การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปโฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์จากแบคทีเรีย *Alcaligenes latus*

เมทินี อมรชัยสิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
สิงหาคม 2561
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ เมทินี อมรชัยสิน ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริโฉม ทุ่งเก้า)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 14 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจากผู้ศาสตราจารย์ ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอใส ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ดวงใจ โอชัยกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริโฉม ทุ่งเก้า ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษา ตรวจแก้ไขและวิจารณ์ผลงานทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น เนื่องจากงานวิจัยฉบับนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยของมหาวิทยาลัยบูรพา จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

เมทินี อมรชัยสิน

56910498: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
คำสำคัญ: พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHAs)/ โคพอลิเมอร์/ พลาสติกชีวภาพ/ การสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต/ *Alcaligenes latus*

เมทินี อมรชัยสิน: การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์จากแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* (PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATE IN HOMOPOLYMER AND COPOLYMER FROM ALCALIGENESV LATUS)
คณะกรรมการควมคุมวิทยานิพนธ์: กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์, Ph.D., เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ Ph.D., ค.ด. 166 หน้า. ปี พ.ศ. 2561.

การเปรียบเทียบการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากเชื้อ *Alcaligenes latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม BOT I และ BOT II ที่เลี้ยงในอาหารดัดแปลงสำหรับพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารสูตรดัดแปลง DSMZ catalogue สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ 5.90±0.20 และ 4.10±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 69.49 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ซึ่งมากกว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ BOT I เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 20 และ 60 กรัมต่อลิตร มีการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ถึงร้อยละ 90 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่การใช้ความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร แบคทีเรียสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ร้อยละ 75 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมที่ใช้ฟรุคโตส (ร้อยละ 65 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) จากการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารดัดแปลงทั้งหมด 3 ชุด พบว่าอาหารดัดแปลงชุดที่ 3 ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด 3.47±0.15 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด 2.63±0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 75.79 ของมวลเซลล์แห้ง จากการใช้ผงชูรสความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มข้นผงชูรส เท่ากับ 0.5, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ความเข้มข้นของผงชูรส เท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร *A. latus* สายพันธุ์ BOT II สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 4.53±0.32 และ 3.10±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 68.43 ของมวลเซลล์แห้ง และผลของการใช้อัตราส่วนแอมโนเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส พบว่าการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส เท่ากับ 0.25:2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 5.90±0.20 และ 4.10±0.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 69.49

การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปโคพอลิเมอร์ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารดัดแปลงที่มีสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ 3 ชนิด คือ แกมม่า-บิวทาโรแลกโตน 1,4-บิวเทนไดออล และกรดวาเลอริก พบว่าในอาหารดัดแปลงที่มีสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออล สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด 7.30±0.20 กรัมต่อลิตร และพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ได้เท่ากับ 6.00±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82.19 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการเปรียบเทียบน้ำมันชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวโพด น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันรำข้าวร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออล พบว่าการใช้น้ำมันรำข้าวร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออล มีการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ร้อยละ 87.85 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่การใช้น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปาล์ม สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ร้อยละ 79 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเมื่อใช้น้ำมันปาล์มร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออลความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ ร้อยละ 15, 25,50 และ 75 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ของแหล่งคาร์บอน พบว่า 1,4-บิวเทนไดออลความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 7.10±0.20 และ 5.63±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.30 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และจากการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนประเภทน้ำตาลร่วมกับสารกระตุ้นในการผลิตโคพอลิเมอร์ พบว่าฟรุคโตสความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ร้อยละ 83 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ร้อยละ 81 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

สำหรับวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปของกรดโครโตนิก 4 วิธี ได้แก่ วิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม วิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยไฮโปคลอไรท์ร่วมกับคลอโรฟอร์ม วิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยไฮโปคลอไรท์ และวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยไฮโปคลอไรท์ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน พบว่าการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปรคลอไรท์ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด เท่ากับ 3.22±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ด้วยการเลี้ยงแบบกะ พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ 8.6±0.20 และ 6.87±0.57 กรัมต่อลิตรตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 79.88 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

56910498: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M.Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)
KEYWORDS: POLYHYDROXYALKANOATE (PHAs)/ COPOLYMER / BIOPLASTICS/ THE EXTRACTION OF POLYHYDROXYALKANOATE / *Alcaligenes latus*

METHINEE AMORNCHAISIN: PRODUCTIONOF POLYHYDROXYALKA NOATE IN HOMOPOLYMER AND COPOLYMER FROM ALCALIGENESV LATUS KRONGCHAN RATANAPHADIT, Ph.D., SAETHAWAT CHAMSART, Ph.D. 166 P. 2018.

Comparison of PHA production by *A. latus* wild type, BOT I and BOT II. Maximum cell dry weight and PHA production are found in *A. latus* BOT II which cultivated in modified DSMZ catalogue medium. It's can produced maximum CDW and PHA at 5.90±0.20 and 4.10±0.10 g/ L (69.49%CDW) that more than *A. latus* wild type and BOT II. When soybean oil use for C source in varies concentrate (10, 20, 40 and 60 g/ L). The result shown when use soybean oil at 20 and 60 g/ L are given production of PHA 90%CDW, Furthermore when concentrate of soybean oil at 40 g/ L are given production of PHA 75%CDW it's more than control set that use fructose (65%CDW). From the appropriate of carbon and nitrogen source in three set of modified medium, set 3 that use soybean oil at 40 g/ L and MSG 0.5 g/ L it can produced maximum CDW 3.47±0.15 g/ L and maximum PHA 2.63±0.06 g/ L (75.79%CDW). Then the varies of MSG (0.5, 2, 4 and 6 g/ L), at 2 g/ L *A. latus* BOT II can produced maximum CDW and PHA as 4.53±0.32 and 3.10±0.06 g/ L (68.43%CDW) respectively. And the result of ratio of ammonium chloride and MSG at 0.25:2 g/ L can produced maximum CDW and PHA amount 5.90±0.20 and 4.10±0.10 g/ L (69.49%CDW) respectively.

The culture for production of PHA in copolymer form by *A. latus* BOT II in modified medium that contain 3 copolymer stimulant substance, gramma-butyrolactone, 1,4-butanediol and valeric acid. We found in the medium that contain 1,4-butanediol can produced maximum CDW 7.30±0.20 g/ L and PHA 6.00±0.10 g/ L (82.19%CDW). From the comparison of various vegetable oil, soybean oil, palm oil, corn oil, sun flower oil and rice barn oil along with 1,4-butanediol. That shown when use rice barn oil with 1,4-butanediol it's made production of PHA 87.75%CDW. In the same time, when use soybean and palm oil they made production of PHA 79%CDW, while use palm oil along with various concentration of 1,4-butanediol (15, 25, 50 and 75 w/ v

of carbon source). Result shown 1,4-butanediol at 50% w/ v that given maximum production of CDW and PHA 7.10±0.20 and 5.63±0.15 g/ L (79.30%CDW). In the comparison of carbon source from sugar along with copolymer stimulant substance, It's shown fructose at 20 and 40 g/ L can produced PHA 83%CDW and dextrose at 20 and 40 g/ L can produced PHA 81%CDW.

For the four method of PHA extraction in crotonic form, chloroform, hypochlorite and chloroform, hypochlorite and hypochlorite at difference temperature and time. That found extraction by hypochlorite at difference temperature and time at 30 °C, 10 minutes given maximum PHA 3.22±0.03 mg/ mL

For the Fed-batch cultivation of *A. latus* BOT II in 5L bioreactor, production of CDW and PHA is 8.6±0.20 and 6.87±0.57 (79.88%CDW).

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…….... ฉ
สารบัญ……..… ซ
สารบัญตาราง…… ฎ
สารบัญภาพ…….. ฐ
บทที่
1 บทนำ……. 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……... 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย…… 2
สมมติฐานของการวิจัย…… 3
ประโยชน์ที่คาดว่าได้รับจากการวิจัย…… 3
ขอบเขตของการวิจัย…… 3
กรอบของการวิจัย……. 4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…….……...……. 6
พลาสติกชีวภาพ……... 6
พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates) หรือ PHAs…….. 7
พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต (Poly-β-hydroxybutyrate) หรือ PHB……. 8
โคพอลิเมอร์ Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) หรือ [P(HB-co-HV)] 10
คุณสมบัติของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต…… 11
การย่อยสลายของพอลิไอดรอกซีอัลคาโนเอต……. 14
กระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต……. 16
ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของจุลินทรีย์…… 18
การเกิดโคพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์…… 29
การใช้ประโยชน์จากพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต……. 31
วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์……. 33

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	วิธีดำเนินการวิจัย	39
	เชื้อจุลินทรีย์	39
	วัสดุและอุปกรณ์	39
	สารเคมี	40
	วิธีดำเนินการวิจัย	42
	วิธีการวิเคราะห์	50
4	ผลการวิจัย	51
	ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสาหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	51
	ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสาหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	51
	ผลการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	54
	ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	57
	ผลของความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	60
	ผลของการอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	63
	ผลการศึกษาสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์	66
	ผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์	66
	ผลการเปรียบเทียบน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์	68
	ผลการใช้น้ำมันปาล์มร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	69
	ผลการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนประเภทน้ำตาลร่วมกับสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์	71
	ผลการศึกษาวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	74
	ผลการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์ม	74

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

ผลการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์มร่วมกับไฮโปคลอไรท์ 74
ผลการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้ไฮโปรคลอไรท์…….…….. 75
ผลการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปรคลอไรท์ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน…….…….. 75
ผลของการขยายขนาดการเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ (Batch Culture)…….…….... 77
การศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรีย…….…….. 78
การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)…….. 78
การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)……..... 79
5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย…….……. 81
บรรณนุกรม…….. 94
ภาคผนวก…….. 103
ภาคผนวก ก……...……. 104
ภาคผนวก ข……...……. 107
ภาคผนวก ค……...……. 113
ประวัติย่อของผู้วิจัย…….. 158

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 คุณสมบัติของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHAs) เทียบกับพอลิโพรพิลีน (PP)…. 11

2-2 การย่อยสลายของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในสภาวะต่าง ๆ……..... 15

2-3 การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ..... 20

2-4 เปรียบเทียบผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและแหล่งคาร์บอนที่ใช้…….. 21

2-5 รายชื่อสายพันธุ์จุลินทรีย์/วัตถุดิบและบริษัทที่ผลิตพลาสติกชีวภาพ…….. 32

3-1 องค์ประกอบของอาหารของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา……... 43

3-2 องค์ประกอบแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารดัดแปลงของ
อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา…… 44

3-3 อัตราส่วนแอมโนเนียมคลอไรท์ต่อผงชูรสในอาหารดัดแปลงของอาหาร
เลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา…… 45

4-1 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs
ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II
ที่เลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน……. 53

4-2 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs
ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II
ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน……... 56

4-3 องค์ประกอบแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารดัดแปลง DSMZ
catalogue ของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา……. 57

4-4 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs
ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II
ในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน……. 59

4-5 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs
ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II
ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของผงชูรสแตกต่างกัน…….. 62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4-6 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II ในอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสแตกต่างกัน…….…….. 65

4-7 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 72 ชั่วโมงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีสารกระตุ้นชนิดต่าง ๆ…….. 67

4-8 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 72 ชั่วโมงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้น……..…… 69

4-9 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 72 ชั่วโมงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออลความเข้มข้นต่าง ๆ……. 71

4-10 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 24 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นโพรพิโอนิคและอะซิเตท……..…….. 73

4-11 การเปรียบเทียบการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีการต่าง ๆ…… 77

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates; PHAs)…… 8

2-2 สูตรโครงสร้างของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-β-hydroxybutyrate;PHB). …. 9

2-3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโคไฮดรอกซีวาเลอเรต…..…… 9

2-4 ลักษณะโครงสร้างโมเลกุล (A) : P(HB-co-HV) และ (B) : P(HB-co-HHx)……. 10

2-5 แผนภาพแสดงประเภทและตัวอย่างของพอลิเอสเทอร์……. 13

2-6 ลักษณะการย่อยสลายของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต……..…… 15

2-7 วิถีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในแบคทีเรีย……...……. 17

2-8 การแสดงออกของ *pha* CBA cluster สำหรับการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต……...…….. 18

2-9 วิถีการสังเคราะห์ PHB และ PHBV……..…… 18

2-10 วิถีการผลิต Propiony-CoA จากรดอะมิโน threonine…….…….…… 19

3-1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น LEO 1450 VP บริษัท LEO…….. 49

3-2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน รุ่น TECNAI 20 บริษัท Philips……...…. 50

4-1 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสูตรอาหาร 3 สูตร……..……. 52

4-2 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน ที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง……..……. 55

4-3 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสูตรอาหารดัดแปลง 3 สูตร…… 58

4-4 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในความเข้มข้นผงชูรสที่แตกต่างกัน……... 61

4-5 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน……. 64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-6 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดในสูตรอาหารดัดแปลง ที่มีสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์แตกต่างกัน……. 67

4-7 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดในสูตรอาหารดัดแปลง ที่มีน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นที่เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง…….. 70

4-8 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดในสูตรอาหารดัดแปลง ที่มีน้ำมันปาล์มร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออล…….. 72

4-9 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้น โพรพิโอนิคและอะซิเตทที่เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง……..…… 74

4-10 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากการสกัดตัวอย่างวิธีไฮโปรคลอไรท์ที่ อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน……. 77

4-11 การเจริญและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 42 ชั่วโมง…….. 78

4-12 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 42 ชั่วโมง……. 79

4-13 (ก) ลักษณะของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)…….. 80

4-13 (ข) เชื้อ *A. latus* สายพันธุ์กลายซ้ำที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (SEM)……...……. 80

4-14 (ก) ลักษณะของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)……..…….. 81

4-13 (ข) เชื้อ *A. latus* สายพันธุ์กลายซ้ำที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่าน (TEM)……...…… 81

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกที่สูงขึ้นนำไปสู่การสะสมของเสียมากมายทั้งที่สามารถย่อยสลายเองได้และไม่สามารถย่อยสลายเองได้ เช่น พลาสติกที่นิยมใช้กันอย่างมากในชีวิตประจำวัน โดยพลาสติกส่วนใหญ่เป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากปิโตรเคมีที่อยู่ในรูปของพอลิโพรพิลีน พอลิเอทิลีน และพอลิไวนิลคลอไรด์ ซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยมีคุณสมบัติที่โดดเด่น คือ มีความเหนียว ทนทานแข็งแรง กันน้ำได้ น้ำหนักเบา ราคาถูก และสามารถปรับแต่งให้มีลักษณะตามต้องการได้ แต่มีข้อเสีย คือ ใช้เวลาในการย่อยสลายยาวนานเกิดสะสมเป็นขยะพลาสติกจำนวนมาก เมื่อนำมาเผาทำลายจะทำให้เกิดสภาวะเรือนกระจกเพิ่มมากขึ้นส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (พิชาภัค สมยูรทรัพย์, 2553) ด้วยเหตุดังกล่าวจึงมีการริเริ่มแนวคิดที่จะลดปัญหาขยะพลาสติก โดยการพัฒนาพลาสติกชีวภาพ (Bioplastics) เป็นทางเลือกใหม่ขึ้นมาทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน พบว่าพลาสติกชีวภาพมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ แต่สามารถย่อยสลายได้เองโดยกระบวนการทางธรรมชาติ (Biodegradable) และความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatible)

พลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate) เป็นพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์ด้วยกรรมวิธีการหมัก โดยจะเกิดขึ้นภายในเซลล์เก็บไว้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานสำรอง ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ แต่ถูกจำกัดออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์หรือฟอสฟอรัสที่จะถูกสะสมไว้ในรูปเม็ดแกรนูล (Granule) กระจายอยู่ภายในเซลล์ (Luengo et al., 2003) ซึ่งสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เช่น *Alcaligenes eutrophus*, *A. latus*, *Azotobacter vinelandii*, *A. choococcum*, *Bacillus megaterium*, *B. mycoides*, *B. cereus Brachymonas* sp., *Corynebacterium glutamicum* (รีคอมบิแนนต์), *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli* (รีคอมบิแนนต์), *Halomonas boliviensis*, *Methylobacterium extorquens*, *M. organophilum Methylocystis* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Ralstonia eutropha* เป็นต้น (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2556) แต่ปริมาณการสะสมพลาสติกยังไม่สูงพอต่อความต้องการ จึงมีการพัฒนาเพื่อประสิทธิภาพการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยการชักนำให้เกิดการกลายวิธีทางกายภาพ ได้แก่ การใช้รังสีหรือสารเคมี นอกจากนี้การปรับปรุงสภาวะการเพาะเลี้ยงเป็นอีกวิธีการหนึ่งใน

การเพิ่มผลผลิต ซึ่งในปัจจุบันสามารถที่จะผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในระดับอุตสาหกรรมได้บ้าง แต่ยังคงพบปัญหาในเรื่องของต้นทุนที่สูงจากการสร้างผลผลิต และวิธีการในการสกัด จึงส่งผลให้พลาสติกชนิดนี้ยังไม่เป็นที่นิยมนำมาใช้งานเนื่องจากมีราคาที่สูงกว่าพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี ดังนั้นการใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก เช่น กรดไขมัน กลีเซอรอล หางนม ของเสียจากกระบวนการบำบัดน้ำเสีย กากน้ำตาล แป้งมันสำปะหลัง กากแป้งมันสำปะหลัง แป้งมันสำปะหลังและกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย และน้ำตาลจากการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เป็นต้น สำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในระดับอุตสาหกรรมอาจช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้ (Nath et al., 2008)

โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของมอนอเมอร์หลายชนิดมาต่อรวมกัน โดยการเกิดโคพอลิเมอร์ได้นั้นจำเป็นต้องมีสารเหนี่ยวนำ (precursor) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ขึ้น เช่น γ-butyrolactone, 1,4-butanediol, valeric acid, γ-hydroxybutyric acid, 1,6-hexanediol, 1,8-octanediol, 1,10-decanediol และ 1,12-dodecanediol เป็นต้น ซึ่งโคพอลิเมอร์สามารถช่วยปรับปรุงเพิ่มคุณภาพลักษณะทางกายภาพของพลาสติกชีวภาพให้มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นได้ดียิ่งขึ้น (Park & kim, 2011) ด้วยเหตุดังกล่าวผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะใช้เชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่ผ่านการกลายด้วยรังสีเหนือม่วงร่วมกับ 2-อะมิโนแอนทราซีน จำนวน 2 ครั้ง และมาทำการเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสารอะคริฟลาวิน (Acriflavin) จากนั้นมาทำการเติมสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ขึ้นมาได้

การวิจัยมุ่งเน้นการใช้วัสดุราคาถูกที่สามารถนำไปใช้ในระบบอุตสาหกรรมได้ โดยนำเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปโฮโมพอลิเมอร์ และโคพอลิเมอร์ จากนั้นศึกษาวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต รวมถึงทำการขยายขนาดการผลิตสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยเทคนิคการเลี้ยงแบบกะ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาการผลิตพลาสติกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาวัสดุราคาถูกมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน รวมถึงศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปโฮโมพอลิเมอร์ และโคพอลิเมอร์ของเชื้อ *Alcaligenes latus* สายพันธุ์ BOT II

2. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *Alcaligenes latus* สายพันธุ์ BOT II

3. เพื่อศึกษาการขยายขนาดสู่ถังระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ โดยวิธีการเลี้ยงแบบกะ

สมมติฐานของการวิจัย

1. การปรับปรุงสภาวะการเจริญที่เหมาะสมสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปโฮโมพอลิเมอร์ และโคพอลิเมอร์ให้สูงขึ้นได้

2. การเติมสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ที่เหมาะสมสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปโคพอลิเมอร์ให้สูงขึ้นได้

3. การศึกษาวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสามารถได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตให้สูงขึ้นได้

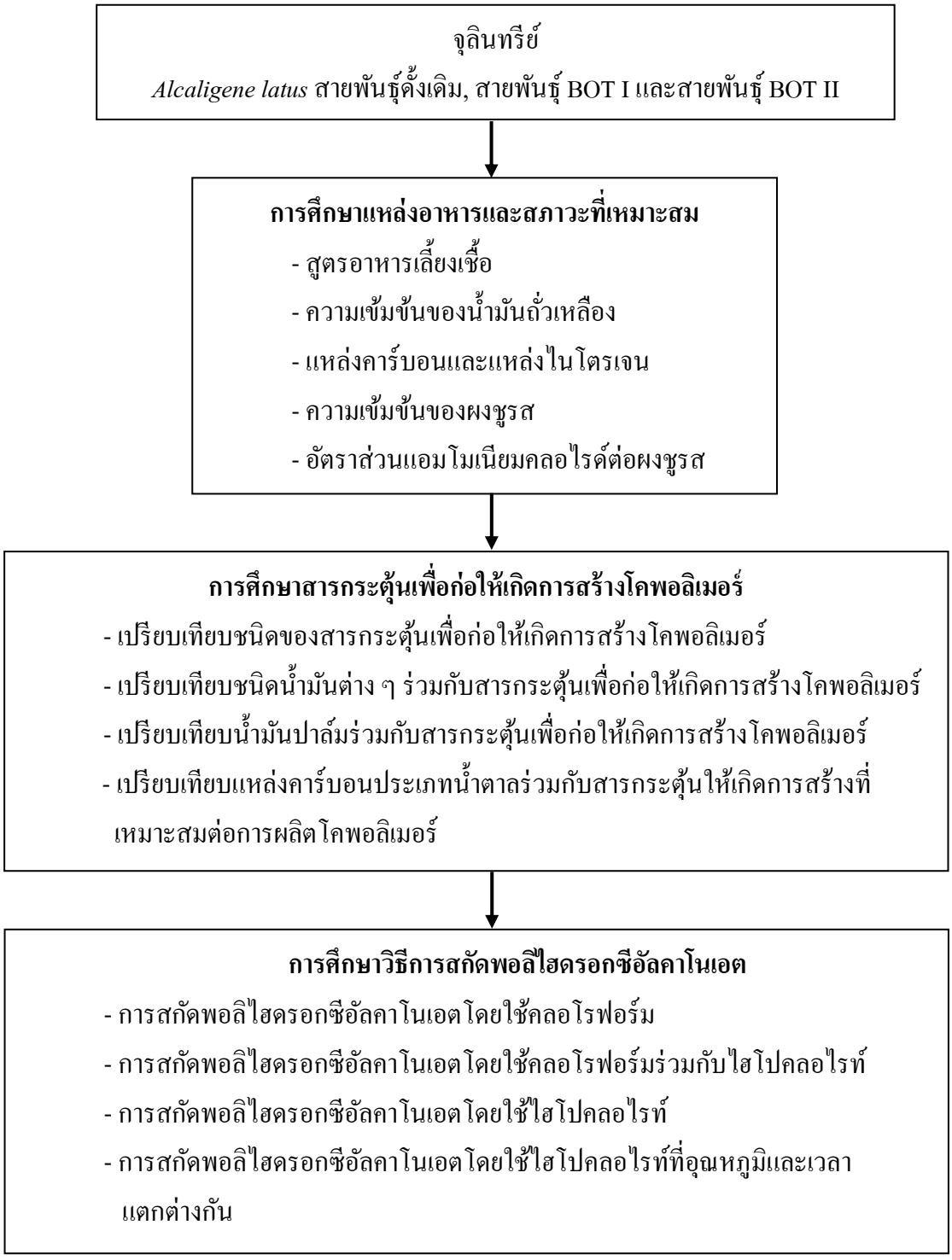
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

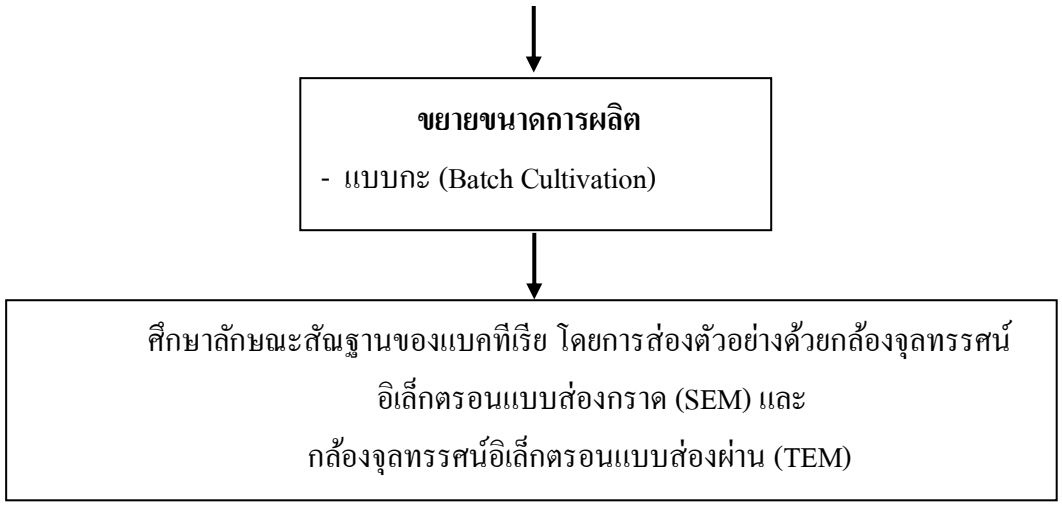
เชื้อ *Alcaligenes latus* สายพันธุ์ BOT II สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปโฮโมพอลิเมอร์ และโคพอลิเมอร์ในการเลี้ยงสภาวะที่เหมาะสม ทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน รวมถึงวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต และการขยายขนาดสู่ถังระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถนำไปประยุกต์ใช้การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้ได้นำเชื้อ *Alcaligenes latus* สายพันธุ์ BOT II ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากนางสาวจารุวรรณ ศรีเสิ่ง และคณะ (2557) มาทำการศึกษาหาวัสดุราคาถูกเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน และหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปโฮโมพอลิเมอร์ รวมถึงการเติมสารกระตุ้นชนิดต่าง ๆ เพื่อก่อให้เกิดการสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปโคพอลิเมอร์ จากนั้นศึกษาวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต และทำการศึกษาการขยายขนาดการเลี้ยงด้วยเทคนิคแบบกะ เพื่อให้ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงขึ้น

กรอบของการวิจัย




ขยายขนาดการผลิต
- แบบกะ (Batch Cultivation)
ศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรีย โดยการส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และ
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. พลาสติกชีวภาพ

พลาสติกสังเคราะห์ เป็นวัสดุมีความนิยมในการนำมาใช้งานต่าง ๆ เนื่องจากพลาสติกเป็นวัสดุที่มีน้ำหนักเบา แข็งแรง สามารถขึ้นรูปเป็นรูปทรงต่าง ๆ ง่าย ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพลาสติกทำให้เกิดความสะดวกสบายในการใช้งานแต่ในขณะเดียวกันก่อให้เกิดขยะพลาสติกเพิ่มมากขึ้นก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะบรรจุภัณฑ์พลาสติกที่มีปริมาณการใช้งานมากแต่มีอายุการใช้งานสั้น เช่น ถุงพลาสติก และฟิล์มห่ออาหาร เนื่องจากพลาสติกที่ใช้แล้วมีการปนเปื้อน อีกทั้งการย่อยสลายและการขจัดทิ้งทำได้ยาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และก่อให้มลพิษทางอากาศ เพื่อลดและแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีการนำพลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์มาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2556)

พลาสติกชีวภาพ ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Lemiogne ในปี 1926 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ แต่สามารถย่อยสลายได้เองโดยกระบวนการทางธรรมชาติ (Biodegradable) ได้แก่ polylactic acid (PLA), polyhydroxyalkanoates (PHAs), poly-β-hydroxybutyrate (PHB), polycaprolactone (PCL), polysaccharides และ aliphatic polyesters ปัจจุบันได้มีการนำพลาสติกชีวภาพในกลุ่มของ PLA และ PHA มาทดแทนการใช้พลาสติกสังเคราะห์ โดยสามารถนำมาทำฟิล์มห่อของไฟเบอร์และชีต หรืออาจนำมาหลอมเป็นภาชนะต่าง ๆ เช่น ขวด ถุงพลาสติก เป็นต้น (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2556) พลาสติกชีวภาพเป็นพอลิเมอร์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่สะสมอยู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์ โดย PHAs เป็นพอลิเมอร์กลุ่มเดียวที่สามารถสังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์ ประเภทของพลาสติกย่อยสลายเองได้

1.1 พลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradable plastics) เป็นพลาสติกย่อยสลายชนิดหนึ่งที่มีกลไกการย่อยสลายโดยแบคทีเรียด้วยเอนไซม์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมกับการย่อยสลายจะได้เป็นน้ำ มวลชีวภาพ ก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการเจริญเติบโตของพืชที่จะนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

1.2 พลาสติกชนิดย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative degradation plastics) การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสติก เป็นปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนลงในโมเลกุลของพอลิเมอร์ สามารถเกิดขึ้นเองในธรรมชาติอย่างช้าๆ โดยมีออกซิเจน ความร้อน และแสงยูวีหรือแรงทางกล เกิดเป็นสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydroperoxide, ROOH) ในพลาสติกที่

ไม่มีการเติมสารแต่งเติมที่ทำหน้าที่เพิ่มความเสถียร (Stabilizing additive) ของแสงและความร้อน จะทำให้ ROOH แตกตัวกลายเป็นอนุมูลอิสระ RO และ OH ที่ไม่เสถียรและทำปฏิกิริยาต่อพันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลอย่างรวดเร็ว

1.3 พลาสติกย่อยสลายด้วยแสง (Photodegradable plastics) การย่อยสลายด้วยแสงเกิดจากการเติมสารเติมแต่งที่มีความว่องไวต่อแสงลงในพลาสติกหรือสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ให้มีพันธะเคมีไม่แข็งแรง แตกหักง่ายภายใต้รังสีเหนือม่วง (UV) แต่การย่อยสลายประเภทนี้จะไม่เกิดขึ้นในบ่อฝังกลบขยะ หรือสภาวะแวดล้อมอื่นที่ไม่มีแสง

