวน 2-3 ครั้ง บนอาหารวุ้นเอียง Nutrient agar (NA)

จากนั้นนำเชื้อที่ได้ใส่ลงในอาหารเหลว Nutrient-rich medium ซึ่งประกอบด้วย เปปโตน (Peptone) 10 กรัมต่อลิตร, ยีสต์สกัด (yeast extract) 5 กรัมต่อลิตรและโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลอง ทั้งนี้จะใช้หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 7 ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในทุกการทดลอง

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบสารอาหารของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร

สารอาหาร	สูตรอาหาร		
	สูตรอาหารที่ 1 DSMZ	สูตรอาหารที่ 2 ดัดแปลง DSMZ	สูตรอาหารที่ 3 Park and Kim
Fructose (g/l)	20	-	-
Soybean oil (g/l)	-	20	20
$CaCl_2$(g/l)	0.001	0.001	-
Ferric citrate (g/l)	0.005	0.005	-
KH_2PO_4(g/l)	2.3	2.3	1.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/l)	0.5	0.5	0.2
$NaHCO_3$ (g/l)	0.5	0.5	-
Na_2HPO_4(g/l)	2.3	2.3	9
NH_4Cl (g/l)	0.5	0.5	-
$(NH4)_2SO_4$ (g/l)	-	-	1
Tween 80 (ml)	-	1	1
Trace element (ml/l)	5	5	10

5.2 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำและ *Alcaligenes latus*TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม ในสูตรอาหาร Nutrient-rich medium ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ 100 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้นให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1×10^7 เซลล์ของอาหารลงในแต่ละชุดการทดลอง เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ความเร็วรอบ 150

รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยการนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมทั้งหาน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณของสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

5.3 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *Alcaligenes latus*TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำและ *Alcaligenes latus*TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม โดยเติมหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 7 ลงในอาหารแต่ละชุดการทดลอง เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเจริญของแบคทีเรียและวิเคราะห์ผล พร้อมทั้งหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยสภาวะที่ศึกษามีดังนี้

5.3.1 การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสูตรอาหารสำหรับผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต 3 สูตร ที่แตกต่างกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 อ้างอิงจาก DSMZ catalogue และคณะ (1993) อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 อ้างอิงจากสูตรอาหารดัดแปลงของ DSMZ catalogue และคณะ (1993) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 อ้างอิงจาก Park and Kim และคณะ (2011) เพื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

5.3.2 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

คัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 6.3.1 จากนั้นใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10, 20, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร แล้วนำมาเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

5.3.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

คัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 6.3.1 และความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดจาก ข้อ 6.3.2 จากนั้นทำการปรับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นทั้งหมด 3 ชุด คือ 1. ความเข้มข้นน้ำตาลฟรุกโตส 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร 2. ความเข้มข้นน้ำตาล ฟรุกโตส 40 กรัมต่อลิตรและผงชูรส 0.5

กรัมต่อลิตร 3. น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรและผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำชุดที่ 3 มาเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเปรียบเทียบหาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

5.3.4 การศึกษาความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

คัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกโพคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 6.3.1 และความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกโพคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 6.3.2 ทำการเลี้ยงเชื้อโดยปรับความเข้มข้นของผงชูรส (อายิโนะโมะโต๊ะ) เริ่มต้นเท่ากับ 0.5, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกโพคาโนเอต

5.3.5 การศึกษาอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

คัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 6.3.1 ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 6.3.2 และความเข้มข้นผงชูรสที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 6.3.4 ทำการเลี้ยงเชื้อโดยปรับอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2, 0.25:2, 0.10:2, 0.5:1, 0.5:0.5 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เพื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสม

6. วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ข้อมูลในแต่ละการศึกษา จะทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยแต่ละชุดของการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

6.1 วัดการเจริญของเซลล์

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จำนวน 2 ครั้ง และนำเซลล์ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่เหมาะสม และผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ค่าการดูดกลืนแสง = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร x อัตราการเจือจาง

6.2 น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (Cell Dry Weight, CDW)

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแอพเพนดรอบที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเทส่วนใสทิ้ง จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำหลอดที่มีตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง = น้ำหนักหลอดที่มีส่วนของตะกอน – น้ำหนักหลอดเปล่า (กรัมต่อลิตร)

6.3 วิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธี Gravimetric method (Grotheและคณะ, 1999)

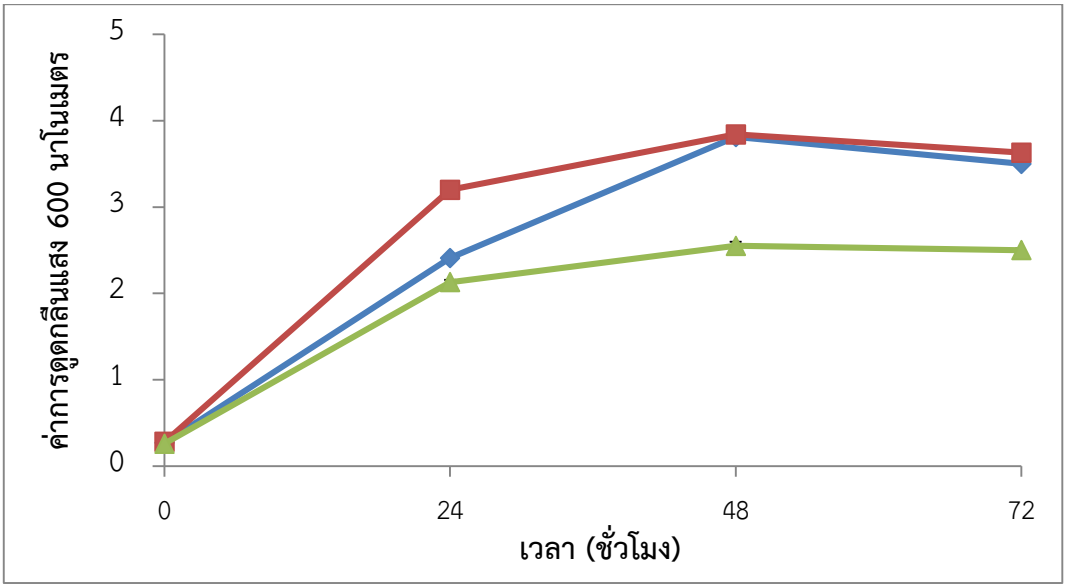
นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแอพเพนดรอบที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์โดยเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง เทส่วนใสทิ้งแล้วเติมสารละลายโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (SDS) 1.2 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติมโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) 1 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อล้างตะกอนและนำไปปั่นเหวี่ยง10,000 รอบต่อนาทีเพื่อล้างเซลล์อีกครั้ง เทส่วนใสทิ้งแล้วนำหลอดที่มีตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณ PHA ที่แท้จริงที่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้

ปริมาณของ PHA = น้ำหนักหลอดที่มีส่วนของตะกอน – น้ำหนักหลอดเปล่า (กรัมต่อลิตร)

ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

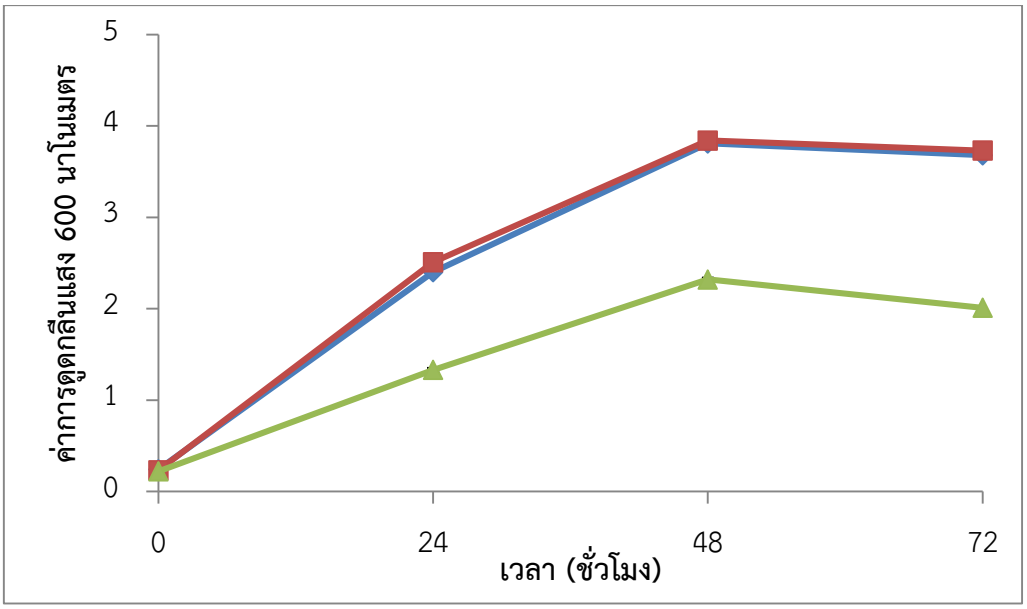
จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำ และ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร ได้แก่ อาหารสูตรที่ 1 DSMZ catalogue และคณะ (1993) อาหารสูตรที่ 2 ดัดแปลงจาก DSMZ catalogue และคณะ (2009) อาหารสูตรที่ 3 Park and Kim (2011) โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำและเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมมีอัตราการเจริญสูงสุดที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้อาหารสูตรที่ 1 และอาหารสูตรที่ 2 รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 3 ดังแสดงในภาพที่ 2 และภาพที่ 3



ภาพที่ 2 การเจริญของเซลล์จากเชื้อ *A. Latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ดังนี้ คือ อาหารสูตรที่ 1 (—◆—) อาหารสูตรที่ 2 (—■—) อาหารสูตรที่ 3 (—▲—)

ในการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่แตกต่างกันพบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำ สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 มีค่าเท่ากับ 1.73 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 1.87 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 92.51 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้งที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง แต่เชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 มีค่าเท่ากับ 1.53 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 1.70 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 90.00 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงทั้งนี้เนื่องจากในสูตรที่ 2 เป็นการดัดแปลงจากสูตรอาหาร DSMZ โดย

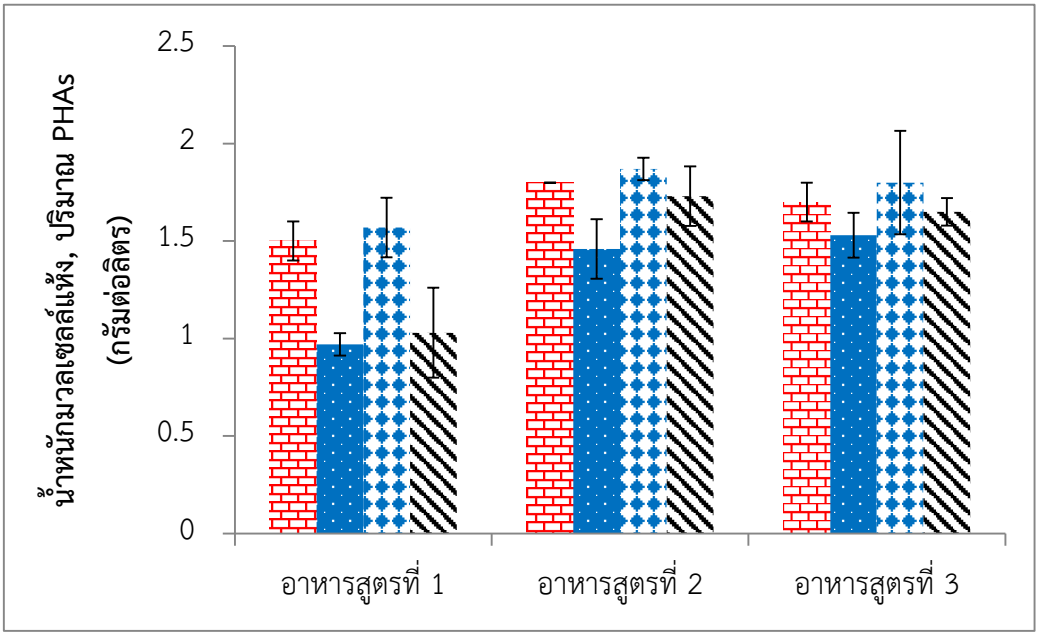
ดัดแปลงแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลฟรุกโตสเป็นน้ำมันถั่วเหลือง จึงให้พลังงานสูงกว่าในอาหารสูตรที่ 1 ที่ใช้น้ำตาล และอาหารสูตรที่ 2 มีการใช้ทวีน 80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว ทำให้จุลินทรีย์ได้รับสารอาหารได้ดีมากขึ้น และยังคงมีสารอาหารที่ต้องการปริมาณน้อย (Micronutrients) ครบถ้วนและมีปริมาณสารอาหารดังกล่าวสูงกว่าในสูตรที่ 3 ที่มีส่วนประกอบของสารอาหารน้อยชนิดกว่า (ดังตารางที่ 2) ส่วนในอาหารสูตรที่ 1 พบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและมวลเซลล์แห้งที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3 และภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 การเจริญของเซลล์จากเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ดังนี้ คือ อาหารสูตรที่ 1 (—◆—) อาหารสูตรที่ 2 (—■—) อาหารสูตรที่ 3 (—▲—)

ตารางที่ 2 ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละปริมาณ การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ของ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ และ *A. Latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ร้อยละ)	
	A. latus ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ	*A. latus* ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ	*A. latus* ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ
อาหารสูตรที่ 1	1.50±0.10	1.57±0.15	0.97±0.06	1.03±0.23	64.66	65.60
อาหารสูตรที่ 2	1.80±0.00	1.87±0.06	1.46±0.15	1.73±0.15	81.11	92.51
อาหารสูตรที่ 3	1.70±0.10	1.80±0.26	1.53±0.12	1.65±0.07	90.00	91.67



ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน โดยที่

น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม

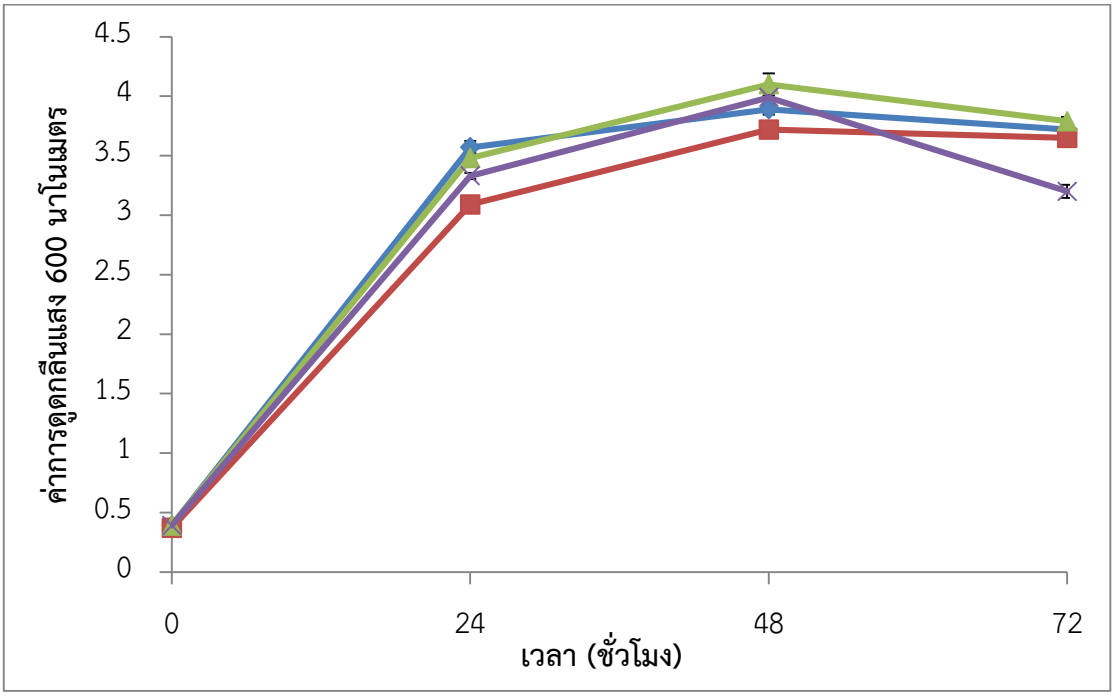
ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม

น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ

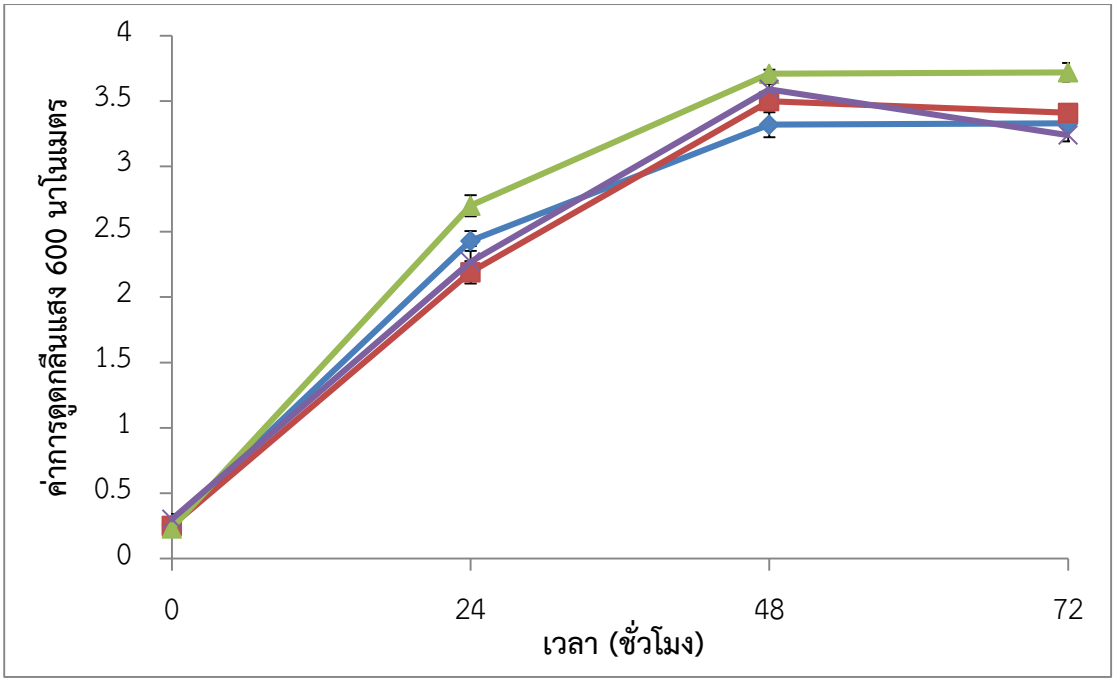
ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ

4.2 ผลของการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำ และ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม ในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ (สูตรที่ 2) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ให้ผลผลิตสูงสุดจากข้อ 4.1 จากนั้นเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 10, 20, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลง DSMZ ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 20 กรัมต่อลิตรเป็นชุดควบคุม ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเท่ากับ 7.0 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำและเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมมีอัตราการเจริญได้ดีในแหล่งคาร์บอนชนิดน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 60, 20 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 5 และภาพที่ 6



ภาพที่ 5 การเจริญของเซลล์จากเชื้อ *A. Latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ โดยมีความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่แตกต่างกัน คือ ชุดควบคุม 20 กรัมต่อลิตร ( ) 10 กรัมต่อลิตร ( ) 40 กรัมต่อลิตร ( ) และ 60 กรัมต่อลิตร ( )

