รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การปรับปรุงสายพันธุ์และการพัฒนาสภาวะการเลี้ยงแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้กลุ่มพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

Induced Mutation and Culture Optimization of *Alcaligenes* sp. for Enhancement of Biodegradable Polymer (Polyhydroxyalkanoate) Production Potential

ผู้วิจัย

ผศ. ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

ดร.สมจิตต์ ปาละกาศ

สนับสนุนโดย งบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๕๕-๒๕๕๗ จากมหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้ทำขึ้นเพื่อศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ของเชื้อ *Alcaligenes latus* TISTR 1403/γ-2AA ด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ ซึ่งพบว่า การเหนี่ยวนำซ้ำด้วยรังสีเหนือม่วงร่วมกับสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน 2 ครั้ง ตามด้วยสารอะคริฟลาวิน (Acriflavin) ทำให้เชื้อสามารถเจริญและผลิต PHB ได้สูงสุด รวมถึง เมื่อมีการปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงด้วยการเลือกใช้สูตรอาหาร DSMZ catalogue ดัดแปลงโดยใช้กากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร น้ำแช่ข้าวโพด 4 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่ดีที่สุด สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและ PHB ได้เท่ากับ 15.62±0.00 และ 9.73±0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อขยายขนาดการเพาะเลี้ยงไปสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะและเติมกะ สามารถผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้น 11.83±0.29 และ 32.20±0.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Abstract

This research was to study increasing efficiency PHB production of *Alcaligenes latus* TISTR 1403/γ-2AA by induction and optimize growth and produce condition. Found that repeat induction with Ultraviolet and 2AA two time and then induce with acriflavin can gave that best growth and PHB production isolate, When adjust culture condition by using DSMZ calalogue that modified to using 30 g/l molasses 4 g/l corn steep liquor and 2.5 potassium dihydrogen phosphate are the best condition can produce cell mass and PHB to 15.62±0.00 and 9.73±0.06 g/l, respectively. And when upscale to fermentor with batch and fed-batch cultivation can increasing PHB production to11.83±0.29 and 32.20±0.10 g/l, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาและสำนักงานคระกรรมการวิจัยแห่งชาติเป็นอย่างสูง ที่เป็นผู้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัยแบบต่อเนื่อง ใน ปีงบประมาณ ๒๕๕๕-๒๕๕๗ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์ โดยขอขอบคุณในความอนุเคราะห์ของห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ทำให้การดำเนินการวิจัยร่วมกันดำเนินด้วยดีตลอด

ผศ.ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารประกอบการวิจัย	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	23
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	81
บรรณานุกรม	83
ภาคผนวก	90

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น LEO 1450 VP บริษัท LEO	20
2	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน รุ่น TECNAI 20 บริษัท Philips	20
3	ค่าน้ำหนักแห้งของมวลเซลล์และปริมาณพลาสติกชีวภาพ จากพันธ์เดิม	23
4	ลักษณะโคโลนีของ *A. lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายด้วยรังสีและสารเคมี	24
5	อัตราการเจริญและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารดัดแปลงทั้ง 3 สูตร	27
6	การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์และปริมาณ PHB ในอาหาร 3 สูตร	28
7	อัตราการเจริญและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารดัดแปลงที่มี กากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทความเข้มข้นร้อยละ 10, 15 และ 20	30
8	อัตราการเจริญและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารดัดแปลงที่มี กากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทความเข้มข้นร้อยละ 25, 30 และ 50	31
9	การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ในอาหารดัดแปลง ที่มีความเข้มข้นกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทแตกต่างกัน	33
10	อัตราการเจริญและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารดัดแปลงที่มี แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	34
11	การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ในอาหารดัดแปลง ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน.	36
12	อัตราการเจริญและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารดัดแปลงที่มี อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 และ 15	37
13	อัตราการเจริญและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารดัดแปลงที่มี อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 21 และ 30	38
14	การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ในอาหารดัดแปลง ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน	39
15	ลักษณะของโคโลนีที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงเป็นเวลา 12 นาที ตามด้วย สาร 2-อะมิโนแอนทราซีน	40
16	ลักษณะของโคโลนีที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสารอะคริฟลาวิน	43
17	ลักษณะของโคโลนีที่ได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวิน	46
18	มวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน	48
19	มวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน	49
20	การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุด ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน	51
21	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน	54

22	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์เดิมที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน	55
23	การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน	56
24	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน	59
25	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน	60
26	การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน	62
27	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน	64
28	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์เดิมที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	65
29	การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน	67
30	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	70
31	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์เดิมที่เพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	71
32	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงแบบเดิมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	73
33	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์เดิมที่เพาะเลี้ยงแบบเดิมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	74
34	ลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีการสะสม PHB ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	76
35	ลักษณะของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	77
36	ลักษณะของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	77
37	โครมาโตแกรมของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน	78
38	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็น internal standard	78
39	มวลสเปคตรัมของ Butanoic acid, 3-hydroxy-methyl ester ที่สกัดได้จากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเทียบกับมวลสเปคตรัม ของสาร PHB จาก Library search NIST08	79

40 สูตรโครงสร้างของ Butanoic acid, 3-hydroxy-methyl ester ที่สกัดได้จากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน 79

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติการละลายพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต.....	6
2	องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร.....	14
3	องค์ประกอบของ Trace element solution ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร	14
4	องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร.....	18
5	น้ำหนักแห้งของมวลเซลล์และ ปริมาณพลาสติกชีวภาพที่สกัดได้ จากการเลี้ยงเชื้อ *A. lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมม่า	25
6	น้ำหนักแห้งของมวลเซลล์และ ปริมาณพลาสติกชีวภาพที่สกัดได้ จากการเลี้ยงเชื้อ *A. lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายพันธุ์โดยสารเคมี	26
7	การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน (ครั้งที่ 1)	41
8	การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน (ครั้งที่ 2)	42
9	การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสารอะคริฟลาวิน	44
10	การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล	45
11	การรอดชีวิตของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสารอะคริฟลาวิน	46
12	การรอดชีวิตของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล	46
13	การเปรียบเทียบการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำซ้ำ	47
14	ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน	50
15	สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน	52
16	ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ของเชื้อสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน	56
17	สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน	58
18	ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน	61
19	สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่	63

	ข้าวโพดแตกต่างกัน	
20	มวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน	66
21	สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน	67
22	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	72
23	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์เดิมที่เพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	72
24	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	75
25	การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์เดิมที่เพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	75
26	ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ภายในเซลล์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich	80

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำงานวิจัย

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์พลาสติกได้เข้ามามีบทบาทต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์เป็นอันมาก โดยการนำมาใช้ในการผลิตเป็นอุปกรณ์เครื่องใช้ต่างๆ เนื่องจากมีความคงทน แข็งแรง น้ำหนักเบา ราคาถูก และสามารถปรับแต่งให้มีลักษณะตามต้องการได้ โดย การใช้เม็ดพลาสติกซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่ง สามารถทำได้อย่างรวดเร็วปริมาณมากและต้นทุนที่ต่ำ จากรายงานประมาณการผลิตพลาสติกทั่วโลกใน 1 ปี มีการผลิตมากกว่า 100 ล้านตัน จึงทำให้เกิดขยะพลาสติกเป็นจำนวนมาก แม้ว่าขยะพลาสติกบางส่วนสามารถนำมาแปรรูปกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่พบว่ากระบวนการในการนำกลับไปใช้ใหม่นี้ยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากยังต้องใช้พลังงานความร้อนสูงในการนำพลาสติกกลับมาใช้ใหม่ อีกทั้งในกระบวนการผลิตจะเกิดการปลดปล่อยสารพิษออกมาด้วย ขยะพลาสติกในส่วนที่เหลือก็เป็นปัญหาใหญ่ในการกำจัดเพราะใช้เวลาในการย่อยสลายนาน ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอันมากโดยเฉพาะการเผาซึ่งส่งผลต่อภาวะโลกร้อน เช่น ถุงพลาสติก 1 ใบ ต้องใช้เวลาย่อยสลายถึง 450 ปี หากนำไปเผาก็จะทำให้เกิดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งทำให้เกิดมลภาวะต่อโลกทำให้โลกร้อนขึ้น ดังนั้นในปัจจุบันนี้จะเห็นได้ว่าพลาสติกชีวภาพ ซึ่งเป็นพลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบธรรมชาติที่ได้จากการหมักน้ำตาลจากพืชด้วยจุลินทรีย์ ที่มีคุณสมบัติต่างๆ ในการนำไปใช้ประโยชน์ได้เช่นเดียวกับพลาสติกสังเคราะห์ สามารถแบ่งออกได้หลายกลุ่ม เช่น พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate, PHAs) พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB) พอลิบิวทิวซัคซิเนต (Polybutylsaccinate, PBS) และพอลิแลคไทค์ (Polylactide, PLA) เป็นต้น พลาสติกชีวภาพเหล่านี้มีข้อดีนอกจากจะย่อยสลายง่าย เมื่อมีการจัดการให้ อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมคือมีแบคทีเรียและเอนไซม์เข้ามาย่อยสลาย ไม่ทิ้งสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นการช่วยป้องกันหรือลดอุณหภูมิของโลกลงและเป็นการประหยัดทรัพยากรน้ำมัน อีกทั้งยังเป็นมิตรต่อสุขภาพของผู้บริโภค ทั้งนี้เนื่องจากพลาสติกชีวภาพ จะไม่ปล่อยสารเคมีที่เป็นพิษต่อร่างกายซึ่งมักก่อให้เกิดมะเร็งในระยะยาวอีกด้วย จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้มีการนำพลาสติกชีวภาพมาใช้กันอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะด้านบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหารเพื่อบรรจุสินค้าทางการเกษตร เช่น ผักและผลไม้ ถุงใส่ของ กล่องใส่อาหารสดและถ้วยกาแฟ ซึ่งอาจมีการใช้พลาสติกชีวภาพร่วมกับกระดาษ รวมทั้งใช้เป็นแคปซูลบรรจุยา สำหรับประเทศไทยมีปัญหาหลัก คือ ต้นทุนค่าใช้จ่ายสูง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นทุนการผลิตพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี แต่ประเทศไทยมีศักยภาพพอในการผลิตพลาสติกชีวภาพ ทั้งนี้เนื่องจากมีแหล่งวัตถุดิบ มากมายและมีราคาถูก ซึ่งวัตถุดิบดังกล่าวได้จากภาคเกษตรและภาคอุตสาหกรรมเกษตรหลายชนิด ที่สามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้น เพื่อการผลิตพลาสติกชีวภาพได้ เช่น มันสำปะหลัง อ้อย ปาล์ม หรือของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น กากมันสำปะหลัง กากชานอ้อย กากปาล์ม และส่วนเหลือทิ้งจากการผลิตไบโอดีเซลของปาล์ม เป็นต้น ซึ่งเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลผลิตทางการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตรที่มีอยู่ในประเทศ อีกทั้งยัง เป็นการลดปริมาณการนำเข้าวัตถุดิบเพื่อใช้ในการผลิตพลาสติก

ชีวภาพจากต่างประเทศ และเป็นการสร้างเทคโนโลยีทีเกิดขึ้นเองภายใน ประเทศ เพื่อเป็นทางเลือกที่สำคัญในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างอุตสาหกรรมพลาสติกสังเคราะห์ให้เป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพที่จะมีผลต่ออุตสาหกรรมภายในประเทศด้วย เช่น อุตสาหกรรมเส้นใยสิ่งทอ อุตสาหกรรมยานยนต์ อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ อุตสาหกรรมพลาสติก ชิ้นส่วนอุปกรณ์ไฟฟ้า และบรรจุภัณฑ์ต่าง ๆ เป็นต้น สำหรับในการวิจัยครั้งนี้จะมุ่งเน้นในพืชกลุ่มมันสำปะหลังเป็นหลัก พบว่าแป้งมันสำปะหลังและกากมันสำปะหลังมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารชีวภาพต่างๆ ได้ เช่น น้ำตาล เอ็นไซม์ กรดอินทรีย์ และพลาสติกชีวภาพ เป็นต้น (Padey, 2000) เช่นเดียวกับ Sriroth และคณะ (2000) พบว่าในองค์ประกอบของกากมันสำปะหลังมีสารอาหารหลงเหลืออยู่สูง โดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนจากแป้งเกาะติดและกลุ่มเซลลูโลสซึ่งเพียงพอต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ได้ สำหรับแนวทางการวิจัยแบ่งเป็นสามส่วน ซึ่งได้แก่ การคัดเลือกเพื่อหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ และทำการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพให้สูงขึ้นตลอดจนทำการตรวจสอบชนิดของพลาสติกชีวภาพในเบื้องต้น การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้สารอาหารราคาถูกโดยเฉพาะแป้งมันสำปะหลัง มันเส้นหรือกากมันปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พร้อมกับศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของไนโตรเจนและแร่ธาตุต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพ ตลอดจน สภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการหมัก เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ส่วนสุดท้ายจะเป็นการพัฒนาระบบการเลี้ยงที่เหมาะสมในถังหมัก กระบวนการสกัดและการแยกบริสุทธิ์ของพลาสติกชีวภาพที่ผลิตได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อการปรับปรุงพันธุ์แบคทีเรียในกลุ่ม *Alcaligenes* sp. ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยรังสีแกมมา รังสีเหนือม่วงและสารเคมีก่อกลายพันธุ์
2) เพื่อปรับปรุงสภาวะการหมักที่เหมาะสมในการผลิตพลาสติกชีวภาพของเชื้อแบคทีเรีย ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์บนเครื่องเขย่า
3) เพื่อพัฒนาสภาวะการหมักและการควบคุมของการเลี้ยงแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพในระดับถังหมัก ตลอดจนการพัฒนาวิธีการสกัดและการแยกบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ ประกอบด้วยงานการศึกษาวิจัยสำคัญ 3 ส่วน ดังนี้