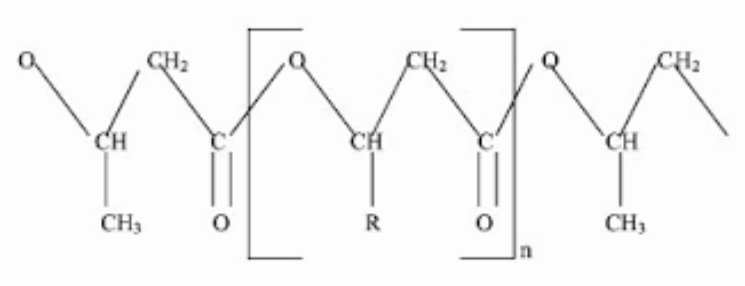
1.4 พลาสติกย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolytic degradation plastics) การย่อยสลายของพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์ เช่น แป้ง พอลิเอสเทอร์ พอลิแอนไฮไดรด์ ผ่านปฏิกิริยาก่อให้เกิดการแตกหักของสายโซ่พอลิเมอร์ โดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalytic hydrolysis) และไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (Non-catalytic hydrolysis)

2. พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates) หรือ PHAs

การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเริ่มต้นในทศวรรษของ ค.ศ. 1970 เป็นยุคที่ประสบกับปัญหาของวิกฤตการณ์น้ำมันโลก จึงได้มีการตระหนักถึงมลพิษด้านสิ่งแวดล้อมจากพลาสติกสังเคราะห์โดยเฉพาะแหล่งวัตถุดิบจากทรัพยากรหมุนเวียนทดแทนแหล่งน้ำมันปิโตรเลียม การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตทางการค้าเริ่มต้นเมื่อ ค.ศ. 1990 แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากมีราคาแพงเมื่อเทียบกับพอลิเอทิลีน พอลิโพรพิลีน และพอลิสไตรีน ที่สังเคราะห์ได้จากปิโตรเคมี (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2556)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจัดเป็นพอลิเมอร์ประเภทอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ มีหน่วยย่อยของมอนอเมอร์ชนิดต่าง ๆ มารวมกันขึ้นอยู่กับจำนวนพอลิเมอร์มาต่อรวมกันจะเป็นสายพอลิเมอร์สายสั้นหรือสายยาว เช่น พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่สั้น (short chain length PHAs หรือ scl-PHA) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ไม่เกิน 5 อะตอม ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมีมากที่สุด โดยพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีองค์ประกอบโครงสร้างในรูปกรดมัน R-(3)-hydroxy fatty acid หรือ R-β-hydroxy fatty acid ดังแสดงในภาพที่ 2-1 น้ำหนักโมเลกุลของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตอยู่ในช่วง 200,000-3,000,000 ดาลตัน โดยสะสมอยู่ในแกรนูล (granule) ภายในไซโตรพลาสซึมของเซลล์เมื่อจุลินทรีย์อยู่ภายใต้ภาวะสารอาหารไม่สมดุล

เช่น ขาดแคลนออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟต และฟอสฟอรัส แต่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ เพื่อใช้เป็นพลังงานให้กับเซลล์ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตประกอบด้วยมอนอเมอร์ของกรดไฮดรอกซี (Hydroxy acid, HA) มากกว่า 100 ชนิด ทั้งนี้จะเป็น PHB, PHA และ PHBV ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม (Sudesh et al., 2000)



ภาพที่ 2-1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates; PHAs) (Khanna & Srivastava, 2005)

3. พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต (Poly-β-hydroxybutyrate) หรือ PHB

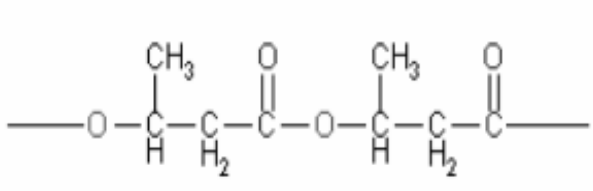
พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตเป็นสารในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHAs) ถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1926 โดย Lemoigne นักวิทยาศาสตร์ของ Pasteur กรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตมีความเหมือนกับพลาสติกสังเคราะห์ แต่มีความเปราะกว่า โดยมีมอนอเมอร์กรดไขมันชื่อว่า เบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตต่อกันเป็นสายพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต โดยจำนวนมอนอเมอร์มีประมาณ 23,000-35,000 ซึ่งความยาวของสายขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ชนิดของสารอาหาร ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ และวิธีการสกัดพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตออกจากเซลล์

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตตามลักษณะการเชื่อมกันของมอนอเมอร์ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ โฮโมพอลิเมอร์ และโคพอลิเมอร์

1. โฮโมพอลิเมอร์ (Homopolymer)

โฮโมพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบด้วยหน่วยย่อยหรือมอนอเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อรวมกัน เช่น การเชื่อมกันของกรดไขมันชนิดไฮดรอกซีบิวทิเรต (Hydroxybutyrate, HB) ซึ่งมีหมู่เมทิลมาต่อสายพอลิเมอร์หลังตำแหน่งที่ 3 หรือ ตำแหน่ง β และมีมอนอเมอร์เชื่อมกันด้วยพันธะเอสเทอร์เกิดเป็นสารประกอบพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ดังแสดงในภาพที่ 2-2 โดย

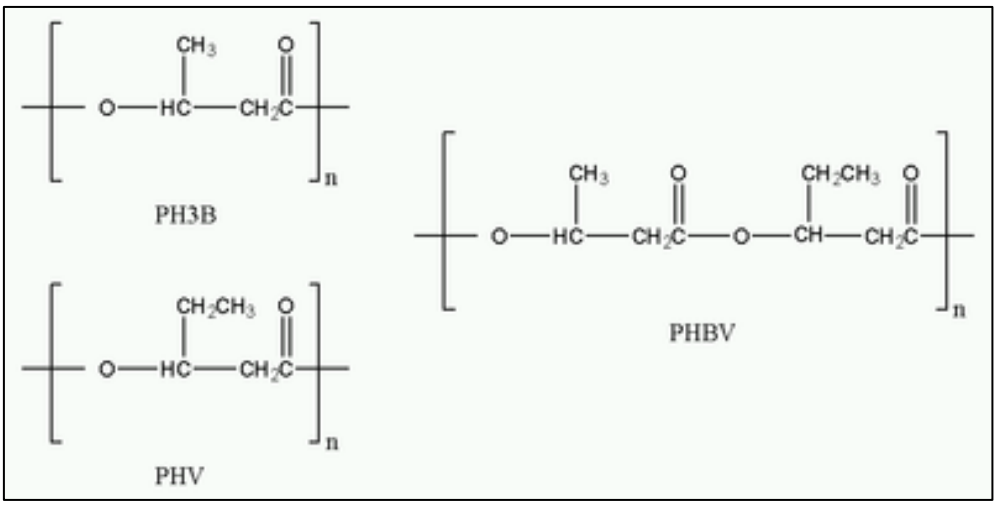
คุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น พอลิเอทิลีน พอลิโพรพิลีน (Khanna & Srivastava, 2005)



ภาพที่ 2-2 สูตรโครงสร้างของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-β-hydroxybutyrate; PHB) (Turesin et al., 2000)

2. โคพอลิเมอร์ (Copolymer)

โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบด้วยหน่วยย่อยหรือมอนอเมอร์หลายชนิดมาต่อรวมกัน เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโคไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly(3-hydroxybutyrate-co-*4*-hydroxybutyrate; P(3HB-co-*4HB*)) พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโคไฮดรอกซีวาเลอเรต (Poly-β-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate; PHBV) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่เป็นไฮดรอกซีบิวทิเรต (HB) และไฮดรอกซีวาเลอเรต (hydroxyvalerate, HV) เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2-3

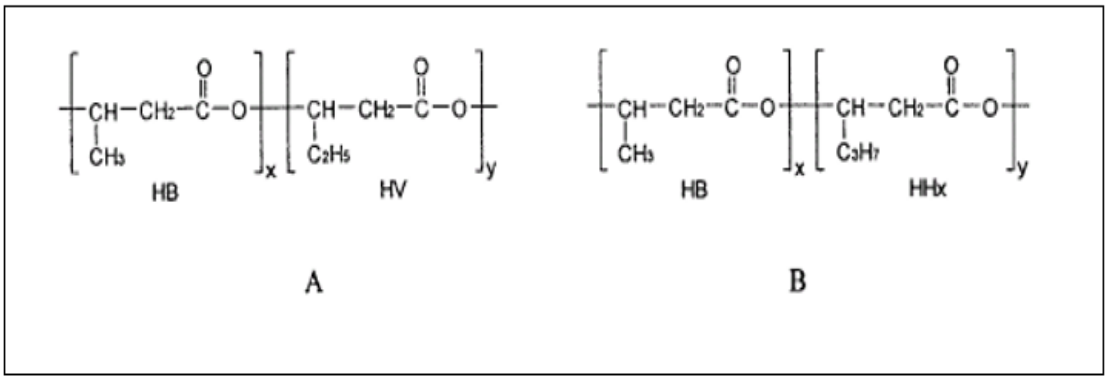


ภาพที่ 2-3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโคไฮดรอกซีวาเลอเรต (Polyhydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate; PHBV) (www.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/24/Polyhydroxyalkanoates.png/400px-Polyhydroxyalkanoates.png)

4. โคพอลิเมอร์ Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) หรือ [P(HB-co-HV)]

Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) หรือ [P(HB-co-HV)] เป็นโคพอลิเมอร์เกิดแบบสุ่ม มีโอกาสเกิดได้สูงประมาณร้อยละ 50 โดยเฉพาะ 3-hydroxyvalerate (-3HV) เกิดได้ตั้งแต่ 0-95 เปอร์เซ็นต์โมล นอกจากนี้ยังมีการเกิดพอลิเมอร์แบบสุ่มชนิดอื่น ๆ คือ 3-HB และ 3-hydroxyhexanoate (3-HHx) ดังแสดงในภาพที่ 2-4 ซึ่งจะช่วยปรับปรุงลักษณะทางกายภาพของพลาสติกชีวภาพให้ดียิ่งขึ้น

โครงสร้างและคุณสมบัติของโคพอลิเมอร์ของ 3HB และ 3HV ซึ่งโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) มีจำนวนโฮโมพอลิเมอร์ใกล้เคียงกันประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ เป็นลักษณะ isodimorphic โดยพบว่าสัดส่วนของ 3HV ยิ่งสูงจะช่วยโคพอลิเมอร์มีความแข็งแรงมากขึ้น มีความยืดหยุ่น ค่าการยืดตัว (elongation) เพิ่มขึ้น มีจุดหลอมเหลวลดลง ดังนั้นการเพิ่มคุณภาพของพอลิเมอร์สามารถทำได้โดยการควบคุมสัดส่วนของ 3HV ให้เหมาะสม (Khanna and Srivastava, 2005) ทั้งนี้การเกิดโคพอลิเมอร์จำเป็นต้องอาศัยสารกระตุ้นให้เกิดการสร้าง (precursor) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ขึ้น เช่น γ-butyrolactone, 1,4-butanediol, valeric acid, Propionic acid, γ-hydroxybutyric acid, 1,6-hexanediol, 1,8-octanediol, 1,10-decanediol และ 1,12-dodecanediol เป็นต้น (Chai et al., 2009)



ภาพที่ 2-4 ลักษณะโครงสร้างโมเลกุล (A) : P(HB-co-HV) และ (B) : P(HB-co-HHx) (Tian et al., 2002)

5. คุณสมบัติของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

คุณสมบัติทางกลของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของมอนอเมอร์ (Composition of monomeric unit) (Rawte & Mavinkuve, 2002) พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1,000 ถึงมากกว่า 1,000,000 โดยชนิดและความยาวของสายโซ่มอนอเมอร์จะมีผลต่อคุณสมบัติพอลิเมอร์ โดยถ้ามีปริมาณผลึกในโครงสร้างสูง (ร้อยละ 60-70) จะทำให้พอลิเมอร์มีความต้านทานต่อตัวทำละลายต่าง ๆ ได้ดีมาก และมีความต้านทานต่อไขมันและน้ำมันปานกลางถึงดี นอกจากนี้ยังมีความต้านทานต่อรังสีเหนือม่วงได้ดี แต่ไม่ทนต่อกรดและด่าง เนื่องจากพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต มีการแพร่ผ่านของก๊าซออกซิเจนต่ำ จึงสามารถนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ไวต่อออกซิเจนได้ดี แต่มีข้อจำกัด คือ ไม่แข็งแรง และเปราะง่าย

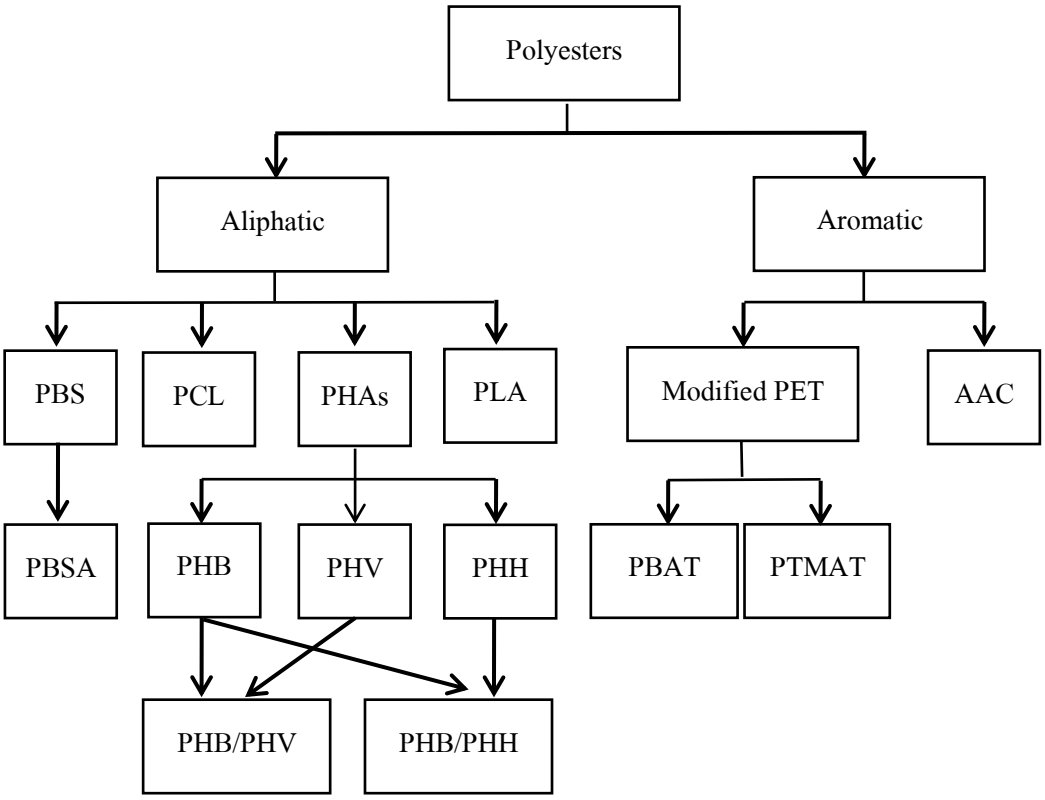
พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่ใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น พอลิโพรไพลีน (polypropylene) พอลิเอทธิลีน (polyethylene) และพอลิสไตรีน (Ojumu and Salomon, 2004) ลักษณะทางกายภาพต่าง ๆ ของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเทียบกับพอลิโพรพิลีน ดังแสดงในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 คุณสมบัติของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHAs) เทียบกับพอลิโพรพิลีน (PP) (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547)

คุณสมบัติ	พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	พอลิโพรพิลีน
จุดหลอมเหลว (°C)	175	176
การเกิดผลึก (%)	80	70
น้ำหนักโมเลกุล (x 10^5 Da)	5	2
อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (°C)	15	-10
ความหนาแน่น (g/ml)	1.25	0.905
โมดูลัส (GPa)	3.5	1.7
ความทนแรงดึง (MPa)	40	38
ความสามารถในการยืด (%)	6	400
ความต้านทานอัลตราไวโอเลต	สูง	ต่ำ
ความต้านทานตัวทำละลาย	ต่ำ	สูง

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ประกอบด้วยมอนอเมอร์ คือ กรดไฮดรอกซีอัลคาโนอิก (Hydroxyalkanoic acids) จำแนกได้เป็น 2 กลุ่มตามความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่ (R) ในหน่วยมอนอเมอร์ คือ ความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่สั้น จะประกอบด้วยอะตอมคาร์บอน 3-5 อะตอม และความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่ปานกลาง จะประกอบด้วยอะตอมคาร์บอน 6-14 อะตอม โดยที่พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตทั่วไปจะประกอบด้วยมอนอเมอร์ 100-30,000 หน่วย และมีความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่สั้น จัดเป็นพอลิเมอร์ในกลุ่มพอลิเอสเทอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เนื่องจากภายในประกอบด้วยพันธะเอสเทอร์ในสายโซ่จำนวนมาก ซึ่งพันธะเอสเทอร์มีความแข็งแรงน้อย แตกตัวได้ง่ายโดยทำปฏิกิริยากับน้ำ (Hydrolysis) ดังนั้นสามารถย่อยสลายให้มีโมเลกุลขนาดเล็กลงได้ โดยพอลิเอสเทอร์สามารถจำแนกตามส่วนประกอบของสายโซ่ได้เป็น 2 ประเภท คือ Aliphatic และ Aromatic polyester โดยพอลิเมอร์ย่อยสลายได้เป็นพอลิเมอร์ประเภท คือ Aliphatic polyester เพราะสายโซ่มีความเหมาะสมต่อการสลายพันธะได้ดีกว่า และในส่วนของ Aromatics polyester ต้องทำการปรับปรุงโครงสร้างให้เหมาะสม โดยอาจต่อกับสายโซ่ Aliphatic polyester ให้เป็นโคพอลิเมอร์ (Aliphatic-aromatic copolyester) จึงจะสามารถย่อยสลายได้ โดยอาจใช้ PET เป็นส่วนประกอบหลัก

Aliphatic polyester ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 4 กลุ่มใหญ่ คือ polybutylene succinate (PBS), polycaprolactone (PCL), polyhydroxyalkanoates (PHAs), polylactic acid (PLA) ซึ่ง 2 ชนิดแรกต้องใช้มอนอเมอร์จากปิโตรเคมี ส่วน PLA สามารถใช้วัตถุดิบทดแทนได้โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีในการสังเคราะห์สายโซ่ในขั้นตอนสุดท้าย และ PHAs เป็นพอลิเมอร์ชนิดเดียวที่สามารถสังเคราะห์ขึ้นในจุลินทรีย์ ดังแสดงในภาพที่ 2-5



ภาพที่ 2-5 แผนภาพแสดงประเภทและตัวอย่างของพอลิเอสเทอร์ (ปกรณ์ โอภาประกาสติ และ มัณฑนา โอภาประกาสิต, 2551)

หมายเหตุ PHA- polyhydroxylknoates PHB - polyhydroxybutyrate,
PHH - polyhydroxyhexanoate PHV - pollyhydroxyvalerate
PLA - polylactic acid PCL - polycaprolactone
PBS - polybutylene succinate PBSA- polybutylene succinate adipate
AAC - Aliphatic-Aromatic copolyester PET - polyethylene terephthalate

คุณสมบัติของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสามารถสรุปได้ดังนี้ (Jogdand, 2004)

1. ไม่ละลายในสารละลายมีขั้ว เช่น น้ำ เมทานอล เป็นต้น อีกทั้งยังสามารถต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (Hydrolysis) ทำให้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่างจากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ชนิดอื่นๆ ที่มีความไวต่อความชื้นและสามารถละลายน้ำได้

2. สามารถต้านทานต่อรังสีอัลตร้าไวโอเลต และออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้ดี แต่มีความทนทานต่อกรดด่างต่ำ

3. มีความสามารถเข้าร่วมกับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (Biocompatible) จึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

4. ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด เช่น คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน สารประกอบคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนอื่น ๆ เป็นต้น

5. มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 171-182 องศาเซลเซียส และมีความทนแรงดึง 40 MPa

6. ไม่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

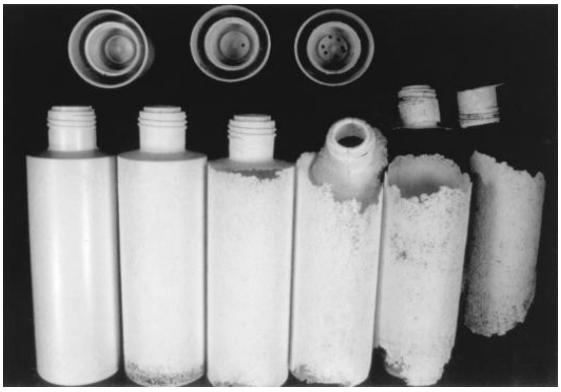
6. การย่อยสลายของพอลิไอดรอกซีอัลคาโนเอต

การย่อยสลายของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตตามธรรมชาติสามารถเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ สภาวะแวดล้อม อุณหภูมิ ความชื้น น้ำหนักโมเลกุล และค่าความเป็นกรดด่าง (Boopathy, 2000) โดยพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะถูกย่อยให้เล็กลง โดยเอนไซม์ PHB hydrolase จนได้เป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) ไตรเมอร์ (trimer) และไดเมอร์ (dimer) จากนั้นเอนไซม์ไดเมอร์ไฮโดรเลส (dimer hydrolase) จะทำให้เกิดเป็นโมโนเมอร์ของเบต้า-ไฮ ดรอกซีบิวทิเรตและเอนไซม์เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรตดีไฮโดรจีเนส (β-hydroxybutyrate dehydrogenase) จะทำปฏิกิริยาจนได้เป็นอะซิโตอะซิเตท (acetoacetate) จากนั้นเกิดเป็นโมเลกุลของอะซิโตอะซิติลโคเอและอะซิติลโคเอ โดยเอนไซม์อะซิโตอะซิติลโคเอไทโอไคเนส (acetoacetyl-CoA thiokinase) และเบต้า-คีโตไทโอเลส (β-kitothiolase) ตามลำดับ เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับตัวเอง (Pouton & Akhtar, 1996) การย่อยสลายของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเกิดได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน หากย่อยสลายในสภาวะที่มีอากาศจะทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่หากย่อยสลายภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และมีเทน (Reddy et al., 2003) การย่อยสลายนี้เกิดได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง โดยมีอุณหภูมิสูงสุด คือ 60 องศาเซลเซียส และความชื้นประมาณร้อยละ 55 ทำให้สามารถย่อยสลายพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ภายในระยะเวลาประมาณ 7 สัปดาห์ (Johnstone, 1990; Flechter, 1993) โดยการย่อยสลายของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ในสภาวะต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 การย่อยสลายของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในสภาวะต่าง ๆ (Pouton & Akhtar, 1996)

สภาพแวดล้อม	เวลาการย่อยสลาย PHAs ขนาดหนา 1 มม. (สัปดาห์)	อัตราเฉลี่ย การกัดกร่อนผิว (สัปดาห์)	การสูญหายน้ำหนัก 100% แผ่นฟิล์ม PHAs (ไมครอน)
Anaerobic sewage	6	100	0.5
Estuarine sediment	40	10	5
Aerobic sewage	60	7	7
ในดินอุณหภูมิ 25ºC	75	5	10
ในน้ำทะเลอุณหภูมิ 15ºC	350	1	50

จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าขวดพลาสติกชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นแบบ P(3HB-3HV) โดยผลิตมาจากกากตะกอนน้ำเสีย ซึ่งลักษณะการย่อยสลายของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เริ่มจาก 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์ (จากซ้ายไปขวา) ภายใต้อุณหภูมิเฉลี่ย 20 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 2-6



ภาพที่ 2-6 ลักษณะการย่อยสลายของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Madison & Huisman, 1999)

7. กระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

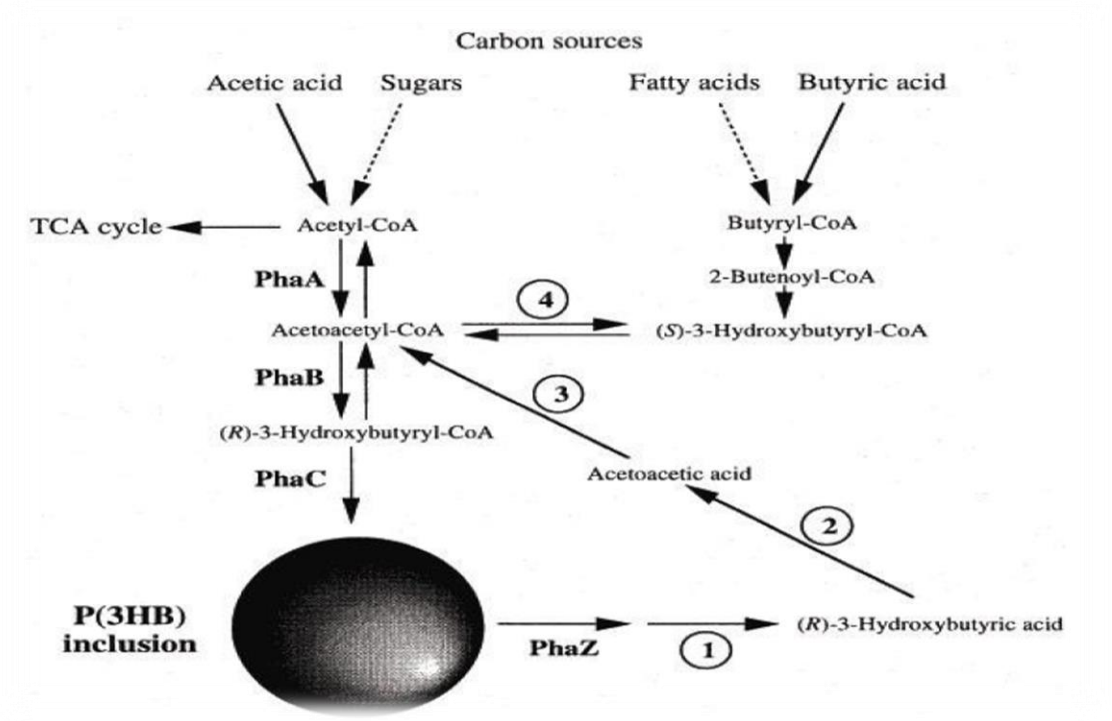
วิถีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต มีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางที่เข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) ผ่านวิถีเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ในการควบคุมการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะเกี่ยวข้องกับ *Pha*CBA cluster ซึ่งประกอบด้วย 3 ยีน คือ *Pha*A, *Pha*B และ *Pha*C (ภาพที่ 2-7 และภาพที่ 2-8) โดยยีน *Pha*A ควบคุมการผลิตเอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลส (β-Ketothiolase) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนอะซิติลโคเอ (Acetyl-CoA) ไปเป็นอะซิโต-อะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) ยีน *Pha*B ควบคุมการผลิตเอนไซม์อะซิโตอะซิติลโคเอ-รีดักเตส (Acetoacrtyl-CoA reductase) โดยเปลี่ยนอะซีโตอะซีติลโคเอให้เป็นอาร์-3-ไฮดรอกซี-บิวทิริลโคเอ (R-3-hydroxybutyryl-CoA) และยีน *Pha*C เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตซินเทส (PHA synthase) ซึ่งจะสังเคราะห์พอลิเมอร์จากอาร์-3-ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอไปเป็นพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Sudesh et al., 2000; Luengo et al., 2003; Suriyamongkol et al., 2007) ยีน *Pha*P ทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของแกรนูลของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ได้แก่ โปรตีนฟาซิน (Phasing) ซึ่งเป็นโปรตีนมวลโมเลกุลต่ำมีหน้าที่ส่งเสริมการผลิต และการจับกับแกรนูลเพื่อควบคุมขนาด จำนวนและพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต นอกจากนี้แล้วการควบคุมขนาดและจำนวนของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตยังขึ้นกับปริมาณของยีน *Pha*C ที่มีอยู่ภายในเซลล์ด้วย ส่วนยีน *Pha*Z จะมีหน้าที่ในการที่จะผลิตเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เรส (Depolymerase) เพื่อใช้ปลดปล่อยมอนอเมอร์ออกจากพอลิเมอร์ โดยเอนไซม์ที่ยีน *Pha*Z ผลิตออกมาจะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถก่อให้เกิดกิจกรรมได้ซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานได้ด้วยพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและสารกระตุ้น เช่น ทริปซิน (Trypsin) ดังนั้นการสลายแกรนูลของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยดีพอลิเมอร์เรสต้องอาศัยเอนไซม์โปรติโอไลติก (Proteolytic) อื่นร่วมด้วย (Luengo et al., 2003)

สำหรับกระบวนการเกิดพอลิไฮดรอกซีโคพอลิเมอร์ไฮดรอกซีวาเลอเรต [P(HB-co-HV)] ดังแสดงในภาพ 2-9 สามารถได้ด้วยการใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ มีผลทำให้ เกิดหน่วยย่อย 2 ชนิดต่างกัน คือ β-hydroxybutyrate และ β-hydroxyvalerate ในการเกิดโคพอลิเมอร์ชนิด PHBV จำเป็นต้องอาศัยสารตัวกลางที่สำคัญ คือ โพรพิโอนิลโคเอ (Propionyl-CoA) สามารถทำได้โดยการเติมกรดโพรพิโอนิก กรดวาเลอริก หรือกรดไขมันระเหยง่ายสายสั้น ๆ ที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคี่หรือกรดอะมิโนตัวอื่น ๆ เช่น ไอโซลิวซีน (isoleucine), วาลีน (valine), เมไธโอนีน (Methionine) และ ทรีโอนีน (Threonine) โดยไอโซลิวซีน, วาลีน และ