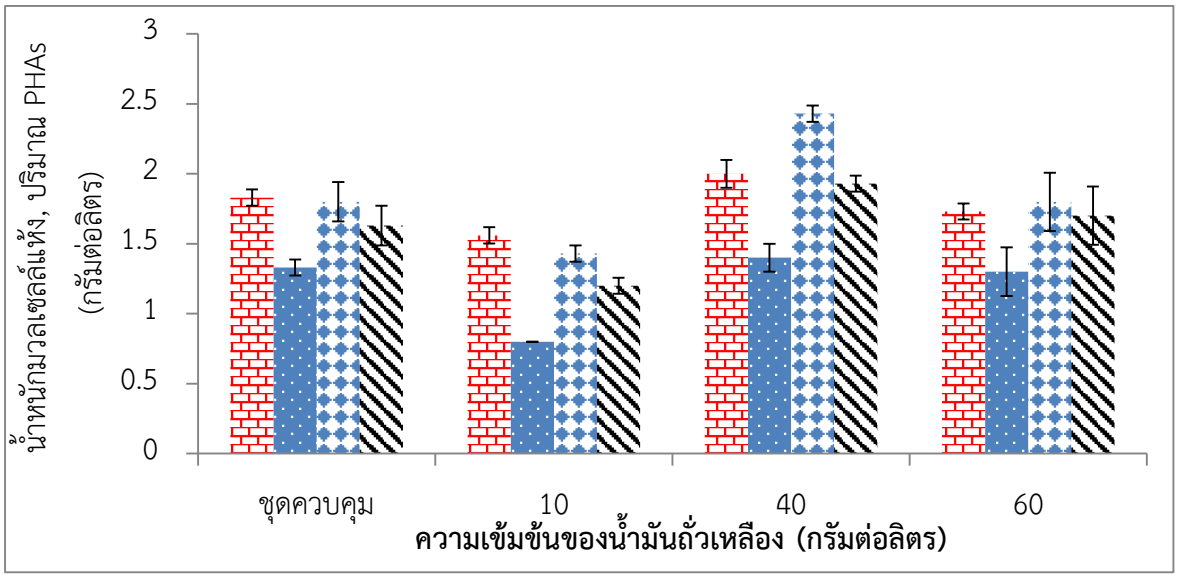


ภาพที่ 6 การเจริญของเซลล์จากเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม โดยมีความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่แตกต่างกัน คือ ชุดควบคุม 20 กรัมต่อลิตร (—◆—) 10 กรัมต่อลิตร (—■—) 40 กรัมต่อลิตร (—▲—) และ 60 กรัมต่อลิตร (—×—)

ผลของการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่แตกต่างกัน พบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำและเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 1.93 และ 1.40 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 2.43 และ 2.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 79.51 และ 70.00 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้งที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 60 กรัมต่อลิตร จะสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองมากเกินไป อาจจะส่งผลให้ไปยับยังการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทำให้สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ปริมาณที่น้อยลง ส่วนน้ำมันถั่วเหลืองที่มีความเข้มข้น 10, 20 และ 60 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีการผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและปริมาณน้ำหนักมวลเซลล์แห้งที่แตกต่างกันดังตารางที่ 3 และ ภาพที่ 7

ตารางที่ 3 ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละปริมาณการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ของ *A. Latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ และ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

น้ำมันถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ร้อยละ)	
	A. latus ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ	*A. latus* ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ	*A. latus* ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ
10	1.56±0.06	1.43±0.06	0.80±0.00	1.20±0.20	51.28	83.92
40	2.00±0.10	2.43±0.06	1.40±0.10	1.93±0.06	70.00	79.42
60	1.73±0.06	1.80±0.21	1.30±0.17	1.70±0.10	75.14	94.44
ชุดควบคุม 20	1.83±0.06	1.80±0.14	1.33±0.06	1.63±0.06	72.68	90.56



ภาพที่ 7 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดสูงสุดที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นแตกต่างกันโดยที่

น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม

ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม

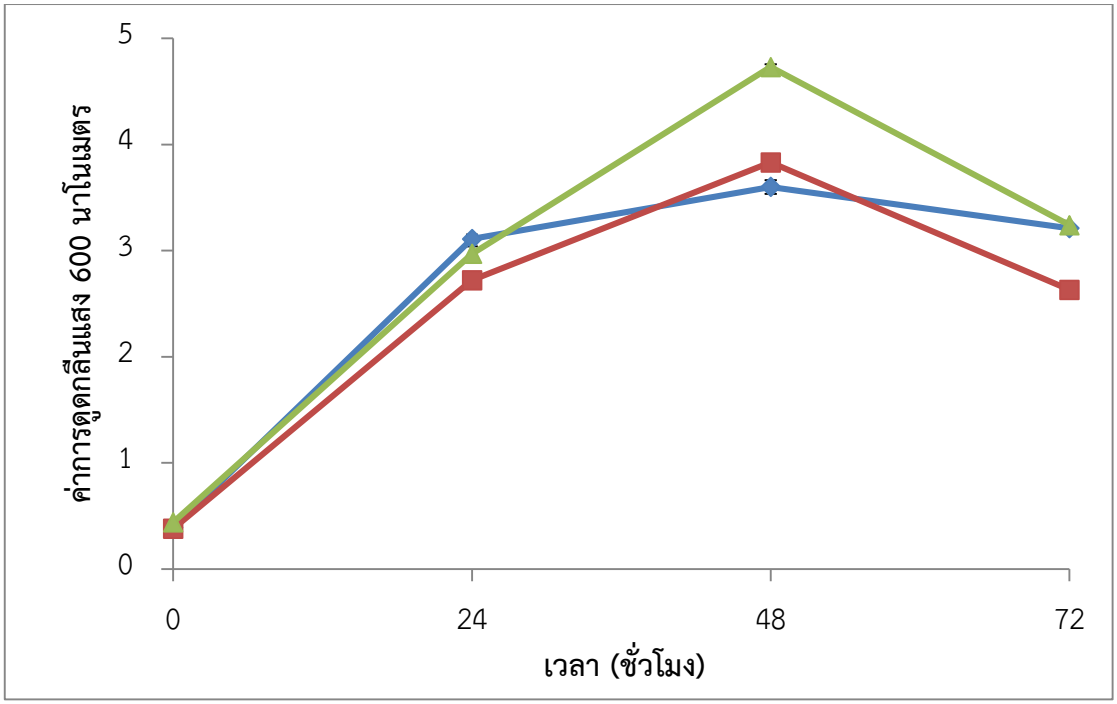
น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ

ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ

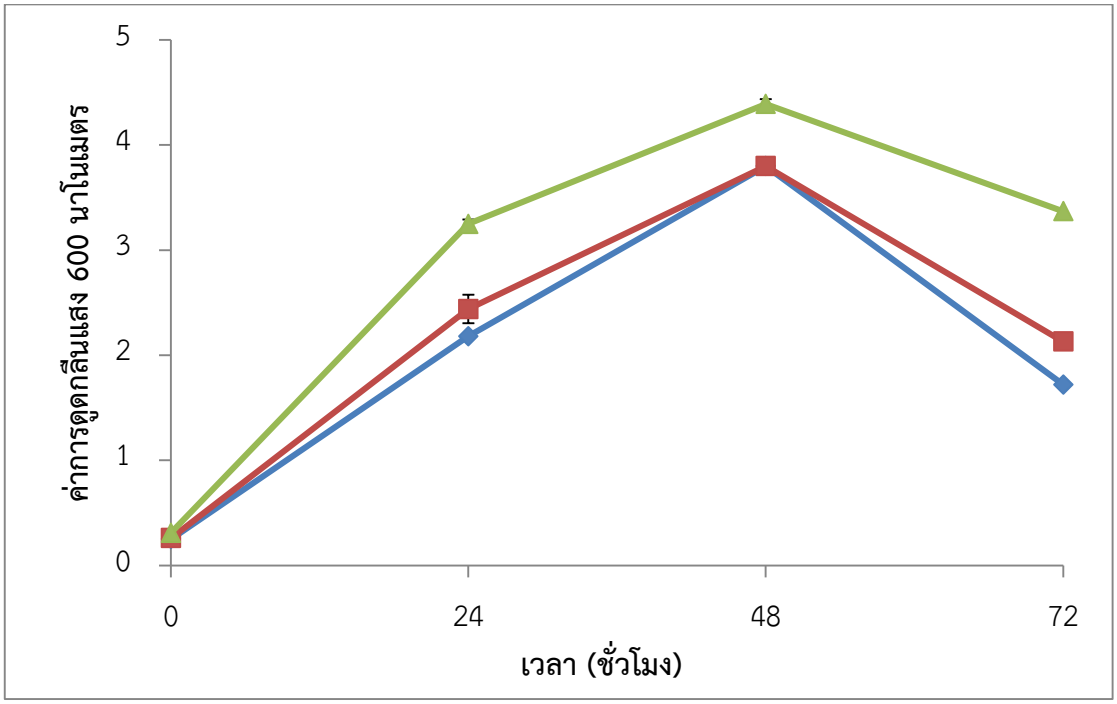
3. ผลของการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

เมื่อนำเชื้อ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำ และ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม เลี้ยงในสูตรอาหาร ดัดแปลง DSMZ (สูตรที่ 2) ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็น 3 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 น้ำตาลฟรุกโตสและแอมโมเนียมคลอไรด์ ชุดที่ 2 น้ำตาลฟรุกโตสและผงชูรส และชุดที่ 3 น้ำมันถั่วเหลืองและผงชูรส โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำและเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมมีอัตราการเจริญดีที่สุดในชุดที่ 3 รองลงมาคือชุดที่ 2 และ 1 ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 8 และภาพที่ 9