ส่วนแรก เป็นการปรับปรุงพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. เพื่อเพิ่มความสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในปริมาณสูงที่ได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย โดยใช้สารก่อการกลายพันธุ์ รังสีแกมม่าและรังสีเหนือม่วง โดยจะให้ความสำคัญกับการคัดเลือกแบคทีเรียดังกล่าวโดยการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนต่างต่าง ที่ผ่านการปรับสภาพโดยการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์

ส่วนที่สอง เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารก่อกลายพันธุ์และรังสี รังสีและ

สารเคมี โดยการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าโดยจะให้ความสำคัญกับการศึกษา แหล่งคาร์บอนต่างๆ เช่น แป้งมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลังและมันเส้น ซึ่งผ่านกระบวนการการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน ชนิดและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน สัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม ชนิดของแร่ธาตุและการจำกัดปริมาณแร่ธาตุ รวมทั้งคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม และ อุณหภูมิการหมัก

ส่วนที่สาม เป็นการพัฒนาสภาวะการเลี้ยงในถังหมัก เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาการหมักในระดับถังหมักและการใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมอันจะเป็นการสนับสนุนการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง โดยจะให้ความสำคัญกับการศึกษาระบบการหมัก 2 แบบ คือการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (batch fermentation) และระบบการหมักแบบกึ่งเบ็ดเสร็จ (fed batch fermentation) โดยศึกษาระบบการกวน อัตราการกวน การให้อากาศและการควบคุมความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสม

บทที่ 2

เอกสารประกอบการวิจัย

พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ (Biodegradable plastic) หรือพลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) เป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ ซึ่งผลิตได้จากแหล่งวัตถุดิบที่สามารถผลิตขึ้นมาทดแทนได้ (renewable resource) ในกระบวนการผลิต โดยให้พลาสติกที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงหรือเทียบเท่าพลาสติกสังเคราะห์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี แต่มีข้อดีคือสามารถย่อยสลายได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยลดปัญหาของขยะพลาสติกได้สูง สำหรับพลาสติกชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีหลายชนิดแต่มีเพียง 2 ชนิดที่ได้รับความสนใจ ได้แก่ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate, PHAs) และ พอลิแลคไทค์ (Polylactide, PLA) โดยเฉพาะกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต หรือเรียกโดยทั่วไปว่า พลาสติก PHAs ได้รับความสนใจสูง เนื่องจากผลิตภัณฑ์เม็ดพลาสติกที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นภายในเซลล์สามารถทนความร้อนได้ดีเมื่อนำมาขึ้นรูป สามารถนำไปใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ในกลุ่มพอลิโพรไพลีน (Polypropylene, PP) (Hocking and Marchessault, 1994) ส่วนพลาสติกชนิดพอลิแลคไทค์พบว่า มีคุณสมบัติของฟิล์มเหมาะสำหรับใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ชนิดพอลีเอสทิลีน (PE) และพอลิเอทธิลีนเทเรฟทาเลต (Polyethylene terephthalate, PET) ได้ สำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพทั้งสองชนิดนี้ของจุลินทรีย์จะใช้วัตถุดิบจากแป้ง น้ำตาลหรือกรดไขมันเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสร้างผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีงานวิจัยที่มีการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนอีกด้วย เช่น วัสดุเหลือทิ้งจากการสกัดน้ำมันมะกอก (Martinez, et al., 1995) วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหาร (Yu, et al., 1998) กากน้ำตาลจากอ้อย (Gouda, et al., 2001) กลีเซอรอลจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม (Hassan, et al., 1996) น้ำทิ้งจากโรงงานแป้ง (Haas, et al., 2008) น้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำมันมะกอก (Dionisi, et al., 2005) และน้ำทิ้งโรงงานปาล์มน้ำมัน (Alias and Tan, 2005) เป็นต้น ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตลง เนื่องจากพบว่าในการผลิตพลาสติก PHAs นั้นมีต้นทุนของวัตถุดิบและค่าใช้จ่ายในการทำให้บริสุทธิ์สูง จึงต้องมีการคัดเลือกและปรับปรุงจุลินทรีย์ให้มีความสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้สูง และใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกเพื่อลดค่าใช้จ่ายให้ต่ำที่สุด ในการสร้างผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญนำไปสู่การสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีความแตกต่างกัน โดยมีสารอาหารเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญและมีผลต่อการสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดของจุลินทรีย์ด้วย เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน วิตามินและเกลือแร่ รวมทั้ง สารบางชนิดที่สามารถเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ กลุ่มโคเอนไซม์หรือโคแฟคเตอร์ นอกจากนี้ปัจจัยทางกายภาพก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ เช่น อุณหภูมิในการหมัก ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ การให้อากาศ และการกวน เป็นต้น โดยทั่วไปส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์มีผลโดยตรงต่อชนิดและปริมาณการสร้างผลิตภัณฑ์ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ต้องมีส่วนประกอบสำคัญ 4 ส่วน คือ เป็นอาหารที่มีแร่ธาตุและสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและให้พลังงาน เป็นอาหารที่มีความสมดุลย์ของธาตุอาหารเพื่อความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ เป็นอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์และเป็นอาหารที่สร้างสารเหนี่ยวนำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดขึ้นได้ดี (Wiseman, 1995) สำหรับการสังเคราะห์พลาสติก PHAs ซึ่งเป็นกลุ่มสารพอลิเอสเทอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ (R)-3HA ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในรูป R-Configuration ทำให้มีความจำเพาะของสเตอริโอไอโซเมอร์ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์

ของเอนไซม์ PHA synthase (Sudesh et al., 2000) ในการสังเคราะห์ PHAs ชนิดต่าง ๆ จะมีเอนไซม์ PHA synthase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอน ลักษณะในการสะสมพลาสติก PHAs ในเซลล์นั้นจะมีเอนไซม์อยู่รอบๆ พื้นผิวของ PHA granule นอกจากนี้ยังมีโปรตีน phasin และโปรตีนที่เป็นตัวควบคุมแบบจำเพาะ (specific regulator protein) ซึ่งมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พลาสติกโดยตรง และในการสังเคราะห์จะมีเอนไซม์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความหลากหลาย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยมียีนมากกว่า 60 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พลาสติกกลุ่ม PHAs ซึ่งในการสังเคราะห์พลาสติกชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตหรือเรียกกันทั่วไปว่า PHB ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) โดยเริ่มจากอะซิติลโคเอนไซม์เอ (acetyl-co A) ถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ (acetoacetyl-co A) และไฮดรอกซีบัวทิริลโคเอนไซม์เอ (hydroxybuacetyl-co A) โดยการทำงานของเอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลส (β-ketothiolase) และเอนไซม์อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (acetoacetyl-coA reductase) จากนั้นจึงเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) ทำให้ไฮดรอกซีบัวทิริลโคเอนไซม์เอเปลี่ยนไปเป็นพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต โดยเอนไซม์ PHB synthase (Sudesh et al., 2000) ในกรณีที่มีอะซิติลโคเอนไซม์เอมากเกินไปจะส่งผลทำให้การสังเคราะห์ลดลงรวมถึงสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมก็เป็นสาเหตุสำคัญต่อชนิดของ PHAs ได้ด้วยเช่นเดียวกัน (Luengo, et al., 2003) นอกจากนี้ยังพบว่ามีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพลาสติก PHAs แต่ละชนิดได้แตกต่างกัน เช่น สายพันธุ์จุลินทรีย์ แหล่งสารอาหาร ออกซิเจน อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่าง เป็นต้น (Anderson and Dawes, 1990; Grothe et al., 1999; Khanna and Srivastana,2005 ; Silva, et al., 2004 ; Luengo, et al., 2003 ; Kasemsap and Wantawin, 2007)

นอกจากนี้การใช้หลักการปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์โดยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้เทคนิคทางวิศวกรรมพันธุศาสตร์ การใช้สารก่อการกลายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์ด้วยการฉายรังสีเป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการสร้างผลิตภัณฑ์ได้สูงขึ้นได้เช่นกัน (Stanbury, et al., 1995) เช่นในการศึกษาการเหนี่ยวนำเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิต PHB ได้แก่ *Bacillus megaterium* Y6, *B. subtilis* K8, *B. sphaericus* X3 และ *B. firmus* G2 ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี acriflavi และ 5-bromourasil พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (Hikmet, et al.,2003) ส่วนรายงานของ Divyashree และคณะ (2009) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus flexus* โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำเชื้อ *B. flexus* ที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 5 , 10, 20 และ 40 kGy พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 45 ของน้ำหนักเซลล์เมื่อได้รับรังสีแกมมา (5-40 kGy) และทำให้น้ำหนักโมเลกุลของ PHB เพิ่มสูงขึ้นจาก 1.5 $x10^5$ ถึง 1.9 $x\ 10^5$ พร้อมทั้งยังเพิ่มความทนแรงดึงจาก 18 ถึง 20 MPa หลังจากได้รับรังสีปริมาณ 10 kGy เป็นต้น นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาใช้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพลาสติกชนิดพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยการ over expression ยีน *Pha* ชนิดต่างๆ เช่น การทำ recombinant *E.coli* จากการตัดต่อยีน *Pha*C ของ Pseudomonas sp. ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต mcl-PHA synthase เพื่อทำให้เกิดการสังเคราะห์พอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่มีสายโซ่กลางขึ้น (Suriyamonkol et al., 2007)

พลาสติกที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต หรือพลาสติก PHAs เป็นอะลิฟาติกพอลิเมอร์ธรรมชาติที่จุลินทรีย์ผลิตและเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสำรอง ซึ่งจะเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่สมดุลของสารอาหารในการเจริญของจุลินทรีย์ มีปริมาณสารอาหารที่จำเป็น (essential nutrient) เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส หรือ แมกนีเซียม เป็นต้น อยู่ในปริมาณน้อย แต่มีปริมาณสารอาหารคาร์บอนสูงจึงเป็นผลให้เกิดการสะสมสารพลังงานสูงอยู่ในรูปพอลิเมอร์ (Salehizadeh & Van Loosdrecht, 2004) ที่มีการสังเคราะห์โดยทางกระบวนการทางชีวภาพ สามารถแบ่งหมวดหมู่ตามความยาวของเส้นสายของกรดไฮดรอกซีอัลคาโนอิต (hydroxyalkanoic acids) คือ พอลิเมอร์สายสั้น ซึ่งจะประกอบด้วยหมู่อัลคิลที่มีคาร์บอน 2 อะตอม ได้แก่ พลาสติกชนิดโฮโมพอลิเมอร์ เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (polyhydroxybutyrate, PHB) พอลิไฮดรอกซีวาเลอเรต (polyhydroxyvalerate, PHV) และพลาสติกชนิดโคพอลิเมอร์ของพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตกับไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxy butyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV) (Chien et al., 2007) ส่วนกลุ่มพอลิเมอร์ที่มีสายปานกลางซึ่งจะประกอบด้วยหมู่อัลคิลไม่น้อยกว่า 3 อะตอม ได้แก่ พอลิไฮดรอกซีออกตาโนเอต (poly-3-hydroxyoctanoate, PHO) พอลิไฮดรอกซีโนนาโนเอต (poly-3-hydroxynonanoate, PHN) เป็นต้น ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพลาสติก PHAs มีมากมายหลายกลุ่ม เช่น แบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* มีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์สายสั้นได้สูง (Lenz and Marchessault 2005) ในขณะที่ *Pseudomonas oleovorans* และ *Pseudomonads sensu* จะผลิตพอลิเมอร์สายปานกลางได้ดี (Timm and Steinbüchel 1990). คุณสมบัติของพลาสติก PHAs แต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับการรวมกันของชนิดและปริมาณหน่วยย่อยของโมโนเมอร์ของ 3-hyeoxy-acid (Ha) เช่น poly-3-hydroxybutyrate (PHB) ซึ่งพบว่ามีหน่วยย่อย HAs มีมากกว่า 80 ชนิด เป็นสารประกอบของ PHAs โดยในการผลิตหน่วยย่อยจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอนเป็นหลัก (Madison and Huisman, 1999 ; Hazer and Steinbüchel, 2007) พลาสติกในกลุ่ม PHAs ได้รับความสนใจในวงการอุตสาหกรรมพลาสติกมากเนื่องจากมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างพลาสติกชนิด พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตหรือเรียกกันทั่วไปว่า พลาสติก PHB ซึ่งมีคุณสมบัติสังเคราะห์ใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์พอลิโพรพิลีน (polypropylene) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (PHB) และ โคพอลิเมอร์ของ พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตกับไฮดรอกซีวาเลอเรต (PHBV) เปรียบเทียบกับพอลิโพรพิลีน (PP) (Ojumu et al., 2004)

Property	PHB	P(HB-HN)[a]			Polypropylene
		3 mol %	14 mol %	25 mol %	
Melting point(^{0}c)	175	169	150	137	176
Glass-transition temp (^{0}C)	15	-	-	-1	-10
Crystalline (%)	80	-	-	40	70
Young's modulus	3.5	2.9	1.5	0.7	1.7
Tensile strength (MPa)	40	38	35	30	34.5
Elongation to Break (%)	6	-	-	-	400
Impact strength (v/m)	50	60	120	400	45

จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าพลาสติก PHB มีความสามารถทนอุณหภูมิสูง โดยมีจุดหลอมเหลวสูงถึง 180 องศาเซลเซียส และมีคุณสมบัติเป็นฟิล์มกันน้ำและความชื้นได้ดี แต่พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาดน้อยกว่าพลาสติก PP มาก แต่มีข้อดีคือสามารถย่อยสลายได้ง่าย เป็นผลทำให้พลาสติกชนิดนี้ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในภาคอุตสาหกรรมและนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยต่างๆ ทั้งทางการแพทย์ และการเกษตร (Zhang et al., 2004)