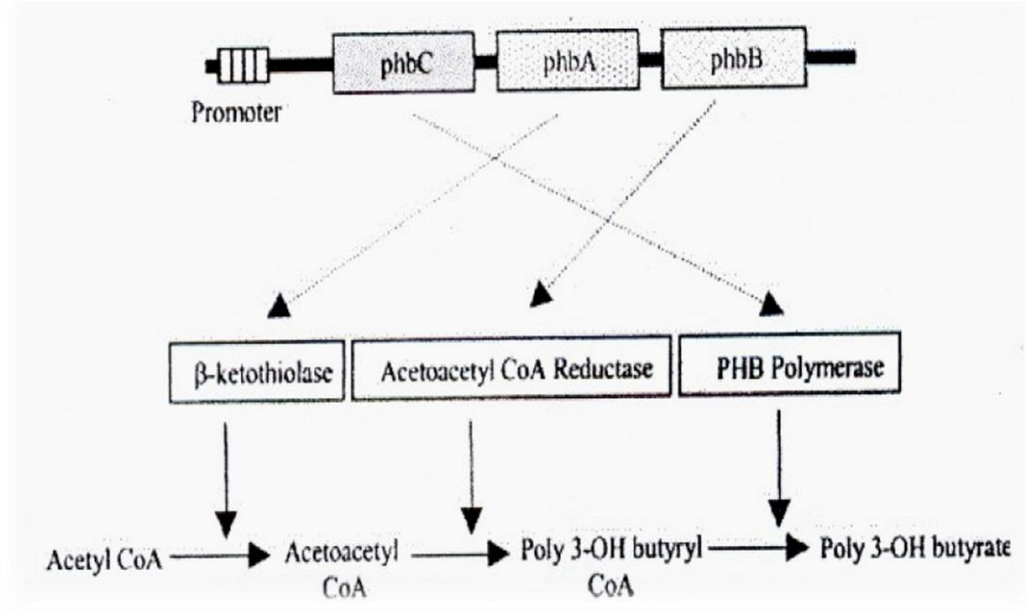
เมไธโอนีน ต้องผ่านกระบวนการสลายหลายขั้นตอนเพื่อให้ได้เป็น Propiony-CoA ซึ่งทรีโอนีนจะเกิดเพียง 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. กระบวนการ Deamination คือการดึงหมู่อะมิโนจากทรีโอนีน โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ threonine dehydratase เพื่อให้เกิดเป็น α-ketobutyric acid (α-KB)

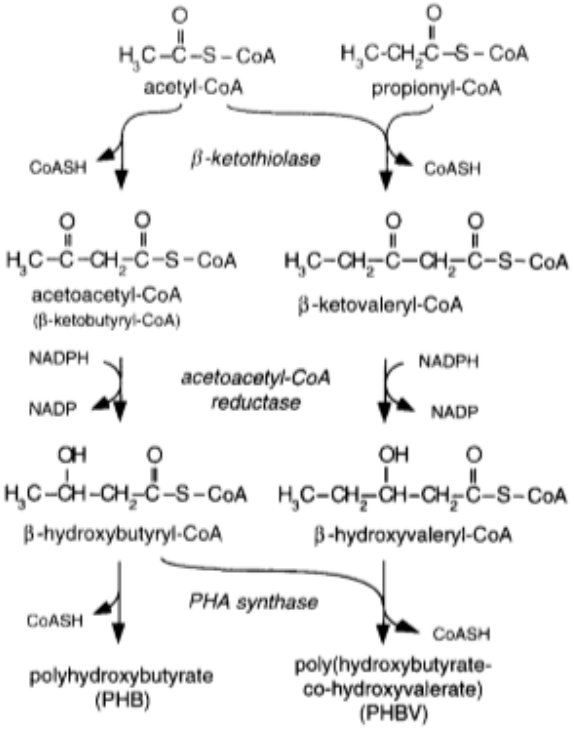
2. กระการเกิด Propionyl-CoA โดยในกระบวนการนี้ต้องอาศัยกลุ่มเอนไซม์หลายชนิด เช่ น α -ketoacid oxidative dehydrogenase complex (BCKD), α -ketoglutarate dehydrogenase complex (KGD) และ pyruvate dehydrogenase complex (PD) ซึ่งเป็นตัวเร่งกระบวนการการกำจัดหมู่คาร์บอนซิลจาก α-ketoacid ส่งผลให้เกิดพันธะไธโอเอสเตอร์ (thioester bond) ระหว่าง CoA อิสระกับหมู่ ketoacyl ของ α-ketoacid ดังแสดงในภาพ 2-10 (Eschenlaner et al., 1996)



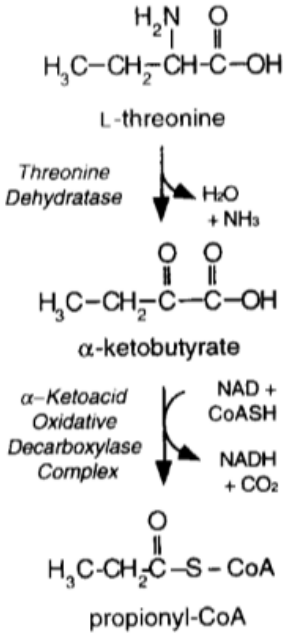
ภาพที่ 2-7 วิถีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในแบคทีเรีย (Sudesh et al., 2000)



ภาพที่ 2-8 การแสดงออกของ *pha* CBA cluster สำหรับการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Reddy et al., 2003)



ภาพที่ 2-9 วิถีการสังเคราะห์ PHB และ PHBV (Eschenlaner et al., 1996)



ภาพที่ 2-10 วิถีการผลิต Propiony-CoA จากรดอะมิโน threonine (Eschenlaner et al., 1996)

8. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของจุลินทรีย์

การผลิตหรือการสังเคราะห์พอลิเมอร์ โดยกระบวนการทางชีวภาพจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อชนิดและคุณสมบัติพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ เนื่องจากมีกลไลการสังเคราะห์ที่ซับซ้อน สามารถเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม ดังนั้นจึงควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์พอลิเมอร์ โดยมีปัจจัยสำคัญดังนี้

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ต่างชนิดกัน มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิต พบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน แต่ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์แตกต่างกันจะส่งผลทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันไป (Anderson & Wynn, 1995) บางสายพันธุ์ของจุลินทรีย์อาจจะผลิตพอลิเมอร์ออกมาในรูปโฮโมพอลิเมอร์ ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์อีกชนิดอาจผลิตพอลิเมอร์ออกมาในรูปโคพอลิเมอร์ เช่น *Alcaligenes eutrophus* R3 พบว่ามีการผลิตพอลิเมอร์ในรูปโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) แต่เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันให้กับ *A. eutrophus* ATCC17697 พบว่ามีการผลิตพอลิเมอร์ในรูปโฮโมพอลิเมอร์คือพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (Anderson & Wynn, 1995) นอกจากนี้การศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากจุลินทรีย์หลายชนิด พบว่าจุลินทรีย์

แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ได้แตกต่างกัน (Jogdand, 2004) ดังแสดงในตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-3 การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (Jogdand, 2004)

จุลินทรีย์ที่สะสม PHAs	**การสะสม PHAs (% of dry cell weight)**
Alcaligenes eutrophus	69
Azospirillum	75
Azotobacter	73
Baggiatoa	57
Leptophrix	67
Methylocystis	70
Psudomonas	67
Rhizobium	57
Rhodobacter	80

จุลินทรีย์ที่มีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์พบมากในกลุ่มแบคทีเรีย (Holmes, 1985; Verlinden et al., 2007) ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและคุณภาพของผลผลิตที่ได้แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้คือ *Alcaligenes eutrophus* หรือที่รู้จักกันในชื่อ *Ralstonia eutropha* (Fatemeh & Ebrahim, 2002) เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายและสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ในปริมาณสูงถึงร้อยละ 80 ของมวลเซลล์แห้ง (Mercan, Aslim, Yuksekdag, & Beyatli, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนตได้สูงถึงร้อยละ 87 ในระหว่างการเจริญในสภาวะที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจนซึ่งสูงกว่าในสภาวะปกติที่ไม่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจนร้อยละ 50 (Wang & Lee, 1997) และในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาเพื่อพัฒนาศักยภาพในการผลิตพอลิเมอร์ โดยการ recombinant *E. coli* จากการตัดต่อยีน *Pha*C ของ *Psuudomonas* sp. ที่ผลิต mcl-PHA synthase เพื่อสังเคราะห์ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลาง เป็นต้น (Suriyamonkol et al., 2007)

2. แหล่งอาหาร

2.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์และสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นสูงหลังจากแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) ภายใต้สภาวะสารอาหารที่ไม่สมดุล แต่ต้องมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอแต่มีการจำกัดปัจจัยอื่น ๆ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และออกซิเจน เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจะทำให้ผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ในปริมาณเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ในธรรมชาติมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน (ปิยะรัตน์ บุญแสวง, 2552) ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่สำคัญที่จุลินทรีย์นำมาใช้ในการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีอยู่หลายชนิด ได้แก่ กลูโคส ซูโครส มอลโตส กากน้ำตาล กรดกลูตามิก น้ำอ้อย น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 เปรียบเทียบผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและแหล่งคาร์บอนที่ใช้

สายพันธุ์จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณ PHAs (g/l)	แหล่งอ้างอิง
Alcaligenes latus TISTR 1403	molasses	9.73	(จารุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ, 2557)
Alcaligenes australica	Sucrose	6.24	(Gahlawat & Srivastava, 2013)
Bacillus megaterium R11	oil palm empty fruit bunch	9.32	(Zhang Youhong et al.,2013)
Alcaligenes latus ATCC 29714	Sugarcane juice	4.01	(Bingqing Wang et al., 2013)
Ralstronia eutropha	Soybean oil	13.00	(Park & Kim, 2011)
Alcaligenes eutrophus	Sugarcane juice	1.28	(Waranya et al., 2011)
Alcaligenes latus I-14	Glucose	5.25	(Chomchai & Chongchroen, 2010)
	Glucose+maltose	4.05	
Alcaligenes eutropha ATCC 17696	Glucose	0.81	(El-Sayed et al., 2009)
Alcaligenes latus ATCC 29712		4.94	
Rhodobacter sphaeroides N20	Glutamic acid	7.8	(Sangkharak & Prasertsan, 2007)

ดังนั้นในการผลิตจึงต้องศึกษาถึงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น จากรายงานของ (ผกาวดี นารอง, 2542) พบว่าแหล่งคาร์บอนสำคัญที่แบคทีเรียนำมาใช้ในการสังเคราะห์มีหลากหลายชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส กลูโคเนต กรดอะซิติก มีเทน กรดคาร์บอลิก กรดซิตริก กรดแลกติก และกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น (Leda et al., 2009) โดยการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากเชื้อ *Halomonas boliviensis* โดยใช้ไฮโดรไลเซทแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนตเอตได้สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 56 (Quilaguaman et al., 2005) และ (Nisha et al., 2009) ได้ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* พบว่าการใช้แป้งมันฝรั่งที่ผ่านการย่อยสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด 0.71 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 47 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

Wang et al. (2007) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ได้จากเชื้อผสมจากตะกอนเร่งที่เพาะเลี้ยง โดยใช้ของเสียจากมอลท์ (malt waste) และของเสียจากถั่วเหลือง (soya waste) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าองค์ประกอบของพอลิเมอร์ของเชื้อผสมมีสัดส่วน HB:HV เท่ากับ 90:10 และ 75:25%โมล ตามลำดับ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีสัดส่วน HB:HV เท่ากับ 55:45 และ 20:80%โมล ตามลำดับ

Tanamool et al. (2009) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยใช้น้ำข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรีย *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 กับ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 พบว่า *A. latus* TISTR 1095 สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและน้ำหนักมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 0.68 และ 1.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่า *A. eutrophus* ATCC 29714 ที่ผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและน้ำหนักมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 0.034 และ 0.920 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

Montaser et al. (2012) ศึกษาการเลี้ยง *Azotobacter Beijerinckii* DSMZ 1041 เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.5, 1 และ 2 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการใช้กลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิต

น้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 6.5 และ 2.95 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Jain, Sing, and Tiwari (2013) ทำการศึกษาการเลี้ยง *Ralstonia eutropha* H 16โดยใช้กรดปาล์มิติกที่สกัดได้จากน้ำมันปาล์มในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ ร้อยละ 1,2 และ 3 (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าการใช้กรดปาล์มมิติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สูงที่สุด คือ 4.14 กรัมต่อลิตร

Wang, Sharma-Shivappa, Olson, and Khan (2013) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *A. latus* ATCC 29714 โดยใช้น้ำตาลหัวบีทเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.97 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่ามีน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับ 10.30±1.01 และ 4.01±0.95 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 36.66±7.28 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.22±0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Tripathi, Srivastava, and Singh (2013) ศึกษาการเลี้ยง *Alcaligenes sp.* NCIM 5085 เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7.5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 5.6 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะโดยใช้สูตรอาหารที่มีกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 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

Youhong et al. (2013) ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* R11 โดยความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ได้จากการย่อยกากจากผลปาล์มเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และทริปโตน 12 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ โดยอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนคือ 15:3 พบว่าสามารถผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 24.29 และ 12.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 51.60 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

ศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด (2551) ทำการศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้น้ำเสียจากโรงงานอาหารทะเลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *Achmobacter xylosoxidan* PSU-I 1 และ *Achomobacter* sp. PSU-M ที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิกและกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ พบว่าการใช้กรดวาเลอริกให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงกว่ากรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 0.83 และ 0.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อทำการขยายขนาดการผลิตในถังหมักขนาด 3 ลิตรของจุลินทรีย์ผสม พบว่าสามารถผลิตพอลิไฮ ดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ 2.29 กรัมต่อลิตร โดยพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ได้เป็นชนิด poly-(hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate) (PHBV) มีสัดส่วนของ HB และ HV เท่ากับ 30.56 และ 69.44 โมลเปอร์เซ็นต์

เมทินี อมรชัยสิน และอารติ อนันตนิกร (2555) ได้ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยรังสีเหนือม่วง และสาร 5-โบรโมยูราซิล ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DSMZ Catalogue และคณะ (1993) และใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 6.20 และ 5.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็น ร้อยละ 82.26 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

จารุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ (2557) ได้ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำซ้ำด้วยรังสีเหนือม่วงร่วมกับสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน จำนวน 2 ครั้ง และสารอะคริฟิลาวิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร DSMZ Catalogue และคณะ (1993) และใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 7.30 และ 5.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 75.89 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

2.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนได้แตกต่างกันทั้งที่อยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ 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) จุลินทรีย์สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มี

แหล่งคาร์บอนมากเกินพอแต่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด คือมีอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนมีค่าสูง

Grothe et al. (1999) ศึกษาเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของเชื้อ *A. latus* ATCC 29714 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรีย พบว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 4.6 กรัมต่อลิตร

Kumar, Mudlair, and Reddy (2004) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบตะกอนเร่งโรงงานผลิตอาหารความเข้มข้นตะกอนเริ่มต้นเท่ากับ 3.15 กรัมต่อลิตร โดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 500 ถึง 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 24, 96, 120, 144 และ 168 (โมลต่อโมล) ตามลำดับ พบว่าเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น โดยอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 144 มีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับร้อยละ 33

Khannafari, Akhavan, and Mogharab (2006) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *Azotobacter chroococum* จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ 281, 398 และ 1723 โดยใช้โปรตีนในหางนม (Milk whey) เป็นแหล่งคาร์บอนและเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แบคโตเปปโตน เคซีน ยีสต์สกัด เนื้อสกัด โปรทิเอชเปปโตน และ ทริปโตน ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ในอัตราเร็ว 122 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่า *A. chroococum* 1723 ที่ใช้เนื้อสกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนจะสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุดในปริมาณร้อยละ 75 ของมวลเซลล์แห้ง

Wang et al. (2007) ทำการศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 20, 40, 60, 80, 100, 120 และ 140 (โมลต่อโมล) โดยใช้ตะกอนสลัดจ์ในระบบ SBR กรดบิวทิริก และกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นกรดเริ่มต้น 1 กรัมต่อลิตร พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 100 ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับ 30.3 กรัมต่อกรัมเซลล์

สุพัฒน์ ชมใจ และคณะ (2551) รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) เท่ากับ 20:8 พบว่ามีค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 4.57 และ 2.58 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 61.10 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

สุพัฒน์ ชมใจ และรสมันต์ จงเจริญ (2555) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ในอาหาร Basal mineral medium ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ 10 ชนิด พบว่าเด็กซ์โตรส และน้ำตาลทรายแดง มีศักยภาพใกล้เคียงกันต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ส่วนผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แอมโนเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด ผงชูรส และยีสต์สกัด โดยมีเด็กซ์โตรสเป็นแหล่งคาร์บอนในอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:2 20:4 20:6 20:8 และ 20:10 โดยน้ำหนัก พบว่าการใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจนที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:2 มีผลให้ *A. latus* สามารถสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้สูงถึงร้อยละ 80.6 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง โดยมีความเข้มข้นของเซลล์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 4.86 และ 3.92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:4 มีการสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดร้อยละ 61.1ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง แต่ได้ความเข้มข้นของเซลล์และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงถึง 8.15 และ 4.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.3 แหล่งฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอื่น ๆ

การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะเกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ แต่มีปริมาณสารอาหารรองจำกัด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ เป็นต้น ซึ่งพบว่าฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ จัดเป็นแร่ธาตุหลักที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณที่มากพอ โดยเฉพาะฟอสฟอรัสและแมกนีเซียมเนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้างและการถ่ายเทพลังงานต่อจุลินทรีย์และพลังงานในเซลล์โดยอยู่ในรูปของพอลิเมอร์ ในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของแบคทีเรียเกิดขึ้นเมื่อมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอแต่มีการกำจัดปริมาณของฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอื่น ๆ เพื่อให้เหมาะสมกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต (ผกาวดี นารอง, 2542)

Ryu et al. (1997) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้นเท่ากับ 2.2, 3.1, 4.3 และ 5.5 กรัมต่อลิตร ในสภาวะกึ่งกะที่มีการจำกัดปริมาณฟอสเฟต มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.8 อุณหภูมิในการหมัก 34 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นสูงขึ้นสามารถผลิตเซลล์และพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิว

ทิเรตได้สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตเริ่มต้น 5.5 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณของเซลล์และพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 2.81 และ 2.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Grothe et al. (1999) ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการเติมและไม่มีการเติมธาตุอาหารเสริมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *A. latus* โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเติมธาตุอาหารเสริมที่ประกอบด้วย $C_6H_{11}O_7FeNO_7$ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร, $CaCI_2{\cdot}2H_2O$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร, H_3BO_3 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร, $CoCl_2{\cdot}H_2O$ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร, $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, $MnCI_2{\cdot}4H_2O$ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร, $Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร, $NiSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงขึ้นเท่ากับ 3.2 กรัมต่อลิตร

2.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญมีผลต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของจุลินทรีย์ *Alcaligenes latus* เพื่อให้ได้ปริมาณที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ซึ่ง Grothe et al. (1999) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* ATCC 29714 คือที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจจะแปรผันได้ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็นร้อยละ 63 ของมวลเซลล์แห้ง

2.5 ความเป็นกรดด่าง

ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่าการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ควรมีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไม่ให้ต่ำกว่า 7 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดมากเกินไป (Kinoshita, Kulprecha, & Chao, 1991) ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำจะขาดความสมดุลระหว่างปริมาณไอออนของไฮโดรเจนและไฮดรอกไซด์ ทำให้ส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหารและเซลล์อีกทั้งยังก่อให้เกิดความเป็นพิษ เนื่องจากมีปริมาณกรดในระบบมากเกินไป (Luli & Strohl, 1990) นอกจากนี้การปรับความค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เป็นการปรับปริมาณไฮโดรเจนอิสระที่แสดงประจุเป็นบวกให้ลดลงด้วยไฮดรอกซีไซด์ที่มีประจุเป็นลบ ส่งผลทำให้ไฮโดรเจนไอออนไม่สามารถส่งผลกระทบโดยตรงกับเซลล์ (Du et al., 2001) จากการศึกษาของ Seo, Yoon, Oh, and Kim. (1998) รายงานว่าความเป็นกรดด่างจะมีค่าลดลงในระหว่างที่แบคทีเรีย *Alcaligenes* มีการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ในวัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) ซึ่งความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Alcaligenes* มีค่าเท่ากับ 7

เขมรัฐ เขมวงศ์ (2550) ศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจาก *Rhodobacter spaerodes* U7 พบว่าสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยมาก เมื่อค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 และ 6 ในขณะที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 และ 8 จะทำให้ผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ใกล้เคียงกัน

2.6 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเนื่องจากในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซิเตรทซินเทส (Citrate synthase) และไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส (Isocitrate dehydrogenase) จะถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิติลโคเอไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยเอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลส (Luengo et al., 2003)

Satoh, Iwamoto, Mino, and Matsuo (1998) ได้ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบตะกอนเร่ง 2 ระบบคือ Anaerobic–Aerobic (AA) และ Microanaerobic–Aerobic (MA) จากนั้นนำตะกอนจากระบบทั้งสองระบบมาทดสอบหาปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในถังปฏิกรณ์แบบกะ 2 แบบ คือ แบบไม่เติมออกซิเจนและแบบที่มีการเติมออกซิเจนในปริมาณจำกัด พบว่าตะกอนจากระบบ AA มีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในสภาวะที่มีออกซิเจนสูงกว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน คิดเป็นร้อยละ 33 และ 22 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนในตะกอนจากระบบ MA สามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ถึงร้อยละ 62 ของมวลเซลล์แห้ง

ธงชัย วงศ์สุวรรณ (2550) ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์มสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้ *R. eutropha* TISTR 1095 พบว่าการให้อากาศที่ 2 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที (vvm) ทำให้จุลินทรีย์เกิดการเจริญของสูงกว่า แต่มีการสะสมปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยกว่าการให้อากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที (vvm)

9. การเกิดโคพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์

โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของมอนอเมอร์หลายชนิดมาต่อรวมกัน เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตโคไฮดรอกซีบิวทีเรต (Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)) [P(3HB-co-4HB)], พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตโคไฮดรอกซีวาเลอเรต (Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)) [P(3HB-co-3HV)] และพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตโคไฮดรอกซีเฮกซาโนเอต (Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)) [P(3HB-co-3HHx)] โดยการเกิดโคพอลิเมอร์ได้นั้นจำเป็นต้องมีสารเหนี่ยวนำ (precursor) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ขึ้น เช่น γ-butyrolactone, 1,4-butanediol, valeric acid, γ-hydroxybutyric acid, 1,6-hexanediol, 1,8-octanediol, 1,10-decanediol และ 1,12-dodecanediol เป็นต้น (Chai et al., 2009) เป็นต้น ซึ่งโคพอลิเมอร์สามารถช่วยปรับปรุงเพิ่มคุณภาพลักษณะทางกายภาพของพลาสติกชีวภาพให้มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นได้ดียิ่งขึ้น (Park & Kim, 2011)

Seol, Hee, and Soo (2005) ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 โดยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ ซึ่งใช้ฟรุกโตส ร่วมกับ γ-butyrolactone เป็นแหล่งคาร์บอน โดยช่วงแรกจะใช้ฟรุกโตสเพียงอย่างเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ หลังจากชั่วโมงที่ 24 จะเติมฟรุกโตสและ γ-butyrolactone เพื่อทำให้เกิดสร้างพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตโคไฮดรอกซีบิวทีเรต (Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)) [P(3HB-co-4HB)] พบว่าได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ในช่วง 33.6-49.1 กรัมต่อลิตร ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต อยู่ในช่วง 13.8-24.4 กรัมต่อลิตร พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสุทธิอยู่ในช่วง 38.8-50.2% 4HB fraction อยู่ในช่วง 1.64-25.2mol% และสัมประสิทธิผลได้อยู่ในช่วง 0.32-0.55 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Song and Kim (2005) ได้ทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อ *R. eutropha* NCIMB 11599 และ ATCC 17699 โดยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะภายใต้สภาวะฟอสเฟตจำกัด ซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ γ-butyrolactone เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ พบว่าในชั่วโมงที่ 74 เชื้อ *R. eutropha* ATCC 17699 ได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณพอลิเมอร์สุทธิ และ 4HB fraction เท่ากับ 51 กรัมต่อลิตร, 35% และ 32mol% ตามลำดับ

Chai et al. (2009) ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ [P(3HB-co-4HB)] จากเชื้อ *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 โดยใช้สารกระตุ้นให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ γ-butyrolactone, 4-hydroxybutyric acid, 1,4-butanediol, 1,6-hexanediol, 1,8-octanediol, 1,10-decanediol และ 1,12-dodecanediol พบว่า γ-butyrolactone ได้ผลดีสุด โดยมีน้ำหนักมวลโมเลกุล

17 x 10^3 ถึง 412 x 10^3 ดาลตัน ซึ่งความเข้มข้นของ γ-butyrolactone เยอะขึ้นจะทำให้น้ำหนักมวลโมเลกุลน้อยลง

Vigneswari et al. (2010) ทำการศึกษาการโคพอลิเมอร์ [P(3HB-co-4HB)] จากเชื้อ *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 โดยการเพาะเลี้ยงแบบ two-stage ซึ่งใช้ 1,4-butanediol ปริมาณ 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าได้ปริมาณ โคพอลิเมอร์และ 4HB fraction เท่ากับ 31wt.% และ 41mol% ตามลำดับ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้ γ-butyrolactone ปริมาณ 1.4% (w/v) ร่วมกับ 1,4-butanediol ปริมาณ 0.35% (w/v) พบว่าได้ปริมาณ 4HB ได้สูงถึง 84mol%

Rao, Sridhar, and Sehgal (2010) ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Cupriavidus necator* โดยใช้น้ำมันปาล์มที่ผ่านการใช้ความเข้มข้น 20% เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ 1,4-butanediol ในการผลิตโคพอลิเมอร์ โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไนโตรเจนจำกัด พบว่าในชั่วโมงที่ 144 สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดถึง 81wt% และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของพอลิเมอร์ได้อยู่ระหว่าง 70 และ 81wt% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Chanprateep et al. (2010) รายงานว่าเชื้อ *Cupriavidus necator* ที่ใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับ 1,4-butanediol ที่มีความเข้มข้น 0, 25, 50 และ 100% (w/w) และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 และ 200 ในการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ พบว่าการใช้ 1,4-butanediol ที่มีความเข้มข้น 50% (w/w) และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 112 กรัมต่อลิตร และปริมาณโคพอลิเมอร์ 73 กรัมที่ประกอบด้วย 4HB สุทธิ 38% mole

Zhila et al. (2011) ศึกษาการเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อ *Ralstonia eutropha* B5786 และ *Cupriavidus eutrophus* B10646 โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ฟรุกโตส และกรดบิวทิริค เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ γ-butyrolactone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ ทำการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไนโตรเจนจำกัด มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 พบว่าเชื้อ *Cupriavidus eutrophus* B10646 ให้ผลที่ดีกว่าเชื้อ *Ralstonia eutropha* B5786 โดยใช้กรดบิวทิริคเป็นแหล่งคาร์บอน และการใช้ γ-butyrolactone ความเข้มข้นสูงไม่มีผลต่อการเจริญและการสร้างโคพอลิเมอร์ของเชื้อลดลง อีกทั้งยังได้ค่าสัมประสิทธิผลได้ของน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 7-8 กรัมต่อลิตร ค่าสัมประสิทธิผลได้ของปริมาณพอลิเมอร์เท่ากับ 80-90 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่า 4HB สุทธิได้ถึง 17mol%

Park and Kim (2011) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* KCTC2662 ซึ่งใช้น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ γ-butyrolactone ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัม และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture) พบว่าหลังชั่วโมงที่ 15 สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-4HB) ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 10-12 กรัมต่อลิตร มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตร้อยละ 80-83, 4HB เท่ากับ 6-10mol% และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของโคพอลิเมอร์เท่ากับ 0.45-0.56 กรัมต่อกรัมน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งการใช้ γ-butyrolactone 10 กรัมทำให้ปริมาณ 4HB เพิ่มขึ้นแต่ปริมาณ แต่ปริมาณของพอลิอัลคาโนเอตและ 3HB ลดลง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (fed-batch culture) โดยความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลืองและ γ-butyrolactone เท่ากับ 50 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าชั่วโมงที่ 96 ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 21 กรัมต่อลิตร, ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตร้อยละ 95, 4HB เท่ากับ 9.4mol% และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของโคพอลิเมอร์เท่ากับ 0.47 กรัมต่อกรัมน้ำมันถั่วเหลือง

10. การใช้ประโยชน์จากพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (พรเทพ ถนนแก้ว และตริตาภรณ์ จันทน์เทศ, 2553) สามารถนำมาใช้ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

1. ด้านการแพทย์ เช่น ไหมเย็บแผล (sutures) ตัวเย็บแผล (staples) วัสดุปิดแผล (wound dressing) อุปกรณ์ฝังในร่างกาย (surgical implants) อุปกรณ์สำหรับยึดกระดูก (orthopedic fixation devices) วัสดุสำหรับนำพาหรือปลดปล่อยตัวยา ซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. ด้านการเกษตร เช่น ภาชนะปลูกพืช วัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช หรือปุ๋ยตามช่วงเวลาที่กำหนด

3. ด้านบรรจุภัณฑ์ เช่น บรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ถุงพลาสติก กล่องโฟม ฟิล์มสำหรับหีบห่อ เม็ดโฟมกันกระแทก ตัวเคลือบภาชนะกระดาษ

4. ด้านเส้นใย และแผ่นผ้าแบบ non-woven เช่น ผลิตภัณฑ์อนามัย ผ้าอ้อมสำเร็จรูป เสื้อผ้าและเครื่องนุ่งห่ม เส้นใยสำหรับบรรจุในเครื่องนอน

5. ด้านอิเล็กทรอนิกส์และการสื่อสาร เช่น ชิ้นส่วนประกอบโทรศัพท์เคลื่อนที่ ชิ้นส่วนประกอบในคอมพิวเตอร์ แผ่นซีดี

อีกทั้งยังรวมไปถึงพวกสารยึดเกาะ สารเคลือบผิว สารยึดประสานสำหรับผงโลหะและเซรามิกซ์ นอกจากนี้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตยังเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีพิเศษ (specialty chemicals) เช่น solvents and coalescing และ polyurethane intermediates เป็นต้น

ปัจจุบันได้มีการนำพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตใช้เพื่อการค้าเพิ่มมากขึ้น โดยตัวอย่างบริษัทที่มีการผลิตพลาสติกชีวภาพเพื่อการพาณิชย์ ดังแสดงในตารางที่ 2-5

ตารางที่ 2-5 รายชื่อสายพันธุ์จุลินทรีย์/วัตถุดิบและบริษัทที่ผลิตพลาสติกชีวภาพ (Reddy et al., 2003)