ผลจากการเลี้ยงเชื้อในชุดอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแตกต่างกัน พบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำและเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในชุดที่ 3 นั่นคือ น้ำมันถั่วเหลืองและผงชูรสความเข้มข้น 40 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าเท่ากับ 2.63 และ 1.40 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 3.47 และ 1.66 กรัมต่อลิตรคิดเป็นร้อยละ 75.79 และ 84.34 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากการใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเพิ่มสูงขึ้น



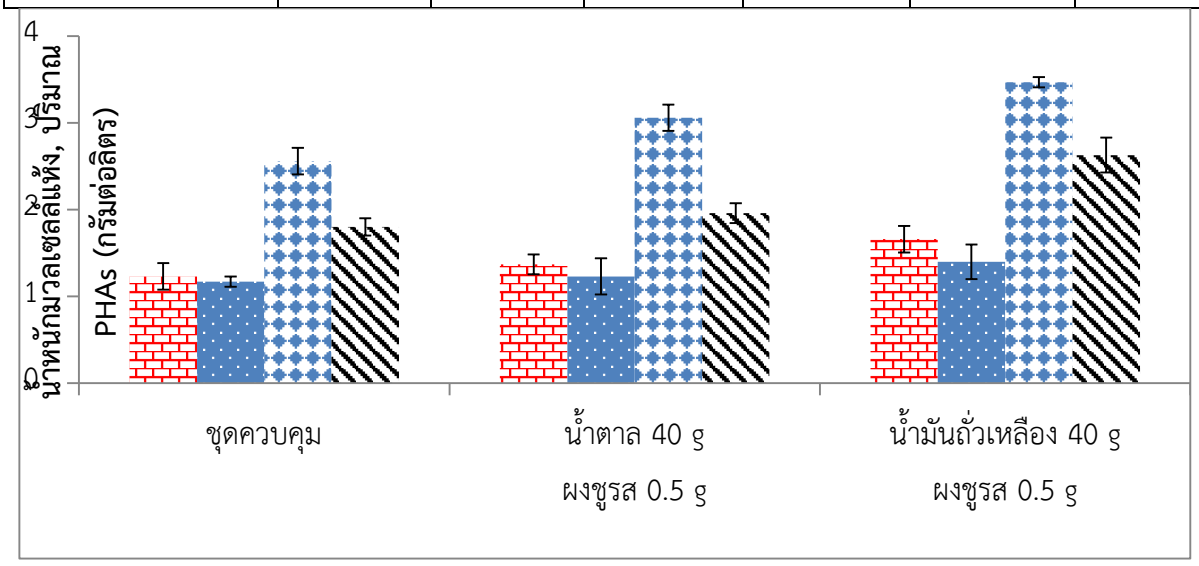
ภาพที่ 8 การเจริญของเซลล์จากเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ โดยชุดควบคุม คือ น้ำตาลและแอมโมเนียคลอไรด์ ( ) น้ำตาลและผงชูรส ( ) น้ำมันถั่วเหลืองและผงชูรส ( )



ภาพที่ 9 การเจริญของเซลล์จากเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม โดยชุดควบคุม คือ น้ำตาล และแอมโมเนียคลอไรด์ ( ) น้ำตาลและผงชูรส ( ) น้ำมันถั่วเหลืองและผงชูรส ( )

ตารางที่ 4 ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละปริมาณ การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ของ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ และ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

ชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน	น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ร้อยละ)	
	A. latus ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ	*A. latus* ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ	*A. latus* ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ
น้ำตาลฟรุกโตส 40 g. และผงชูรส 0.5 g.	1.37±0.11	3.06±0.15	1.23±0.20	1.96±0.11	89.78	64.05
น้ำมันถั่วเหลือง 40 g. และผงชูรส 0.5 g.	1.66±0.15	3.47±0.06	1.40±0.20	2.63±0.20	84.34	75.79
ชุดควบคุม น้ำตาลฟรุกโตส 40 g. และ NH_4Cl 0.5 g.	1.23±0.15	2.56±0.15	1.17±0.06	1.80±0.10	95.12	70.31



ภาพที่ 10 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดสูงสุดที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยที่

น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม

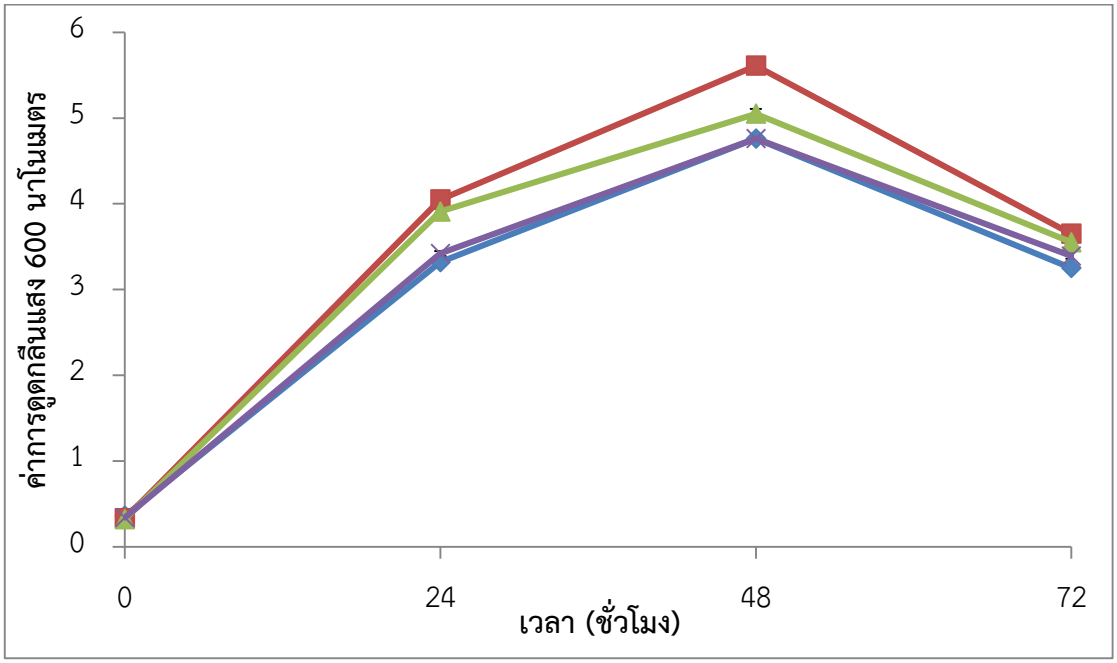
ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม

น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ

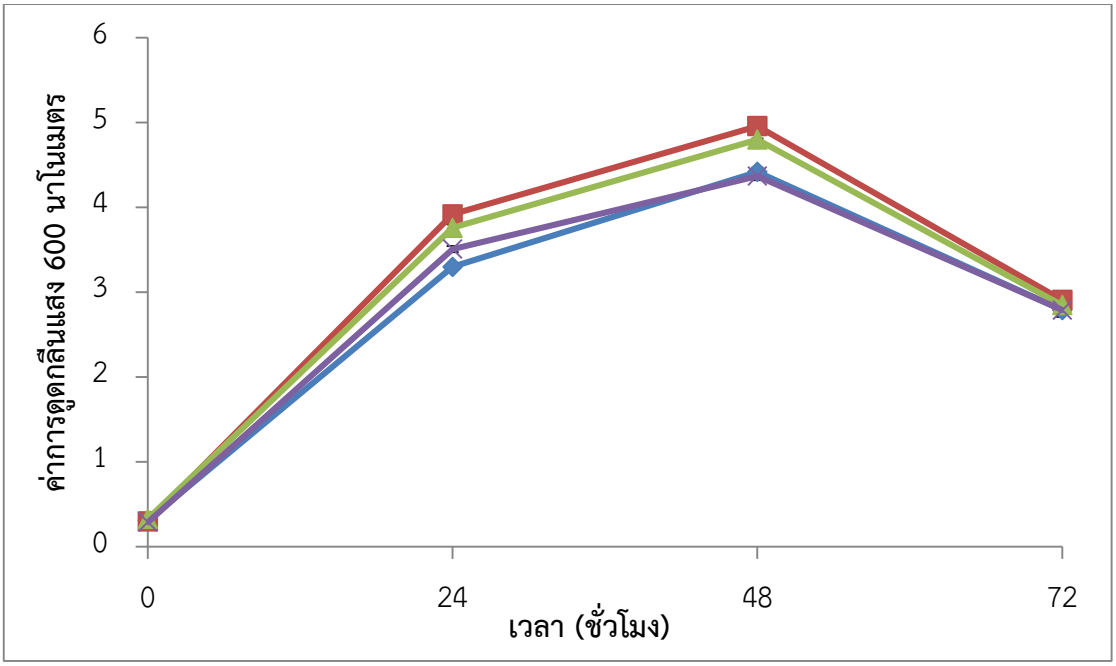
ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ

4. ผลการศึกษาความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำและ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารดัดแปลง DSMZ (สูตรที่ 2) โดยทำการปรับแหล่งคาร์บอนโดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรและแหล่งไนโตรเจนเป็นผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม จากนั้นทำการศึกษาความเข้มข้นของผงชูรส เท่ากับ 0.5, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเท่ากับ 7.0 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำและเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมมีอัตราการเจริญได้ดีในอาหารที่มีผงชูรสความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารที่มีผงชูรสความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร และสุดท้ายมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกันในอาหารที่มีผงชูรสความเข้มข้น 0.5 และ 6 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 11 และภาพที่ 12



ภาพที่ 11 การเจริญของเซลล์จากเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ โดยมีความเข้มข้นของผงชูรสที่แตกต่างกัน ดังนี้ ชุดควบคุม 0.5 กรัมต่อลิตร (—◆—) 2 กรัมต่อลิตร (—■—) 4 กรัมต่อลิตร (—▲—) และ 6 กรัมต่อลิตร (—✕—)