ในการผลิตพลาสติก PHB ของจุลินทรีย์ พบว่ามีจุลินทรีย์มากกว่า 20 ชนิด สามารถสังเคราะห์และสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตไว้ภายในเซลล์ เช่น *Bacillus* sp. *Actinomycetes* sp., *Beijerinckia* sp., *Azospirillium* sp., *Chromatium* sp., *Chromobacterium* sp., *Chlorogloea* sp., *Hyphomicrobium* sp., *Ferrobacillus* sp., *Derxia* sp., *Rhodospirillium* sp., *Micrococcus* sp., *Lumpeopaedia* sp., *Streptomyces* sp., *Rhizobrium* sp., *Nocardia* sp., *Spirillium* sp. และ *Sphaerotilus* sp. แต่จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการศึกษาเพื่อผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตมีเพียง 4 ชนิดคือ *Alcaligenes* sp., *Azobacter* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Methylobacterium* sp. โดยเชื้อที่นิยมนำมาใช้มากคือ *Alcaligenes eutrophus* หรือที่รู้จักกันในชื่อ *Ralstonia eutropha* ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ง่ายและสร้างพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตได้ในปริมาณสูง (Kim et al., 2003) *Alcaligenes* sp. เป็นแบคทีเรียประเภทแกรมลบมีรูปร่างเป็นท่อนกลมหรือกลม มีขนาด 0.5-1.0 x 0.5-2.6 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา 1-8 เส้น โคโลนีมีลักษณะไม่มีสี สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน แต่มีบางสายพันธุ์ที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส พบได้ทั้งในน้ำและบนบก (Holt et al.,1994) จากรายงานของ Khandenavis และคณะ (2007) ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิต PHB จากตะกอนในอุตสาหกรรมนมและอุตสาหกรรมอาหาร โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาทดลองผลิต PHB ในอาหารที่ประกอบด้วยกรดซิตริก พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณร้อยละ 40 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนการเลี้ยงเชื้อ *Ralstonia eutropha* สายพันธุ์ NRRL B14690 โดยใช้ฟรุคโตสเข้มข้น 10 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตมวลเซลล์ได้สูงสุดเท่ากับ 3.25 กรัมต่อลิตร และผลิต PHB ได้เท่ากับ 1.4 กรัมต่อลิตร และการเติมยีสต์สกัดสามารถเพิ่มผลผลิตของ PHB ได้สูงยิ่งขึ้น (Khanna and Srivastana, 2005) มีรายงานพบว่านอกจากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* และ *Alcaligenes latus* จะสามารถสร้าง PHB ได้ในปริมาณสูงแล้ว ยังพบว่าเชื้อทั้งสองยังสามารถสังเคราะห์พลาสติกชนิด P(3HB-co-3HV) ซึ่งเป็นพลาสติกชนิดทนร้อน (Thermoplastic) ที่มีคุณภาพดีกว่าพลาสติก PHB แต่มีกระบวนการผลิตด้วยเทคนิคพิเศษและมีต้นทุนในการผลิตสูงกว่าได้อีกด้วย (Lee, 1995) ส่วนรายงานของ Ramsay และคณะ (1990) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Alacaligenes latus และ Alcaligenes eutrophus* บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิต P(HB-co-HV) ได้ในปริมาณร้อยละ 43 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากเชื้อแบคทีเรีย *Alacaligenes latus และ Alcaligenes eutrophus* นิยมนำมาใช้ในการศึกษาแล้ว พบว่าเชื้อ *Methylobacterium sp.* สามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณสูงและถูกนำมาใช้ศึกษาเพื่อผลิต PHB แล้วในปัจจุบัน (Nath, et al., 2008)

ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นวิธีที่สำคัญที่จะทำให้ได้ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น จากรายงานการ ศึกษาของ Hikmet และคณะ (2003) โดยทำการเหนี่ยวนำเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิต PHB ได้แก่

Bacillus megaterium Y6, *B. subtilis* K8, *B. sphaericus* X3 และ *B. firmus* G2 ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี acriflavi และ 5- bromourasil พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และจากรายงานของ Divyashree และคณะ (2009) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus flexus* โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำเชื้อ *B. flexus* ที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 5 , 10, 20 และ 40 kGy พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 45 ของน้ำหนักเซลล์เมื่อได้รับรังสีแกมมา (5-40 kGy) และทำให้น้ำหนักโมเลกุลของ PHB เพิ่มสูงขึ้นจาก 1.5 x 10^5 ถึง 1.9x 10^5 พร้อมทั้งยังเพิ่มความทนแรงดึงจาก 18 ถึง 20 MPa หลังจากได้รับรังสีปริมาณ 10 kGy นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อองค์ประกอบและปริมาณการผลิตพลาสติกชีวภาพได้แก่ แหล่งคาร์บอน พบว่าในธรรมชาติ มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ในการผลิต PHB จากแบคทีเรีย *Vibrio spp* ที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเลจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ M11, M14, M20 และ M31 โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันและความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า สายพันธุ์ M11 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้โซเดียมอะซิเตตเข้มข้นสูงถึง 7.8 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิต PHB ได้มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 30.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนการใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสายพันธุ์ M14 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 12.3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงที่สุดคิดเป็นร้อยละ 45.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนสายพันธุ์ M20 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 15.5 กรัมต่อลิตร โดยผลิต PHB ได้สูงสุดร้อยละ 42.8 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ M31 ที่เจริญได้ดี เมื่อใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 14.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ผลิต PHB ได้ปริมาณต่ำคิดเป็นร้อยละ 24.0 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Chien, et al., 2007) ส่วนในการผลิต PHB ของเชื้อ *Halomonas boliviensis* ได้สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 56 เมื่อใช้แป้งที่ผ่านการย่อยสลาย (starch hydrolysate) เป็นแหล่งคาร์บอน (Quillaguaman, et al., 2005) ส่วนในการเลี้ยง *Burknolderia megaterium* ด้วยกากน้ำตาลอ้อย พบว่าเชื้อสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับร้อยละ 46.2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงด้วยน้ำแช่ข้าวโพด (Mona, et al., 2001) ในการนำเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยสลาย (cellulose hydrolysate) มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHA จากเชื้อ *Burknolderia cepacia* และ *Burknolderia sacchari* พบว่าสามารถ PHA ได้ปริมาณสูงร้อยละ 53 และ 62 ตามลำดับ (Silva, et al., 2004)

ในการผลิตพลาสติก PHB จากเชื้อ *Azotobacter chroococum* จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ 281, 398 และ 1723 โดยการใช้หางนมเป็นส่วนประกอบของอาหารที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ เช่น แอมโมเนียมไนเตรต แบคโตเปปโตน เคซีน ยีสต์สกัด เนื้อสกัด ทริปโตน และโปรทิเอชเปปโตน พบว่าการใช้เนื้อสกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิต PHB ได้สูงที่สุดในปริมาณร้อยละ 75 ของน้ำหนักแห้ง หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Khanafari, et al.,2006) ส่วนรายงานของ Khanna และ Srivastava (2006) ซึ่งทำการศึกษาความเหมาะสมในการเติมความเข้มข้นของไนโตรเจน และระยะเวลาของการเติมโดยทำการเลี้ยงเชื้อ *R. eutropha* NRRL B14690 ในถังปฏิกรณ์ โดยทำการเติมไนโตรเจน (7 กรัมต่อลิตร) ที่อัตราการเติม 70 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 50 เชื้อ *R. euthopha* มีการผลิตมวลเซลล์ได้มากถึง 32 กรัมต่อลิตร

มีปริมาณ PHB 14 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงพบว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน จะทำให้ได้ปริมาณของพลาสติกแตกต่างกัน ดังนั้นจึงพบว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน จะทำให้ได้ปริมาณของพลาสติกแตกต่างกันด้วย อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างมีผลต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 จะผลิตพลาสติกชีวภาพได้ดี ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาเช่นกัน จากรายงานการศึกษาของ Grothe และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดยการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes latus* พบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB ได้แก่ ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสหรือผันแปรได้ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม คือ 6.5 โดยมีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.075 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณ PHB ร้อยละ 63 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้พบว่าปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHB เนื่องจากในสภาวะออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซิเตรทซินเทสและไอโซซิเตรทดีไฮโดรตีเนสจะถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิทิบโคเอนไซม์เอไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยใช้เอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลส จึงมีการสะสม PHB แทน (Luego et al., 2003)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

Alcaligenes latus TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำโดยการได้รับสัมผัสรังสีแกมมาตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน (*A. latus* TISTR 1403/γ-2AA) ซึ่งเป็นส่วนที่ได้จากผลการศึกษาของขวัญใจ แก้วจันทร์ และคณะ (2554) โดยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งจะใช้ชื่อเรียกว่า สายพันธุ์เดิม ตลอดการทดลอง

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-5MS ความยาว 30 เมตร หนา 0.25 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 2-อะมิโนแอนทราซีน (2AA) บริษัท Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstr

3.2 อะคริฟลาวิน (Acriflavin) บริษัท Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstr

3.3 5-โบรโมยูราซิล (5-Bromourasil) บริษัท Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstr

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

3.5 แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.6 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.7 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.8 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.9 โซเดียมไบคาร์บอเนต $(NaHCO_3)$ บริษัท QRëC™

3.10 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท QRëC™

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

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

3.13 แคลเซียมไดคลอไรด์ $(CaCl_2)$ บริษัท อินเตอร์เอ็ดดูเคชั่น ซัพพลายส์ จำกัด

3.14 แคลเซียมไดคลอไรด์ 2 ไฮเดรต $(CaCl_2 \cdot 2H_2O)$ บริษัท APS Finechem

3.15 กรดบอริก (H_3BO_3) บริษัท QRëC™

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

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

3.18 แมงกานีสคลอไรด์ 4 ไฮเดรต $(MnCl_2 \cdot 4H_2O)$ บริษัท Ajax Laboratory Chemicals

3.19 โซเดียมโมลิปดินัม 2 ไฮเดรต $(Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O)$ บริษัท Ajax Chemicals

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

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

3.22 คอปเปอร์คลอไรด์ 2 ไฮเดรต $(CuCl_2 \cdot 2H_2O)$ บริษัท QRëC®

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

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

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

3.26 เฟอริกซิเตรท (Ferric citrate) บริษัท Fluka

3.27 โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) บริษัท FARMITALIA CARLO ERBA

3.28 โซเดียมไฮดรอกไซค์ (NaOH) บริษัท Merck KGaA, Darmstadt, Germany

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

3.30 ไดไนโตรซาลิไซลิคแอซิด (DNS) บริษัท Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstr

3.31 โซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (SDS**)** บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.32 โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl)

3.33 น้ำตาลกลูโคส (Glucose) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.34 น้ำตาลฟรุคโตส (Fructose) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.35 น้ำตาลซูโครส (Sucrose) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.36 กากมันสำปะหลัง

3.37 น้ำแช่ข้าวโพด (Corn Steep Liquor) บริษัท Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstr

3.38 กากน้ำตาล (Molasses)

วิธีการดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายของเชื้อ *A. lactus* TISTR 1403 และความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพโดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

1. การศึกษาการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403

ในเบื้องต้นได้ตรวจสอบการเจริญและการสร้างพลาสติกชีวภาพของเชื้อ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารดัดแปลงสูตรสำหรับผลิตพลาสติกชีว ภาพ (Grothe et al., 1999) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อศึกษาการเจริญรวมทั้งหาน้ำหนักเซลล์แห้งและวัดการสร้าง PHB ของแบคทีเรีย

2. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีการฉายรังสี

ทำโดยเตรียมอาหารสูตร Nutrient broth ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 5 นาที เขี่ยเชื้อ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่เก็บรักษาไว้ในอาหารวุ้นเอียง เชื้อละ 1 หลอด เพื่อเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการเหนี่ยวนำเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการวิธีการฉายรังสี โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่อัตรา 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6-9 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้ มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาปั่นเหวี่ยงล้างเซลล์อีกครั้งด้วยน้ำกลั่นสเตอริไลส์ และนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย ใส่ปริมาณหัวเชื้อ 1000 เซลล์ 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาณ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฉายรังสีแกมมา โดยใช้เครื่องฉายรังสี Mark I ปริมาณรังสีที่ 0.8 kGray และ 1 kGray จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการฉายรังสีมาทำการเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยง โดยทำการกระจายเชื้อลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร Nutrient agar จากนั้นนำไปบ่มเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดขนาดของโคโลนีที่

เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเก็บตัวอย่างโคโลนีของแบคทีเรียที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

2. วิธีการเหนี่ยวนำโดยการใช้สารเคมี

ทำโดยเตรียมอาหารสูตร Nutrient broth ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 5 นาที เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่อัตรา 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการนำไปทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี ทำโดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารสูตร Nutrient broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ตกตะกอนมาปั่นเหวี่ยงล้างเซลล์อีกครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว และทำการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เติมหัวเชื้อ *A. lactus* TISTR 1403 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติมสาร 2-aminoanthracene (2AA) ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ทำการเหนี่ยวนำโดยใช้สารเคมีมาทำการเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง โดยทำการกระจายเชื้อลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร Nutrient agar จากนั้นนำไปบ่มเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดขนาดของโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเก็บตัวอย่างโคโลนีของแบคทีเรียที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

3. การศึกษาความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพของเชื้อ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยรังสีในสูตรอาหารสังเคราะห์

ทำการตรวจสอบการเจริญและการสร้างพลาสติกชีวภาพของเชื้อ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำรังสีแกมม่า ทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารดัดแปลงสูตรสำหรับผลิตพลาสติกชีวภาพ (Grothe et al., 1999) โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ของอาหารที่เลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3-4 วัน และศึกษาการเจริญตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อศึกษาการเจริญรวมทั้งหาน้ำหนักเซลล์แห้งและวัดการสร้าง PHB ของแบคทีเรีย

4. การศึกษาความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพของเชื้อ *Alcaligenes latus* ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีในสูตรอาหารสังเคราะห์

ทำการตรวจสอบการเจริญและการสร้างพลาสติกชีวภาพของเชื้อ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสาร 2-amioanthracene (2AA) ทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารดัดแปลงสูตรสำหรับผลิตพลาสติกชีว ภาพ (Grothe et al., 1999) โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ของอาหารที่เลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3-4 วัน และศึกษาการเจริญตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อศึกษาการเจริญรวมทั้งหาน้ำหนักเซลล์แห้งและวัดการสร้าง PHB ของแบคทีเรีย

5. การศึกษาความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพของเชื้อ *Alcaligenes latus* ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีและรังสีแกมมาในสูตรอาหารสังเคราะห์ 3 สูตร

ทำการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารดัดแปลงสูตรที่ 1 (Ryu และคณะ, 1996) สูตรอาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 (Grothe และคณะ, 1999) และสูตรอาหารดัดแปลงสูตรที่ 3 (Khanna และ Srivastana, 2005) ดังตารางที่ 2 และ 3 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ของอาหารที่เลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3-4 วัน และศึกษาการเจริญตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 2 องค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร

องค์ประกอบของสูตรอาหาร	สูตรที่ 1 (Ryu และคณะ, 1996)	สูตรที่ 2 (Grothe และคณะ,1999)	สูตรที่ 3 (Khanna และ Srivastana,2005)
กลูโคส (Glucose)	10 กรัมต่อลิตร	20 กรัมต่อลิตร	10 กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	1 กรัมต่อลิตร	1.4 กรัมต่อลิตร	2.0 กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.5 กรัมต่อลิตร	1.5 กรัมต่อลิตร	2.0 กรัมต่อลิตร
Na_2HPO_4	9 กรัมต่อลิตร	1.8 กรัมต่อลิตร	0.6 กรัมต่อลิตร
$MgSO_4$ $7H_2O$	0.2 กรัมต่อลิตร	0.2 กรัมต่อลิตร	0.2 กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	-	-	0.02 กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	-	-	0.1 กรัมต่อลิตร
Trace element solution	1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร	1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร	10 มิลลิลิตรต่อลิตร

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของ Trace element solution ในอาหารทั้ง 3 สูตร

องค์ประกอบของ Trace element solution	สูตรที่ 1 (Ryu และคณะ, 1996)	สูตรที่ 2 (Grothe และคณะ ,1999)	สูตรที่ 3 (Khanna และ Srivastana, 2005)
$FeSO_4$ $7H_2O$	10 กรัมต่อลิตร	-	0.0013 กรัมต่อลิตร
$ZnSO_4$ $7H_2O$	2.25 กรัมต่อลิตร	0.1 กรัมต่อลิตร	0.0002 กรัมต่อลิตร
$CuSO_4$ $5H_2O$	1 กรัมต่อลิตร	0.2 กรัมต่อลิตร	-
$MnSO_4$ H_2O	0.5 กรัมต่อลิตร	-	-
$CaCl_2$ $2H_2O$	2 กรัมต่อลิตร	10 กรัมต่อลิตร	-
$Na_2B_4O_7$ 10 H_2O	0.23 กรัมต่อลิตร	-	-
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0.1 กรัมต่อลิตร	-	-
35% HCl	10 มิลลิลิตรต่อลิตร	-	-
Ammonium Fe (III) citrate	-	0.6 กรัมต่อลิตร	-
H_3BO_3	-	0.3 กรัมต่อลิตร	0.0006 กรัมต่อลิตร
$MnCl_2$ H_2O	-	0.03 กรัมต่อลิตร	-
Na_2MoO_4 $7H_2O$	-	0.03 กรัมต่อลิตร	-
$NaSO_4$ $7H_2O$	-	0.02 กรัมต่อลิตร	-
$CoCl_2$ $6H_2O$	-	0.01 กรัมต่อลิตร	-
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ $4H_2O$	-	-	0.0006 กรัมต่อลิตร

6. การศึกษาความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทที่เหมาะสมในการผลิตพลาสติกชีวภาพ

ทำการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารดัดแปลงที่ให้ปริมาณพลาสติกชีวภาพสูงที่สุดจากการศึกษาข้างต้น โดยใช้กากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 , 15, 20, 25, 30 และ 50 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นทำเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3-4 วัน และศึกษาการเจริญตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

7. การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตพลาสติกชีวภาพ

คัดเลือกความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทที่ให้ปริมาณพลาสติกชีวภาพสูงที่สุดจากหัวข้อการศึกษาข้างต้น แล้วทำการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารดัดแปลงโดยจะใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจน 3 แหล่ง ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมอะซิเตท ที่ความเข้มข้น 1.4 กรัมต่อลิตร และใช้หัวเชื้อเริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วยความเข้มข้นร้อยละ 3 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นทำเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3-4 วัน และศึกษาการเจริญตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

8. การศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม

นำผลการทดลองจากข้อที่ 3 และ ข้อที่ 4 มาทำการเลี้ยงเชื้อโดยปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) เท่ากับ 10, 15, 21 และ 30 ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วยความเข้มข้นร้อยละ 3 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นทำเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3-4 วัน และศึกษาการเจริญตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

ส่วนที่ 2 การศึกษาการกลายซ้ำและ แหล่งอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพลาสติกชีวภาพ

1. การเตรียมหัวเชื้อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์

เชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ เชื้อ *A. latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำโดยการได้รับสัมผัสรังสีแกมมาตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน (*A. latus* TISTR 1403/γ-2AA) โดยใช้เป็นตัวควบคุม จะถูกเก็บรักษาบนอาหารวุ้นเอียงชนิด Nutrient agar (NA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยจะเปลี่ยนถ่ายเชื้อใหม่ทุก ๆ 3 เดือน

สำหรับการนำมาใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น ทำโดยเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ที่ประกอบด้วยเปปโตน (Peptone) 5 กรัมต่อลิตร และเนื้อสกัด (Beef extract) 3 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่

อุณหภูมิห้องความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในระยะปลายของการเจริญ (log phase) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้นร้อยละ 7 ในทุกการทดลอง

2. การเหนี่ยวนำแบคทีเรียด้วยสารเคมี และรังสีร่วมกับสารเคมี

นำเชื้อที่ต้องการใช้ทดลองมาเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นตามวิธีการในข้อ 1 นับจำนวนเซลล์ให้ได้จำนวน 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อทำให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และทำการเจือจางให้ได้จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเชื้อไปทำการเหนี่ยวนำตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ครั้งที่ 1 นำเชื้อที่เตรียมไว้จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ซึ่งใช้รังสีเหนือม่วงความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่มีระยะห่างจากเชื้อ 13 เซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านรังสีเหนือม่วงทุก ๆ 1 นาที นำไปเติมสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปกระจายเชื้อ (spread plate) โดยดึงตัวอย่าง 30 ไมโครลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร NA นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยง พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างโคโลนีที่รอดชีวิต เพื่อนำไปตรวจสอบการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเลี้ยงในสูตรอาหารของ Grothe et al. (1999)

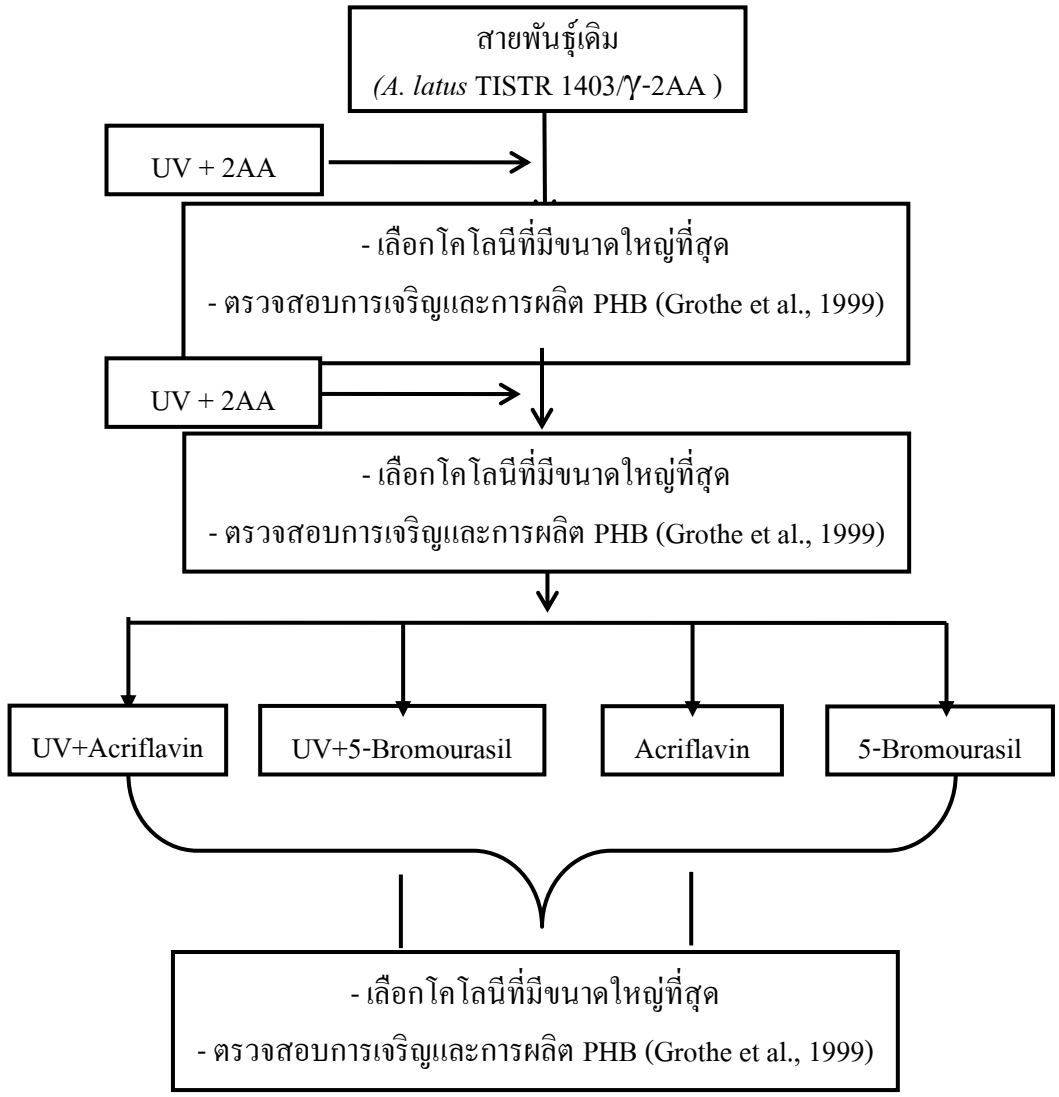
ครั้งที่ 2 นำเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกครั้งที่ 1 มาเหนี่ยวนำซ้ำด้วยวิธีการเดียวกับครั้งที่ 1 อีกครั้ง จากนั้นนำไปกระจายเชื้อ โดยดึงตัวอย่าง 30 ไมโครลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร NA นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยง พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างโคโลนีที่รอดชีวิต เพื่อนำไปตรวจสอบการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเลี้ยงในสูตรอาหารของ Grothe et al. (1999)

ครั้งที่ 3 นำเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วย สาร 2-อะมิโนแอนทราซีน จำนวน 2 ครั้ง มาทำการเหนี่ยวนำซ้ำโดยใช้วิธีการแตกต่างกัน ได้แก่ การได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสารอะคริฟลาวิน (Acriflavin) การได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงร่วมกับสาร 5-โบรโมยูราซิล (5-Bromourasil) การได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวิน และการได้รับสัมผัสสาร 5-โบรโมยูราซิล

การเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสารอะคริฟลาวินหรือการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล จะใช้วิธีการเดียวกับครั้งที่ 1 จากนั้นนำไปกระจายเชื้อ โดยดึงตัวอย่าง 30 ไมโครลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร NA นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยง พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างโคโลนีที่รอดชีวิต เพื่อนำไปตรวจสอบการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเลี้ยงในสูตรอาหารของ Grothe et al. (1999)

ส่วนการเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวินหรือการได้รับสัมผัสสาร 5-โบรโมยูราซิล จะใช้สารที่ความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปกระจายเชื้อ โดยดึงตัวอย่าง 30 ไมโครลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร NA นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยง พร้อมทั้ง

เก็บตัวอย่างโคโลนีที่รอดชีวิต เพื่อนำไปตรวจสอบการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเลี้ยงในสูตรอาหารของ Grothe et al. (1999) โดยมีขั้นตอนของการเหนี่ยวนำซ้ำเชื้อดังนี้



3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ทำโดยเตรียมอาหารสูตรสำหรับผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน 1 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 7 ของปริมาตรอาหารทั้งหมด ลงในแต่ละชุดการทดลอง ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อพร้อมทั้งวิเคราะห์ผล โดยวัดค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยมีสภาวะที่ศึกษามีดังนี้

3.1 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

ทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร ได้แก่ DSMZ catalogue (1993), El-Sayed et al. (2009) และ Savenkova et al. (1999) ดังแสดงในตารางที่ 4 เพื่อเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตในสูตรอาหารที่แตกกันทั้ง 3 สูตร

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา

องค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร)	DSMZ catalogue, 1993	El-Sayed et al., 2009	Savenkova et al., 1999
Fructose	20	-	-
Sucrose	-	20	20
NH_4Cl	0.5	-	-
KH_2PO_4	2.3	1.5	0.2
Na_2HPO_4	2.3	-	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	0.2	0.41
$NaHCO_3$	0.5	-	-
$CaCl_2$	0.01	-	0.1
Ferric citrate	0.5	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	2	-
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	-	9	-
$FeCl_2 \cdot H_2O$ *	-	60	-
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ *	-	10	-
NH_4NO_3	-	-	3
K_2HPO_4	-	-	0.64
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ *	-	-	10
Na-citrare	-	-	0.5
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ *	-	-	6
Trace element (ml/l)	5	1	-

* = mg/l

3.2 การศึกษาการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ ในสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุดจากข้อที่ 3.1 ซึ่งได้รับการดัดแปลงโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ความเข้มข้น 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ในสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้สูตรอาหารที่ได้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.1 เป็นชุดควบคุม

3.3 การศึกษาใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ ในสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุดจากข้อที่ 3.2 ซึ่งได้รับการดัดแปลงโดยใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนที่ความเข้มข้น 2, 3 และ 4 กรัมต่อลิตร เพื่อ

เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ในสูตรอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้สูตรอาหารที่ได้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.2 เป็นชุดควบคุม

3.4 การศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB

ทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ ในสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุดจากข้อ 3.3 โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ในสูตรอาหารที่ใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้สูตรอาหารที่ได้ผลดีที่สุดจากข้อ 3.3 เป็นชุดควบคุม