จุลินทรีย์/ วัตถุดิบ	รายชื่อบริษัท
Alcaligenes eutrophus (H16)	ZENECA Bio-products, UK (formerly ICI Ltd.)
Alcaligenes latus	Biotechnolgische Forschungs gelleschaft mbH (Austria) Petrochemia Danubia
Transgenic plants	Metabolix, Inc. (USA), Mousanto (USA), ZENECA Seeds (UK)
Unknown bacteria	Biocorp (USA), Asahi Chemicals and Institute of Physical and Chemical Research, (Japan)
Starch	Warnr's Lambert (USA), Fertec, Italy, Ferruzie Technologia (Italy), Biotec (Mellita) Emmerich (Germany), BASF Ludwigshafen, (Germany), Bayer/ Wolf warlsrodeleven, (Germany) Kusen (Germany), Novamont Novara (Italy)
Recombinant *E. coli*	Bioventures Alberta inc. (Canada)
Cheaper substrates	Polyferm Inc. (Canada)
Corn starch	SPC Biotech Pvt. Ltd. (India)

11. วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Shojaosadati, Kolaei, Balaeipour, and Farroul, 2008)

วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยทั่วไป สามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ แบบกะ (Batch) แบบเติมกะ (Fed-batch) และแบบต่อเนื่อง (Continuous) ในปัจจุบันมีแบบอื่นอีกที่การขยายขนาดทำได้ยุ่งยากเนื่องจากเป็นการเพาะเลี้ยงค่อนข้างพิเศษ ซึ่งแต่ละแบบมีวิธีการการควบคุม ระยะเวลาในการดำเนินการแตกต่างกัน โดยในการเลือกใช้นั้นต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ในการตัดสินใจ เช่นชนิดของจุลินทรีย์ ผลผลิต และเทคนิคต่าง ๆ ซึ่งจะเป็นตัวช่วยให้กระบวนการเพาะเลี้ยงมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

11.1 การเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch)

เป็นการเพาะเลี้ยงที่มีการหมักโดยการเตรียมอาหารครั้งเดียวเท่านั้น หลังจากการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นไปแล้วนั้น จะไม่มีการเติมสารอาหารเข้าไปอีก รวมถึงจะไม่มีการนำสิ่งใด ๆ ออกระหว่างการหมัก โดยเซลล์จะใช้สารตั้งต้นต่าง ๆ ได้จากสารอาหารเริ่มต้นเพียงอย่างเดียว เมื่อครบกำหนดเวลาการหมักที่กำหนดไว้ จะทำการเก็บน้ำหมักทั้งหมดเพียงครั้งเดียว ดังนั้นการหมักแบบเบ็ดเสร็จแต่ละครั้งต้องมีการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นใหม่ทุกครั้ง การหมักแบบนี้เป็นที่นิยมมากในระดับโรงงานอุตสาหกรรม โดยเป็นถังหมักสำหรับใส่สารอาหารและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก มีระบบการกวนเพื่อให้เกิดการผสมกันอย่างทั่วถึง มีการควบคุมอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ จนได้ผลผลิตตามที่ต้องการ จึงถ่ายออกเพื่อเข้าสู่กระบวนการเก็บเกี่ยวในขั้นต่อไป

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบบกะ

1. เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สำหรับผลิตผลิตภัณฑ์ที่ในปริมาตรไม่มาก
2. เกิดการผ่าเหล่า (mutation) ได้ยาก เนื่องจากหัวเชื้อที่ใช้มีการเตรียมใหม่ทุกครั้ง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีความแข็งแรง
3. การเพาะเลี้ยงทำได้ง่าย และเกิดการปนเปื้อนได้ยาก เนื่องจากมีการควบคุมระบบอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อตลอดระยะเวลา ไม่มีการเปิดระบบเพื่อนำสารอาหารเข้าหรือออก
4. การควบคุมทำได้ง่ายไม่สลับซับซ้อน เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ใช้อุปกรณ์ในการดำเนินการน้อยมาก

ข้อเสียของการเพาะเลี้ยงแบบกะ

1. ต้องเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นและวัตถุดิบต่าง ๆ ใหม่ทุกครั้งที่ดำเนินการหมัก ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมาก

2. ต้องเสียเวลารอเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตในช่วงแรกทุกครั้ง เนื่องจากเป็นหัวเชื้อที่เตรียมใหม่ จึงต้องมีการปรับสภาวะของจุลินทรีย์ให้สามารถใช้อาหารได้

11.2 การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-batch)

เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องหรือเป็นช่วง ๆ หลังจากที่ใส่หัวเชื้อเริ่มต้นแล้ว จะไม่มีการถ่ายสารอาหารออก ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงแบบกะที่ปริมาตรอาหารในการหมักแบบเติมกะจะเพิ่มขึ้นตลอดเวลาไม่คงที่ ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเติมกะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมักมากที่สุด เช่น การผลิตยีสต์ทำขนมปัง การผลิตเพนนิซิลิน เป็นต้น

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

1. ช่วยลดการยับยั้งของอาหาร (substrate inhibition) สารอาหารที่เป็นแหล่งจำพวกคาร์บอน เช่น แอลกอฮอล์ เมทานอล กรดน้ำส้ม และสารประกอบพวกอะโรมาติก สามารถก่อให้เกิดยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ แม้ในความเข้มข้นน้อย ๆ เพราะฉะนั้นการเติมสารอาหารเหล่านี้ในปริมาณที่เหมาะสมอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้เซลล์จุลินทรีย์สามารถเจริญได้โดยปราศจากการยับยั้งของอาหาร

2. ช่วยลดผลจากกลูโคส (glucose effect) คือ การที่มีกลูโคสในระบบการเพาะเลี้ยงมากเกินไป ส่งผลให้เกิดสภาวะการขาดแคลนออกซิเจน ซึ่งทำให้เซลล์มีการสร้างเป็นสารอื่นขึ้นมาแทนการสร้างเซลล์ โดยสารที่สร้างขึ้นมาอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตได้

3. ช่วยลดความหนืดของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ หรือผลผลิตจากจุลินทรีย์ เช่น เดกซ์แทรน (dextran) และแซนแทนกัม (xanthan gum) การค่อย ๆ เติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องสามารถควบคุมความหนืดของน้ำหมักได้ เนื่องจากสารอาหารที่ค่อย ๆ เติมลงไปจะเข้าไปช่วยในการเจือจางน้ำหมักที่มีความหนืดมากได้ เนื่องจากถ้ามีความหนืดในการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นจะมีผลต่อระบบการเติมอากาศ เช่น ใบกวนจะต้องใช้กำลังไฟเพิ่มมากขึ้นเกิดฟองมากขึ้นทำให้การละลายของออกซิเจนไม่ดีพอ อีกทั้งค่าใช้ยังจ่ายสูงขึ้นตาม

4. สามารถป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ เนื่องจากเป็นระบบที่มีเพียงการเติมสารอาหารเท่านั้น ทำให้ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ที่เลี้ยงนั้นไม่ถูกเจือจาง จึงทำให้มีความได้เปรียบมากกว่าเชื้อชนิดอื่น

11.3 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด จำนวนจุลินทรีย์จะถูกรักษาสมดุลโดยการดึงน้ำหมักออกบางส่วนแล้วแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ในอัตราการไหลที่เท่ากันระหว่างน้ำหมักที่ออกมาและอาหารใหม่ที่เติมเข้า ทำให้ปริมาตรภายในอยู่ในสภาวะคงที่หรือสภาวะสมดุล (steady state)

ระบบการหมักอย่างต่อเนื่องแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ chemostat และ turbidostat โดย chemostat เป็นการเพาะเลี้ยงที่อัตราการเติมสารอาหารถูกตั้งไว้ที่ค่าหนึ่งและอัตราการเจริญของเซลล์ปรับตามอัตราการไหล ส่วน turbidostat เป็นวิธีที่ค่าความขุ่นของเซลล์จะถูกตั้งไว้ในระดับที่คงที่โดยการปรับอัตราการไหล ในทางปฏิบัติระบบการหมักแบบ chemostat ง่ายกว่า turbidostat เพราะสามารถทำได้โดยการปั๊มที่อัตราการไหลคงที่ ส่วน turbidostat ต้องใช้อุปกรณ์ตรวจวัดความขุ่น (optical sensing) และเครื่องควบคุมอื่น ๆ ซึ่งมีความยุ่งยากมากกว่า

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

1. สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ให้คงที่ได้ เนื่องจากมีการเติมสารอาหารใหม่ตลอดเวลา ไปพร้อมกับการดึงสารอาหารเก่าออกพร้อมกับเซลล์บางส่วน ทำให้ปริมาณหัวเชื้ออยู่ในปริมาณคงที่ และมีสารอาหารใหม่เข้าไปให้ใช้เท่ากัน

2. สามารถศึกษาผลของการเปลี่ยนพารามิเตอร์ทางเคมีและกายภาพต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ที่อัตราการเจริญคงที่

3. สามารถรักษาระดับความเข้มข้นของมวลชีวภาพให้คงที่ได้โดยการปรับค่าอัตราการเจือจางให้คงที่

ข้อเสียของการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

1. ไม่เหมาะกับการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการเจริญของเซลล์ เนื่องจากเซลล์จะถูกดึงออกจากระบบการหมักในขณะที่เซลล์ยังอยู่ในขั้นตอนของการเจริญเติบโต ซึ่งอาจยังไม่เข้าขั้นตอนที่เซลล์มีการสร้างผลิตภัณฑ์

2. การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง จะทำให้การเจริญของเซลล์เป็นแบบต่อเนื่องในช่วงเวลานาน ซึ่งอาจเป็นผลให้เกิดการกลายพันธุ์จากการแทนที่ของสายพันธุ์อื่นที่ปนเปื้อนเข้ามาและสามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่า

3. การเพาะเลี้ยงในช่วงเวลานานอาจเกิดปัญหาการปนเปื้อนได้

วิธีการขยายขนาดเพาะเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงขึ้น ซึ่งพบว่ามีงานวิจัยที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก เช่น

Jiang et al. (2008) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* A2a5 ซึ่งเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 3 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้สูตรอาหารที่มีน้ำอ้อย (Sugarcane Liquor) ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และโมโนโซเดียมกลูตาเมตความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 32 และ 22 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

El-sayed et al. (2009) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Ralstonia eutropha* ATCC 17697 และ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงแบบกะและเติมกะ ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ ซึ่งเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 2 ลิตร โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิในถังเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7±0.1 และความเร็วของใบพัดเท่ากับ 750 รอบต่อนาที ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 100 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *R. eutropha* ATCC 17697 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 10.18 และ 0.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน *A. latus* ATCC 29714 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 8.73 และ 4.94 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 1.2 ลิตร โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมน้ำตาลกลูโคสในชั่วโมงที่ 25 และ 35 พบเชื้อ *R. eutropha* ATCC 17697 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 16.32 และ 10.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน *A. latus* ATCC 29714 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 15.21 และ 8.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Kulpreecha, Boonruangthavan, Meksiriporn, and Thongchul. (2009) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 3 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่ง

ไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับ 8.80 และ 5.41 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 61.60 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 2.5 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมง โดยเติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 400 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับ 72.60 และ 30.50 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 42.1 ของมวลเซลล์แห้ง

Park and Kim (2011) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยเชื้อ *Ralstonia eutropha* KCTC 2662 โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 1 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.8 เติมอากาศที่ 1 vvm และปรับความเร็วของใบพัดเท่ากับ 700-1300 รอบต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 100 ชั่วโมง พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 87 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับ 15 และ 13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 1 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 100 ชั่วโมง และเติมน้ำมันถั่วเหลืองในชั่วโมงที่ 18 และ 50 พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับ 32 และ 25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Gahlawat and Srivastava (2013) ศึกษาการเลี้ยง *Azohydromonas australica* เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 4 ลิตร ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 33 องศาเซลเซียส และปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับ 8.71 และ 6.24 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 72 มวลเซลล์แห้ง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 2 ลิตร ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีการเติมสารอาหารตั้งแต่ชั่วโมงที่ 20-35 เป็นเวลา 15 ชั่วโมง และทำการเพาะเลี้ยงจนครบ 38 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิว

ทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 29.71 และ 22.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 76 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ผลิตได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ 3.6 เท่า

Tripathi, Srivastawa, and Singh (2013) ศึกษาการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. NCIM 5085 เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7.5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 5.6 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้สูตรอาหารที่มีกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 34 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและมีปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับ 11.0±0.5 และ 8.58±0.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และผลผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดและความสามารถในการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.78 และ 0.19 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 *Alcaligene latus* TISTR 1403 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยจะใช้ชื่อเรียกว่า สายพันธุ์ดั้งเดิม ตลอดการทดลอง

1.2 *Alcaligene latus* สายพันธุ์ BOT I เป็นส่วนที่ได้จากผลการศึกษาของขวัญใจ แก้วจันทร์ และคณะ (2554) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

1.3 *Alcaligene latus* สายพันธุ์ BOT II เป็นส่วนที่ได้จากผลการศึกษาของจารุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ (2557) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2. วัสดุและอุปกรณ์

2.1 เครื่องชั่ง METTLER รุ่น AE 200 และ OHAUS รุ่น Adventurer

2.2 กล้องจุลทรรศน์ Olympus รุ่น CH-2

2.3 เครื่อง Vortex Heidolph รุ่น REAX 2000 และรุ่น CERTOMAT

2.4 เครื่อง Hot plate รุ่น VELP scientific

2.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง HERMLE รุ่น z 323 k

2.6 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง SHIMADZU รุ่น UV-1601 UV-visible spectrophotometer

2.7 ตู้อบความร้อนสูง SHEL LAB รุ่น SL 1375 FX Sheldon manufacturing. Inc

2.8 หม้อนึ่งความดันไอ HIRAYAMA รุ่น HA-300 MII

2.9 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ SHEL LAB รุ่น Sheldon manufacturing Model 1265 และรุ่น YCW-04M

2.10 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ SHEL LAB รุ่น Sheldon manufacturing Inc. Model 1925

2.11 เครื่อง Sonicator Cole-Parmer รุ่น 8893

2.12 เครื่อง dispenser BioHT Rroline prosenser

2.13 ปิเปตดูดสารปริมาณน้อย รุ่น BiOHiT ขนาด 20-200 µL และ 100-1000 µL

2.14 เตาแผ่นความร้อนไฟฟ้า imarflex รุ่น IF-830

2.15 คิวเวตแก้ว Hellma ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2.16 ขวดเก็บตัวอย่าง

2.17 หลอดปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge tube)

2.18 ถังปฏิกรณ์ (Bioreactor) ปริมาตรบรรจุ 5 ลิตร รุ่น Biostat B บริษัท B. Braun Biotech International ประเทศเยอรมัน

2.19 คอลัมภ์ HP-5 ความยาว 30 เมตร หนา 0.32 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร

2.20 หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร

2.21 ปิเปต (Pipette) ขนาด 10 มิลลิลิตร

2.22 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 25 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร

2.23 เครื่องเขย่า (Shaker) NB-101M

3. สารเคมี

3.1 แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ บริษัท Ajax Laboratory Chemicals

3.2 แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.3 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.4 แอมโมเนียมโมลิปเดรต 4 ไฮเดรต $(NH_4)_6Mo_7O_{24}{\cdot}4H_2O$ บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.5 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.6 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.7 โซเดียมไบคาร์บอเนต $(NaHCO_3)$ บริษัท QRëC™

3.8 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท QRëC™

3.9 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 12 ไฮเดรต $(Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O)$ บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.10 แมกนีเซียมซัลเฟต 7 ไฮเดรต $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$ บริษัท QRëC®

3.11 แคลเซียมไดคลอไรด์ $(CaCl_2)$ บริษัท อินเตอร์เอ็ดดูเคชั่น ซัพพลายส์ จำกัด

3.12 กรดบอริก (H_3BO_3) บริษัท QRëC™

3.13 โคบอลต์คลอไรด์ 7 ไฮเดรต $(CoCl_2 \cdot 7H_2O)$ บริษัท APS Finechem

3.14 ซิงค์ซัลเฟต 7 ไฮเดรต $(ZnSO_4 \cdot 7H_2O)$ บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.15 แมงกานีสคลอไรด์ 4 ไฮเดรต $(MnCl_2{\cdot}4H_2O)$ บริษัท Ajax Laboratory Chemicals

3.16 แมงกานีสซัลเฟต 7 ไฮเดรต $(MgSO_4{\cdot}7H_2O)$ บริษัท Ajax Laboratory Chemicals

3.17 โซเดียมโมลิปดินัม 2 ไฮเดรต $(Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O)$ บริษัท Ajax Chemicals

3.18 นิลเกิลคลอไรด์ 6 ไฮเดรต ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.19 นิลเกิลซัลเฟต 7 ไฮเดรต ($NiSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.20 คอปเปอร์คลอไรด์ 6 ไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 6H_2O$) บริษัท QRëC®

3.21 คอปเปอร์ซัลเฟต 5 ไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) บริษัท Ajax Chemicals

3.22 เฟอรัสคลอไรด์ไฮเดรต ($FeCl_2 \cdot H_2O$) บริษัท APS Finechem

3.23 เฟอรัสซัลเฟต 7 ไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)) บริษัท QRëC®

3.24 เฟอริกซิเตรท (Ferric citrate) บริษัท Fluka

3.25 โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) บริษัท FARMITALIA CARLO ERBA

3.26 โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรท ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.27 โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl)

3.28 Tween 80

3.29 น้ำตาลฟรุคโตส (Fructose) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.30 น้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil) ยี่ห้ออุ่น บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด

3.31 น้ำมันปาล์ม (Palm oil) ยี่ห้อหยก บริษัท สหอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม จำกัด (มหาชน)

3.32 น้ำมันข้าวโพด (Corn oil) ยี่ห้ออุ่น บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด

3.33 น้ำมันทานตะวัน (Sunflower oil) ยี่ห้ออุ่น บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด

3.34 น้ำมันรำข้าว (Rice Barn Oil) ยี่ห้อคิง บริษัท น้ำมันบริโภคไทย จำกัด

3.35 ผงชูรส ยี่ห้อ ถ้วยแดง บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ

3.36 แกมม่า-บิวทาโรแลกโตน บริษัท Aldrich

3.37 1,4-บิวเทนไดออล บริษัท Sigma-Aldrich

3.38 กรดวาเลอริก บริษัท Aldrich

3.39 โพรพิโอเนต บริษัท Aldrich

3.40 อะซิเตท บริษัท Aldrich

4. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 DSMZ catalogue (1993)

4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ดัดแปลงมาจาก DSMZ Catalogue (1993)

4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 Park and Kim (2011)

วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การศึกษาแหล่งอาหาร สภาวะที่เหมาะสม และความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ทำการกระตุ้นเชื้อแบคทีเรีย *A. latus* TISTR 1403 สายพันธุ์ดั้งเดิม, สายพันธุ์ BOT I และสายพันธุ์ BOT II จำนวน 2-3 ครั้ง ที่เก็บรักษาบนอาหารวุ้นเอียง Nutrient agar (NA) จากนั้นนำเชื้อที่ได้ใส่ลงในอาหารเหลว Nutrient-rich medium ซึ่งประกอบด้วยเปปโตน (Peptone) 10 กรัมต่อลิตร, ยีสต์สกัด (yeast extract) 5 กรัมต่อลิตร และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5 กรัมต่อลิตร ที่บรรจุขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน 1 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้นร้อยละ 7 ในทุกการทดลอง

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ดั้งเดิม, สายพันธุ์ BOT I และสายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อบรรจุอยู่ 100 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 7 ของอาหารลงในแต่ละชุดการทดลอง ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ พร้อมทั้งวิเคราะห์ผล โดยวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่ามวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยมีสภาวะที่ศึกษามีดังนี้

2.1 ผลของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสูตรอาหารสำหรับผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต 3 สูตรที่แตกต่างกัน ได้แก่ DSMZ catalogue (1993), อาหารดัดแปลงของ DSMZ catalogue (1993) และ Park and Kim (2011) เพื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ดังแสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 องค์ประกอบของอาหารของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา

องค์ประกอบของสูตรอาหาร	สูตรที่ 1 (DSMZ catalogue, 1993)	สูตรที่ 2 (ดัดแปลง DSMZ catalogue, 1993)	สูตรที่ 3 (Park & Kim, 2011)
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	-
$(NH_4)_2SO_4$ (g/ L)	-	-	1
Tween 80 (ml)	-	1	1
Trace element (ml/ L)	5	5	10

2.2 ผลของการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากข้อ 2.1 ซึ่งได้รับการดัดแปลงโดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ในสูตรอาหารที่ใช้น้ำมัน ถั่วเหลืองความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้สูตรอาหารที่ได้ผลดีที่สุดจากข้อ 2.1 เป็นชุดควบคุม

2.3 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 2.2 จากนั้นทำการปรับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นทั้งหมด 3 ชุด ดังแสดงในตารางที่ 3-2 และมาเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเปรียบเทียบหาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ตารางที่ 3-2 องค์ประกอบแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารดัดแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา

องค์ประกอบของสูตรอาหาร	อาหารดัดแปลง ชุดที่ 1	อาหารดัดแปลง ชุดที่ 2	อาหารดัดแปลง ชุดที่ 3
ฟรุกโตส (g/ L)	40	40	-
น้ำมันถั่วเหลือง (g/ L)	-	-	40
แอมโมเนียมคลอไรด์ (g/ L)	0.5	-	-
ผงชูรส (g/ L)	-	0.5	0.5
ทวิน 80 (ml)	-	-	1

2.4 ผลของความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 2.3 จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของผงชูรส (ตราถ้วยแดง) เริ่มต้นเท่ากับ 0.5, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

2.5 ผลของอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 2.4 จากนั้นทำการปรับอัตราส่วนความ

เข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2, 0.25:2, 0.10:2, 0.5:1, 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ดังแสดงในตารางที่ 3-3

ตารางที่ 3-3 อัตราส่วนแอมโนเนียมคลอไรท์ต่อผงชูรสในอาหารดัดแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา

องค์ประกอบของสูตรอาหาร	อาหารดัดแปลงชุดที่ 1	อาหารดัดแปลงชุดที่ 2	อาหารดัดแปลงชุดที่ 3	อาหารดัดแปลงชุดที่ 4	อาหารดัดแปลงชุดที่ 5
แอมโมเนียมคลอไรด์ (g/ L)	0.5	0.25	0.10	0.5	0.5
ผงชูรส (g/ L)	2	2	2	1	0.5

ส่วนที่ 2 การศึกษาการเติมสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

2.1 การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

ทำการคัดเลือกอาหารเลี้ยงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, สายพันธุ์ BOT I และสายพันธุ์ BOT II ที่ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด จากส่วนที่ 1 ข้อ 2.5 มาทำการเปรียบเทียบชนิดของสารกระตุ้นให้เกิดการสร้าง 3 ชนิด คือ แกมม่า-บิวทาโรแลกโตน ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร Park and Kim (2011) 1,4-บิวเทนไดออล ปริมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของแหล่งคาร์บอน Chanprateep et al. (2010) และกรดวาเลอริก ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร Chanprateep and Kulpreecha (2006) เพื่อเปรียบเทียบสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ที่เหมาะสม

2.2 การศึกษาเปรียบเทียบน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์สูงสุดจากข้อ 2.1 โดยทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงในน้ำมันชนิดต่าง ๆ ทั้ง 5 ชนิด คือ

น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวโพด น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันรำข้าวที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์

2.3 การศึกษาการใช้น้ำมันปาล์มร่วมกับสารกระตุ้นความเข้มข้นต่าง ๆ ให้เกิดการสร้างที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากมีราคาถูกร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 15, 25, 50 และ 75 ของแหล่งคาร์บอน เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ 1,4-บิวเทนไดออลที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโคพอลิเมอร์

2.4 การศึกษาการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนประเภทน้ำตาลร่วมกับสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II โดยปรับแหล่งคาร์บอนเป็นเด็กซ์โตรส น้ำตาลที่ผ่านการย่อย และฟรุคโตรสความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมสารโพรพิโอนิคและอะซิเตท ปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร โดยอะซิเตทและโพรพิโอนิคมีปริมาณ 28.75 และ 1.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ Reddy et al. (2016) เพื่อเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนประเภทน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโคพอลิเมอร์

ส่วนที่ 3 การศึกษาวิธีการตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 48 โดยทำการเก็บตัวอย่างหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง และเก็บตะกอนเซลล์แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการตรวจสอบหาปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ดัดแปลงจาก DSMZ catalogue, 1993)

3.1 การศึกษาการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์ม (ดัดแปลงจาก Rawte & Mavinkurve, 2002)

นำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์มต่อตัวอย่างที่ 1:1 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนไปทำการกรองเพื่อเก็บส่วนคลอโรฟอร์มมาตกตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนตะกอนไปล้างด้วยอะซิโตน 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำตะกอนไปละลายในคลอโรฟอร์มร้อน ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องจนคลอโรฟอร์มระเหยออกหมด เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ดัดแปลงจาก Nabila & Veena, 2016) โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มมาเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 98 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้กรดโครโตนิก (Crotonic acid) ที่ทราบความเข้มข้นเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

3.2 การศึกษาการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์มร่วมกับไฮโปคลอไรท์

นำตะกอนเซลล์มาทำการเติมไฮโปคลอไรท์และคลอโรฟอร์มร้อน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่ในคลอโรฟอร์มร้อนปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองเพื่อเก็บส่วนคลอโรฟอร์มมาตกตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนมาล้างด้วยอะซิโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำตะกอนไปละลายในคลอโรฟอร์มร้อน ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนคลอโรฟอร์มระเหยออกหมด เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ดัดแปลงจาก Nabila and Veena, 2016)

3.3 การศึกษาการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปรคลอไรท์ (ดัดแปลงจาก Rawte & Mavinkurve, 2002)

นำตะกอนเซลล์ไปเติมไฮโปคลอไรท์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบเป็นเวลา 20 นาที ทำการล้างตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ดัดแปลงจาก Nabila & Veena, 2016) จากนั้นนำตะกอนที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีไฮโปรคลอไรท์ มาทำการเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 98% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้กรดโครโตนิก (Crotonic acid) ที่ทราบความเข้มข้นเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ดังนี้

3.3.1 การศึกษาการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปรคลอไรท์ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน

นำตะกอนเซลล์มาทำการเติมไฮโปคลอไรท์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณภูมิต่างแตกกัน คือ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 10, 20 และ 30 นาที

ส่วนที่ 4 การศึกษาการขยายขนาดการผลิตการเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ (Batch Culture)

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยใช้สภาวะต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาในส่วนที่ 1 และ 2 ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ โดยทำการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 10 ลงในถัง ซึ่งมีปริมาตรการทำงานทั้งหมดเท่ากับ 3 ลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของเหลวต่อนาที (vvm) ความเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 42 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ค่าการเจริญของเซลล์ ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต และปริมาณน้ำตาลดิวซ์โดยวิธี DNS

ส่วนที่ 5 การศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรีย

5.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรีย

5.1.1 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydrate) โดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) แล้วนำตัวอย่างไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical point drying) ติดตัวอย่างลงบน Stub แล้วเคลือบด้วยทอง (ดัดแปลงจากวิธีของ Nunoy et al., 2011) จากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น LEO 1450 VP บริษัท LEO ดังแสดงในภาพที่ 3-1

ภาพที่ 3-1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น LEO 1450 VP บริษัท LEO

5.1.2 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydrate) โดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) แล้วนำตัวอย่างมาแช่ในสารผสมโพรไพลีนออกไซด์ (PO) 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที แล้วนำตัวอย่างไปฝังใน pure araldite 502 resin และนำไปอบ จากนั้นตัดด้วยเครื่องตัดตัวอย่าง (Ultramicrotome) และย้อมด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ ยูรานิล อะซิเตท (uranyl acetate) ใน 70 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล (methanol) และ 1 เปอร์เซ็นต์ เลด ซิเตรท (lead citrate) ในน้ำอย่างละ 30 นาที ตามลำดับ (ดัดแปลงจากวิธีของ Nunoy et al., 2011) จากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) รุ่น TECNAI 20 บริษัท Philips ดังแสดงในภาพที่ 3-2

ภาพที่ 3-2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน รุ่น TECNAI 20 บริษัท Philips

วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ข้อมูลในแต่ละการศึกษา จะทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยแต่ละชุดของการทดลองมีจำนวน 3 ซ้ำ ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การวิเคราะห์มวลเซลล์แห้ง (Dry cell weight, DCW)
2. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธี Gravimetric method
3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ DNS assay (Miller, 1959)
4. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปกรดโครโตนิก (ดัดแปลงจาก Nabila & Veena, 2016)

บทที่ 4

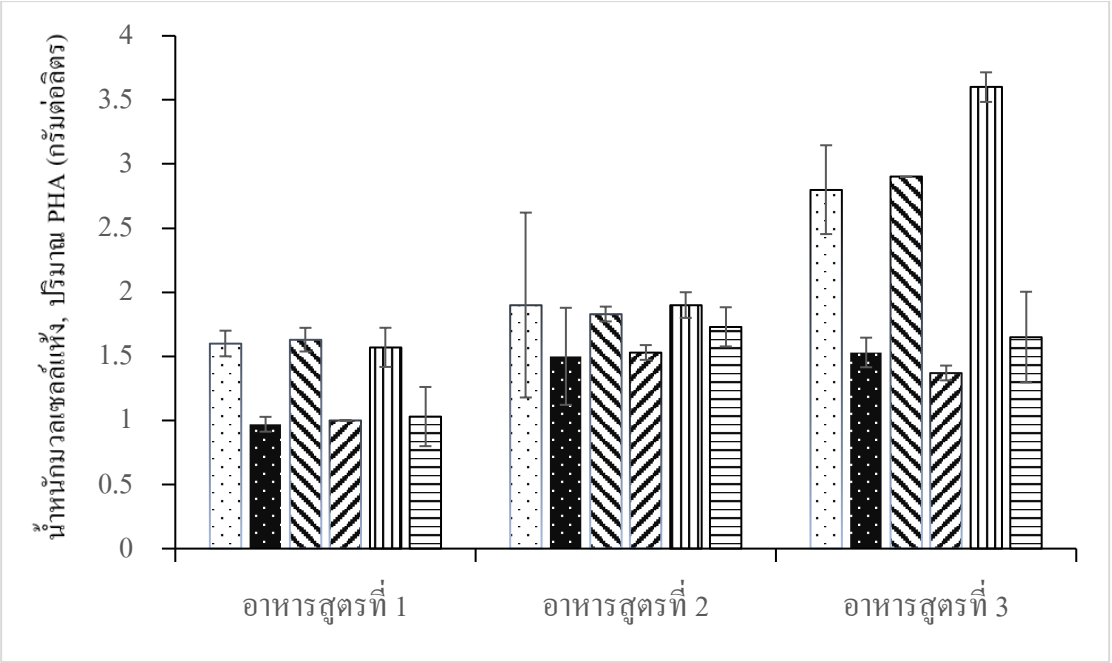
ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