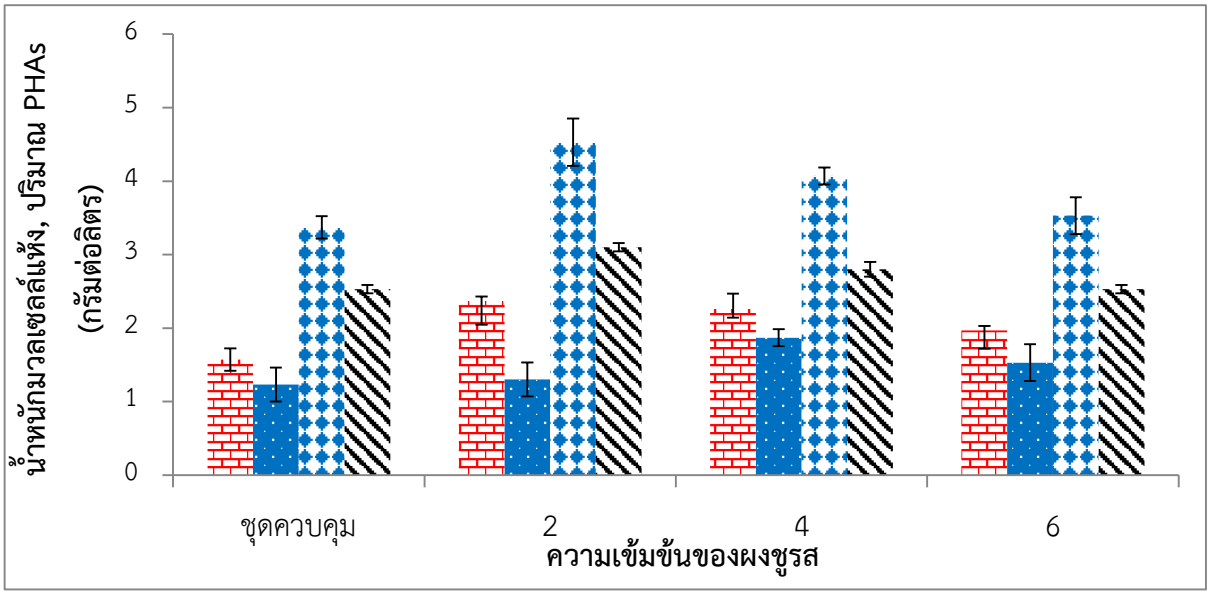


ภาพที่ 12 การเจริญของเซลล์จากเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม โดยมีความเข้มข้นของผงชูรสที่แตกต่างกันดังนี้ ชุดควบคุม 0.5 กรัมต่อลิตร ( ) 2 กรัมต่อลิตร ( ) 4 กรัมต่อลิตร ( ) และ 6 กรัมต่อลิตร ( )

จากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของผงชูรสที่แตกต่างกันพบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดอาหารที่มีผงชูรสความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 3.10 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 4.53 คิดเป็นร้อยละ 68.43 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดอาหารที่มีผงชูรสความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 1.87 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 2.26 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82.74 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีและมีการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมากที่สุดเพราะในผงชูรสยังมีสารอื่นๆ เช่น กรดอะมิโนชนิดต่างๆ จึงทำให้มีการผลิตพอลิโฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนอาหารที่มีความเข้มข้นของผงชูรส 0.5, 4, และ 6 เชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและมวลเซลล์แห้งได้แตกต่างกัน ดังตารางที่ 5 และภาพที่ 13

ตารางที่ 5 ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละปริมาณ การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ของ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ และ*A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ที่เลี้ยงในแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ผงชูรส (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ร้อยละ)	
	A. latus ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ	*A. latus* ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ	*A. latus* ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ
2	2.37±0.06	4.53±0.32	1.30±0.23	3.10±0.06	54.85	68.43
4	2.26±0.21	4.07±0.11	1.87±0.11	2.80±0.10	82.74	68.80
6	1.97±0.06	3.53±0.25	1.53±0.25	2.53±0.06	77.66	71.67
ชุดควบคุม 0.5	1.57±0.15	3.37±0.15	1.23±0.23	2.53±0.05	78.34	75.07



ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดสูง ที่เลี้ยงในความเข้มข้นของผงชูรสที่แตกต่างกัน โดยที่

น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม

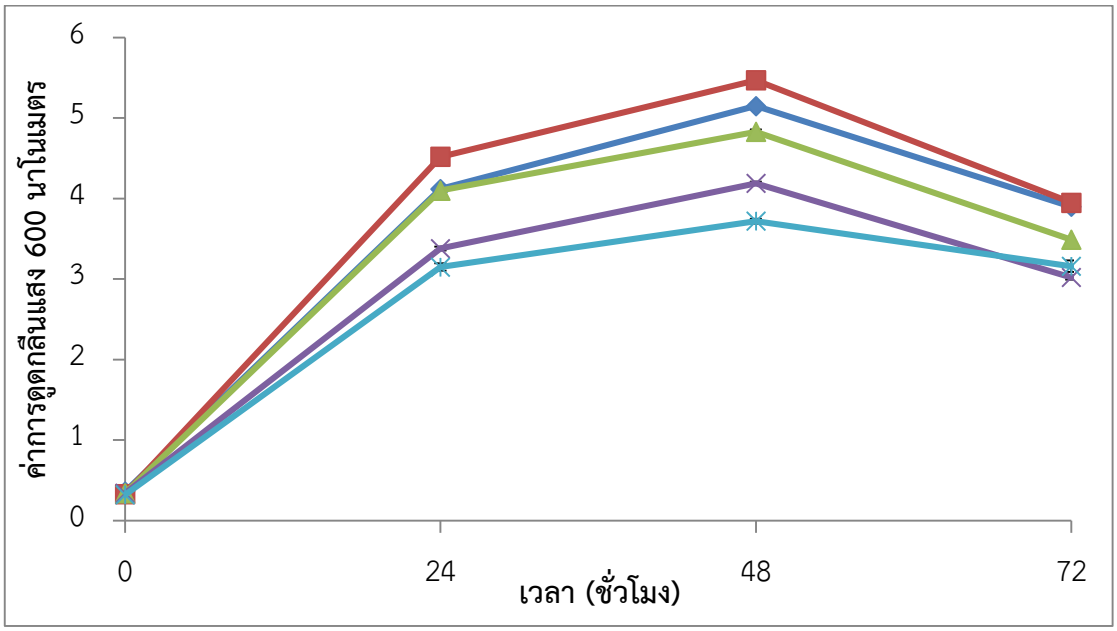
ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม

น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ

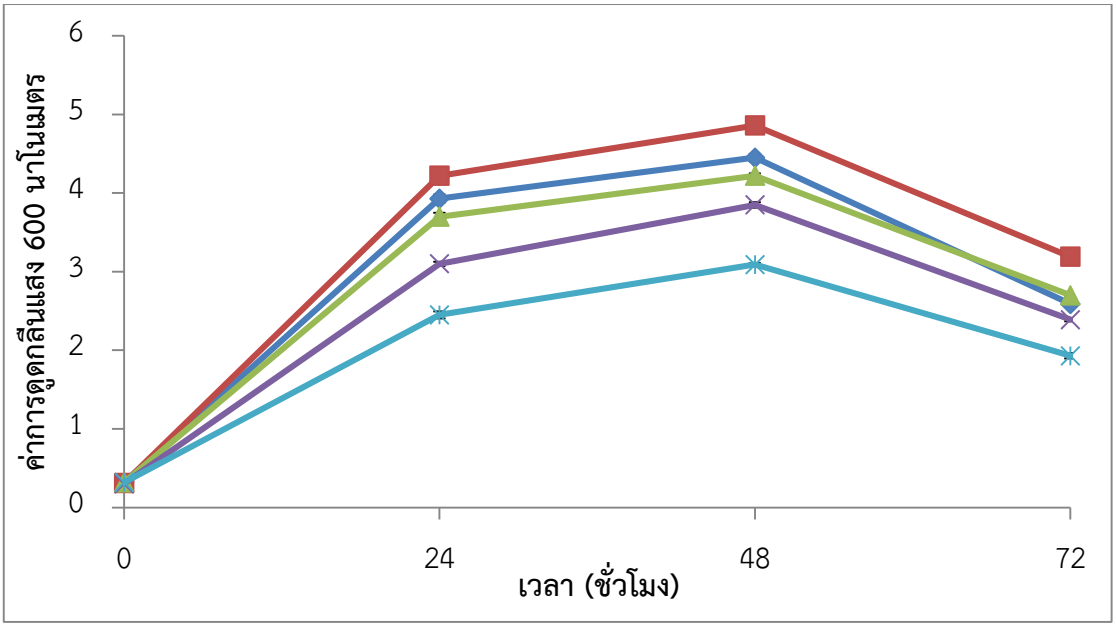
ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ

5. ผลการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ร่วมกับผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการศึกษาเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำและ*Alcaligenes latus* TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารดัดแปลง DSMZ (สูตรที่ 2) โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาทำการศึกษาต่อโดยเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจากผงชูรสเพียงอย่างเดียวเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ร่วมกับผงชูรสในอัตราส่วนแตกต่างกัน เท่ากับ 0.25:2, 0.10:2, 0.5:1, 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเท่ากับ 7.0 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำและเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมมีอัตราการเจริญได้ดีในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสความเข้มข้น 0.25:2 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือผงชูรสความเข้มข้น 0.5:2 กรัมต่อลิตร 0.10:2 0.5:1 และ 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 14 และภาพที่ 15