ส่วนที่ 3 การศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

1. การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch)

ทำการเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยใช้สภาวะต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3 เติมหัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 10 ลงในถัง โดยปริมาตรการทำงานทั้งหมดเท่ากับ 3 ลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1-2 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของเหลวต่อนาที (vvm) ความเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 100-200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

2. การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (fed-batch)

ทำการเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยใช้สภาวะต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3 ปริมาตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 10 ลงในถัง อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1-2 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของเหลวต่อนาที (vvm) ความเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 100-200 รอบต่อนาที เมื่อทำการหมักผ่านไปถึงช่วงปลายของการเจริญ (late log phase) ของเชื้อ ชั่วโมงที่ 18 จึงทำการเติมอาหารใหม่ (Feed medium) ที่มีความเข้มข้นของอาหารเท่ากับ 10 เท่า ที่อัตราการเติม (feed rate) เท่ากับ 79 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงซึ่งคำนวณได้จากสูตร $F=F_0e^{\mu t}$ (ภาคผนวก ข) ทำการหมักต่อจนครบ 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ส่วนที่ 4 การศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรีย และการตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

1. การศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรีย

1.1 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

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

ภาพที่ 1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น LEO 1450 VP บริษัท LEO

1.2 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) แล้วจึงนำตัวอย่างมาแช่ในสารผสมโพรไพลีนออกไซด์ (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 (ภาพที่ 3-3)

ภาพที่ 2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน รุ่น TECNAI 20 บริษัท Philips

2. การตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (Ganzeveld et al., 1989)

การตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ทำโดยนำตัวอย่างไประเหยแห้ง (Freeze dry) จากนั้นนำเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัม ละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสาร esterification fluid 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยกรดเบนโซอิก 0.025 กรัม เมทานอลปริมาตร 242 มิลลิลิตร และกรดซัลฟุริก เข้มข้นร้อยละ 95-98 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเก็บตัวอย่างที่เกิดจากการแยกชั้นโดยนำส่วนของคลอโรฟอร์มที่มี β-hydroxymethyl ester ละลายอยู่ นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรมิตรี (gas chromatography-mass spectrophotometry, GC-MS)

สภาวะของแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatograph) จะควบคุมโดยใช้อุณหภูมินำเข้าที่ 250 องศาเซลเซียส กำหนดให้อุณหภูมิของ Oven เริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 70 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการเพิ่ม 5 องศาเซลเซียสต่อนาที และอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นเป็น 115 องศาเซลเซียส มีอัตราการเพิ่ม 15 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 190 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 25 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 250 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการเพิ่ม 10 องศาเซลเซียสต่อนาที กำหนดให้อุณหภูมิสุดท้าย (Post Run) คือ 250 องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 6 นาที คอลัมภ์ที่ใช้คือ HP-5MS, ความยาวเท่ากับ 30 เมตร ความหนาเท่ากับ 0.25 ไมโครเมตรและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.25 มิลลิลิตร

สภาวะของ Mass Spectrometer ควบคุมโดยใช้ ระบบ Electron Ionization: Acquisition mode; Sim mode ใช้ Detector ชนิด Electron multiplier detector กำหนดระบบ Solvent delay โดยใช้เวลา 4 นาที

สารมาตรฐานใช้สาร Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid], natural origin จาก Aldrich Product number 363502 เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข)

ในการวิเคราะห์กำหนดระบบการฉีดสารตัวอย่างแบบ Splitless ใช้ปริมาตรสารตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร

วิธีการวิเคราะห์ (ภาคผนวก ข)

การวิเคราะห์ข้อมูลในแต่ละการศึกษา จะทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยแต่ละชุดของการทดลองมีจำนวน 3 ซ้ำ ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การวิเคราะห์มวลเซลล์แห้ง (Dry cell weight, DCW)
2. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยวิธี Gravimetric method
3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ DNS assay (Miller, 1959)
4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

การคำนวณจลนพลศาสตร์ของการผลิต

นำค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ที่ได้จากการศึกษามาคำนวณหาค่าดัชนีจลนพลศาสตร์ คือ สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากเซลล์ (Yp/x) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q*p*)

1. สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) มีหน่วยเป็นกรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร

$$(Yx/s) = \frac{X-Xo}{So-S}$$

2. สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) มีหน่วยเป็นกรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร

$$(Yp/s) = \frac{P-Po}{So-S}$$

3. สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากเซลล์ มีหน่วยเป็นกรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์

$$(Yp/x) = \frac{P-Po}{X-Xo}$$

4. อัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

$$Qp = \frac{P}{t}$$

กำหนดให้

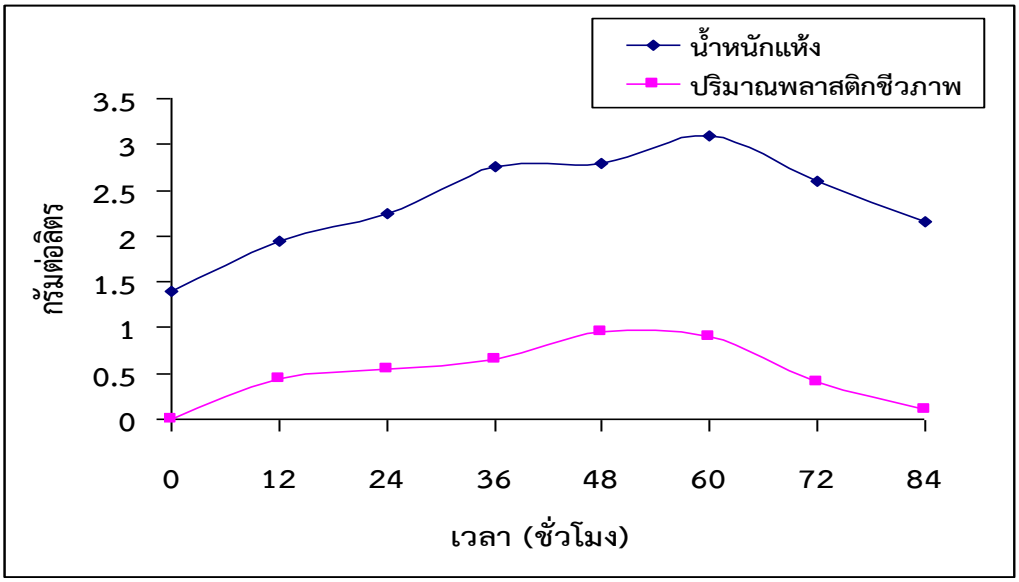
X_0 คือ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น
X คือ ปริมาณเซลล์ที่เวลาที่สนใจ
S_0 คือ ปริมาณสารอาหารเริ่มต้น
S คือ ปริมาณสารอาหารที่เวลาที่สนใจ
P_0 คือ ปริมาณ PHB ที่แบคทีเรียผลิตได้เริ่มต้น
P คือ ปริมาณ PHB ที่แบคทีเรียผลิตได้ที่เวลาที่สนใจ
t คือ เวลา (ชั่วโมง)

บทที่ 4
ผลการดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายของเชื้อ *A. lactus* TISTR 1403 **และความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพโดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน** ประกอบไปด้วยรายละเอียดในการศึกษาดังนี้

1. การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ในสภาวะปลอดเชื้อ

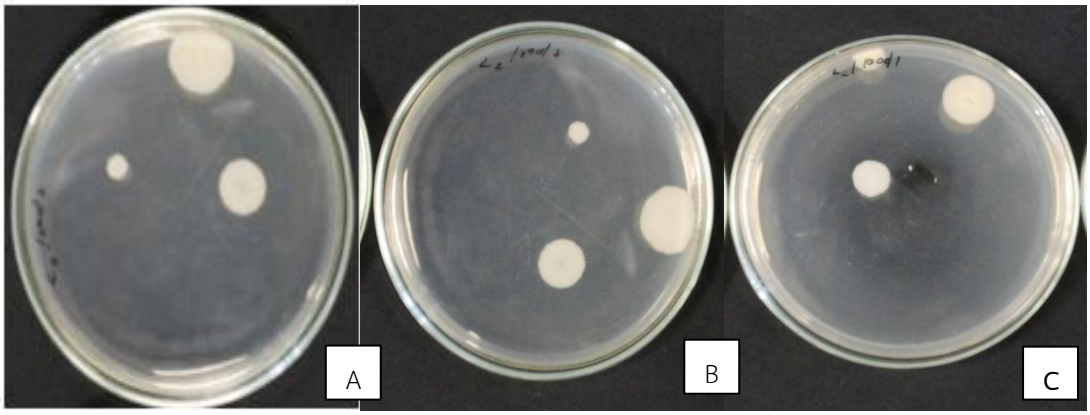
เมื่อนำแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 (สายพันธุ์เดิม) มาเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตรสำหรับผลิตพลาสติกชีวภาพ (Grothe et al., 1999) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อศึกษาการเจริญรวมทั้งหาน้ำหนักเซลล์แห้งและวัดการสร้างพลาสติกชีวภาพ ของแบคทีเรีย พบว่า *A. lactus* TISTR 1403 มีการเจริญอย่างช้า ๆ เริ่มเข้าสู่ระยะก้าวหน้าหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง โดยสังเกตพบว่าอาหารมีความขุ่นเพิ่มขึ้น จากนั้นการเจริญเริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยสามารถผลิตมวลเซลล์และพลาสติกชีวภาพได้สูงสุดเท่ากับ 2.50 และ 0.95 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง คิดเป็นร้อยละ 38 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของพลาสติกชีวภาพ เท่ากับ 0.63 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง



ภาพที่ 3 ค่าน้ำหนักแห้งของมวลเซลล์โดยรวมและ ปริมาณพลาสติกชีวภาพที่สกัดได้ จากการเลี้ยง *Alcaligenes lactus* TISTR 1403

2. การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. โดยการหนี่ยวนำการฉายรังสีแกมมาร่วมกับการใช้สารเคมี

จากการนำแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 มาทำการเหนี่ยวนำโดยการฉายรังสีแกมมาที่ 0.8 และ 1 กิโลเกรย์ และการใช้สาร 2- aminoanthracene (2-AA) จากนั้นนำแบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำมาเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยง ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *A. lactus* TISTR 1403/γ และ *A. lactus* TISTR 1403/2AA มีการเจริญอย่างรวดเร็ว สังเกตจากการเกิดโคโลนีของแบคทีเรียและเมื่อเปรียบเทียบขนาดโคโลนีพบว่ามีขนาดใหญ่กว่าขนาดโคโลนีของ *A. lactus* TISTR 1403 (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.3 เซนติเมตร) โดยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของแบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำมีค่าเท่ากับ 0.75, 0.70 และ 0.50 เซนติเมตร ตามลำดับ ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย ที่ผ่านการเหนี่ยวนำจะมีรูปร่างกลม นูนเล็กน้อย และมีขอบหยักแบบ undulate (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีของ *A. lactus* TISTR 1403 / γ 0.8 (A) และ *A. lactus* TISTR 1403 / γ 1 kGray (B) และ *A. lactus* TISTR 1403 / 2AA (C) ที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. การตรวจสอบการผลิตพลาสติกชีวภาพของจุลินทรีย์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำโดยวิธีการฉายรังสี

ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายพันธุ์โดยวิธีการฉายรังสีแกมมาปริมาณรังสีที่ 0.8 และ 1 kGray เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อทดสอบการสร้างพลาสติกชีวภาพ แสดงผลดังตารางที่ 5 พบว่าการเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณรังสี 0.8 และ 1 kGray ค่าการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้จากการฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 0.8 kGray มีค่าการเจริญที่ดีกว่าที่ปริมาณรังสี 1 kGray แต่มีการสร้างพลาสติกชีวภาพได้ใกล้เคียงกัน คือ 0.7 กรัมต่อลิตร แต่มีระยะในการสะสมพลาสติกชีวภาพแตกต่างกันคือที่เวลาเลี้ยง 36 และ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ค่าน้ำหนักแห้งของมวลเซลล์โดยรวมและ ปริมาณพลาสติกชีวภาพที่สกัดได้ จากการเลี้ยงเชื้อ *A. lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายพันธุ์โดยวิธีการฉายรังสีแกมมาปริมาณรังสีที่ 0.8 และ 1 kGray

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณรังสีแกมมาที่ 0.8 kGray			ปริมาณรังสีแกมมาที่ 1 kGray		
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ปริมาณ PHB (g/l)	PHB content (%w/w)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ปริมาณ PHB (g/l)	PHB content (%w/w)
0	2.20	0.00	0	1.25	0.40	32.00
12	2.37	0.10	4.23	1.45	0.10	6.90
24	3.65	0.20	5.48	3.45	0.60	17.39
36	2.77	0.70	25.30	2.85	0.25	8.77
48	2.70	0.47	17.28	2.80	0.25	8.93
60	3.50	0.40	11.43	3.25	0.70	21.54
72	4.13	0.47	11.29	2.55	0.65	25.49
84	3.63	0.40	11.01	2.27	0.10	4.41

4. การผลิตพลาสติกชีวภาพของจุลินทรีย์ที่เหนี่ยวนำด้วยสารเคมีที่ก่อการกลายพันธุ์

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการใช้สารเคมี 2-amioanthracene (2AA) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี แสดงในตารางที่ 6 พบว่าเชื้อมีน้ำหนักแห้งของมวลเซลล์โดยรวมสูงสุด ในชั่วโมงที่ 36 โดยสามารถผลิตพลาสติกชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 0.47 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 12 คิดเป็นร้อยละ 44.44 ของน้ำหนักแห้ง