1.1 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II ในสูตรอาหารสำหรับผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตทั้ง 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 เป็นสูตรของ DSMZ catalogue และคณะ (1993), สูตรที่ 2 เป็นสูตรดัดแปลง DSMZ catalogue และคณะ (1993) และสูตรที่ 3 เป็นของ Park & Kim (2011) ทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 และเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในสูตรอาหารที่ 2 จากนั้นทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อทั้งสามสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร มีการเจริญสูงสุดในอาหารสูตรที่ 2 รองลงมา คือ อาหารสูตรที่ 1 และ 3 ตามลำดับ โดยมีการเจริญในทิศทางเดียวกัน คือ มีระยะการเจริญอย่างรวดเร็วอยู่ในช่วง 6-12 ชั่วโมงของการเลี้ยง โดยเริ่มคงที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II มาเลี้ยงในสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดในอาหารสูตรที่ 3 แต่มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 โดยเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้มีค่าเท่ากับ 1.87±0.10 และ 1.73±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 92.51 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนในเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ BOT I พบว่า เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 1.90±0.72 และ 1.83±0.09 กรัมต่อลิตร มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ 1.55±0.37 และ 1.53±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 81.58 และ 94.55 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสูตรอาหาร 3 สูตร โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A.latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II

ตารางที่ 4-1 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน

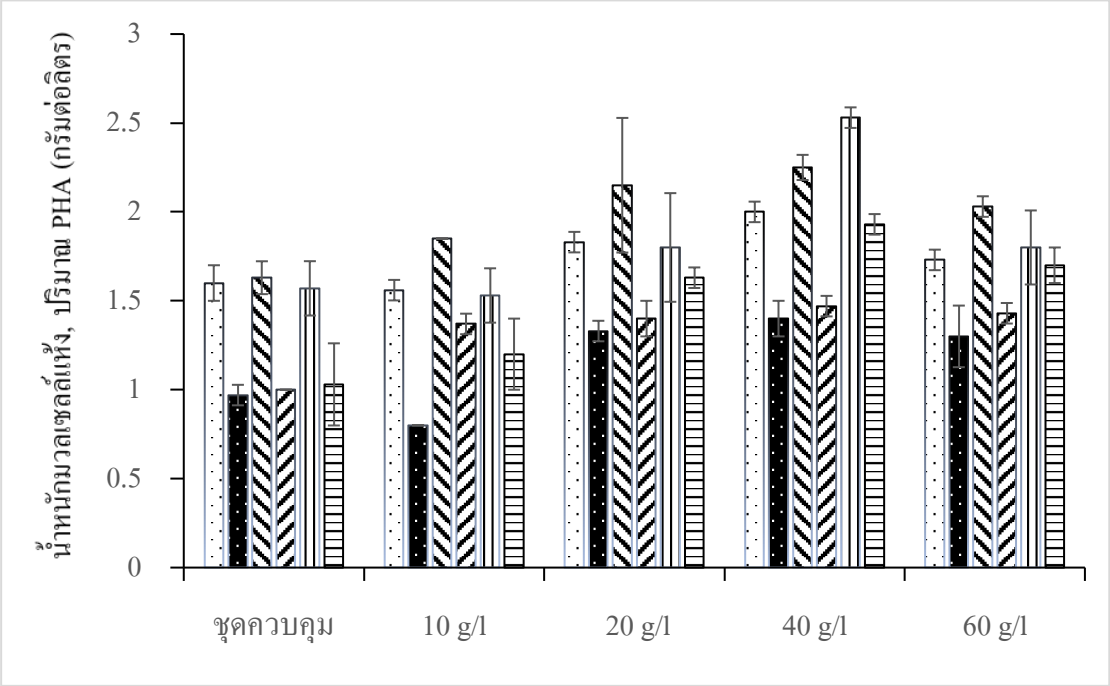
สูตรอาหาร	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร)			PHAs (ร้อยละ)		
	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II
สูตรที่ 1	1.60±0.10	1.63±0.09	1.57±0.15	0.97±0.06	1.00±0.00	1.03±0.23	60.63	61.35	65.61
สูตรที่ 2	1.90±0.72	1.83±0.09	1.90±0.37	1.55±0.37	1.53±0.06	1.73±0.15	81.58	94.55	91.05
สูตรที่ 3	2.80±0.35	2.90±0.00	3.60±0.12	1.53±0.12	1.37±0.06	1.65±0.35	54.64	47.24	45.83

1.2 ผลการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากจุดประสงค์ของการศึกษาเพื่อต้องการใช้สารอาหารราคาถูกมาเป็นสารตั้งต้นให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในกระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ดังนั้นในครั้งนี้ได้เลือกใช้น้ำมันถั่วเหลืองมาเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน เนื่องจากน้ำมันถั่วเหลืองมีปริมาณคาร์บอนมากกว่าน้ำตาลฟรุกโตส จึงคาดว่ามีผลทำให้มีพลังงานในการเจริญเติบโตและผลิตผลิตภัณฑ์ได้มากกว่า

ในการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II ในสูตรอาหารที่ 2 ซึ่งใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยทำการปรับความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองเป็น 10, 20, 40 และ 60 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่มีน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 จากนั้นทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ มีการเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตรสูงกว่าชุดควบคุม โดยมีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง และมีการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง ในทุกชุดการทดลอง

จากการศึกษา เชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ 2.53±0.06 และ 1.93±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 76.28 ของมวลเซลล์แห้ง และพบว่าที่ความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 60 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้รองลงมา มีค่าเท่ากับ 1.85±0.21 และ 1.70±0.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่มากเกินไปอาจส่งผลให้ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (substrate inhibition) ทำให้สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลาโนเอตได้น้อยลง ดังนั้นความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ส่วนในเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ BOT I พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 2.00±0.06 และ 2.27±0.07 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ 1.40±0.10 และ 1.47±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 70.00 และ 65.33 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-2 และภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน ที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A.latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II

ตารางที่ 4-2 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน

ความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			PHAs (กรัมต่อลิตร)			PHAs (ร้อยละ)		
	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II
ชุดควบคุม	1.60±0.10	1.63±0.09	1.57±0.15	0.97±0.06	1.00±0.00	1.03±0.23	60.63	61.35	65.61
10	1.56±0.02	1.85±0.00	1.53±0.15	0.80±0.00	1.37±0.06	1.20±0.20	51.28	74.05	78.43
20	1.83±0.06	2.15±0.38	1.80±0.31	1.33±0.06	1.40±0.10	1.63±0.06	72.68	65.12	90.56
40	2.00±0.06	2.27±0.07	2.53±0.06	1.40±0.10	1.47±0.06	1.93±0.06	70.00	65.33	76.28
60	1.73±0.06	2.03±0.06	1.85±0.21	1.30±0.17	1.43±0.06	1.70±0.10	75.14	70.44	91.89

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ น้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

1.3 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยทำการปรับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นทั้งหมด 3 ชุดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4-3

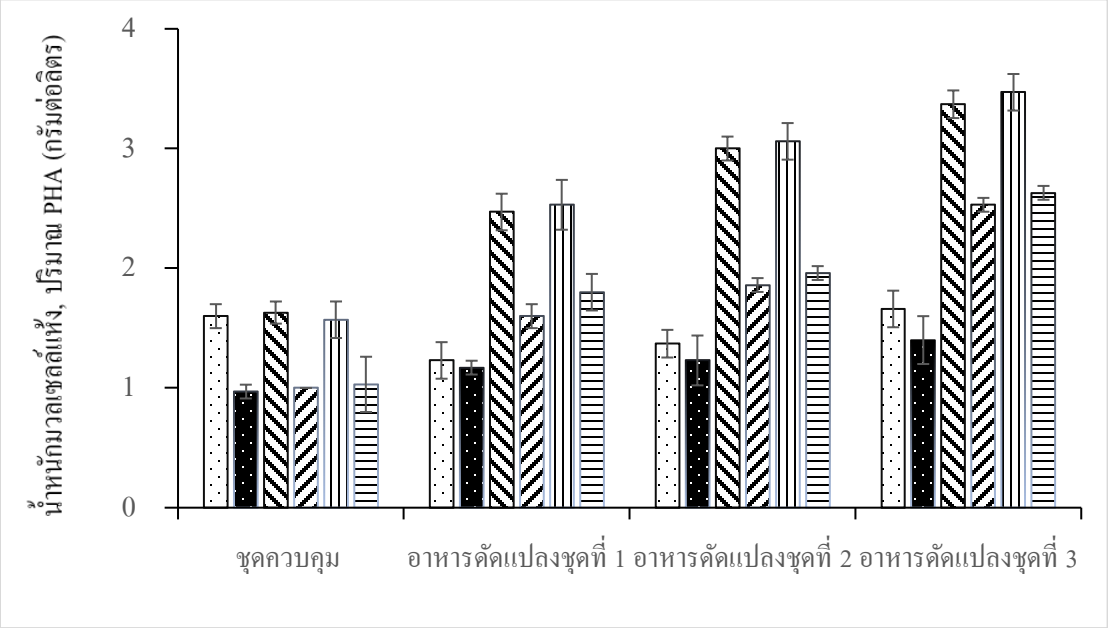
ตารางที่ 4-3 องค์ประกอบแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue ของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา

องค์ประกอบของสูตรอาหาร	ชุดควบคุม	อาหารดัดแปลงชุดที่ 1	อาหารดัดแปลงชุดที่ 2	อาหารดัดแปลงชุดที่ 3
Fructose (g/ L)	20	40	40	-
Soybean oil (g/ L)	-	-	-	40
Ammonium Chloride (g/ L)	0.5	0.5	-	-
Monosodium glutamate (g/ L)	-	-	0.5	0.5
Tween 80 (ml)	-	-	-	1

โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่ 3 มาเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ มีการเจริญสูงสุดในอาหารดัดแปลงชุดที่ 3 รองลงมา คือ อาหารดัดแปลงชุดที่ 2 ชุดควบคุม และอาหารดัดแปลงชุดที่ 1 ตามลำดับ และมีการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง ในทุกชุดการทดลอง

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ พบว่า เชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงชุดที่ 3 ซึ่งมีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด 3.47±0.15 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ได้สูงสุด 2.63±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 75.79 ของมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง ส่วนในอาหารดัดแปลงชุดที่ 1, 2 และชุดควบคุม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่แตกต่างกัน ส่วนเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม และ BOT I พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารดัดแปลงชุดที่ 3 ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมงเช่นกัน สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 1.40±0.20 และ 2.53±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 84.34 และ 75.07 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-4 และภาพที่ 4-3



ภาพที่ 4-3 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสูตรอาหารดัดแปลง 3 สูตร โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A.latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II

ตารางที่ 4-4 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II ในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

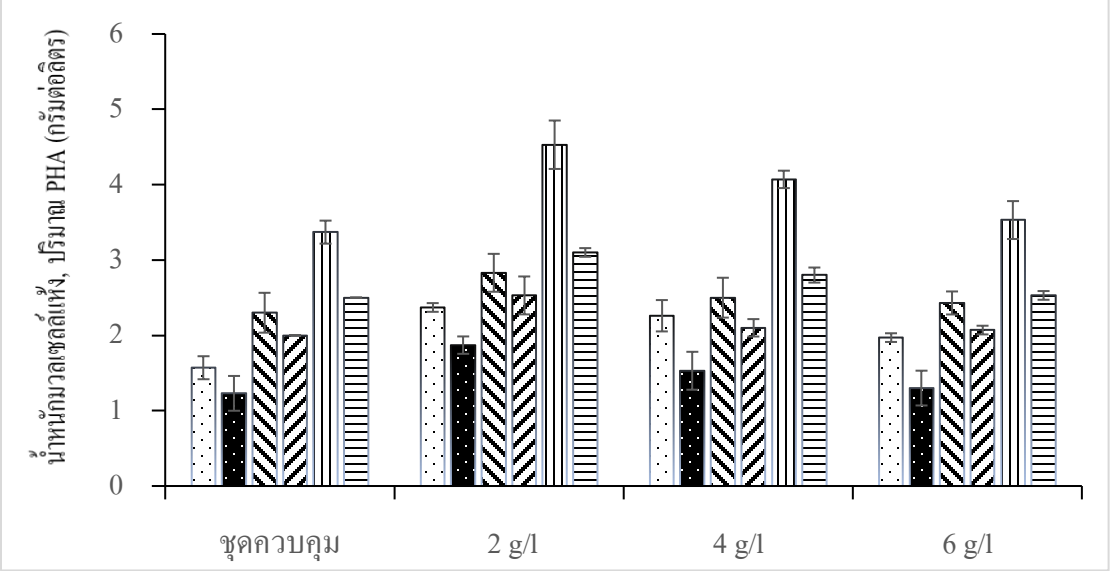
อาหารดัดแปลงชุดที่	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			PHAs (กรัมต่อลิตร)			PHAs (ร้อยละ)		
	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II
ชุดควบคุม	1.60±0.10	1.63±0.09	1.57±0.15	0.97±0.06	1.00±0.00	1.03±0.23	60.63	61.35	65.61
อาหารดัดแปลงชุดที่ 1	1.23±0.15	2.47±0.15	2.53±0.21	1.17±0.06	1.60±0.10	1.80±0.15	95.12	64.78	71.15
อาหารดัดแปลงชุดที่ 2	1.37±0.12	3.00±0.10	3.06±0.15	1.23±0.21	1.86±0.06	1.96±0.06	89.78	41.00	64.05
อาหารดัดแปลงชุดที่ 3	1.66±0.15	3.37±0.12	3.47±0.15	1.40±0.20	2.53±0.06	2.63±0.06	84.34	75.07	75.79

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ น้ำตาลฟรุกโตส 20 ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร

1.4 ผลของความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการศึกษาความเข้มข้นผงชูรสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยทำการปรับความเข้มข้นของผงชูรส (ตราถ้วยแดง) เริ่มต้นเท่ากับ 0.5, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ความเข้มข้นผงชูรสเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกชุดการทดลอง ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้ง สามสายพันธุ์ มีการเจริญสูงสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของผงชูรส 2 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ความเข้มข้นของผงชูรส 4, 0.5 และ 6 กรัมต่อลิตร โดยการเจริญสูงสุดชั่วโมงที่ 48 ในทุกชุดการทดลอง

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงมีความเข้มข้นของผงชูรสเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 4.53±0.32 และ 3.10±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 68.43 ของมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง รองลงมา คือ ความเข้มข้นผงชูรส 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่ามวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงกว่าชุดควบคุม ส่วนในเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม และ BOT I พบว่าในสูตรอาหารดัดแปลงมีความเข้มข้นของผงชูรสเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง 2.37±0.06 และ 2.83±0.25 และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ 1.87±0.16 และ 2.53± 0.25 คิดเป็นร้อยละ 78.90 และ 89.40 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-5 และภาพที่ 4-4



ภาพที่ 4-4 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในความเข้มข้นผงชูรสที่แตกต่างกัน โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A.latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II

ตารางที่ 4-5 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของผงชูรสแตกต่างกัน

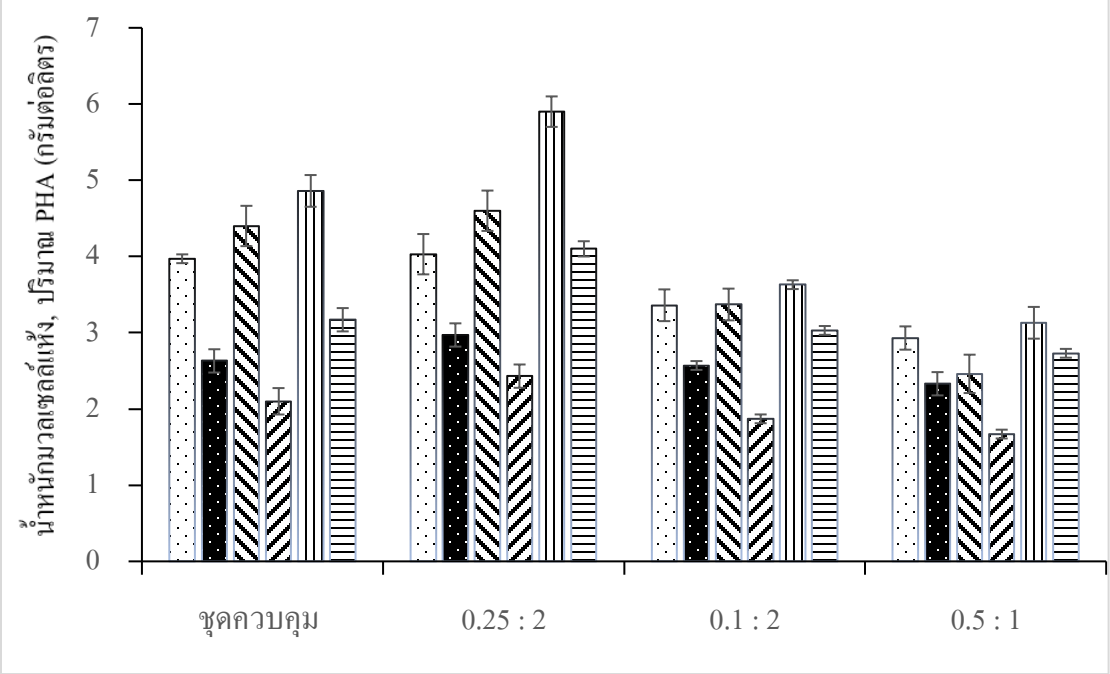
ความเข้มข้นของผงชูรส (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร)			PHAs (ร้อยละ)		
	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II
ชุดควบคุม	1.57±0.15	2.30±0.26	3.37±0.15	1.23±0.23	2.00±0.00	2.50±0.00	78.34	86.96	74.18
2	2.37±0.06	2.83±0.25	4.53±0.32	1.87±0.16	2.53±0.25	3.10±0.06	78.90	89.40	68.43
4	2.26±0.21	2.50±0.26	4.07±0.12	1.53±0.25	2.10±0.16	2.80±0.10	67.70	84.00	68.80
6	1.97±0.06	2.43±0.15	3.53±0.25	1.30±0.23	2.07±0.26	2.53±0.06	65.99	85.19	71.67

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ ความเข้มข้นของผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร

1.5 ผลของการอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการศึกษาความเข้มข้นผงชูรสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยทำการปรับอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2, 0.25:2, 0.10:2, 0.5:1, 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกชุดการทดลอง ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ มีการเจริญอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 6-12 และเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารชุดที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.25:2 กรัมต่อลิตร มีการเจริญสูงสุด รองลงมา คือ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:0.5, 0.10:2, 0.5:1 และ 0.25:2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ในการเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ ในอาหารที่มีการทดแทนแหล่งไนโตรเจนโดยการใช้แอมโนเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.25:2 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 48 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 5.90±0.20 และ 4.10±0.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 69.49 รองลงมา คือ สูตรอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2, 0.10:2, 0.5:1 และ 0.5:0.5 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *A. latus* ดั้งเดิมและสายพันธุ์ BOT I ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสอัตราส่วน 0.25:2 มีมวลเซลล์แห้ง เท่ากับ 4.03± 0.26 และ 4.60±0.26 ส่วนปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต มีค่าเท่ากับ 2.97±0.15 และ 2.43±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 73.70 และ 52.83 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-6 และเมื่อนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตให้ชัดเจนมากขึ้น ในระยะเวลาการเลี้ยงที่ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-5



ภาพที่ 4-5 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A.latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II

ตารางที่ 4-6 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม BOT I และ BOT II ในอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสแตกต่างกัน

แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร)			PHAs (ร้อยละ)		
	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II	สายพันธุ์ดั้งเดิม	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II
ชุดควบคุม	3.97±0.06	4.40±0.26	4.86±0.21	2.63±0.15	2.10±0.17	3.17±0.15	66.25	47.73	65.23
0.25:2	4.03±0.26	4.60±0.26	5.90±0.20	2.97±0.15	2.43±0.15	4.10±0.10	73.70	52.83	69.49
0.10:2	3.36±0.21	3.37±0.21	3.36±0.06	2.57±0.06	1.87±0.06	3.03±0.06	76.49	55.49	90.18
0.5:1	2.93±0.15	2.46±0.25	3.13±0.21	2.33±0.15	1.67±0.06	2.73±0.06	79.52	67.89	87.22
0.5:0.5	2.13±0.12	2.13±0.25	2.97±0.15	1.60±0.10	1.67±0.06	2.30±0.26	75.12	78.40	77.44

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส เท่ากับ 0.5:2

2. ผลการศึกษาสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

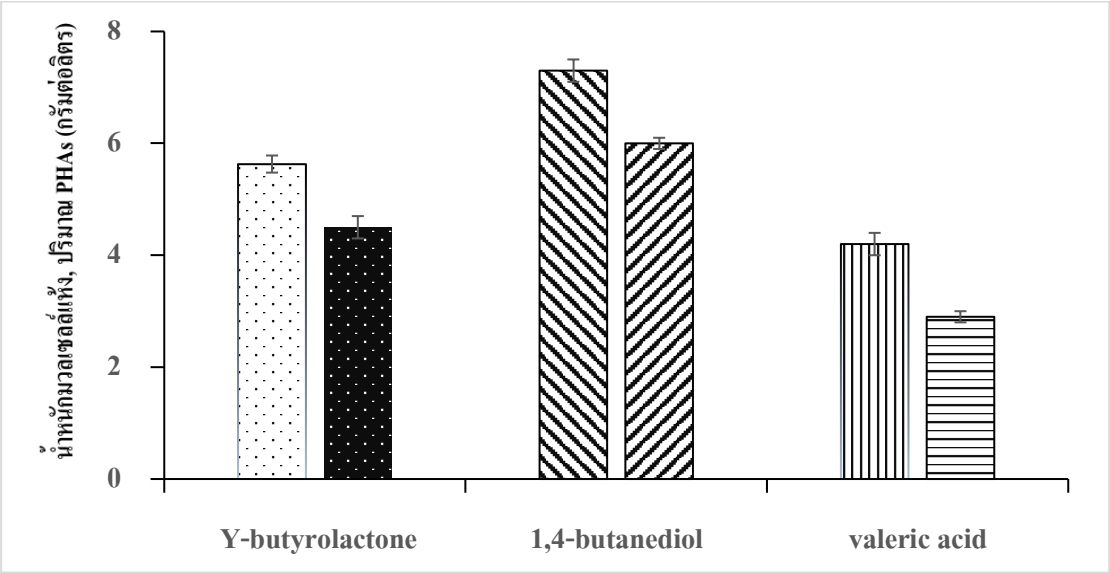
2.1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

การเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจากข้อการศึกษาที่ 1 โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร มีอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.25:2 และทำการเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกชุดการทดลอง จากนั้นทำการเปรียบเทียบชนิดของสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ 3 ชนิด คือ แกมม่า-บิวทาโรแลกโตน ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร (Park & Kim, 2011), 1,4-บิวเทนไดออล ปริมาณร้อยละ 25 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ของแหล่งคาร์บอน (Chanprateep et al., 2010), กรดวาเลอริก ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร (Chanprateep & Kulpreecha, 2006) ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOI II ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารกระตุ้น 1,4-บิวเทนไดออล มีการเจริญสูงสุด โดยมีการเจริญอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 6-12 และการเจริญสูงสุดชั่วโมงที่ 24 และลดลงหลังจากเลี้ยงเชื้อไป 24 ชั่วโมง และการเจริญเพิ่มขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 48 ในทุกชุดการทดลอง

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มี 1,4-บิวเทนไดออล ในชั่วโมงที่ 72 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด 7.30±0.20 กรัมต่อลิตร และพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ 6.00±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82.19 รองลงมา คือ แกมม่า-บิวทาโรแลกโตน และกรดวาเลอริก โดยสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด 5.63±0.15 และ 4.20±0.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ 4.50±0.20 2.90±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.93 และ 69.05 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-7 และภาพที่ 4-6

ตารางที่ 4-7 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 72 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีสารกระตุ้นชนิดต่าง ๆ ดังนี้

ชนิดของสารกระตุ้น	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร)	PHAs (ร้อยละ)
γ-butyrolactone	5.63±0.15	4.50±0.20	79.93
1,4-butanediol	7.30±0.20	6.00±0.10	82.19
valeric acid	4.20±0.20	2.90±0.10	69.05



ภาพที่ 4-6 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์แตกต่างกัน โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีแกมม่า-บิวทาโรแลกโตน
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีแกมม่า-บิวทาโรแลกโตน
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มี 1,4-บิวเทนไดออล
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มี 1,4-บิวเทนไดออล
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีกรดวาเลอริก
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีกรดวาเลอริก

2.2 ผลการเปรียบเทียบน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

ในการศึกษาการเปรียบเทียบน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในสูตรอาหารที่ได้จากข้อการศึกษาที่ 1 โดยเปรียบเทียบน้ำมันชนิดต่าง ๆ คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวโพด น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเจริญลดลงหลังจากเลี้ยงเชื้อไป 24 ชั่วโมง และเริ่มคงที่ในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารที่มีน้ำมันทานตะวันเป็นแหล่งคาร์บอนมีการเจริญสูงสุด รองลงมา คือ น้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันข้าวโพด

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II พบว่าเชื้อสายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในชั่วโมงที่ 72 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 7.67±0.15 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ น้ำมันทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันปาล์ม ได้เท่ากับ 7.40±0.25, 7.00±0.61, 6.97±0.40 และ 6.63±0.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตพบว่า น้ำมันข้าวโพด สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 6.13±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 87.85 รองลงมา คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันข้าวโพด คิดเป็นร้อยละ 79.00, 79.49, 68.92 และ 65.58 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-8 เมื่อนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตให้ชัดเจนมากขึ้น ในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นที่เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-7

ตารางที่ 4-8 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 72 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้น ดังนี้

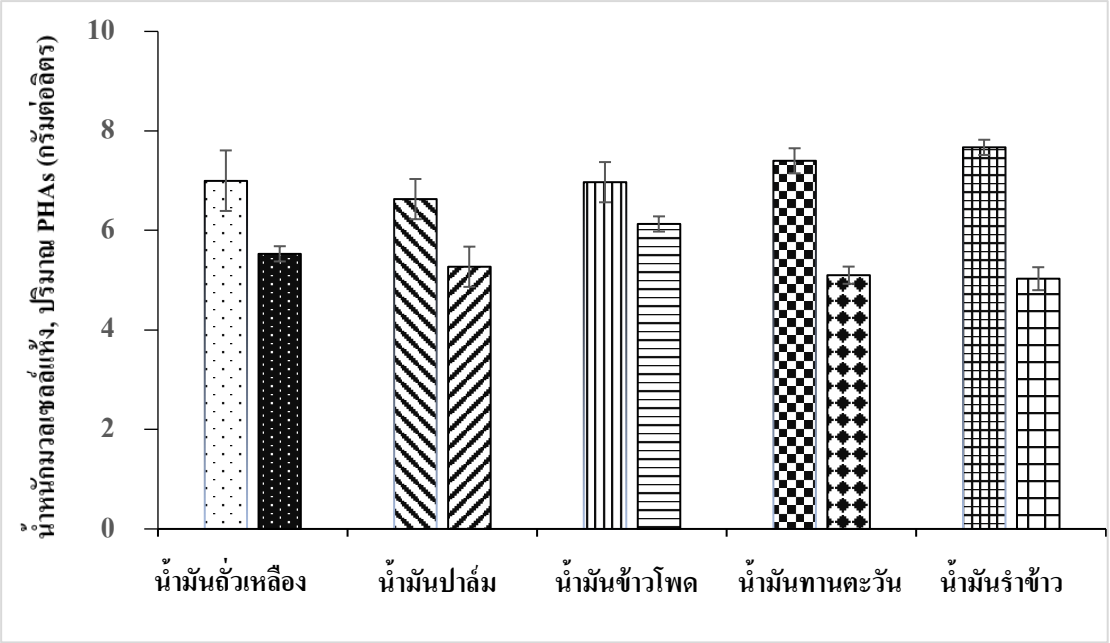
ชนิดของน้ำมัน	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร)	PHAs (ร้อยละ)
น้ำมันถั่วเหลือง	7.00±0.60	5.53±0.15	79.00
น้ำมันปาล์ม	6.63±0.40	5.27±0.40	79.49
น้ำมันข้าวโพด	6.97±0.40	6.13±0.15	87.85
น้ำมันทานตะวัน	7.40±0.25	5.10±0.17	68.92
น้ำมันรำข้าว	7.67±0.15	5.03±0.23	65.58

2.3 ผลการใช้น้ำมันปาล์มร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากจุดประสงค์ของการศึกษาที่ต้องการใช้สารอาหารราคาถูก ในการศึกษานี้จึงได้ทำการเลือกน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องน้ำมันปาล์มหาได้ง่ายและมีราคาถูก จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารที่ได้จากข้อการศึกษาที่ 1 เพื่อเปรียบเทียบน้ำมันปาล์มร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ ร้อยละ 15, 25,50 และ 75 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ของแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเจริญลดลงหลังจากเลี้ยงเชื้อไป 24 ชั่วโมง และเริ่มคงที่ในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารที่มีสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50 มีการเจริญสูงสุด รองลงมา คือ ร้อยละ 75, 25 และ 15 ตามลำดับ

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 ในชั่วโมงที่ 72 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เท่ากับ 7.10±0.20 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ความเข้มข้นร้อยละ 75, 25 และ 15 ได้เท่ากับ 6.80±0.10, 6.70±0.50 และ 6.40±0.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตพบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 5.63±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็น

ร้อยละ 79.30 รองลงมา คือ ความเข้มข้นร้อยละ 75, 25 และ 15 คิดเป็นร้อยละ 81.91, 82.54 และ 83.28 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-9 และภาพที่ 4-8



ภาพที่ 4-7 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นที่เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองแหล่งคาร์บอน
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองแหล่งคาร์บอน
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีน้ำมันถั่วปาล์มแหล่งคาร์บอน
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีน้ำมันถั่วปาล์มแหล่งคาร์บอน
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีน้ำมันข้าวโพดแหล่งคาร์บอน
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีน้ำมันข้าวโพดแหล่งคาร์บอน
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีน้ำมันทานตะวันแหล่งคาร์บอน
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีน้ำมันทานตะวันแหล่งคาร์บอน
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีน้ำมันรำข้าวแหล่งคาร์บอน
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีน้ำมันรำข้าวแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4-9 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 72 ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออลความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