ภาพที่ 14 การเจริญของเซลล์จากเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายซ้ำ โดยความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสแตกต่างกัน ดังนี้ 0.5:2 กรัมต่อลิตร ( ) 0.25:2 กรัมต่อลิตร ( ) 0.10:2 กรัมต่อลิตร ( ) 0.5:1 กรัมต่อลิตร ( ) 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร ( )

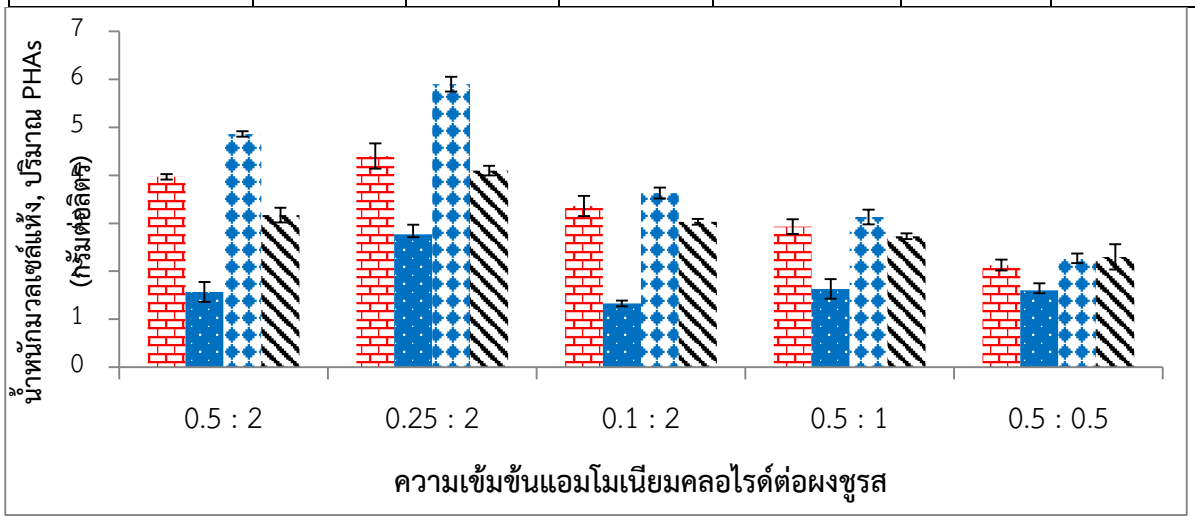


ภาพที่ 15 การเจริญของเซลล์จากเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม โดยความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสแตกต่างกัน ดังนี้ 0.5:2 กรัมต่อลิตร ( ) 0.25:2 กรัมต่อลิตร( ) 0.10:2 กรัมต่อลิตร ( ) 0.5:1 กรัมต่อลิตร ( )0.5:0.5 กรัมต่อลิตร ( )

ผลของการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน พบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำและเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสความเข้มข้น 0.25:2 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 4.10และ 2.77 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 5.90 และ 4.40 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 69.49 และ 62.39 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสในอัตราส่วน 0.25:2 กรัมต่อลิตร เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมทำให้สามารถผลิตสามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ร่วมกับผงชูรสยังสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้เพราะแอมโมเนียมคลอไรด์มีราคาต้นทุนที่สูงกว่าผงชูรส และนอกจากนี้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส 0.10:2 , 0.5:1 , 0.5:0.5 และ 0.5:2 พบว่า เชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและมวลเซลล์แห้งแตกต่างกัน ดังตารางที่ 6 และภาพที่ 16

ตารางที่ 6 ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละปริมาณ การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ของ*A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ และ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิมเลี้ยงในแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

แอมโมเนียมคลอไรด์และผงชูรส (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ร้อยละ)	
	A. latus ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ	*A. latus* ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ	*A. latus* ดั้งเดิม	*A. latus* กลายซ้ำ
0.5 : 2	3.97±0.06	4.86±0.21	2.57±0.06	3.17±0.15	64.73	65.22
0.25 : 2	4.40±0.26	5.90±0.20	2.77±0.15	4.10±0.10	62.95	69.49
0.10 : 2	3.36±0.21	3.63±0.06	2.33±0.12	3.03±0.06	69.35	83.47
0.5 : 1	2.93±0.15	3.13±0.21	2.63±0.15	2.73±0.06	89.76	87.22
0.5 : 0.5	2.13±0.12	2.97±0.15	1.60±0.10	2.30±0.26	75.12	77.44



ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดสูงสุดที่เลี้ยงในความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน โดยที่

น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม

ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม

น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ

ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการกลายซ้ำ

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำ และ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม โดยเติมหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 7 ของอาหารลงในแต่ละชุดการทดลอง ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง ทุก 24 ชั่วโมง สามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

1. จากการคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมทั้ง 3 สูตรต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่า *A. latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำ มีการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในสูตรอาหารที่ 2 เท่ากับ 1.73 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 1.87 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 92.51 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และ *A. latus* TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในสูตรอาหารที่ 3 เท่ากับ 1.53 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 1.70 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 90.00 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

2. การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนชนิดน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่า *A. latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำ และ *A. latus* TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม มีการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 1.93 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 2.43 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.42 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 1.40 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 2.00 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 70.00 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

3. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่า *A. latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำ และ *A. latus* TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม มีการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรและผงชูรสความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 2.63 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 3.47 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 75.79 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 1.40 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 1.66 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 75.79 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

4. การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนชนิดผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่า *A. latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำ และ *A. latus* TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม มีการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด ในผงชูรสซึ่งเป็นแหล่งไนโตเจนความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำ มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 3.10 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 4.53 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 68.43 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 1.30 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 2.37 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 54.85 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

5. การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนชนิดแอมโมเนียมคลอไรด์ร่วมกับผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่า *A. latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายซ้ำ และ *A. latus* TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม มีการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสความเข้มข้น 0.25 และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำ มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 4.10 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 5.90 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 69.49 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 2.77 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 4.40 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 62.95 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง เมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสในอัตราส่วน 0.25:2 กรัมต่อลิตร เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมทำให้สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ร่วมกับผงชูรสยังสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้เพราะแอมโมเนียมคลอไรด์มีราคาต้นทุนที่สูงกว่าผงชูรส โดยที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส 0.10:2 , 0.5:1 , 0.5:0.5 และ 0.5:2 พบว่า เชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและมวลเซลล์แห้งแตกต่างกัน

บรรณานุกรม

Akiyama M., Tsuge T. & Doi Y. 2003. Environmental Life Cycle Comparison of Polyhydroxy alkanoates Produced from Renewable Carbon Resources by Bacterial Fermentation. *Polymer Degradation and Stability*, 80(1), 183–194.

Alias, Z. &Tan, I.K.P. 2005. Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. *Biores. Technol*. 96, 1229-1234.

Ashby R.D., Solaiman D.K.Y., &Foglia T.A., 2004, Bacterial Poly(hydroxyalcanoate) polymer productionfrom the biodiesel co-product stream, *J. Polym. Environ*., 12, 105–112.

Ashby R.D., Solaiman D.KY, &Strahan G.D., 2011, Efficient utilization of crude glycerol as fermentationsubstrate in the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) biopolymers, *J. Am. Oil Chem. Soc.,* 88, 949–959.

Cavalheiro J.M.B.T., de Almeida M.C.M.D., Grandfils C., &da Fonseca M.M.R., 2009, Poly(3-hydroxybutyrate) production by Cupriavidus necator using waste glycerol, *Proc. Biochem.,* 44, 509–515.

Chaijamrus, S. & Udpuay, N. 2008. Production and characterization of polyhydroxybutyrate from molasses and corn steep liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC6748. *Agricultural Engineering International*, *Proceeding, Naresuan University*, 1-12.

Chanprateep S, Buasri K, Muangwong A, Utiswannakul P. 2010. Biosynthesis and biocom patibility of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polym Degrad Stab.*95(10): 2003–2012.

Chen, Y. J. Chen, C.Yu, G.Du, & S. Lun, 1999. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant-chelate aqueous system, *Process Biochem*. 34, 153–157.

Chen, Y. H. Yang, Q. Zhou, J. Chen, G. Gu, 2001. Cleaner recovery of poly(3-hydroxy-butyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus*, *Process Biochem*. 36, 501–506.

Chen GQ. 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates PHA based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev*.38: 2434-2446.

Chien, C. C., Chen, C. C., Choi, M. H., Kung, S. S. & Wei, Y. H. 2007. Production of poly- ß - hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment. *Journal of Biotechnology*. 132, 259–263.

Choi J, & Lee S.Y. 1997. Process Analysis and Economic Evaluation for Poly (3-hydroxy butyrate) Production by Fermentation. *Bioprocess Engineering*, 17(6), 335-342.

Dionisi, D., Caruccia, G., Petrangeli Papinia, M., Riccardi, C., Majone, M. & Carrasco, F.2005. Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water Res.* 39, 2076–2084.

Divyashree M.S. & Shamala T.R. 2009. Effect of gamma irradiation on cell lysis and polyhydro xyalkanoate produced by *Bacillus flexus*. *Radiation Physics and Chemistry*.78, 147–152.

DeKoning. G.J.M., Kellerhals M., Van Meurs, Witholt, C. B. 1997. Process for the recovery of poly(hydroxy -alkanoates from *pseudomonads* part 2: process development and economic evaluation, *Bioprocess Eng.* 17, 15–21.

Dong, Z. & X. Sun, 2000. A new method of recovering polyhydroxyalkanoate from *Azotobacter chroococcum*, *Chin. Sci. Bull.* 45, 252–255.

Elbahloul Y. & Steinbüchel A. 2009. Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by *Pseudomonasputida* GPo1 and a simplified downstream process. *Applied and Environmental Microbiology,* **75**, 643–651.