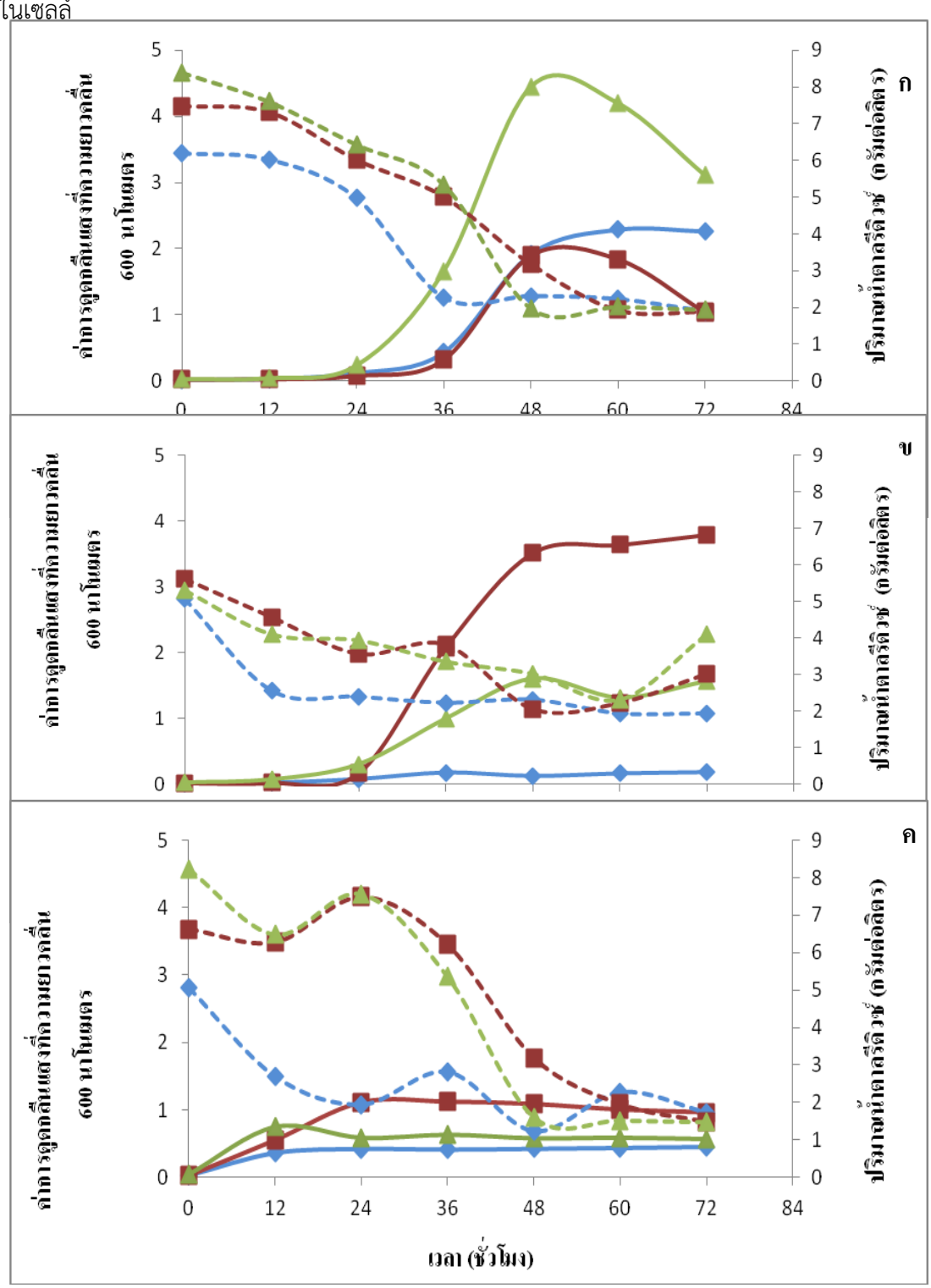
ตารางที่ 6 น้ำหนักแห้งของมวลเซลล์โดยรวมและ ปริมาณพลาสติกชีวภาพที่สกัดได้ จากการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี 2-AA

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	ปริมาณ PHB (g/l)	PHB content (%w/w)
0	0.60	0.35	58.33
12	1.05	0.47	44.44
24	1.17	0.40	34.29
36	1.50	0.20	13.33
48	1.45	0.33	22.99
60	1.10	0.40	36.36
72	0.95	0.45	47.37
84	1.35	0.13	9.88

5. การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพโดยสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร

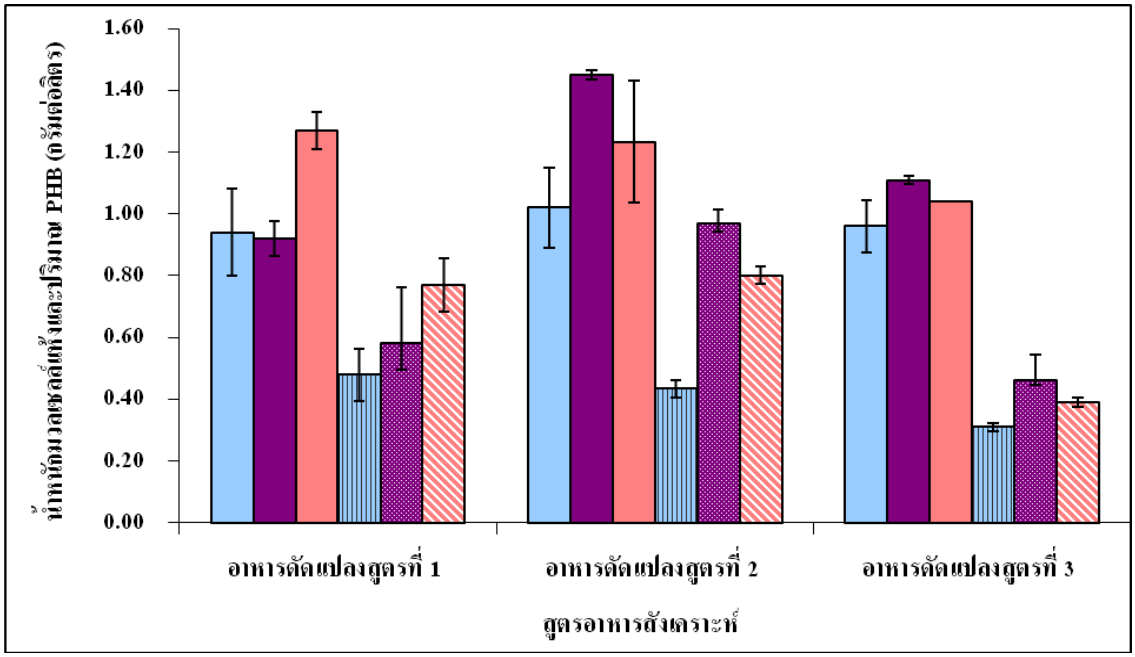
ในการเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes latus* ที่ผ่านการกลายกับสายพันธุ์เดิมรวมจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 (*A. latus*), *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสาร 2- amioanthracene (2AA) (*A. latus*/2AA) และ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยรังสีแกมมาที่ 0.8 KGy (*A. latus*/ γ) ในอาหารดัดแปลงทั้ง 3 สูตร ได้แก่ สูตรอาหารที่ 1 ดัดแปลงจาก Groth และคณะ(1999) สูตรอาหารที่ 2 ดัดแปลงจาก Ryu และคณะ, (1996) และ สูตรอาหารที่ 3 ดัดแปลงจาก Khanna และ Srivastana (2005) โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 และ ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง พบว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตรที่ 1 และ 2 มีการเจริญในระยะก้าวหน้าที่ 36 ชั่วโมง ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยในอาหารดัดแปลงสูตรที่ 1 มีค่าลดลงมากที่สุดอยู่ระหว่างเวลา 36-48 ชั่วโมง และในอาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 มีค่าลดลงมากที่สุดอยู่ระหว่างเวลา 12-24 ชั่วโม ง ส่วนในอาหารดัดแปลงสูตรที่ 3 มีการเจริญในระยะก้าวหน้าที่ 12 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงมากที่สุดอยู่ระหว่างเวลา 12-24 ชั่วโมง (ภาพที่ 5) จะเห็นได้ว่าอาหารดัดแปลงสูตรที่ 1 ให้ค่าการเจริญที่สูงกว่า เนื่องจากมีปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนที่เพียงพอต่อการเจริญ ส่วนการเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 ให้ค่าการเจริญรองลงมาจากอาหารดัดแปลงสูตรที่ 1 เนื่องจากมีปริมาณคาร์บอนที่สูง แต่มีปริมาณฟอสเฟตไม่เพียงพอจึงส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ และในอาหารดัดแปลงสูตรที่ 3 เชื้อมีการอัตราเจริญรวดเร็วในช่วงแรก แต่ให้ค่าการเจริญน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารดัดแปลงอีก 2 สูตร อาจเป็นผลมาจากองค์ประกอบของอาหารดัดแปลงสูตรที่ 3 ซึ่งเพิ่มแคลเซียมคลอไรด์ และยีสต์สกัด ลงในอาหารดัดแปลง โดยจากการศึกษาอาหารดัดแปลงทั้ง 3 สูตร พบว่าปริมาณน้ำตาล

รีดิวซ์ที่ลดลงมีผลสอดคล้องกับอัตราการเจริญ และมีปริมาณการสะสมของพลาสติกชีวภาพเพิ่มขึ้นภายในเซลล์



ภาพที่ 5 อัตราการเจริญ (—) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (---) ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยที่ เชื้อ *A. latus* (◆) เชื้อ *A. latus*/2AA (■) เชื้อ *A. latus*/γ (▲) : ก=อาหารดัดแปลงสูตรที่ 1 ข = อาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 ค = อาหารดัดแปลงสูตรที่ 3

จากการเลี้ยงเชื้อพบว่าในชั่วโมงที่ 48 ในอาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 เชื้อ *A. latus*/2AA ให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 1.45 กรัมต่อลิตรและปริมาณพลาสติกชีวภาพเท่ากับ 0.97 กรัมต่อลิตรคิด เป็นร้อยละ 66.74 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง รองลงมาคือเชื้อ *A. latus*/γ ในอาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 ให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 1.23 กรัมต่อลิตรและปริมาณพลาสติกชีวภาพเท่ากับ 0.80 คิดเป็นร้อยละ 64.86 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (ภาพที่ 6) ซึ่งพบว่ามีค่าสูงกว่าการศึกษาของ Groth และคณะ (1999) รายงานว่า การเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes latus* ATCC 29713 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 0.38 กรัมต่อลิตร และปริมาณพลาสติกชีวภาพเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงว่าเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการเหนี่ยวนำจากทั้งสารเคมีและรังสีแกมมา มีผลต่อการสะสมพลาสติกชีวภาพโดยเชื้อ *A .latus*/2AA มีการสะสมพลาสติกชีวภาพสูงที่สุด รองลงมาคือเชื้อ *A .latus*/γ และ *A. latus* ตามลำดับ ส่วนในอาหารดัดแปลงสูตรที่ 1 พบว่า เชื้อ *A. latus*/γ การสะสมปริมาณพลาสติกชีวภาพใกล้เคียงกับอาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง แต่เมื่อคิดเป็นร้อยละต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้งพบว่าให้ค่าต่ำกว่าอาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 และในอาหารดัดแปลงสูตรที่ 3 พบว่ามีการสะสมพลาสติกชีวภาพได้น้อยกว่า 2 สูตรแรก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้อาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 ที่มีการสะสมปริมาณพลาสติกชีวภาพสูงที่สุดและมีระยะคงที่ที่ยาวเพื่อใช้ในหัวข้อการศึกษาต่อไป

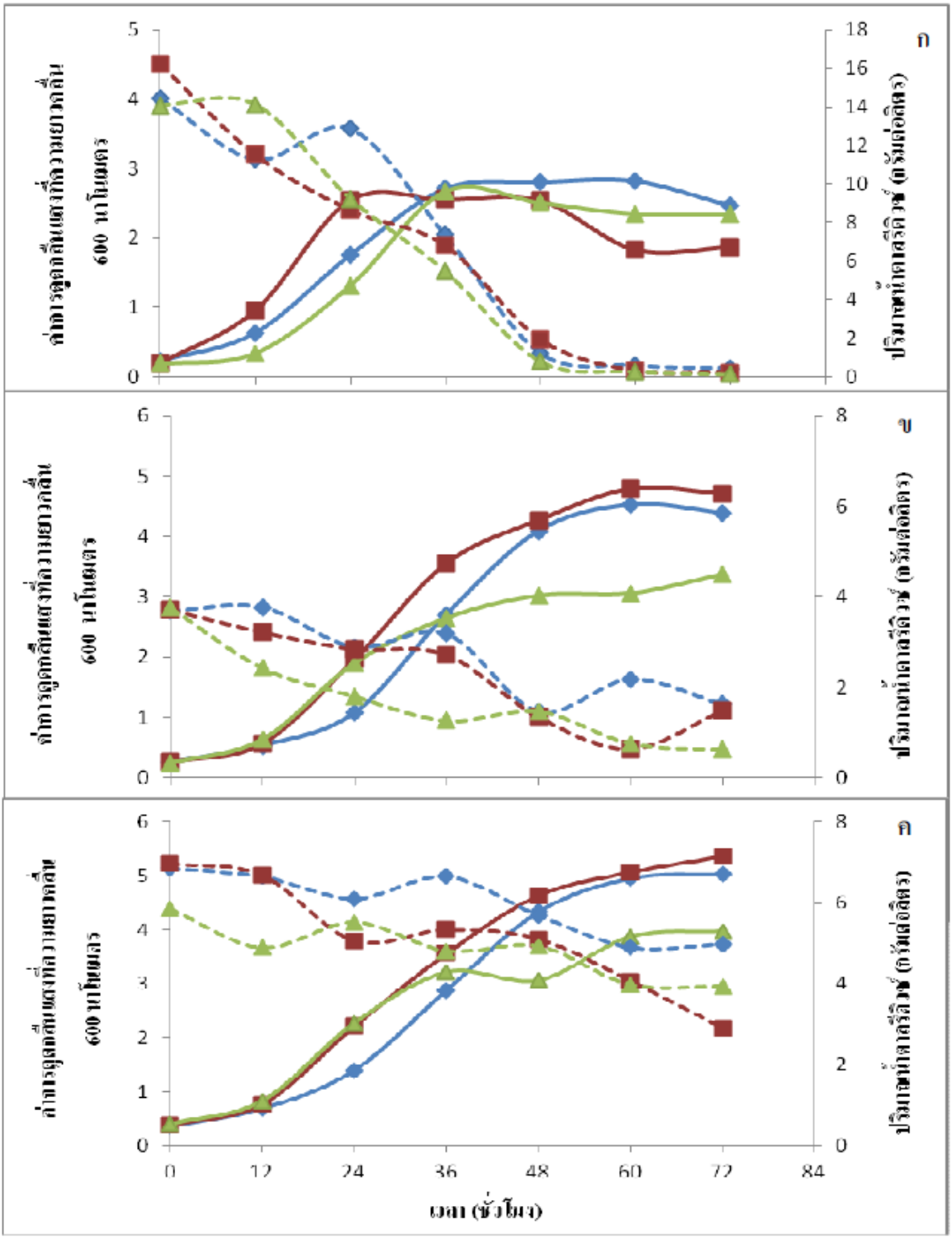


ภาพที่ 6การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพลาสติกชีวภาพในอาหารดัดแปลงแต่ละสูตรโดยที่