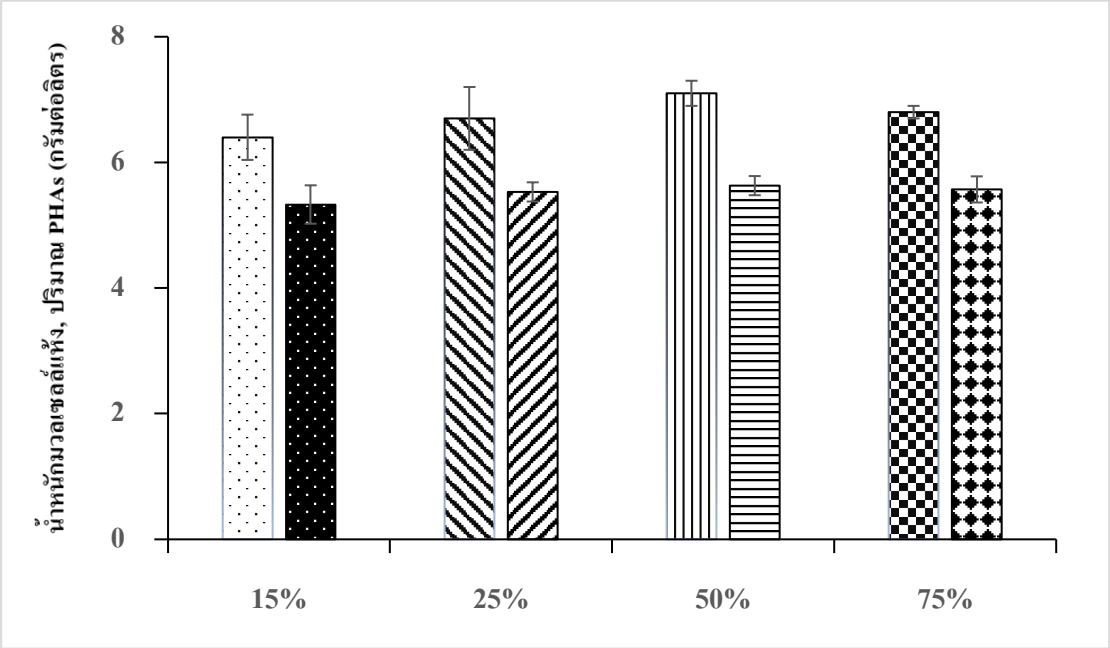
ความเข้มข้นของ 1,4-butanediol	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร)	PHAs (ร้อยละ)
15%	6.40±0.36	5.33±0.30	83.28
25%	6.70±0.50	5.53±0.15	82.54
50%	7.10±0.20	5.63±0.15	79.30
75%	6.80±0.10	5.57±0.20	81.91

2.4 ผลการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนประเภทน้ำตาลร่วมกับสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจากส่วนที่ 1 โดยปรับแหล่งคาร์บอนเป็นเด็กซ์โตรส น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง และฟรุคโตสความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ชนิดโพรพิโอนิคและอะซิเตทความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร โดยอะซิเตทและโพรพิโอนิคมีปริมาณ 28.75 และ 1.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 6-36 ชั่วโมง และมีการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร มีการเจริญดีที่สุด รองลงมา คือ เด็กซ์โตรสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ฟรุตโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 24 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด 7.10±0.00 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ฟรุคโตสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เด็กซ์โตรสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ฟรุคโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ได้เท่ากับ 6.47±0.51, 6.33±0.65, 6.07±0.21, 5.80±0.26 และ 5.35±0.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนพอลิไฮดรอกซีอัลคา

โนเอต พบว่าเด็กซ์โตรสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 5.80±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 81.69 รองลงมา คือ ฟรุคโตสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร, เด็กโตสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ฟรุคโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร น้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 83.93, 81.04, 83.52, 82.24 และ 72.41 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-10 และภาพที่ 4-9

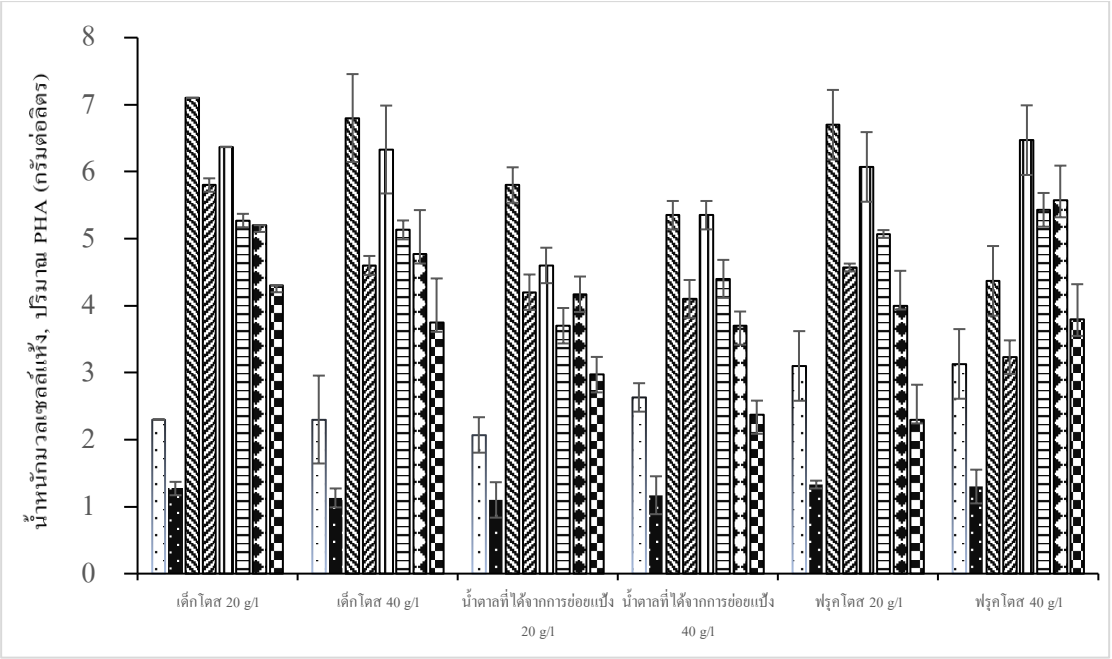


ภาพที่ 4-8 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดในสูตรอาหารที่มีน้ำมันปาล์มร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มี 1,4-บิวเทนไดออลร้อยละ 15
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มี 1,4-บิวเทนไดออลร้อยละ 15
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มี 1,4-บิวเทนไดออลร้อยละ 25
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มี 1,4-บิวเทนไดออลร้อยละ25
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มี 1,4-บิวเทนไดออลร้อยละ 50
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มี 1,4-บิวเทนไดออลร้อยละ 50
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มี 1,4-บิวเทนไดออลร้อยละ 75
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มี 1,4-บิวเทนไดออลร้อยละ 75

ตารางที่ 4-10 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 24 ของเชื้อ A. latus สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นโพรพิโอนิคและอะซิเตท

แหล่งคาร์บอน (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร)	PHAs (ร้อยละ)
เด็กซ์โตรส 20	7.10±0.00	5.80±0.10	81.69
เด็กซ์โตรส 40	6.33±0.65	5.13±0.14	81.04
น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง 20	5.80±0.26	4.20±0.26	72.41
น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง 40	5.35±0.21	4.40±0.28	82.24
ฟรุคโตส 20	6.07±0.21	5.07±0.05	83.52
ฟรุคโตส 40	6.47±0.51	5.43±0.25	83.93



ภาพที่ 4-9 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นโพรพิโอนิคและอะซิเตทที่เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง 20 กรัมต่อลิตร
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง 20 กรัมต่อลิตร
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง 40 กรัมต่อลิตร
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง 40 กรัมต่อลิตร
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีฟรุคโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีฟรุคโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีฟรุคโตสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีฟรุคโตสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร

3. ผลการศึกษาวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 48 โดยทำการเก็บตัวอย่างหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นทำการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

3.1 ผลการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์ม

นำตะกอนเซลล์ตัวอย่างของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์มต่อตัวอย่างที่ 1:1 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนไปทำการกรองเพื่อเก็บส่วนคลอโรฟอร์มมาตกตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนตะกอนไปล้างด้วยด้วยอะซิโตน 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำตะกอนไปละลายในคลอโรฟอร์มร้อน ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องจนคลอโรฟอร์มระเหยออกหมด จากนั้นนำตะกอนตัวอย่างมาเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 98 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานโครโตนิก พบว่าการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์มมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนต เท่ากับ 1.13±0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2 ผลการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์มร่วมกับไฮโปคลอไรท์

นำตะกอนเซลล์ตัวอย่างของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มาทำการเติมไฮโปคลอไรท์และคลอโรฟอร์มร้อนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมคลอโรฟอร์มร้อนปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองเพื่อเก็บส่วนคลอโรฟอร์มมาตกตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนมาล้างด้วยอะซิโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำตะกอนไปละลายในคลอโรฟอร์มร้อน ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนคลอโรฟอร์มระเหยออกหมด จากนั้นนำตะกอนตัวอย่างมาเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 98 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และ

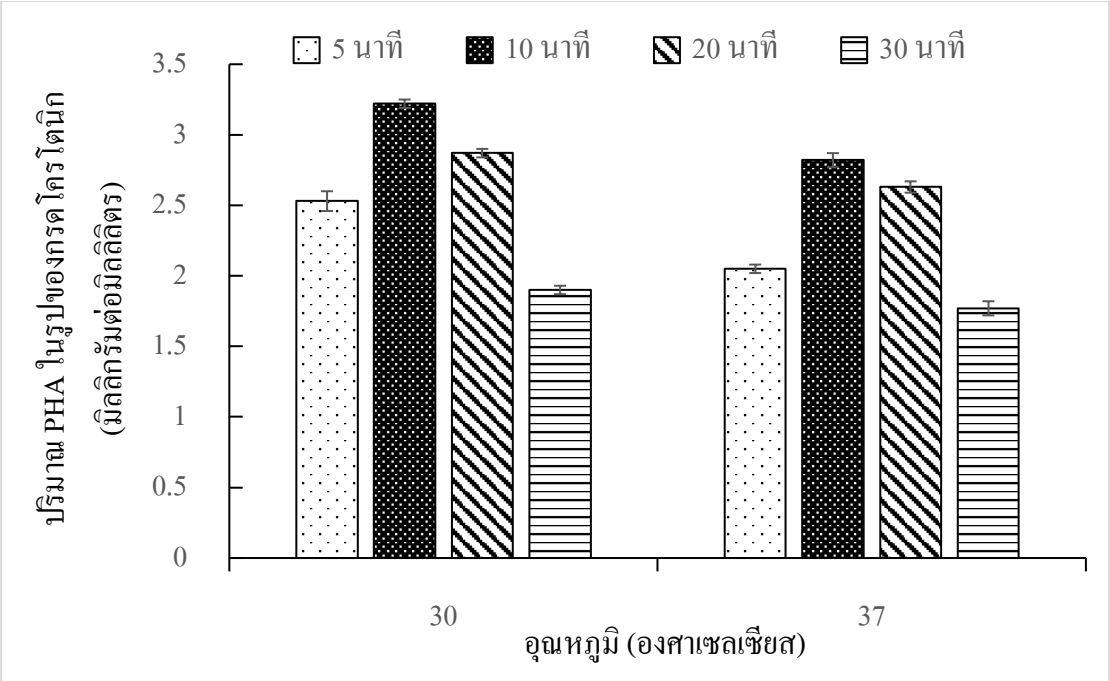
นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานโครโตนิก พบว่าการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์มร่วมกับไฮโปคลอไรท์มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนต เท่ากับ 1.47±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 ผลการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้ไฮโปคลอไรท์

นำตะกอนเซลล์ตัวอย่างของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ไปทำการเติมไฮโปคลอไรท์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบเป็นเวลา 20 นาที ทำการล้างตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาทำการเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 98 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานโครโตนิก พบว่าการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้ไฮโปคลอไรท์ มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ 2.28±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.1 ผลการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน

นำตะกอนเซลล์ตัวอย่างมาทำการเติมไฮโปคลอไรท์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณภูมิต่างแตกกัน คือ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาทำการเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 98 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานโครโตนิก โดยการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน พบว่าที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด เท่ากับ 3.22±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4-10 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จากการสกัดตัวอย่างวิธีไฮโปคลอไรท์ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน

จากการศึกษาการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่อนำมาเปรียบเทียบดังแสดงในตารางที่ 4-11 พบว่าวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด เท่ากับ 3.22±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

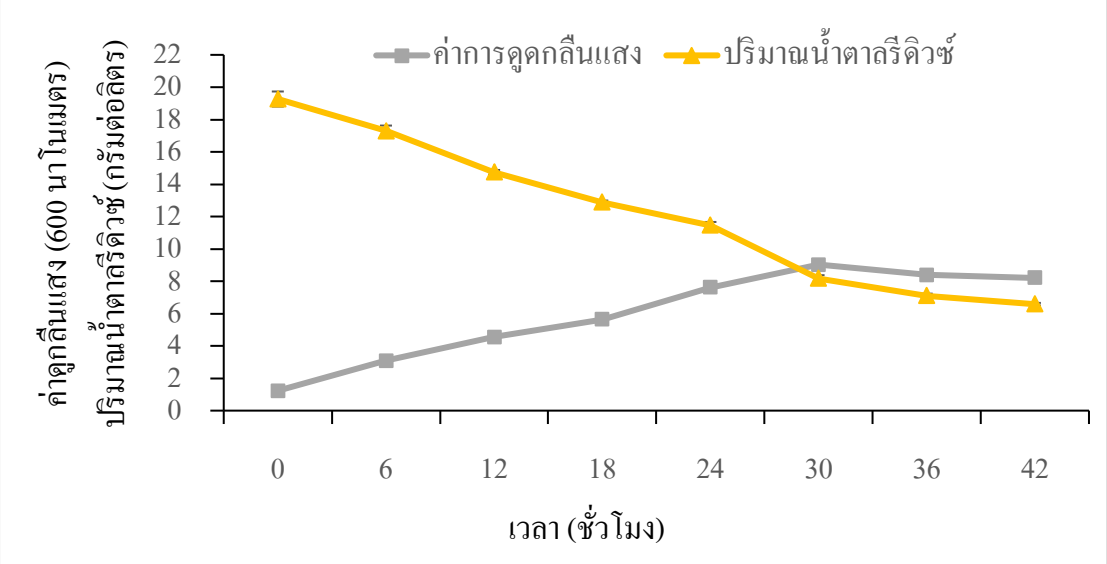
ตารางที่ 4-11 การเปรียบเทียบการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีการต่าง ๆ

วิธีการสกัด	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1. การสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์ม	1.13±0.02
2. การสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์มร่วมกับไฮโปคลอไรท์	1.47±0.03
3. การสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์	2.28±0.03

วิธีการสกัด	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
4. การสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน	3.22±0.03

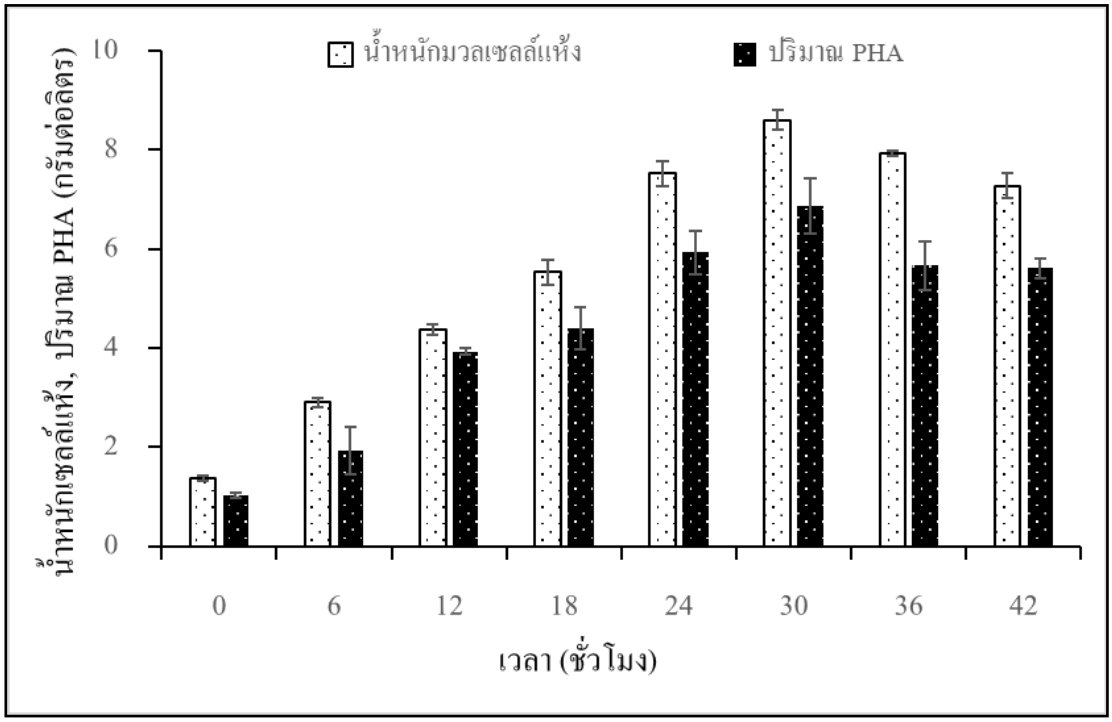
4. ผลของการขยายขนาดการเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ (Batch Culture)

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ขนาด 5 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เติมลงในอาหารปริมาตร 3 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 200 รอบต่อนาที กำหนดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 vvm และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 นอร์มอล ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง และสูงสุดที่ 30 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการลดลงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่ระยะเวลา 42 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือภายในถังหมัก เท่ากับ 6.58±0.08 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4-11



ภาพที่ 4-11 การเจริญและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 42 ชั่วโมง

จากการศึกษาเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II พบว่าในการเลี้ยงที่ 30 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 8.60±0.20 และ 6.87±0.57 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.88 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงในภาพที่ 4-12

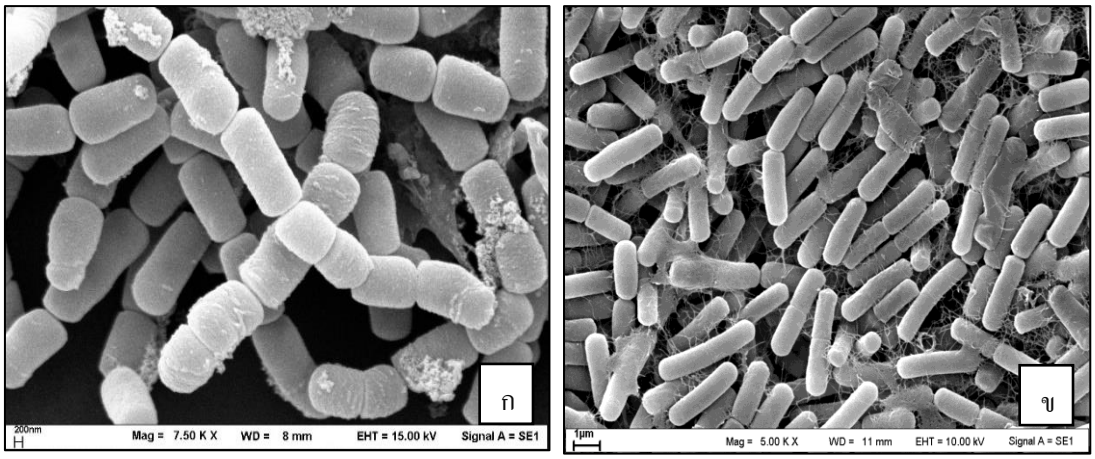


ภาพที่ 4-12 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 42 ชั่วโมง

5. การศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรีย

5.1 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

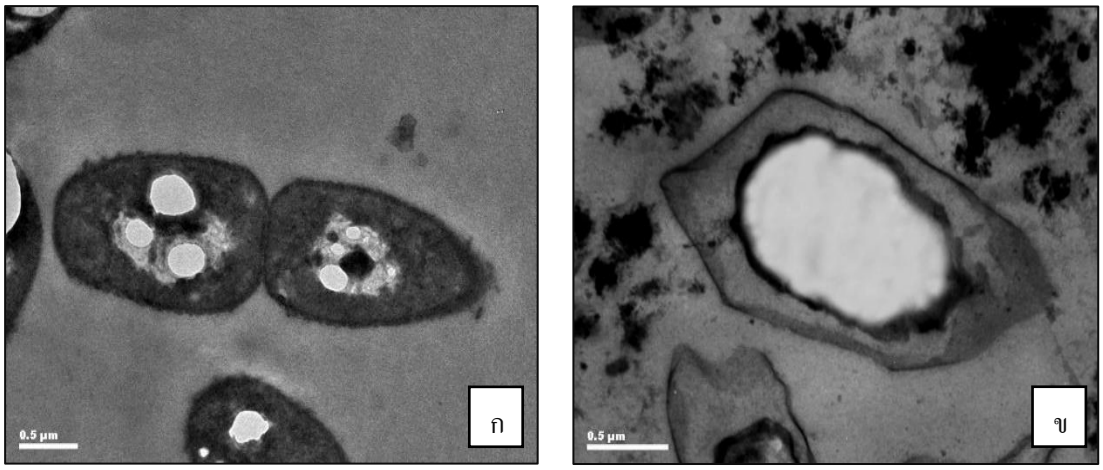
เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาขั้นต้น จากนั้นนำมาทำการตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่ารูปร่างของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีลักษณะเป็นท่อนสั้น และมีขนาดใหญ่ เนื่องจากมีการสะสมของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเกิดขึ้นภายในเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 4-13 (ก) โดยเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับรายงานของจารุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ, (2557) พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์กลายซ้ำ มีลักษณะเป็นท่อนยาวกว่า ดังแสดงในภาพที่ 4-13 (ข)



ภาพที่ 4-13 (ก) ลักษณะของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II และ (ข) เชื้อ *A. latus* สายพันธุ์กลายซ้ำ อ้างอิงจากจารุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ, (2557) ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

5.2 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาขั้นต้น จากนั้นนำมาทำการตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้าง ขนาดใหญ่ ลักษณะค่อนข้างกลม เนื่องจากมีการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในแกรนูล และเมื่อเชื้อถูกกระตุ้นทำให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ขึ้นมา จะพบก้อนสีดำลักษณะกลมปะปนอยู่ภายในเซลล์ คาดว่าเป็นชิ้นส่วนของโคพอลิเมอร์ ดังแสดงในภาพที่ 4-14 (ก) โดยเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับรายงานของจารุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ, (2557) พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์กลายซ้ำมีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในแกรนูลปริมาณสูงกว่า และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่กว่า แต่ไม่พบก้อนสีดำลักษณะกลมปะปนอยู่ภายในเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 4-14 (ข)



ภาพที่ 4-14 (ก) ลักษณะของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II และ (ข) เชื้อ *A. latus* สายพันธุ์กลายซ้ำ อ้างอิงจากจารุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ, (2557) ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

1.1 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารดัดแปลงสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตทั้ง 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 เป็นสูตรของ DSMZ catalogue และคณะ (1993) สูตรที่ 2 เป็นสูตรดัดแปลง DSMZ catalogue และคณะ (1993) และสูตรที่ 3 เป็นของ Park and Kim (2011) พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดในอาหารสูตรที่ 3 แต่มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 โดยเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ มีค่าเท่ากับ 1.87±0.10 และ 1.73±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 92.51 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนในเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ BOT I พบว่า เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 1.90±0.72 และ 1.83±0.09 กรัมต่อลิตร มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ 1.55±0.37 และ 1.53±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 81.58 และ 94.55 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ เนื่องจากในอาหารสูตรที่ 2 เป็นการดัดแปลงจากสูตรอาหารที่ 1 โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลฟรุกโตสเป็นน้ำมันถั่วเหลือง จึงทำให้มีปริมาณแหล่งคาร์บอนสูงกว่าในอาหารสูตรที่ 1 ที่ใช้น้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน อีกทั้งในอาหารสูตรที่ 2 มีการใช้ทวีน 80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว ส่งผลทำให้จุลินทรีย์ได้รับสารอาหารได้ดีมากขึ้น และมีสารอาหารที่ต้องการปริมาณน้อย (Micronutrients) ครบถ้วน และสูงกว่าในอาหารสูตรที่ 3 ที่มีส่วนประกอบของสารอาหารน้อยชนิดกว่า จากการศึกษาครั้งนี้ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซอัลคาโนเอตต่ำกว่ารายงานของ Park and Kim (2011) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Ralstonia eutropha* ในการผลิตโคพอลิเมอร์ โดยใช้น้ำถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน พบว่าเมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 20 กรัม สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต และปริมาณพอลิไฮดรอกซอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ 8.30 และ 7.40 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 88 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงทั้งสามสายพันธุ์ในสูตรอาหารที่ 2 ที่มีน้ำมันความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่ง

คาร์บอนเหมาะสมในการนำมาใช้ เนื่องจากเชื้อสามารถสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ได้สูงที่สุด

1.2 ผลการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากจุดประสงค์ของการศึกษาเพื่อต้องการใช้สารอาหารราคาถูกมาเป็นสารตั้งต้นให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในกระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ดังนั้นในครั้งนี้ได้เลือกใช้น้ำมันถั่วเหลืองมาเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน เนื่องจากน้ำมันถั่วเหลืองมีปริมาณคาร์บอนมากกว่าน้ำตาลฟรุกโตส จึงคาดว่ามีผลทำให้มีพลังงานในการเจริญเติบโตและผลิตผลิตภัณฑ์ได้มากกว่า

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II ในสูตรอาหารที่ 2 ซึ่งใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยทำการปรับความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองเป็น 10, 20, 40 และ 60 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่มีน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ มีการเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตรสูงกว่าชุดควบคุม โดยมีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง และมีการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง ในทุกชุดการทดลอง

จากการศึกษา เชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ 2.53±0.06 และ 1.93±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 76.28 ของมวลเซลล์แห้ง และพบว่าที่ความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 60 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้รองลงมา มีค่าเท่ากับ 1.85±0.21 และ 1.70±0.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่มากเกินไปอาจส่งผลให้ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (substrate inhibition) ทำให้สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลาโนเอตได้น้อยลง ดังนั้นความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ส่วนในเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ BOT I พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 2.00±0.06 และ 2.27±0.07 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ 1.40±0.10 และ 1.47±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 70.00 และ 65.33 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ โดยการศึกษาในครั้งนี้มีค่าต่ำกว่าการศึกษาของ Park and Kim (2011) รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อ *Ralstonia eutropha* ในการผลิตโคพอลิเมอร์ที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด

เท่ากับ 8.3 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณโคพอลิเมอร์ เท่ากับ 7.4 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 88 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

1.3 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยทำการปรับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นทั้งหมด 3 ชุด เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงชุดที่ 3 มีการเจริญสูงสุด ซึ่งมีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด 3.47±0.15 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด 2.63±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 75.79 ของมวลเซลล์แห้ง และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่ามีค่าสูงกว่า ส่วนเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม และ BOT I พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารดัดแปลงชุดที่ 3 เช่นกัน สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 1.40±0.20 และ 2.53±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 84.34 และ 75.07 ตามลำดับ จากการใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ ส่งผลทำให้ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากในแอมโนเนียมคลอไรด์เป็นอนินทรีย์ไนโตรเจน ส่วนในผงชูรสจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนต่าง ๆ ซึ่งโดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอนินทรีย์ไนโตรเจน (ปราณี นิมิบุตร, 2549) โดยการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Quillaguamán et al. (2008) ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Halomonas Boliviensis* ในการเลี้ยงแบบเติมกะ โดยใช้ผงชูรสความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 44 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตร้อยละ 81 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และพบว่ามีปริมาณพลาสติกชีวภาพต่ำกว่ารายงานสุพัฒน์ ชมใจ และรสมันต์ จงเจริญ (2555) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตของ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 เมื่อใช้เด็กซ์โตรสและผงชูรสเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยมีอัตรา C:N เท่ากับ 20:2 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต ได้เท่ากับ 4.86 และ 3.92 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 80.60 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

1.4 ผลของความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการศึกษาความเข้มข้นผงชูรสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยทำการปรับความเข้มข้นของผงชูรส (ตราถ้วยแดง) เริ่มต้นเท่ากับ 0.5, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ความเข้มข้นผงชูรสเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกชุดการทดลอง พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้ง สามสายพันธุ์ มีอัตราการเจริญสูงสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของผงชูรส 2 กรัมต่อลิตร

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงมีความเข้มข้นของผงชูรสเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 4.53±0.32 และ 3.10±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 68.43 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งมีค่ามวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงกว่าชุดควบคุม ส่วนในเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม และ BOT I พบว่าในสูตรอาหารดัดแปลงมีความเข้มข้นของผงชูรสเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง 2.37±0.06 และ 2.83±0.25 และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ 1.87±0.16 และ 2.53± 0.25 คิดเป็นร้อยละ 78.90 และ 89.40 ตามลำดับ การใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นผงชูรสที่เหมาะสม เนื่องจากผงชูรสยังมีสารอื่น ๆ เช่น กรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่ามีปริมาณพลาสติกชีวภาพต่ำกว่ารายงานของสุพัฒน์ ชมใจ และรสมันต์ จงเจริญ (2555) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 โดยใช้เด็กซ์โตรสเป็นแหล่งคาร์บอนในอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:2, 20:4, 20:6, 20:8 และ 20:10 พบว่าการใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจนที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:2 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต เท่ากับ 4.86 และ 3.92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 80.60 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และพบว่ามีค่าพลาสติกชีวภาพสูงกว่ารายงานของขวัญจันทร์ แก้วจันทร์ (2554) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซิเตรท และยูเรียความเข้มข้น 1.4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่ง

ไนโตรเจนทดแทน พบว่าการใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังร้อยละ 50 ร่วมกับแอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้น 1.4 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณพลาสติกชีวภาพ เท่ากับ 2.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 39.61 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