El-sayed, Azhar, A., Abdelhady, H. M., Abdel, A. M., & Khodair, T. A. 2009. Batch production of polyhydroxy butyrate (PHB) by *Ralstonia eutropha* and *Alcaligenes latus* using bioreactor different culture strategies, *J. of Applied Science Research*, 5(5), 556-564.

Fatemeh, T., & Ebrahim, V. F. 2002. Biosynthesis of Poly-β-hydroxybutyrate as a biodegradable polymer. *Iranian Polymer Journal*, 12, 37-42.

Fiorese M. L., Freitas F., Pais J., Ramos A. M., de Aragão G. M. F.& Reis M. A. M. 2009. Recovery of polyhydroxy butyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. *Engineering in Life Sciences*, 9, 454–461.

Gahlawat, G., & Srivastava, A. K. 2013. Development of a mathematical model for the growth associated polyhydroxybutyrate fermentation by *Azohydromonas australica* and its use for the design of fed-batch cultivation strategies. *Bioresource Technology*, 137, 98-105.

Ghatnekar, M.S. J.S. Pai & M. Ganesh, 2002. Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from methylobacterium sp V49, *J. Chem. Technol.Biotechnol*. 77, 444–449.

Gomaa EZ. 2014. Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) By *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* Grown on Cane Molasses Fortified with Ethanol. *Braz. Arch. Biol. Technol*. v.57 n.1: pp. 145-154, Jan/Feb 2014

Grothe, E., Young, M. M., & Chisti, Y. 1999. Fermentation optimization for the production of Poly(ß-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology,* 25, 132-141

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

Haas, R., Jin, B., & Zepf, F. T. 2008. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 253–256.

Hahn, S.K. Y.K. Chang, B.S. Kim, K.M. Lee, .1993. The recovery of poly(3-hydroxybutyrate) by using dispersion of sodium hypochlorite solution and chloroform, *Biotechnol. Bioeng*. 44, 256–261.

Hahn, S.K, Y.K. Chang, B.S. Kim & H.N. Chang, 1994. Communication to the editor optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform, *Biotechnol. Bioeng*. 44, 256–261.

Hahn S. K., Chang Y. K.& Lee S. Y. 1995. Recovery and characterization of poly(3-hydroxy butyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 34–39

Hassan, M. A., Shirai, M. A.Y., Kusubayashi, Y.N. N., Karim, M. I. A. , Nakanishi, M. I. A.K. & Hashimoto, K.K. 1996. Effect of organic acid profiles during anaerobic treatment of palm oil mill effluent on the production of polyhydroxyalkanoates by *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Ferment. Bioeng*. 82, 151–156.

Hazer, B. & Steinbuchel, A. 2007. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 74, 1–12.

Holmes, P.A. & Lim, G.B. 1990. Separation process, U.S. Patent 4,910, 145.

Hwang,K.J., S.F. You & T.M. Don. 2006. Disruption kinetics of bacterial cells during purification of polyhydroxy alkanoates using ultrasonication, *J. Chin. Inst. Chem. Eng.* 37, 209–216.

Huang T-Y., Duan K-J., Huang S-Y. & Chen C.W. 2006. Production of Polyhydroxy -alkanoates from Inexpensive Extruded Rice Bran and Starch by *Haloferax mediterranei*. *J. of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 33(8), 701–706.

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

JINGNAN LU, RYAN C. T., & CHRISTOPHER T. N. 2009.Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxy alkanoates. *J. of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 49:226–248,

Jacquel N., Lo C-W., Wei Y-H., Wu H-S., Wang S. S.2008. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxy alkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39,15–27

Kapritchkoff, F.M.A.P. Viotti, R.C.P. Alli, M. Zuccolo, J.G.C. Pradella, A.E. Maiorano, E.A. Miranda, & A. Bonomi. 2006. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*, *J. Biotechnol*. 122, 453–462.

Kawata Y., Aiba S., 2010. Poly(3-hydroxybutyrate) production by isolated Halomonas sp. KM-1 using waste glycerol, *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 74,175–177.

Khanafari, A., Akhavan, S. A., & Mogharab, M. 2006. Production and recovery of poly-ß-hydroxybutyrate from whey degradation by Azotobacter. *Environment Health Science Engineering,* 3, 193-198.

Khanna, S., & Srivastana, A. K. 2005. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutrophus. Process Biochemistry,* 40, 2173-2182.

Khanna, S. & Srivastana, A. K. 2006. Optimization of nutrient feed concentration and addition time for production of poly(ß-hydroxybutyrate. *Enzyme and Microbial Technology. 39*, 1145-1151.

Khardenavis, A. A., Kumar, M. S., Mudlia, S. N.& Chakrabarti, T. 2007. Biotechnological conversion of agro-industrial wasteeater into biodegradable plastic, poly- β –hydroxy butyrate. *Biores. Technol*. 98, 3579-3584.

Khosravi-Darani, K. E. Vasheghani-Farahani, S.A. Shojaosadati, & Y. Yamini .2004. Effect of process variables on supercritical fluid disruption of ralstonia eutropha cells for poly(*R*-hydroxybutyrate) recovery, *Biotechnol. Progr*. 20,1757–1765.

Kim, M. K.S. Cho, H.W. Ryu, E.G. Lee & Y.K. Chang. 2003. Recovery of poly(3-Hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodiumdodecyl sulfate, *Biotechnol.Lett*. 25,55–59.

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

Kumar, M.S., Mudliar, S.N., Reddy, K.M., & Chakrabarti, T. 2004. Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant. *Bioresource Technology*, 95, 327-330.

Kunasundari B. & Sudesh K. 2011. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *eXPRESS Polymer Letters.* 5, (7). 620–634.

Lafferty R. M.& Heinzle E.1979. Use of cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-(β -hydroxybutyric acid). U.S. Patent 4140741, USA

Lee, S. Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. 49, 1-14.

Le Meur S., Zinn M., Egli T., Thöny-Meyer L& Ren Q. 2012. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered *Pseudomonas putida* KT 2440. *BMC Biotechnology*, 12, 53.

Lenz, R.W. & Marchessault, R.H. 2005. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*. 6, 1–8.

Ling Y., D.R.G. Williams, C.J. Thomas & A.P.J. Middelberg, 1997. Recovery of poly-3-hydroxy butyrate from recombinant *Escherichia coli* by homogenization and centrifugation, *Biotechnol.Technol*. 11, 409.

LooC-Y & Sudesh K. 2007. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal (MPJ),* 2(2), 31-57

Lu, C.H. 2006. Purification and separation of polyhydroxyalkanoates from bacteria, Ms Thesis, Yuan Ze University, Taiwan,

Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., & Olivera, E. R. 2003. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion Microbiology,* 6(3), 251-260.

Madison, L.L. & Huisman, G.W., 1999. Metabolic engineering of poly (3- hydroxyalkanoates) from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63 (1), 21-53.

Mantelatto P. E.& Durao N. A. S. 2008. Process for extracting and recovering polyhydroxy alkanoates (PHAs) from cellular biomass. U.S. Patent 20080193987, USA

Mona, K. G., Azza E. S. & Sanaa, H. O. 2001. Production of PHB by *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen soure. *Microbiological Researc. 156*, 201-207

Mothes G., Schnorpfeil C. & Ackermann JU. 2007. Production of PHB from crude glycerol, *Eng.Life Sci.*7, 475–479.

Montaser, N., Ardjmand, M., Heidari, N. A., & Safe, K. A. 2011. Optimization of microbial culture for production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Azotobacter Beijerinckii* DSMZ-1041. *World Applied Sciences J*., 14, 72-82.

Nikel PI, Pettinari MJ, Mendez BS & Galvagno MA. 2005. Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly3-hydroxybutyrate production by recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial by products. *Int Microbiol.* 8, 243-250.

Ojumu, T.V., Yu, J. & Solomon, B.O. 2004. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*. 3, 18-24.

Park, D.H. & Kim, BS.2011. Production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxy butyrate -co -4-hydroxy butyrate) by *Ralstonia eutropha* from soybean oil. *New Biotechnology*, 28, 719-724.

Posada J.A., Naranjo J.M., López J.A., Higuita J.C. & Cardona C.A. 2011. Design and Analysis of Poly-3- hydroxyl butyrate Production Processes from Crude Glycerol. *Process Biochemistry*, 46(1), 310–317.

Quillaguaman, J., Hashim, S., Bento, F., Mattiasson, B. & Hatti-Kaul, R. 2005. Poly (ß-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LCi using starch hydrolysate as substrate. *Journal of Applied Microbiology,* 99, 151-157.

Ramsay J.A., E. Berger, B.A. Ramsay & C. Chavarie, 1990. Recovery of polyhydroxybutyric acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment, *Biotechnol. Technol*. 4, 221–226.

Ramsay, B. A. , Lonaliza K., Chavarie C., Dube B., Bataille P. & RamsayJ. A. 1990. Production of Poly-(ß-Hydroxybutyric-Co- ß -Hydroxyvaleric) Acid , *Appli. and Environ. Microbial*. 56, 2093-2098.

Ramsay J. A., Berger E., Voyer R., Chavarie C.& Ramsay B. A. 1994. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate usingchlorinated solvents. *Biotechnology Techniques*, 8, 589–594.

Rodrigues MFA, Da Silva LF, Gomez JGC, Valentin HE &Steinbuchel A. 1995. Biosynthesis of poly (3-hydroxy butyric acid-*co*-3-hydroxy-4-pentenoic acid) from unrelated substrates by *Burkholderia* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 43, 880-886.

Rodrigues MFA, Vicente EJ, Steinbuchel A. 2000. Studies on polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in a PHA synthase Inegative mutant of *Burkholderia cepacia* generated by homogenotization. *FEMS Microbiology Letters*; 193, 179-185.