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus*
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A .latus*/2AA
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus*/γ
- ปริมาณ PHB ของเชื้อ *A. latus*
- ปริมาณ PHB ของเชื้อ *A. latus*/2AA
- ปริมาณ PHB ของเชื้อ *A. latus*/γ

6. การหาแหล่งคาร์บอนทดแทนที่เหมาสมต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพโดยใช้กากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทที่ความเข้มข้นของต่างๆ กัน

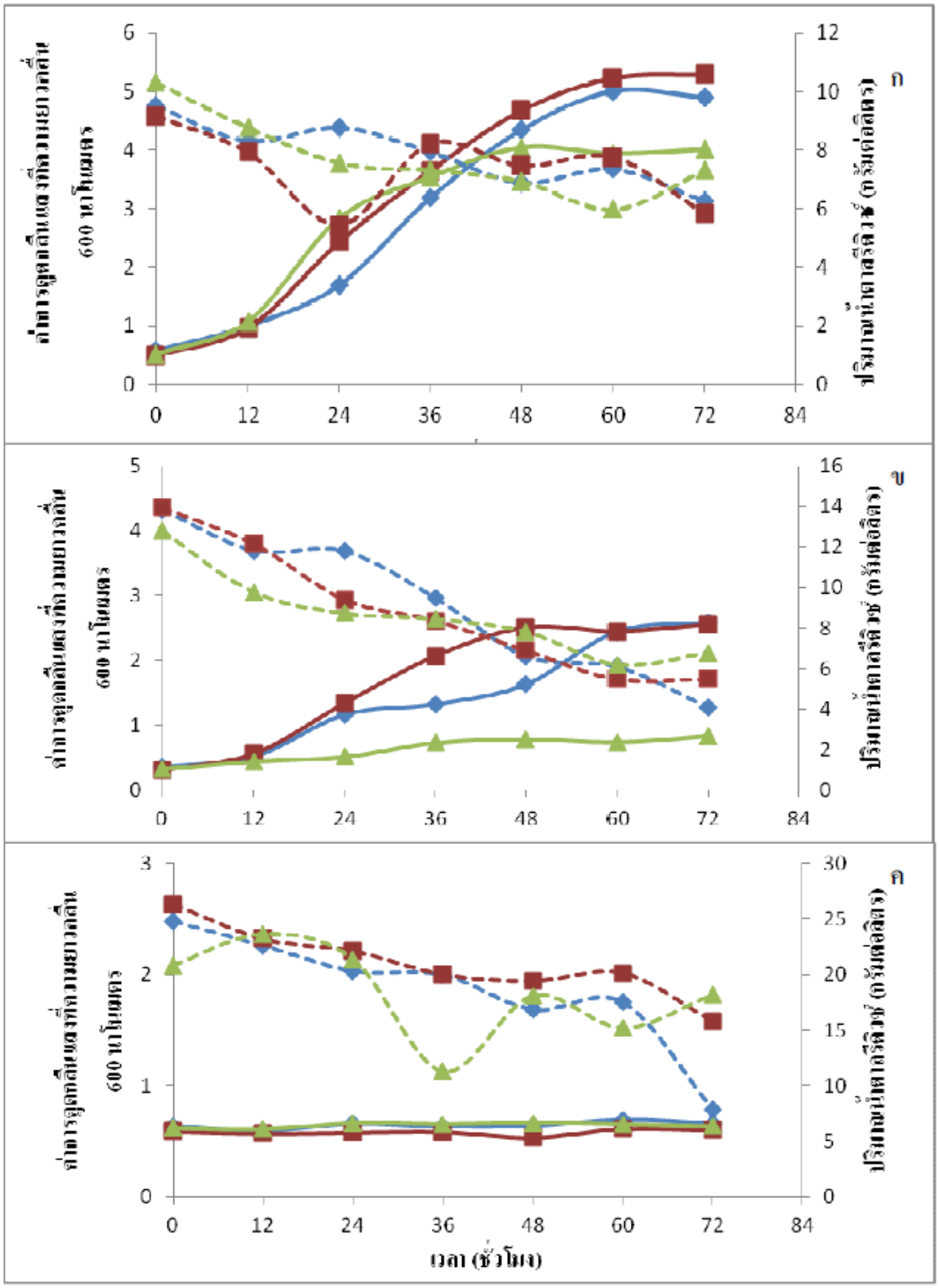
จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus*, *A. latus*/2AA และ *A. latus/* γ ในอาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 ซึ่งใช้กากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยทำการปรับความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทเป็นร้อยละ 10, 15, 20, 25, 30 และ 50 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 และเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทที่ร้อยละ 15, 20 และ 25 เชื้อมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน โดยเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์เข้าสู่การเจริญในระยะก้าวหน้าที่ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 7 และภาพที่ 8) ส่วนที่ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทร้อยละ 30 พบว่าเชื้อมีการเจริญใกล้เคียงกับอาหารที่มีความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทร้อยละ 15 , 20 และ 25 ซึ่งเชื้อ *A. latus* และ *A. latus*/2AA มีการเจริญใกล้เคียงกัน ส่วนเชื้อ *A. latus/* γ นั้นมีการเจริญที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ 2 สายพันธุ์แรก และจากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเลี้ยง ส่วนที่ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทร้อยละ 10 เชื้อมีอัตราการเจริญก้าวหน้าที่เร็วกว่าความเข้มข้นอื่นๆ แต่มีการเจริญต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบอาหารดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทร้อยละ 15, 20, และ 25 โดยปริมาณน้ำตาลมีการลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการเจริญ และ ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทที่ร้อยละ 50 พบว่ามีอัตราการเจริญต่ำ เนื่องจากมีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมากเกินไป จึงมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ



ภาพที่ 7 อัตราการเจริญ (—) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (---) ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยที่เชื้อ *A. latus* (◆) เชื้อ *A. latus*/2AA (■) และเชื้อ *A. latus*/γ (▲)

หมายเหตุ : ก= ความเข้มข้นกากมันไฮโดรไลเซทร้อยละ 10

ข = ความเข้มข้นกากมันไฮโดรไลเซทร้อยละ 15 ค = ความเข้มข้นกากมันไฮโดรไลเซทร้อยละ 20

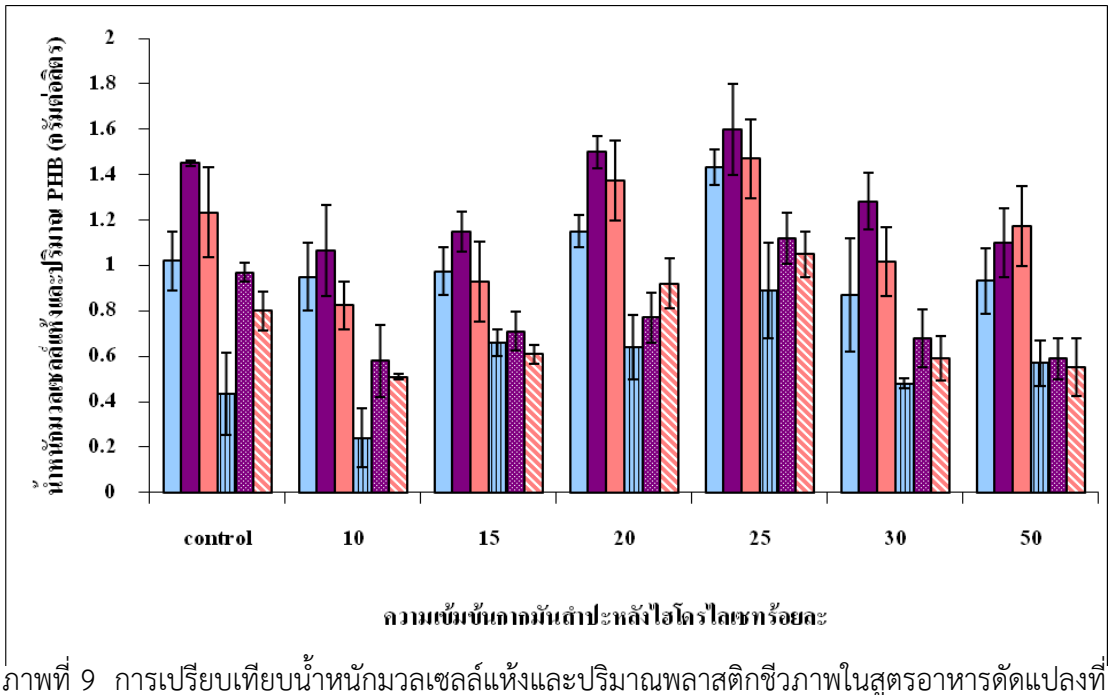


ภาพที่ 8 อัตราการเจริญ (—) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (---) ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยที่เชื้อ *A. latus* (◆) เชื้อ *A. latus*/2AA (■) และเชื้อ *A. latus*/γ (▲)

หมายเหตุ : ก=ความเข้มข้นกากมันไฮโดรไลเซทร้อยละ 25

ข = ความเข้มข้นกากมันไฮโดรไลเซทร้อยละ 30 ค = ความเข้มข้นกากมันไฮโดรไลเซทร้อยละ 50

จากการเลี้ยงเชื้อพบว่าในชั่วโมงที่ 48 อาหารดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทที่ร้อยละ 25 ของปริมาตรอาหาร เชื้อ *A. latus*/2AA ให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 1.60 กรัมต่อลิตรและปริมาณพลาสติกชีวภาพเท่ากับ 1.12 กรัมต่อลิตรคิดเป็นร้อยละ 70.00 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง รองลงมาคือเชื้อ *A. latus/* **γ** ให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 1.47 กรัมต่อลิตรและปริมาณ พลาสติกชีวภาพเท่ากับ 1.05 กรัมต่อลิตรคิดเป็นร้อยละ 71.42 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (ภาพที่ 9) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Aremu และคณะ (2010) รายงานการเลี้ยงเชื้อ *Psesomonas aeroginosa* โดยใช้กากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อ 84 ชั่วโมง มีค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 1.62 กรัมต่อลิตร และปริมาณพลาสติกชีวภาพเท่ากับ 0.935 กรัมต่อลิตรคิดเป็นร้อยละ 57.71 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง แสดงว่าเชื้อ *Alcaligenes latus* มีความสามารถในสะสมพลาสติกชีวภาพที่ดีกว่าเชื้อ *Psesomonas aeroginosa* และจากการศึกษาของ ขวัญใจ แก้วจันทร์ และคณะ (2553) เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes latus* ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยรังสีแกมมาร่วมกับการได้รับสาร 2-aminoanthracene (*A. latus/***γ** -2AA) โดยใช้กากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน พบว่าการใช้ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทร้อยละ 50 เชื้อ *A. latus/***γ** -2AA ให้ปริมาณพลาสติกชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 1.08 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดลอง โดยจากการทดลองพบว่า การใช้ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทร้อยละ 50 ทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตน้อยมาก อาจเป็นผลมาจากเชื้อ *A. latus* ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยรังสีแกมมาร่วมกับได้รับสาร 2- aminoanthracene ทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทร้อยละ 50 ต่างจากการศึกษาซึ่งพบว่า เชื้อ *A. latus*/2AA มีการสะสมพลาสติกชีวภาพได้มากที่สุด รองลงมาคือเชื้อ *A. latus/***γ** และ *A. latus* ตามลำดับ โดยความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทมีผลต่อการสะสมพลาสติกชีวภาพเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีและรังสีแกมมา และพบว่าอาหารดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทร้อยละ 25 ของปริมาตรอาหาร ให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาตรพลาสติกชีวภาพมากที่สุด ดังนั้นในการศึกษาหัวข้อต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทที่ร้อยละ 25 ของปริมาตรอาหาร เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน



ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพลาสติกชีวภาพในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังแตกต่างกัน โดยที่

น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของ *A. latus* ปริมาณพลาสติกชีวภาพของ *A. latus*