1.5 ผลของการอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการศึกษาความเข้มข้นผงชูรสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยทำการปรับอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2, 0.25:2, 0.10:2, 0.5:1, 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกชุดการทดลอง พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 6-12 และเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารชุดที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.25:2 กรัมต่อลิตร มีการเจริญสูงสุด รองลงมา คือ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:0.5, 0.10:2, 0.5:1 และ 0.25:2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ในการเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ ในอาหารที่มีการทดแทนแหล่งไนโตรเจนโดยการใช้แอมโนเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.25:2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ 5.90±0.20 และ 4.10±0.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 69.49 ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม ส่วนเชื้อ *A. latus* ดั้งเดิมและสายพันธุ์ BOT I ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสอัตราส่วน 0.25:2 มีมวลเซลล์แห้ง เท่ากับ 4.03± 0.26 และ 4.60±0.26 ส่วนปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต มีค่าเท่ากับ 2.97±0.15 และ 2.43±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 73.70 และ 52.83 ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงทั้งสามสายพันธุ์ในสูตรอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.25:2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ เนื่องจากเชื้อสามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด โดยการศึกษาในครั้งนี้มีค่าพลาสติกชีวภาพต่ำกว่ารายงานของจารุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ, (2557) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์กลายพันธุ์ โดยใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น

30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง เท่ากับ 7.85 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไอดรอกซีบิวทีเรต เท่ากับ 6.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 78.34 ของมวลเซลล์แห้ง

2. ผลการเติมสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

2.1 ผลการเปรียบเทียบชนิดของสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

ในการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจากข้อการศึกษาที่ 1 โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร มีอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.25:2 และทำการเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกชุดการทดลอง จากนั้นทำการเปรียบเทียบชนิดของสารกระตุ้นให้เกิดการสร้าง 3 ชนิด คือ แกมม่า-บิวทาโรแลกโตน ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร (Park and Kim, 2011), 1,4-บิวเทนไดออล ปริมาณร้อยละ 25 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ของแหล่งคาร์บอน (Chanprateep et al., 2010) และกรดวาเลอริก ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร (Chanprateep & Kulpreecha, 2006) พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOI II ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารกระตุ้น 1,4-บิวเทนไดออล มีการเจริญสูงสุด โดยมีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 6-12 และอัตราการเจริญสูงสุดชั่วโมงที่ 24 และลดลงหลังจากเลี้ยงเชื้อไป 24 ชั่วโมง และการเจริญเพิ่มขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 48 ในทุกชุดการทดลอง

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มี 1,4-บิวเทนไดออล สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด 7.30±0.20 กรัมต่อลิตร และพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ 6.00±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82.19 รองลงมา คือ แกมม่า-บิวทาโรแลกโตน และกรดวาเลอริก โดยสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด 5.63±0.15 และ 4.20±0.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ 4.50±0.20 2.90±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.93 และ 69.05 ตามลำดับ จากการศึกษาในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chanprateep et al. (2010) ในการเลี้ยงเชื้อ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ A-04 แบบเติมกะ (Fed-Batch Culture) โดยใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออล ความเข้มข้นร้อยละ 50 พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เท่ากับ 112 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณ P(3HB-co-4HB) เท่ากับ 73 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีค่าพลาสติกชีวภาพรายงานต่ำกว่าของ Norhafini et al. (2017) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Cupriavidus* sp. ในการผลิต Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) โดยการเติม 1,6-เฮกซานีไดออลร้อยละ 0.1 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออลร้อยละ 0.5 (โดย

น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เท่ากับ 9.3 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลาโนเอต เท่ากับ 7.6 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

2.2 การเปรียบเทียบน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

ในการศึกษาการเปรียบเทียบน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในสูตรอาหารที่ได้จากข้อการศึกษาที่ 1 โดยเปรียบเทียบน้ำมันชนิดต่าง ๆ คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวโพด น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเจริญลดลงหลังจากเลี้ยงเชื้อไป 24 ชั่วโมง และเริ่มคงที่ในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารที่มีน้ำมันทานตะวันเป็นแหล่งคาร์บอนมีการเจริญสูงสุด รองลงมา คือ น้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันข้าวโพด

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II พบว่าเชื้อสายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เท่ากับ 7.67±0.15 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ น้ำมันทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันปาล์ม ได้เท่ากับ 7.40±0.25, 7.00±0.61, 6.97±0.40 และ 6.63±0.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่าน้ำมันข้าวโพด สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 6.13±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 87.85 รองลงมา คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันข้าวโพด คิดเป็นร้อยละ 79.00, 79.49, 68.92 และ 65.58 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต มีความใกล้เคียงกับน้ำมันข้าวโพด ได้เท่ากับ 6.63±0.40 และ 5.27±0.40 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อคิดในด้านเศรษฐศาสตร์การหมัก พบว่าน้ำมันปาล์ม มีราคาต่อหน่วยถูกกว่าน้ำมันข้าวโพด ซึ่งจากรายงานของ Park and Kim (2011) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* KCTC2662 ใช้น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ γ-butyrolactone ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture) พบว่าการใช้ γ-butyrolactone ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-4HB) ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 10-12 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตร้อยละ 80-83

2.3 การใช้น้ำมันปาล์มร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากจุดประสงค์ของการศึกษาที่ต้องการใช้สารอาหารราคาถูก ในการศึกษานี้จึงได้ทำการเลือกน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องน้ำมันปาล์มหาได้ง่ายและมีราคาถูก จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารที่ได้จากข้อการศึกษาที่ 1 เพื่อเปรียบเทียบน้ำมันปาล์มร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ ร้อยละ 15, 25,50 และ 75 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ของแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเจริญลดลงหลังจากเลี้ยงเชื้อไป 24 ชั่วโมง และเริ่มคงที่ในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารที่มีสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50 มีอัตราการเจริญสูงสุด รองลงมา คือ ร้อยละ 75, 25 และ 15 ตามลำดับ

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เท่ากับ 7.10±0.20 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ความเข้มข้นร้อยละ 75, 25 และ 15 ได้เท่ากับ 6.80±0.10, 6.70±0.50 และ 6.40±0.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตพบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 5.63±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.30 รองลงมา คือ ความเข้มข้นร้อยละ 75, 25 และ 15 คิดเป็นร้อยละ 81.91, 82.54 และ 83.28 ตามลำดับ เช่นเดียวกับรายงานงานวิจัยของ Chanprateep et al. (2010) ในการเลี้ยงเชื้อ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ A-04 แบบเติมกะ (Fed-Batch Culture) โดยใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออล ความเข้มข้นร้อยละ 50 พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 112 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณ P(3HB-co-4HB) เท่ากับ 73 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และสอดคล้องกับรายงานของ Rao, Sridhar, and Sehgal (2010) ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Cupriavidus necator* โดยใช้น้ำมันปาล์มที่ผ่านการใช้ความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ 1,4-บิวเทนไดออลในการผลิตโคพอลิเมอร์ โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไนโตรเจนจำกัด พบว่าในชั่วโมงที่ 144 สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดถึงร้อยละ 81 และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของพอลิเมอร์ได้อยู่ระหว่างร้อยละ 70 และ 81 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

2.4 การศึกษาการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนประเภทน้ำตาลร่วมกับสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจากส่วนที่ 1 โดยปรับแหล่งคาร์บอนเป็นเด็กซ์โตรส น้ำตาลที่ผ่านการย่อย และฟรุคโตสความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับโพรพิโอนิคและอะซิเตทความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร โดยอะซิเตทและโพรพิโอนิคมีปริมาณ 28.75 และ 1.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 6-36 ชั่วโมง และมีอัตราการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร มีการเจริญดีที่สุด รองลงมา คือ เด็กซ์โตรสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร น้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร น้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ฟรุตโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 24 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด 7.10±0.00 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ฟรุคโตสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เด็กซ์โตรสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ฟรุคโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร น้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ได้เท่ากับ 6.47±0.51, 6.33±0.65, 6.07±0.21, 5.80±0.26 และ 5.35±0.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่าที่เด็กซ์โตรสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 5.80±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 81.69 รองลงมา คือ ฟรุคโตสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เด็กซ์โตรสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ฟรุคโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร น้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 83.93, 81.04, 83.52, 82.24 และ 72.41 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของอรลดา สวาฤทธิ และคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของอะซิเตทและพิโอเนตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่าการใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรร่วมกับอะซิเตทและพิโอเนตความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 24 ชั่วโมง ของ

เชื้อ *A. latus* ให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งสุดสูง เท่ากับ 10.17 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 9.14 คิดเป็นร้อยละ 89.87 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และจากการศึกษาของ Reddy et al. (2016) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพของจุลินทรีย์ *Hydrogenophaga palleronii* ในการผลิต poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) และ poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) โดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ร่วมกับความเข้มข้นของอะซิเตทและโพพิโอเนตที่ 20 30 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนอะซิเตทและโพพิโอเนตที่ 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพสูงที่สุดร้อยละ 63

3. การศึกษาวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการศึกษาผลการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 48 พบว่าในการสกัดตัวอย่างโดยใช้คลอโรฟอร์ม สามารถให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ 1.13±0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์มร่วมกับไฮโปคลอไรท์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ให้ค่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ 1.47±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ พบว่าการใช้ไฮโปรคลอไรท์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร สามารถให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ 2.28±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยวิธีไฮโปรคลอไรท์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด เท่ากับ 3.22±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาในครั้งนี้ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีสูงกว่าบุษรา เชื้อหยก (2559) ได้ทำการศึกษาการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปรคลอไรด์ โดยใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่าได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต มีค่าเท่ากับ 1.71 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสอดคล้องกับรายงานของ Rawte and Mavinkurve (2002) ได้ทำการศึกษาการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทะเลด้วยวิธีการสกัดโดยใช้ไฮโปรคลอไรท์ ซึ่งบ่มเวลาที่แตกต่างกัน คือ 5, 10, 20, 40 และ 60 นาที พบว่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีแนวโน้มลดลงที่เวลา 20 นาที ขึ้นไป

4. ผลของการขยายขนาดการเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ (Batch Culture)

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ขนาด 5 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เติมลงในอาหารปริมาตร 3 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 200 รอบต่อนาที กำหนดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 vvm และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 นอร์มอล ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง และสูงสุดที่ 30 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการลดลงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่ระยะเวลา 42 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดคงเหลือภายในถังเท่ากับ 6.58±0.08 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ 8.6±0.2 และ 6.87±0.57 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.88 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยการศึกษาในครั้งนี้มีค่าสูงกว่ารายงานของขวัญใจ แก้วจันทร์ และคณะ, (2554) ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* TISTR ที่ผ่านการกลายด้วยการฉายรังสีแกมม่าร่วมกับการได้รับ 2-aminoanthracene การเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ขนาด 5 ลิตร พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตได้สูงสุด เท่ากับ 4.53 และ 2.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 54.52 ของมวลเซลล์แห้ง และพบว่ามีค่าต่ำกว่ารายงานของจารุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ, (2557) ที่ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์กลายซ้ำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ขนาด 5 ลิตร โดยใช้น้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เท่ากับ 18.73±0.06 และ 11.83±0.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 63.16 ของมวลเซลล์แห้ง

5. การศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรีย

5.1 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่ารูปร่างของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีลักษณะเป็นท่อนสั้น และมีขนาดใหญ่ เนื่องจากมีการสะสมของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งต่างจากรายงานของจารุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ, (2557) พบว่ารูปร่างของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์กลายซ้ำ มีลักษณะเป็นท่อนยาว และมีขนาดใหญ่

5.2 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้าง ขนาดใหญ่ ลักษณะค่อนข้างกลม เนื่องจากมีการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในแกรนูล และเมื่อเชื้อถูกกระตุ้นทำให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ขึ้นมา จะพบก้อนสีดำลักษณะกลมปะปนอยู่ภายในเซลล์ คาดว่าเป็นชิ้นส่วนของโคพอลิเมอร์ โดยเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับรายงานของจารุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ, (2557) พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์กลายซ้ำมีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในแกรนูลปริมาณสูงกว่า และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่กว่า แต่ไม่พบก้อนสีดำลักษณะกลมปะปนอยู่ภายในเซลล์

สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม สายพันธุ์ BOT I และสายพันธุ์ BOT II สามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.25:2 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ 5.90±0.20 และ 4.10±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 69.49 น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ 4.03± 0.26 และ 2.97±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 73.70 น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และ

เชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ได้เท่ากับ 4.60±0.26 และ 2.43±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 52.83 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

สำหรับวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปของกรดโครโตนิก โดยการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปรคลอไรท์ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน พบว่าที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด เท่ากับ 3.22±0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธีการนี้จะมีการใช้สารเคมีที่มีความเป็นอันตรายน้อย และระยะเวลาการสกัดที่สั้น เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ 8.6±0.20 และ 6.87±0.57 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.88 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

บรรณานุกรม

เขมรัฐ เขมวงศ์. (2550). *การคัดเลือกและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์กลาย*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จารุวรรณ ศรีเส็ง. (2557). *การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายและการปรับสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมโดยการเพาะเลี้ยงแบบกะและเติมกะ*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ธงชัย วงศ์สุวรรณ. (2550). *การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้กรดคาร์บอกซิลิกที่ได้จากเส้นใยปาล์ม*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาลัยสงขลานครินทร์.

ปกรณ์ โอภาประกาศสติ และมัณนา โอภาประกาศสติ. (2551). *พอลิเมอร์กับปัญหาสิ่งแวดล้อม*. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: http//www.vchrkrn.com/vricl/18774/#P6

ปิยะรัตน์ บุญแสวง. (2552). ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากจุลินทรีย์. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, *37*(3), 256-267.

ปิยาภรณ์ วังสิริกุล. (2557). การสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ อัลคาลิจิเนส ยูโทรฟัส ด้วยสารสกัดเอนไซม์อย่างหยาบจากน้ำสับปะรด. *วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์*, *6*(2), 105-116.

พรเทพ ถนนแก้ว และตริตาภรณ์ จันทน์เทศ. (2553). โพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต: พลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้ง่าย. *วารสารศูนย์วิชาการ*, *18*(1), 27-30.

พิชาภัค สมยูรทรัพย์. (2553). *พลาสติกชีวภาพ: นวัตกรรมของผลิตภัณฑ์สีเขียว. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*, *26*(2), 177-195.

เมทินี อมรชัยสิน และอารติ อนันตนิกร. (2555). *การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) จากจุลินทรีย์ Alcaligenes latus TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนาด้วยรังสีอัตราไวโอเลตร่วมกับสารเคมี*. ปัญหาพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพ, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด (2551). *สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-ไฮดรอกซีวาเลอเรตจากน้ำเสียโรงงานอาหารทะเล โดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากระบบเอสบีอาร์*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกลุ (2547). *เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมักและสิ่งแวดล้อม*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล (2556). *วิศวกรรมกระบวนการหมัก*. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาภรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพัฒน์ ชมใจ และรสมันต์ จงเจริญ (2555). *อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของ Alcaligenes latus ATCC 29714*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

Anderson, A.J., & Wynn, J.P. (1995). Microbial polyhydroxyalkanoates, polysaccharides and lipids. In C., Ratledge, & B. Kristiansen, (Eds.), *Basic Biotechnology* (2nd ed.) (pp. 325-333). Cambridge: Cambrige University Press.

Bingqing, W., Ratna, R., & Sharma, S. (2013). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice. *Industrial Crops and Products*, *43*, 802-811.

Boopathy, R. (2004). Anaerobic biodegradation of no. 2 diesel fuel in soil: a soil column study. *Bioresource technology*, *94*(2), 143-151.

Chai, H., Ahmad, R., Yahya, A.R.M., Majid, M.I.A., & Amirul, A. A. (2009). Microbial synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 through a two step cultivation process. *Bioresource Technology*, *8*(17), 4189-4196.

Chail, H., Ahmagl, R., Yahyal, A.R.M., Majid, M.I.A., & Amirull, A.A. (2009). Microbial synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 through a two step cultivation process. *African Journal of Biotechnology*, *8*(17), 4189-4196.

Chanprateep, S., Buasri, K., Muangwong, A., & Utiswannakul, P. (2010). Biosynthesis and biocompatibility of biodegradable poly (3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate). *Polymer Degradation and Stability*, *95*, 2003-2012.

Chomchai, S., & Chongchroen, R. (2010). The production of polyhydroxybutyrate from a newly yeast isolate, strain I-14. In *The second Thai-Japan Bioplastics and Biobased Materials Symposium* (*AIST-NIA Joint Symposium*) (p. 14). Bangkok: Pull Bangkok King Power Hotel.

DSMZ catalogue. (1993). *Deutsche Stammsammlung for Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH (German Culture Collection of Microorganisms and Cell Cultures)* (5th ed.). Braunschweig: The Leibniz Institute DSMZ.

Du, G., Si, Y., & Yu, J. (2001). Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acids on synthesis of polyhydroxyalcanoates from volatile fatty acids by *Ralstonia eutropha*. *Biotechnology Letters*, *23*(19), 1613-1617.

El-Sayed, Azhar, A., Hemmat, M., Abdelhad, A.M., Abdel, H., & Khodair, T.A. (2009). Batch Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Ralstonia Eutropha* and *Alcaligenes latus* Using Bioreactor Different Culture Strategies. *Journal of Applied Sciences Research*, *5*(5), 556-564.

Eschenlaner, A.C., Stoup, S.K., Srience, F., & Somers, D.A. (1996). Production of heteropolymeric polyhydroxyalkanoate in *Escherichia coli* from a single carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *19*, 121-130.

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

Flechter, A. (1993). In : plastics from bacteria and for bacteria : PHA as natural, biodegegradable polyesters. *Springer Verlag*, *11*(3), 77-93.

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.

Ganzeveld, K., Hagen, V.A., Agteren M.H., Koning, W., & Uiterkamp, A.J.M.S. (1999). Upgrading of organic waste: production of the copolymer poly-3-hydroxybutyrate-co-valerate by *Ralstonia eutrophus* with organic waste as sole carbon source. *Journal of cleaner Production*, *7*, 413-419.

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

Heinrich, D., Madkour, M.H., Al-Ghamdi, M.A., Shabbaj, I.I., & Steinbuchel, A. (2012). Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *springer journals*, *9*, 312-318.

Holmes, P.A. (1985). Applications of PHB – A microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology*, *16*, 32-36.

Jain, S., Singh, A.K., & Tiwari, A. (2013). PRODUCTION OF MEDIUM CHAIN LENGTH POLYHYDROXYALKAOATES FROM PALMITIC ACID USING *Ralstonia eutropha* BY FED BATCH CULTURE. *International Journal of Chemical Sciences and Applications*, *4*(4), 152-158.

Jogdand, S.N. (2004). *Welcome to the E-coFriendly Plastic*. (online). Retrieved from http://www.biotechsupportindae.com/jogsn/.html

Johnstone, B. (1990). A throw away answer. *Far Eastern Economic Review*, *147*, 62-63.

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

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

Kim, J.S., Lee, B.H., & Kim, B.S. (2005). Production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*. *Biochemical Engineering Journal*, *23*, 169-174.

Kinoshita, S., Kulprecha, K., & Chao, A. (1991). Microbial production of Poly-β-hydroxybutyric acid. In Y. Oshima (Ed.), *Annual Report of IC Biotech*. (pp 347-349), Osaka: Osaka University.

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

Leda, R.C., David, A.M., & Denise, M.G.F. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, *100*, 5996-6009.

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

Luli, G.W., & Strohl, W.R. (1990). Comparison of Growth, acetate, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(4), 1004-1011.

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

Mercan, N., Aslim, B., Yuksekdag, Z.N., & Beyatil, Y. (2002). Production of poly-β-Hydroxybutyrate (PHB) by some Rhizobium bacteria. *Turkish Journal of Biology*, *26*, 215-219.

Mohammadi, M., Hassan, A.M., Phang, L., Ariffin, H., Shirai, Y., & Ando, Y. (2012). Recovery and purification of intracellular polyhydroxyalkanoates from recombinant *Cupriavidus necator* using water and ethanol. *Biotechnology letters*, *34*, 253-259.

Montaser, N., Heidarinasab, A., & Arjmand, M. (2012). Optimization of polyhydroxybutrate (PHB) microbial culture by *Azotobacter beijerinckii* DSMZ 1041. *Petroleum research*, *22*(69), 73-85.

Nabila, F., & Veena, G.K. (2016). Optimization of poly-β-hydroxybutyrate production by halotolerant bacteria strains isolated from saline environment. *International Journal of Bioassay*, *5*(8), 4775-4781.

Nath, A., Dexit, M., Bandiya, A., Chavda, S., & Desai, A. J. (2008). Enhance PHB production and scal up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Bioresource Technology*, *99*, 5749-5755.

Nisha, V.R., Sudheer, K.S., Carlos, R.S., & Ashok. (2009 b). A statistical approach for optimization of polyhydroxybutyrate production by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149 under submerged fermentation using central compostion design. *Applied Biochemistry Biotechnology*, *162*, 996-1007.

Norhafini, H., Thinagaran, L., Shantini, K., Huong, K.H., Syafiq, I.M., Bhubalan, K., & Amirul, A.A. (2017). Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with high 4HB composition and PHA content using 1,4-butanediol and 1,6-hexanediol for medical application. *Journal of polymer research*, *24*, 189-197.

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, B.S. (2011). Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxy butyrate-co-4-hydroxybutyrate by *Ralstronia eutropha* from soybean oil. *New Biotechnology*, *28*, 719-724.

Pouton, C. W., & Akhtar, S. (1996). Biosynthetic Polyhydroxyalkanoates and their Potential in Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *18*, 133-162.

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

Quillaguaman, J., Van, T.D., Guzmán, H., Guzmán, D., Martín, J., Everest, A., & Kaul, R.H. (2008). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. *Applied Microbiology Biotechnology*, *78*, 227–232.

Rao, U., Sridhar, R., & Sehgal, P.K. (2010). Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil. *Biochemical Engineering Journal*, *49*, 13-20.

Rawte, T., & Mavinkurve, S. (2002). A rapid hypochlorite method for extraction of polyhydroxyalkanoates from bacteril cell. *Indian Journal of Experimental Biology*, *40*, 924-929.

Rawte, T., & Mavinkurve, S. (2002). Characterization of polyhydroxyalkanoates-Biodegradable plastics from marine bacteria. *Current Science*, *83*(5), 562-564.

Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, V.C., & Kalia. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an review. *Bioresurce Techlogy*, *87*, 137-146.

Reddy, M.V., Mawatari, Y., Yajima, Y., Satoh, K., Mohan, S.V., & Chang, Y.C. (2016). Production of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-

hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) from synthetic wastewater using *Hydrogenophaga palleronii*. *Bioresource Technology*, *215*, 135-162.

Ryu, H.W., Sei, K.H., Yong, K.C., & Ho, N.C. (1997). Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density Fed-Batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnology and Bioengineering*, *55*, 30-32.

Sangkharak, K., & Prasertsan, P. (2007). Optimization of pohydroxybutyrate production from a wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. *Journal of Biotechnology*, *132*, 331-340.

Satoh, H., Iwamoto, Y., Mino, T., & Matsuo, T. (1998). Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. *Water Quality International*, *38*(2), 103-109.

Selvakumar, K., Srinivasan, G., Baskar, V., & Madhan, R. (2011). Production and isolation of polyhydroxyalkanoates from *Haloarcula marismortui* MTCC 1596 using cost effective osmotic lysis methodology. *European Journal of Experimental Biology*, *1*(3), 180-187.

Seo, J.K., Yoon, J.Y., Oh, J.T., & Kim, W.S. (1998). Optimam growth condition and pH control solution for PHB biosynthesis in *A. eutrophus*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *4*, 215-220.

Shojaosadati, S.A., Kolaei, S.M.V., Balaeipour, V., & Farroul, A.M. (2008). Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iranian Journal of Biotechnology*, *6*, 63-83.

Song, J.Y., & Kim, B.S. (2005). Charateristics of Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) Production by *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 and 17699. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *10*, 603-606.

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

Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plant - A review. *Biotechnology Advances*, *25*, 148-175.

Tanamool, V., Danvirutai, P., Thanonkeo, P., Imai, T., & Kaewkannetra, P. (2009). *Production of Poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) from sweet sorghum juice by Alcaligenes eutrophus TISTR 1095 and Alcaligenes latus ATCC 29714 via batch fermentation*. Master's thesis, Department of Biotechnology, Khon Kaen University.

Tian, G., Q.W., Suqin S., Isao, N., & Guo, Q.C. (2000). Two-dimensional fourier transform infrared spectroscopy study of biosynthesized poly(hydroxybutyrate-*co*-hydroxyhexanoate) and poly(hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate). *Polymer Physics*, *40*, 649-656.

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*, *55*, 243-250.

Turesin, F., Gumusyazici, Z., Kok, F.N., Gursel, I., Alaaddinoglu, N.G., & Hasirci, V. (2000). Biosynthesis of polyhydroxybutyrate and its copolymers and their use in controlled drug release. *Turk Journal of Medical Science*, *30*, 535-541.

Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, *102*, 1437-1449.

Venkateswar, R.M., Yasuter, M., Yaka, Y., Kohki, S., Venkata, M.S., & Young-Cheol, C. (2016). Production of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvzlerate) P(3HB-co-3HV) from synthetic wastewater using *Hydrogenophaga palleronii*. *Bioresource Technology*, *215*, 155-162.

Vigneswari, S., Nik, L.A., & Majid, M.I.A. (2010). Improved production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) copolymer using a combination of 1,4-butanediol and γ-butyrolactone. *World J Microbiol Biotechnol*, *26*, 743-746.

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

Wang, F., & Lee, S.Y. (1997). Poly(3-Hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a Fed-Batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied and Enviromental Microbiology*, *63*, 3703-3706.

Wang, Y., Hua, F.L., Tsang, Y.F., Chan, S.Y., Sin, S.N., Chua, H., Yu, P.H.F., & Ren, N.Q. (2007). Synthesis of PHAs from waste under various C:N ratio. *Bioresource Technology*, *98*, 1690-1693.

Waranya, S., Samart M., & Pakawadee, K. (2011). Yields of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) during Batch Fermentation of Sugar Cane Juice by *Alcaligenes latus* and *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Life Sciences*, *5*, 960-966.

www.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/24/Polyhydroxyalkanoates.png/400

Zhang, Y., Sun, W., Wang, H., & Geng, A. (2013). Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. *Bioresource Technology, 147*, 307-314.