Ryu HW, Hahn SK, Chang YK, & Chang HN. 1997. Production of poly3-hydroxybutyrate by high cell density fed batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnol Bioengin*.; 55: 27-32.

Ryu H.W., K.S. Cho, E.G. Lee & Y.K. Chang. 2000. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from coagulated *Ralstonia eutropha* using a chemical digestion method, *Biotechnol. Progr*. 16, 676–679.

Saika A., Watanabe Y., Sudesh K., Abe H. & Tsuge T. 2011. Enhanced Incorporation of 3-Hydroxy-4-Methylvlerate Unit into Biosynthetic Polyhydroxyalkanoate Using Leucine as a Precursor. *AMB Express*, 1:6

Salehizadeh, H. & Van Loosdrecht, M.C.M. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*. 22, 261–279.

Silva, L.F., Taciro, M.K., Ramos, M.E.M., Carter, J.M., Pradella, J.G.C., & Gomez, J.G.C. 2004. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugar cane bagasse hydrolysate. *J. of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 31, 245–254.

Singh M., Patel S. KS & Kalia V C. 2009. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxy alkanoates *Microbial Cell Factories*, 8:38

Shrivastav A., Mishra S.K., Shethia B., Pancha I., Jain D.& Mishra S., 2010. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (phas) production utilizing Jatropha biodiesel byproduct, *Int. J. Biol. Macromol*., 47, 283–287.

Steinbüchel, A. & Lütke-Eversloh, T. 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem. Eng. J.* 16:81-96.

Sudesh, K., Abe, H. & Doi, Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxy alkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 25, 1503-1555.

Tamer, M. M. Moo-Young &Y. Chisti, 1998. Disruption of *Alcaligenes latus* for recovery of poly(ß -hydroxybutyric acid): comparison of high-pressure homogenization, bead milling and chemically induced lysis*, Ind. Eng. Chem. Res*. 37,1807–1814.

Tanamool, V., Danvirutai, P., Thanonkeo, P., Imai, T., & Kaewkannetra, P. 2009. Production of Poly-ß-hydroxyric acid (PHB) from sweet sorhum juice *by Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 and *Alcaligenes latus* ATCC 29714 via batch fermentation, p.95. *In The 3rd Internationnal conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Product (FerVAAP), 26-28 August 2009*. Khon Kaen, Thailand.

Timm, A. & Steinbüchel, A. 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol*. 56:3360–3367.

Tripathi, A.D., Srivastava, S. K., & Singh, R. P. 2013. Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes* sp. *Biomass and Bioenergy*. 3,1-8.

Valappil S. P., Misra S. K., Boccaccini A. R., Keshavarz T., Bucke C.& Roy I. 2007. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *J. of Biotechnology*, 132, 251–258

Valentin, H. E. & Steinbüchel, A. 1995. Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid-*co*-3-hydroxyvaleric acid-*co*-4-hydroxyvaleric acid) by mutants and recombinant strain of *Alcaligenes eutrophus. J. Environ. Polym. Degrad.* 3:169-175.

Van Wegen, R.J. Y. Ling & A.P.J. Middelberg, 1998. Trans. IChemE. 76, 417–426.

Verlinden AJ R. , Hil J D, Kenward M A, Williams CD 1, Piotrowska-Seget Z. & Radecka I. K. 2011. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express*., 1:11

Wang, B., Sharma-Shivappa, R.R., Olson, J.W., & Khan, S, A. 2012. Upstream process optimization of polyhydroxy butyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using two-stage batch and fed-batch fermentation strategies. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 1-12.

Wang, B., Sharma-Shivappa, R.R., Olson, J.W., & Khan, S, A. 2013. Production of polyhydroxy butyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice. *Industrial Crop and Products*, 43, 802-811.

Wiseman, A. 1995. Handbook of enzyme biotechnology. London :Ellis Horwood.

Xu Y., Wang R.H., Koutinas A.A. &Webb C., 2010, Microbial biodegradable plastic production from a wheat based biorefining strategy, *Proc. Biochem*., 45, 153–163.

Yamane, T., Fukunaga, M. & Lee, Y.W. 1996. Increased PHB productivity by high-cell-density fed batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. *Biotechnol. Bioeng.* 50:197-202.

Yezza, A., Halasz, A., Levadoux, W., & Hawari, J. 2007. Production of poly-ß-hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. *Appli. Microbial Biotechnology,* 77, 269-274.

Yu, P.H., Chua, H., Huang, A. L, LO, W. & Chen, G.Q. 1998. Conversion of Food Industrial Wastes into Bioplastics. *Applied Biochemistryand Biotechnology*. 70-72, 603-614.

Yu, J., Si, Y. & Wong, W.K.R. 2002. Kinetics modeling of inhibition and utilization of mixed volatile fatty acids in the formation of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochem.* 37:731-738.

Yu J & Chen LX. 2006. Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass. *Biotechnol Prog.* Mar-Apr; 22(2):547-53.

Zinn, M. H.UWeilenmann, R. Hany, M. Schmid & T.H. Egli. 2003. Tailored synthesisof poly([*R*]-3-hydroxybutyrate -co-3-hydroxyvalerate) (PHB/HV) in *Ralstonia eutropha* DSM 428, *Acta. Biotechnol.* 23, 309–316.

Zhu C., Nomura C.T., Perrota J., Stipanovic A.J.& Nakas J.P., 2010. Production and characterization of poly-3 hydroxyl butyrate from biodiesel-glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC17759, *Biotechnol.Prog.,* 26, 424–430.126

Zhang, S., Norrlöw, O., Wawrzynczyk, J. & Dey, E, S.2004. Poly (3-hydroxybutyrate) Biosyn thesis in the Biofilm of *Alcaligenes eutrophus*, Using Glucose Enzymatically Released from Pulp Fiber Sludge. *Applied and Enviromental Microbiology*. 70, 6776–6782.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. องค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1

Fructose	20	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	0.01	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	2.30	กรัมต่อลิตร
Ferric citrate	0.05	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.50	กรัมต่อลิตร
$NaHCO_3$	0.50	กรัมต่อลิตร
Na_2HPO_4	2.30	กรัมต่อลิตร
NH_4Cl	0.50	กรัมต่อลิตร
Trace elements	5	มิลลิกรัมต่อลิตร

ส่วนประกอบ Trace elements

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.003	กรัมต่อลิตร
H_3BO_4	0.003	กรัมต่อลิตร
$CoCl_2 \cdot 7H_2O$	0.02	กรัมต่อลิตร
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.001	กรัมต่อลิตร
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0.002	กรัมต่อลิตร
$NaMO_4 \cdot 2H_2O$	0.003	กรัมต่อลิตร

2. องค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2

Soybean oil	20	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	0.01	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	2.30	กรัมต่อลิตร
Ferric citrate	0.05	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.50	กรัมต่อลิตร
$NaHCO_3$	0.50	กรัมต่อลิตร

Na_2HPO_4	2.30	กรัมต่อลิตร
NH_4Cl	0.50	กรัมต่อลิตร
Trace elements	5	มิลลิกรัมต่อลิตร

ส่วนประกอบ Trace elements

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.003	กรัมต่อลิตร
H_3BO_4	0.003	กรัมต่อลิตร
$CoCl_2 \cdot 7H_2O$	0.02	กรัมต่อลิตร
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.001	กรัมต่อลิตร
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0.002	กรัมต่อลิตร
$NaMO_4 \cdot 2H_2O$	0.003	กรัมต่อลิตร

3. องค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3

Soybean oil	20	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.50	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
Na_2HPO_4	9.0	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	1.00	กรัมต่อลิตร
Trace elements	10	มิลลิกรัมต่อลิตร

ส่วนประกอบ Trace elements

H_3BO_3	0.3	กรัมต่อลิตร
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.02	กรัมต่อลิตร
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
$MnSO_4 \cdot 4\text{-}5H_2O$	0.03	กรัมต่อลิตร
$(NH4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.03	กรัมต่อลิตร
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0.002	กรัมต่อลิตร
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.003	กรัมต่อลิตร

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์

1. วัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

วัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเจือจางตัวอย่าง 10 เท่า (ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ค่าการดูดกลืนแสง = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร x อัตราการเจือจาง

2. วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight, DCW)

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง (ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนัก) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีอีกครั้งเพื่อเป็นการล้างเซลล์ จากนั้นนำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้จากการชั่งหลอดที่มีส่วนของตะกอนเซลล์แห้งอยู่ลบด้วยน้ำหนักของหลอดเปล่า จะได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่แท้จริงของแบคทีเรีย

มวลเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) = (เซลล์ + น้ำหนักหลอด) –น้ำหนักหลอด

3. วิเคราะห์ปริมาณพอลีไฮดรอกซีอัลคาดนเอตโดยวิธี Gravimetric method (Kim และคณะ, 1994)

นำตัวอย่างมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อบข้ามคืนและรู้ค่าน้ำหนักหลอดเปล่า จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร พร้อมทั้งผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงในความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใส่สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ (ทางการค้ามีส่วนผสมของคลอรีนร้อยละ 6) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปล้างส่วนของตะกอนที่ได้และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1.2

มิลลิลิตรจำนวน 2 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงในความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง โดยตะกอนเซลล์สุดท้ายนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้จากการชั่งหลอดที่มีส่วนของตะกอนอยู่นำไปลบด้วยน้ำหนักหลอดเปล่า จะได้ค่าน้ำหนักที่แท้จริงของปริมาณพลาสติกชนิดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่แบคทีเรียผลิตได้

ปริมาณ PHAs (กรัม/ลิตร) = (PHAs + น้ำหนักหลอด) – น้ำหนักหลอดเปล่า

$$\text{ร้อยละการสะสม PHAs (\% PHAs กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{ปริมาณ PHAs} \times 100}{\text{ค่ามวลเซลล์แห้ง}}$$