Zhila, N.O., Volova, T.G., Nikolaeva, E.D., & Syrvacheva, D.A. (2011). Microbial Synthesis and Characterization of Poly (3-Hydroxybutyrate-*co*-4-Hydroxybutyrate) Copolymers. *Journal of Siberian Federal University*, *2*, 158-171.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

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
$MnSO_4 \cdot 4\text{-}5\ H_2O$	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

การเตรียมสารและการวิเคราะห์

การเตรียมสารละลาย

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS)

ชั่ง SDS 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจนสารละลายใสจะได้ SDS ความเข้มข้นร้อยละ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้งาน

2. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1995)

2.1 การเตรียมสารลายกรดไดโนโตรซาลิซาลิก (dinitrosalicylid acid : DNS)

ชั่งน้ำหนัก DNS (3,5 dinitrosalicylid acid) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัมละลายใน 200 มิลลิลิตร) ทีละน้อยคนให้เข้ากันจนสารละลายใสโดยให้ความร้อน จากนั้นเติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรท (Na-K tartrate) 300 กรัม ตามลำดับ รอให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนใช้งาน

2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

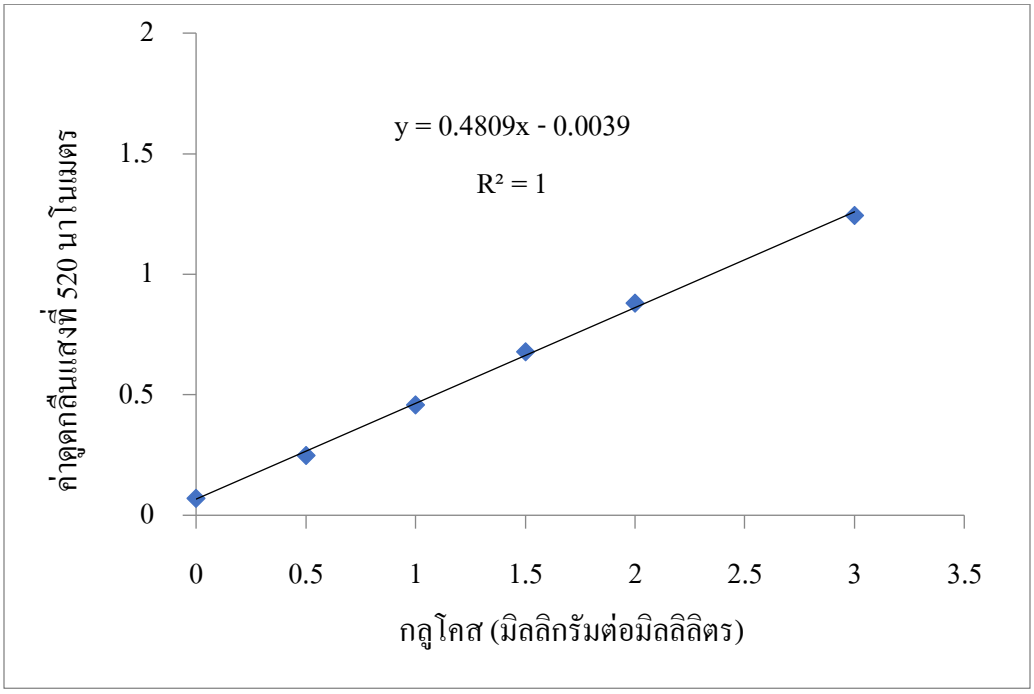
เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายกลูโคส 1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายกลูโคสให้ได้ความเข้มข้น ดังแสดงในตารางภาคผนวก ข 2-1

ตารางภาคผนวก ข 2-1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

หลอดที่	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคส (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
1	0.0	0	1,000
2	0.5	50	950
3	1.0	100	900
4	1.5	150	850
5	2.0	200	800

หลอดที่	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคส (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
6	3.0	300	700

จากนั้นนำหลอดทดลองทั้ง 6 หลอด มาเติม DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ดังแสดงในภาพภาคผนวก ข 2-1



ภาพภาคผนวก ข 2-1 กราฟมาตรฐานกลูโคส

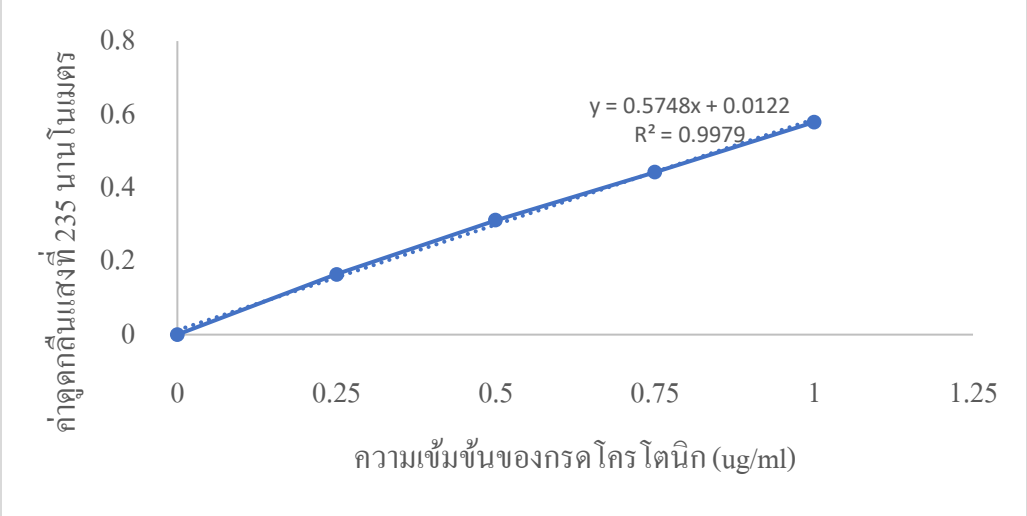
3. การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายโครโตนิก (Hiremanth และคณะ, 1995)

เตรียมสารละลายโครโตนิกมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.1 µg/µl โดยชั่งกรดโครโตนิกละลายในกรดซัลฟูริก และเตรียมสารละลายโครโตนิกให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางภาคผนวก ข 3-1

ตารางภาคผนวก ข 3-1 การเตรียมกราฟมาตรของสารลายโครโตนิก

หลอดที่	สารละลายกรดโครโตนิกมาตรฐาน (µl)	กรดซัลฟูริก (ml)	ความเข้มข้นของกรดโครโตนิก (µg)
1	-	3	-
2	50	2.950	5
3	100	2.900	10
4	150	2.850	15
5	200	2.800	20
6	250	2.750	25
7	300	2.700	30
8	350	2.600	40
9	400	2.500	50

จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาว 235 นาโนเมตร โยใช้กรดซัลฟูริกเป็น blank และนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในภาพภาคผนวก ข 3-1



ภาพภาคผนวก ข 3-1 กราฟมาตรฐานสารละลายโครโตนิก

การวิเคราะห์

1. วัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

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

ค่าการดูดกลืนแสง = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร x อัตราการเจือจาง

2. การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS assay (Miller, 1995)

นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างมาเจือจางให้เหมาะสมจากนั้นเติม DNS (3,5 dinitrosalicylid acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยแผ่นพาราฟินผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 520 นาโนเมตร และนำมาเทียบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ทราบความเข้มข้น จากนั้นคำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากสมการ

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง x อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกลูโคส}}$$

3. วิเคราะห์น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (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 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีอีกครั้งเพื่อเป็นการล้างเซลล์ จากนั้นนำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้จากการชั่งหลอดที่มีส่วนของตะกอนเซลล์แห้งอยู่ลบด้วยน้ำหนักของหลอดเปล่า จะได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่แท้จริงของแบคทีเรีย

น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง = น้ำหนักหลอดที่มีส่วนของตะกอน – น้ำหนักหลอดเปล่า (กรัมต่อลิตร)

4. วิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธี Gravimetric method (Grothe และคณะ, 1999)

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างเซลล์โดยเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (SDS) 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติมโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) 1 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อล้างตะกอน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1.2 มิลลิลิตรอีกครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วนำหลอดที่มีตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณ PHAs ที่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้

ปริมาณของ PHAs = น้ำหนักหลอดที่มีส่วนของตะกอน – น้ำหนักหลอดเปล่า (กรัมต่อลิตร)

ภาคผนวก ค

ข้อมูลการทดลอง

1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

1.1 ผลของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ตารางภาคผนวก ค 1-1 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารดัดแปลง ทั้ง 3 สูตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)		
	อาหารสูตรที่ 1 DSMZ	อาหารสูตรที่ 2 DSMZ ดัดแปลง	อาหารสูตรที่ 3 Park and Kim
0	0.24	0.23	0.22
24	2.40	2.51	1.33
48	3.81	3.84	2.32
72	3.68	3.73	2.01

ตารางภาคผนวก ค 1-2 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในอาหารดัดแปลง ทั้ง 3 สูตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)		
	อาหารสูตรที่ 1 DSMZ	อาหารสูตรที่ 2 DSMZ ดัดแปลง	อาหารสูตรที่ 3 Park and Kim
0	0.24	0.25	0.25
24	2.39	3.00	1.98
48	3.81	3.83	2.46
72	3.70	3.72	2.21

ตารางภาคผนวก ค 1-3 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารดัดแปลงทั้ง 3 สูตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)		
	อาหารสูตรที่ 1 DSMZ	อาหารสูตรที่ 2 DSMZ ดัดแปลง	อาหารสูตรที่ 3 Park and Kim
0	0.27	0.28	0.26
24	2.41	3.20	2.31
48	3.81	3.84	2.55
72	3.63	3.50	2.50

ตารางภาคผนวก ค 1-4 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารดัดแปลงทั้ง 3 สูตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	อาหารสูตรที่ 1 DSMZ	อาหารสูตรที่ 2 DSMZ ดัดแปลง	อาหารสูตรที่ 3 Park and Kim
0	0.87	0.70	0.75
24	1.40	1.40	1.27
48	1.60	1.90	2.80
72	1.50	1.80	1.70

ตารางภาคผนวก ค 1-5 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในอาหารดัดแปลงทั้ง 3 สูตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	อาหารสูตรที่ 1 DSMZ	อาหารสูตรที่ 2 DSMZ ดัดแปลง	อาหารสูตรที่ 3 Park and Kim
0	0.73	0.80	0.70
24	1.50	1.43	1.23
48	1.63	1.83	2.90
72	1.60	1.76	1.80

ตารางภาคผนวก ค 1-6 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารดัดแปลงทั้ง 3 สูตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	อาหารสูตรที่ 1 DSMZ	อาหารสูตรที่ 2 DSMZ ดัดแปลง	อาหารสูตรที่ 3 Park and Kim
0	0.75	0.90	0.83
24	1.33	1.53	1.20
48	1.57	1.90	3.60
72	1.50	1.87	1.80

ตารางภาคผนวก ค 1-7 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารดัดแปลงทั้ง 3 สูตร

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		
	อาหารสูตรที่ 1 DSMZ	อาหารสูตรที่ 2 DSMZ ดัดแปลง	อาหารสูตรที่ 3 Park and Kim
0	0.65	0.55	0.46
24	0.83	1.07	1.17
48	0.97	1.55	1.53
72	0.67	1.46	1.33

ตารางภาคผนวก ค 1-8 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในอาหารดัดแปลงทั้ง 3 สูตร

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		
	อาหารสูตรที่ 1 DSMZ	อาหารสูตรที่ 2 DSMZ ดัดแปลง	อาหารสูตรที่ 3 Park and Kim
0	0.63	0.65	0.24
24	0.87	1.03	2.59
48	1.00	1.53	2.05
72	0.67	1.20	1.87

ตารางภาคผนวก ค 1-9 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารดัดแปลงทั้ง 3 สูตร

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		
	อาหารสูตรที่ 1 DSMZ	อาหารสูตรที่ 2 DSMZ ดัดแปลง	อาหารสูตรที่ 3 Park and Kim
0	0.60	0.67	0.65
24	0.93	1.17	1.10
48	1.03	1.73	1.65
72	0.85	0.93	1.20

1.2 ผลการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางภาคผนวก ค 2-1 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)				
	ชุดควบคุม (ฟรุคโตส 20 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)			
		10	20	40	60
0	0.24	0.25	0.26	0.23	0.30
24	2.40	2.19	2.43	2.27	2.27
48	3.81	3.50	3.32	3.73	3.59
72	3.86	3.41	3.33	3.42	3.24

ตารางภาคผนวก ค 2-2 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)				
	ชุดควบคุม (ฟรุคโตส 20 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)			
		10	20	40	60
0	0.24	0.42	0.41	0.44	0.37
24	2.39	2.55	2.57	2.48	2.55
48	3.81	3.57	3.60	3.85	3.55
72	3.70	3.69	3.48	3.51	3.42

ตารางภาคผนวก ค 2-3 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)				
	ชุดควบคุม (ฟรุคโตส 20 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)			
		10	20	40	60
0	0.27	0.39	0.39	0.39	0.39
24	2.41	3.09	3.57	3.48	3.33
48	3.81	3.72	3.89	4.10	3.99
72	3.63	3.65	3.72	3.79	3.70

ตารางภาคผนวก ค 2-4 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				
	ชุดควบคุม (ฟรุคโตส 20 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)			
		10	20	40	60
0	0.87	0.60	0.76	0.80	0.70
24	1.40	1.33	1.50	1.55	1.43
48	1.60	1.56	1.83	2.00	1.73
72	1.50	1.57	1.70	1.76	1.60

ตารางภาคผนวก ค 2-5 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT ดั้งเดิม ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				
	ชุดควบคุม (ฟรุคโตส 20 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)			
		10	20	40	60
0	0.73	0.86	1.03	1.07	0.90
24	1.50	1.27	1.37	1.43	1.30
48	1.63	1.85	2.15	2.27	2.03
72	1.60	1.60	2.07	2.25	1.90

ตารางภาคผนวก ค 2-6 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ดั้งเดิม ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				
	ชุดควบคุม (ฟรุคโตส 20 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)			
		10	20	40	60
0	0.75	0.50	1.00	1.13	0.83
24	1.33	1.27	1.47	1.67	1.33
48	1.57	1.53	1.80	2.53	1.80
72	1.50	1.43	1.80	2.43	1.73

ตารางภาคผนวก ค 2-7 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต(กรัมต่อลิตร)				
	ชุดควบคุม (ฟรุคโตส 20 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)			
		10	20	40	60
0	0.65	0.43	0.53	0.67	0.46
24	0.83	0.60	0.80	0.83	0.77
48	0.97	0.80	1.33	1.40	1.30
72	0.67	0.73	1.30	1.37	1.27

ตารางภาคผนวก ค 2-8 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต(กรัมต่อลิตร)				
	ชุดควบคุม (ฟรุคโตส 20 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)			
		10	20	40	60
0	0.63	0.43	0.60	0.63	0.57
24	0.87	0.63	0.87	1.00	0.93
48	1.00	1.37	1.40	1.47	1.43
72	0.67	1.33	1.37	1.27	1.37

ตารางภาคผนวก ค 2-9 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต(กรัมต่อลิตร)				
	ชุดควบคุม (ฟรุคโตส 20 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)			
		10	20	40	60
0	0.60	0.46	0.63	0.70	0.53
24	0.93	0.73	0.97	1.07	0.80
48	1.03	1.20	1.63	1.93	1.70
72	0.85	0.93	1.50	1.67	1.47

1.3 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ตารางภาคผนวก ค 3-1 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิมในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)			
	ชุดควบคุม (ฟรุกโตส 20 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม)	ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)		
		ฟรุกโตส 40 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม	ฟรุกโตส 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม	น้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม
0	0.24	0.25	0.26	0.31
24	2.40	2.18	2.44	3.25
48	3.81	3.80	3.80	4.39
72	3.86	1.72	2.13	3.37

ตารางภาคผนวก ค 3-2 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)			
	ชุดควบคุม (ฟรุกโตส 20 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม)	ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)		
		ฟรุกโตส 40 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม	ฟรุกโตส 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม	น้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม
0	0.24	0.34	0.28	0.36
24	2.39	2.97	2.41	2.40
48	3.81	3.60	3.83	4.73
72	3.70	1.44	1.36	2.05

ตารางภาคผนวก ค 3-3 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)			
	ชุดควบคุม (ฟรุกโตส 20 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม)	ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)		
		ฟรุกโตส 40 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม	ฟรุกโตส 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม	น้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม
0	0.27	0.39	0.38	0.44
24	2.41	3.11	2.72	2.97
48	3.81	3.60	3.83	4.73
72	3.63	3.12	2.62	3.24

ตารางภาคผนวก ค 3-4 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	ชุดควบคุม (ฟรุกโตส 20 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม)	ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)		
		ฟรุกโตส 40 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม	ฟรุกโตส 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม	น้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม
0	0.87	0.43	0.50	0.76
24	1.40	0.77	0.96	1.27
48	1.60	1.23	1.37	1.66
72	1.50	1.06	1.10	1.30

ตารางภาคผนวก ค 3-5 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	ชุดควบคุม (ฟรุกโตส 20 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม)	ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)		
		ฟรุกโตส 40 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม	ฟรุกโตส 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม	น้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม
0	0.73	0.50	0.87	1.33
24	1.50	1.73	2.06	2.53
48	1.63	2.47	3.00	3.37
72	1.60	1.57	2.17	2.33

ตารางภาคผนวก ค 3-6 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	ชุดควบคุม (ฟรุกโตส 20 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม)	ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)		
		ฟรุกโตส 40 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม	ฟรุกโตส 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม	น้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม
0	0.75	0.56	0.93	1.40
24	1.33	1.96	2.16	2.67
48	1.57	2.53	3.06	3.47
72	1.50	1.57	2.17	2.33

ตารางภาคผนวก ค 3-7 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)			
	ชุดควบคุม (ฟรุกโตส 20 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม)	ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)		
		ฟรุกโตส 40 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม	ฟรุกโตส 40 กรัม และผงชูรส 0.5 กรัม	น้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัม และผงชูรส 0.5 กรัม
0	0.65	0.23	0.27	0.33
24	0.83	0.37	0.50	0.77
48	0.97	1.17	1.23	1.40
72	0.67	0.50	0.73	0.97

ตารางภาคผนวก ค 3-8 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)			
	ชุดควบคุม (ฟรุกโตส 20 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม)	ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)		
		ฟรุกโตส 40 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม	ฟรุกโตส 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม	น้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม
0	0.63	0.27	0.30	0.43
24	0.87	1.10	1.23	2.13
48	1.00	1.60	1.86	2.53
72	0.67	0.93	1.43	2.00

ตารางภาคผนวก ค 3-9 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เวลา	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)			
	ชุดควบคุม (ฟรุกโตส 20 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม)	ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)		
		ฟรุกโตส 40 กรัม และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัม	ฟรุกโตส 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม	น้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัม และ ผงชูรส 0.5 กรัม
0	0.60	0.30	0.30	0.47
24	0.93	1.13	1.40	2.23
48	1.03	1.80	1.96	2.63
72	0.85	1.03	1.53	2.20

1.4 ผลของความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ตารางภาคผนวก ค 4-1 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในความเข้มข้นผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)			
	ชุดควบคุม (ผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของผงชูรส (กรัมต่อลิตร)		
		2	4	6
0	0.31	0.30	0.33	0.29
24	3.30	3.92	3.76	3.51
48	4.42	4.96	4.80	4.37
72	2.79	2.91	2.85	2.79

ตารางภาคผนวก ค 4-2 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในความเข้มข้นผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)			
	ชุดควบคุม (ผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของผงชูรส (กรัมต่อลิตร)		
		2	4	6
0	0.39	0.32	0.32	0.35
24	3.15	3.83	3.86	3.30
48	4.45	4.93	4.75	4.52
72	3.03	3.47	3.38	3.16

ตารางภาคผนวก ค ที่ 1.4-3 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในความเข้มข้นผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)			
	ชุดควบคุม (ผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของผงชูรส (กรัมต่อลิตร)		
		2	4	6
0	0.36	0.33	0.32	0.34
24	3.32	4.05	3.91	3.42
48	4.76	5.61	5.05	4.76
72	3.25	3.65	3.55	3.39

ตารางภาคผนวก ค 4-4 น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในความเข้มข้นผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	ชุดควบคุม (ผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของผงชูรส (กรัมต่อลิตร)		
		2	4	6
0	0.63	1.40	1.26	1.00
24	1.23	1.73	1.53	1.27
48	1.57	2.37	2.26	1.97
72	1.20	2.07	1.90	1.77

ตารางภาคผนวก ค 4-5 น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในความเข้มข้นผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	ชุดควบคุม (ผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของผงชูรส (กรัมต่อลิตร)		
		2	4	6
0	0.93	1.73	1.50	1.23
24	1.67	2.26	2.03	1.77
48	2.30	2.83	2.50	2.43
72	1.97	2.57	2.37	2.07

ตารางภาคผนวก ค 4-6 น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในความเข้มข้นผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	ชุดควบคุม (ผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของผงชูรส (กรัมต่อลิตร)		
		2	4	6
0	1.53	2.26	2.03	1.73
24	2.77	3.40	3.03	2.87
48	3.37	4.53	4.07	3.53
72	2.63	3.33	3.23	3.03

ตารางภาคผนวก ค 4-7 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในความเข้มข้นผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)			
	ชุดควบคุม (ผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของผงชูรส (กรัมต่อลิตร)		
		2	4	6
0	0.20	0.30	0.23	0.20
24	0.83	1.10	0.93	0.90
48	1.23	1.87	1.53	1.30
72	0.73	1.10	1.30	1.17

ตารางภาคผนวก ค 4-8 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในความเข้มข้นผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)			
	ชุดควบคุม (ผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของผงชูรส (กรัมต่อลิตร)		
		2	4	6
0	0.23	0.27	0.30	0.27
24	1.10	1.40	1.40	1.37
48	2.00	2.53	2.10	2.07
72	1.36	1.63	1.37	1.10

ตารางภาคผนวก ค 4-9 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในความเข้มข้นผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)			
	ชุดควบคุม (ผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของผงชูรส (กรัมต่อลิตร)		
		2	4	6
0	0.23	0.30	0.20	0.27
24	2.10	2.43	2.33	2.03
48	2.50	3.10	2.80	2.53
72	2.10	2.50	2.27	2.00

1.5 ผลของการอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ตารางภาคผนวก ค 5-1 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารดัดแปลงที่มีอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)				
	ชุดควบคุม (แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 2 (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส (กรัมต่อลิตร)			
		แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.25 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.10 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 1	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 0.50
0	0.32	0.31	0.32	0.30	0.32
24	3.93	4.22	3.70	3.10	2.45
48	4.45	4.86	4.22	3.85	3.09
72	2.95	3.19	2.70	2.39	1.93

ตารางภาคผนวก ค 5-2 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในอาหารดัดแปลงที่มีอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)				
	ชุดควบคุม (แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 2 (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส (กรัมต่อลิตร)			
		แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.25 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.10 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 1	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 0.50
0	0.32	0.34	0.32	0.33	0.32
24	3.80	4.34	3.61	3.20	2.74
48	4.95	5.12	4.73	4.13	3.89
72	3.45	3.83	3.28	2.90	2.31

ตารางภาคผนวก ค ที่ 1.5-3 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารดัดแปลงที่มีอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)				
	ชุดควบคุม (แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 2 (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส (กรัมต่อลิตร)			
		แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.25 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.10 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 1	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 0.50
0	0.36	0.33	0.34	0.34	0.32
24	4.12	4.52	4.10	3.38	3.15
48	5.15	5.47	4.83	4.19	3.72
72	3.90	3.95	3.49	3.02	3.16

ตารางภาคผนวก ค 5-4 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารดัดแปลงที่มีอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				
	ชุดควบคุม (แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 2 (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส (กรัมต่อลิตร)			
		แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.25 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.10 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 1	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 0.50
0	0.93	1.10	0.90	0.80	0.67
24	1.90	1.93	1.73	1.50	1.20
48	3.97	4.03	3.36	2.93	2.13
72	3.57	4.13	3.23	2.83	1.97

ตารางภาคผนวก ค 5-5 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในอาหารดัดแปลงที่มีอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				
	ชุดควบคุม (แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 2 (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส (กรัมต่อลิตร)			
		แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.25 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.10 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 1	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 0.50
0	1.03	1.23	0.87	0.73	0.67
24	2.13	2.33	1.97	1.77	1.50
48	4.40	4.60	3.37	2.46	2.13
72	4.00	4.16	3.00	1.93	1.57

ตารางภาคผนวก ค 5-6 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารดัดแปลงที่มีอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				
	ชุดควบคุม (แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 2 (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส (กรัมต่อลิตร)			
		แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.25 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.10 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 1	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 0.50
0	1.20	1.43	1.07	0.77	0.63
24	2.37	2.93	2.27	1.87	1.50
48	4.86	5.90	3.63	3.13	2.97
72	4.37	4.73	3.23	3.03	2.86

ตารางภาคผนวก ค 5-7 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารดัดแปลงที่มีอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)				
	ชุดควบคุม (แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 2 (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส (กรัมต่อลิตร)			
		แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.25 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.10 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 1	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 0.50
0	0.47	0.56	0.43	0.36	0.33
24	1.33	1.47	0.97	0.83	0.73
48	2.63	2.97	2.47	2.33	1.60
72	1.37	1.63	1.37	1.37	1.30

ตารางภาคผนวก ค 5-8 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในอาหารดัดแปลงที่มีอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)				
	ชุดควบคุม (แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 2 (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส (กรัมต่อลิตร)			
		แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.25 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.10 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 1	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 0.50
0	0.67	0.93	0.53	0.47	0.40
24	1.43	2.07	1.70	1.47	1.33
48	2.10	2.43	1.87	1.67	1.67
72	1.57	2.03	1.73	1.57	1.23

ตารางภาคผนวก ค 5-9 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ A. latus สายพันธุ์ BOT II ในอาหารดัดแปลงที่มีอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)				
	ชุดควบคุม (แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 2 (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส (กรัมต่อลิตร)			
		แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.25 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.10 และผงชูรส 2	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 1	แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.50 และผงชูรส 0.50
0	0.80	0.97	0.67	0.40	0.33
24	2.03	2.60	1.83	1.73	1.30
48	3.17	4.10	3.03	2.73	2.30
72	2.43	2.93	1.93	1.77	1.30

2. ผลการศึกษาสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

2.1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

ตารางภาคผนวก ค 2.1-1 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารที่มีสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)		
	γ-butyrolactone	1,4-butanediol	valeric acid
0	0.56	0.56	0.22
24	4.85	4.94	2.94
48	3.48	4.02	2.17
72	3.66	4.46	2.38

ตารางภาคผนวก ค 2.1-2 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ดั้งเดิม ในอาหารที่มีสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)		
	γ-butyrolactone	1,4-butanediol	valeric acid
0	0.56	0.56	0.56
24	4.34	4.64	2.26
48	3.47	3.63	2.49
72	3.86	4.35	2.55

ตารางภาคผนวก ค 2.1-3 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)		
	γ-butyrolactone	1,4-butanediol	valeric acid
0	0.60	0.60	0.57
24	4.54	5.27	2.87
48	3.87	4.11	2.34
72	4.37	4.62	3.17

ตารางภาคผนวก ค 2.1-4 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารที่มีสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	γ-butyrolactone	1,4-butanediol	valeric acid
0	1.13	1.03	1.00
24	2.93	3.40	2.50
48	3.83	4.23	2.80
72	4.27	5.10	3.33

ตารางภาคผนวก ค 2.1-5 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในอาหารที่มีสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	γ-butyrolactone	1,4-butanediol	valeric acid
0	1.33	1.40	1.47
24	3.50	4.00	3.00
48	4.33	5.40	3.30
72	4.90	6.00	3.87

ตารางภาคผนวก ค 2.1-6 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	γ-butyrolactone	1,4-butanediol	valeric acid
0	1.63	1.73	1.70
24	4.07	5.10	3.30
48	5.07	6.17	3.87
72	5.63	7.30	4.20

ตารางภาคผนวก ค 2.1-7 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารที่มีสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		
	γ-butyrolactone	1,4-butanediol	valeric acid
0	070	0.70	0.83
24	1.70	2.30	1.23
48	2.07	2.43	1.53
72	2.27	2.97	1.77

ตารางภาคผนวก ค 2.1-8 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I ในอาหารที่มีสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		
	γ-butyrolactone	1,4-butanediol	valeric acid
0	0.77	0.83	1.00
24	2.10	2.93	1.50
48	2.63	3.27	1.73
72	3.00	3.63	2.20

ตารางภาคผนวก ค 2.1-9 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์แตกต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		
	γ-butyrolactone	1,4-butanediol	valeric acid
0	1.10	1.27	1.03
24	3.70	4.47	2.20
48	4.10	5.20	2.63
72	4.50	6.00	2.90

2.2 การเปรียบเทียบน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

ตารางภาคผนวก ค 2.2-1 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)				
	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันข้าวโพด	น้ำมันทานตะวัน	น้ำมันรำข้าว
0	0.56	0.56	0.55	0.57	0.58
24	5.21	5.17	5.16	5.52	5.47
48	4.08	4.12	4.38	4.58	4.39
72	4.45	4.44	4.55	4.69	4.56

ตารางภาคผนวก ค 2.2-2 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)				
	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันข้าวโพด	น้ำมันทานตะวัน	น้ำมันรำข้าว
0	1.77	1.60	1.76	2.33	2.57
24	5.37	5.20	5.13	5.03	5.47
48	6.53	6.30	6.33	6.55	7.03
72	7.00	6.63	6.97	7.40	7.67

ตารางภาคผนวก ค 2.2-3 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)				
	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันข้าวโพด	น้ำมันทานตะวัน	น้ำมันรำข้าว
0	1.00	0.87	0.73	1.00	1.03
24	4.73	4.57	5.03	4.20	4.23
48	5.30	5.03	5.90	4.67	4.60
72	5.53	5.27	6.13	5.10	5.03

2.3 การเปรียบเทียบน้ำมันปาล์มร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

ตารางภาคผนวก ค 2.3-1 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)			
	1,4-บิวเทนไดออลความเข้มข้นร้อยละ			
	15	25	50	75
0	0.51	0.56	0.56	0.53
24	5.07	5.21	4.87	5.10
48	4.82	4.30	4.50	4.47
72	4.96	4.82	5.16	5.38

ตารางภาคผนวก ค 2.3-2 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	1,4-บิวเทนไดออลความเข้มข้นร้อยละ			
	15	25	50	75
0	1.87	1.57	1.67	1.60
24	5.00	5.13	5.33	5.25
48	5.97	6.03	6.37	6.07
72	6.40	6.70	7.10	6.80

ตารางภาคผนวก ค 2.3-3 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำมัน ปาล์มร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)			
	1,4-บิวเทนไดออลความเข้มข้นร้อยละ			
	15	25	50	75
0	0.83	0.90	0.80	1.00
24	4.23	4.27	4.50	4.43
48	4.97	5.13	5.40	5.30
72	5.33	5.53	5.63	5.57

2.4 การเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนประเภทน้ำตาลร่วมกับสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์

ตารางภาคผนวก ค ที่ 2.4-1 ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำตาลร่วมกับโพรพิโอนิคและอะซิเตท

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร) ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)					
	เด็กซ์โตรส 20	เด็กซ์โตรส 40	น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง 20	น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง 40	ฟรุคโตรส 20	ฟรุคโตรส 40
0	0.35	0.36	0.37	0.37	0.39	0.35
24	2.20	1.79	2.08	2.35	1.17	1.46
48	4.77	4.35	4.15	4.15	3.62	3.33
72	3.77	3.90	3.37	3.60	2.91	2.63

ตารางภาคผนวก ค 2.4-2 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำตาลร่วมกับโพรพิโอนิคและอะซิเตท

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)					
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)					
	เด็กซ์โตรส 20	เด็กซ์โตรส 40	น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง 20	น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง 40	ฟรุคโตรส 20	ฟรุคโตรส 40
0	2.30	2.30	2.07	2.63	3.10	3.13
24	7.10	6.80	5.80	5.35	6.70	4.37
48	6.37	6.33	4.60	5.35	6.07	6.47
72	5.20	4.77	4.17	3.70	4.00	5.57

ตารางภาคผนวก ค 2.4-3 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารที่มีน้ำตาลร่วมกับโพรพิโอนิคและอะซิเตท

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)					
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)					
	เด็กซ์โตรส 20	เด็กซ์โตรส 40	น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง 20	น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง 40	ฟรุคโตรส 20	ฟรุคโตรส 40
0	1.27	1.13	1.10	1.17	1.33	1.30
24	5.80	4.60	4.20	4.10	4.57	3.23
48	5.27	5.13	3.70	4.40	5.07	5.43
72	4.30	3.75	2.97	2.37	2.30	3.80

3. ผลการศึกษาวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

3.1 ผลการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์ม

ตารางภาคผนวก ค 3.1-1 ค่าดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์ม

ค่าการดูดกลืนแสง (235 นาโนเมตร)		
ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3
1.1009	1.1705	1.1322

ตารางภาคผนวก ค 3.1-2 ค่าดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์มร่วมกับไฮโปคลอไรท์

ค่าการดูดกลืนแสง (235 นาโนเมตร)		
ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3
1.4349	1.4662	1.4958

ตารางภาคผนวก ค ที่ 3.1-3 ค่าดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้คลอโรฟอร์มร่วมกับไฮโปคลอไรท์

ค่าการดูดกลืนแสง (235 นาโนเมตร)		
ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3
2.2822	2.2509	2.3152

ตารางภาคผนวก ค 3.1-4 ค่าดูดกลืนแสงของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยวิธีไฮโปคลอไรท์ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส), เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสง (235 นาโนเมตร)		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3
30, 5	2.4457	2.5814	2.5623
30, 10	3.1903	3.2095	3.260
30, 20	2.8424	2.8615	2.8981
30, 30	1.8994	1.8820	1.9325
37, 5	2.0212	2.0596	2.0752
37, 10	2.7850	2.8789	2.7954
37, 20	2.5866	2.6319	2.6580
37, 30	1.8055	1.7759	1.7168

4. ผลของการขยายขนาดการเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ (Batch Culture)

ตารางภาคผนวก ค 4-1 ค่าดูดกลืนแสงของเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

เวลา	ค่าดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)
0	1.23	19.27	1.37	1.03
6	3.09	17.29	2.90	1.93
12	4.54	14.74	4.37	3.93
18	5.63	12.89	5.53	4.40
24	7.62	11.46	7.53	5.93
30	9.03	8.17	8.60	6.87
36	8.39	7.11	7.93	5.67
42	8.21	6.58	7.27	5.61