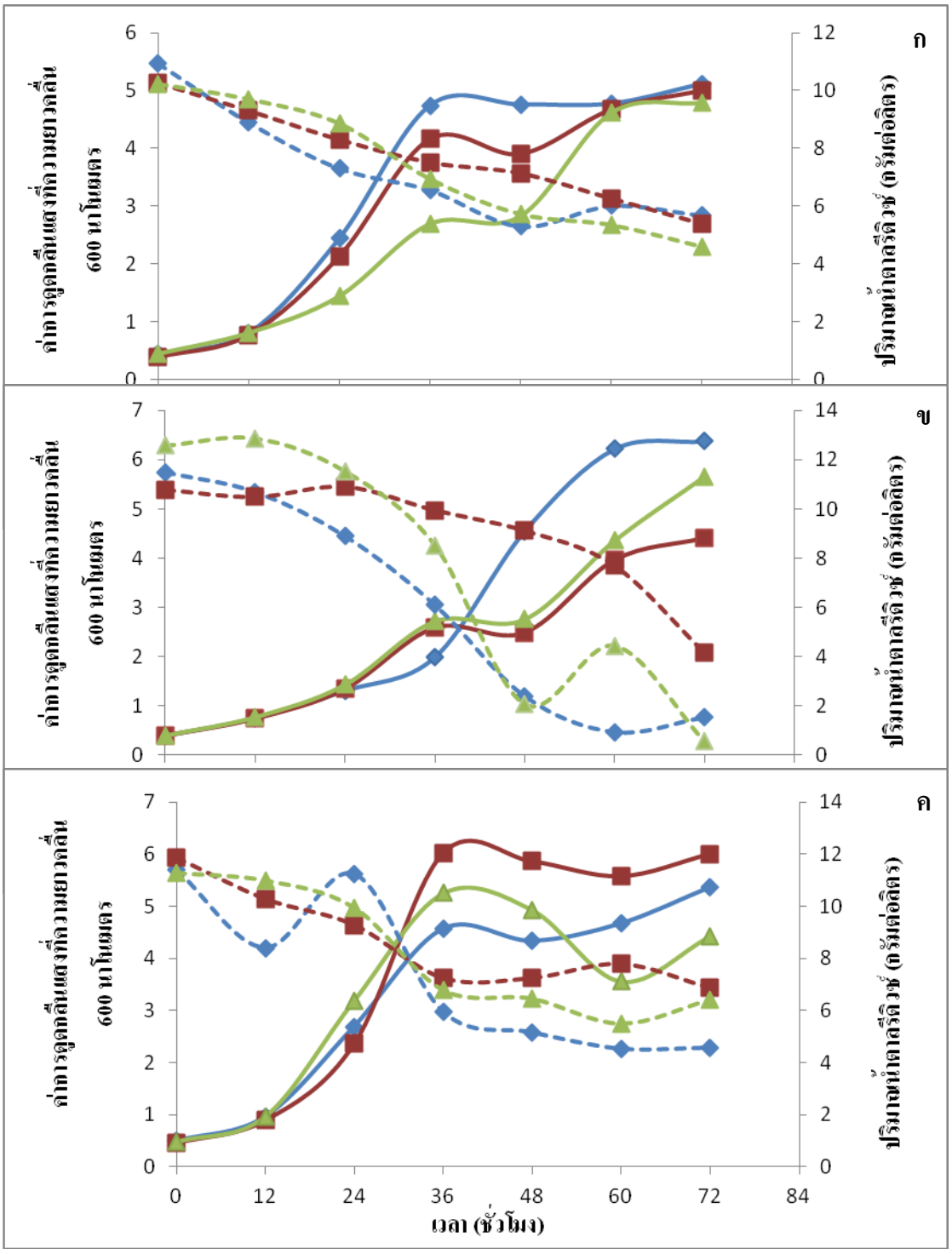
น้ำหนักมวลเซลล์แห้งเชื้อ *A .latus*/2AA ปริมาณพลาสติกชีวภาพของ *A. latus*/2AA

น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของ *A. latus*/γ ปริมาณพลาสติกชีวภาพของ *A. latus*/γ

หมายเหตุ : ชุดควบคุมใช้อาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

7. ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพ

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus*, *A. latus*/ 2AA และ *A. latus*/γ ในอาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 ซึ่งใช้กากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซตที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 ของปริมาตรอาหารเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมอะซิเตท เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 1.4 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 และเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง พบว่าในอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมอะซิเตทเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีการเจริญในระยะก้าวหน้าที่ 24 ชั่วโมง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงที่ 24 ชั่วโมง และลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะการเลี้ยง ส่วนอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า เชื้อมีค่าอัตราการเจริญสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแอมโมเนียมอะซิเตท แต่จะเข้าสู่ระยะคงที่ช้ากว่าอาหารที่มีแอมโมเนียมอะซิเตทเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเลี้ยงและอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อมีการเจริญในระยะก้าวหน้าที่ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 10) ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงน้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ดังนั้นชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน มีผลต่ออัตราการเจริญและปริมาณการสะสมของ PHB ภายในเซลล์

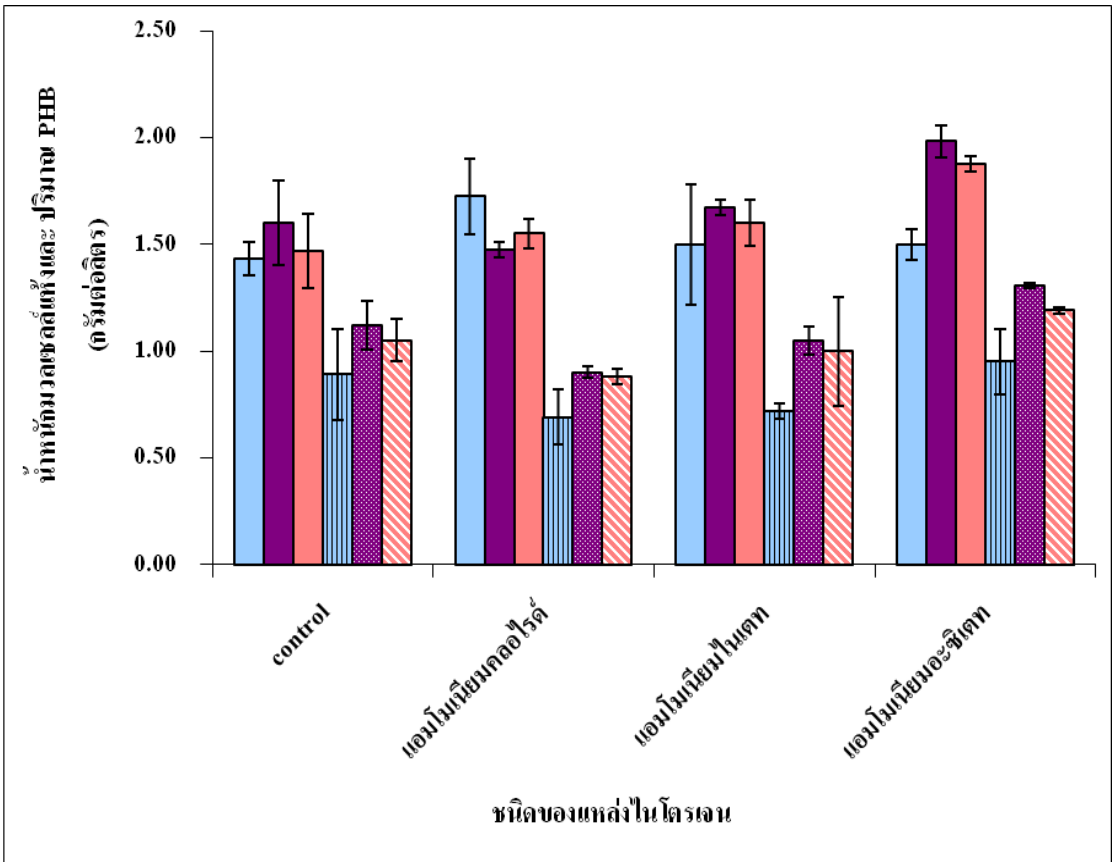


ภาพที่ 10 อัตราการเจริญ (—) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (---) ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยที่ เชื้อ *A.latus* (◆) เชื้อ *A.latus*/2AA (■) เชื้อ *A.latus*/γ (▲)

หมายเหตุ : ก=แอมโมเนียมคลอไรด์ ข = แอมโมเนียมไนเตรท ค = แอมโมเนียมอะซิเตท

จากการเลี้ยงเชื้อพบว่าชั่วโมงที่ 48 ในอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมอะซิเตทเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *A. latus*/2AA ให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง 1.98 กรัมต่อลิตร และปริมาณพลาสติกชีวภาพ เท่ากับ 1.31 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 66.16 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง รองลงมาคือ เชื้อ *A. latus*/ γ ให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 1.88 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพลาสติกชีวภาพเท่ากับ 1.19 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 63.30 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (ภาพที่ 11) ซึ่งมีค่าสูงกว่าการศึกษาของ Mona และคณะ (2001) รายงานการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* ในอาหารที่มีแอมโมเนียมอะซิเตทเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ามีค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 0.396 กรัมต่อลิตร และปริมาณพลาสติกชีวภาพคิดเป็นร้อยละ 22.71 ต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้เชื้อ *Alcaligenes latus* มีความสามารถในการสะสมพลาสติกชีวภาพที่ดีกว่าเชื้อ *Bacillus megaterium* และจากการรายงานของ Khanna และ Srivastana (2005) พบว่า การเลี้ยงเชื้อ *Ralstonia eutropha* NRRL B 14690 โดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 7.92 กรัมต่อลิตร และปริมาณพลาสติกชีวภาพเท่ากับ 3.84 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 48.48 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ซึ่งให้ผลที่แตกต่างจากการทดลองครั้งในนี้ที่ให้ค่าต่ำกว่าเพราะเนื่องจากชนิดของเชื้อและชนิดแหล่งไนโตรเจนมีความแตกต่างกัน และจากการศึกษาของ ขวัญใจ แก้วจันทร์และคณะ โดยเชื้อ *Alcaligenes latus* ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยรังสีแกมมาร่วมกับการได้รับสาร 2-aminoanthracene พบว่า การใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพลาสติกชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 5.25 และ 2.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าและไม่สอดคล้องกับผลการทดลอง โดยการศึกษานี้พบว่าแอมโมเนียมอะซิเตทให้ค่าปริมาณพลาสติกชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 1.31 คิดเป็นร้อยละ 66.16 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง แต่ผลของการใช้แอมโมเนียมไนเตรทก็ให้ค่าใกล้เคียงกับการใช้แอมโมเนียมอะซิเตทเป็นแหล่งไนโตรเจน

ในการศึกษานี้พบว่าเชื้อ *A. latus*/2AA มีการสะสมพลาสติกชีวภาพมากที่สุดเท่ากับ 1.31 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือเชื้อ *A. latus*/ γ และ *A. latus* ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าจุลินทรีย์สามารถใช้อะซิเตทเพื่อเปลี่ยนเป็นอะซิทิลโคเอสำหรับใช้ในการสะสมพลาสติกชีวภาพของเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีและรังสีแกมมา จึงทำให้ได้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพลาสติกชีวภาพสูงกว่าอาหารดัดแปลงที่ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้แอมโมเนียมอะซิเตทเป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อใช้ในหัวข้อการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพลาสติกชีวภาพในสูตรอาหารดัดแปลงที่ชนิดของแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน โดยที่

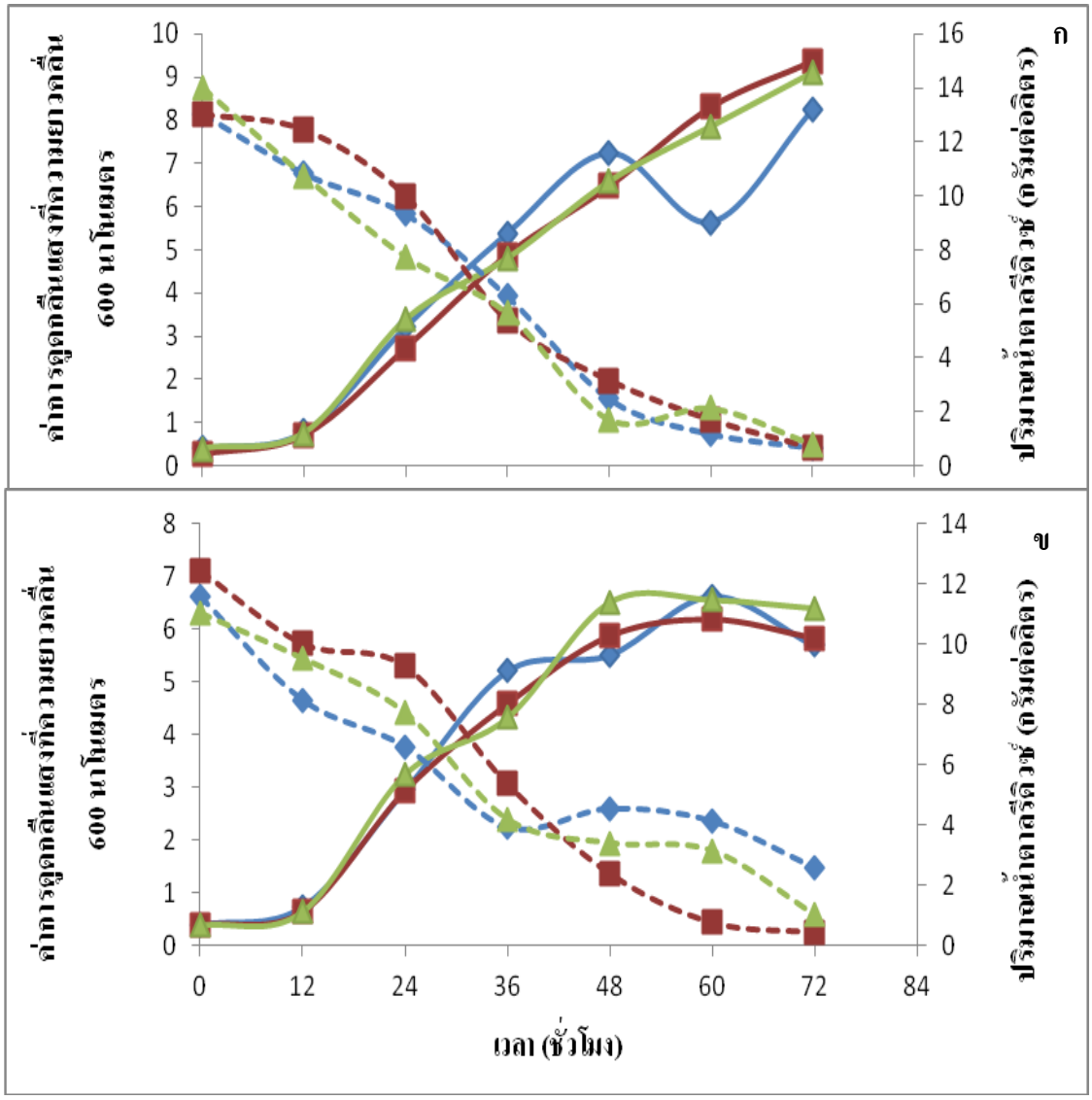
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus*
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A .latus*/2AA
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus*/γ
- ปริมาณพลาสติกชีวภาพของเชื้อ *A. latus*
- ปริมาณ PHB ของเชื้อ *A. latus*/2AA
- ปริมาณ PHB ของเชื้อ *A. latus*/γ

หมายเหตุ : ชุดควบคุมที่ใช้เป็นอาหารดัดแปลงที่มีกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทเข้มข้นร้อยละ 25 เป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต

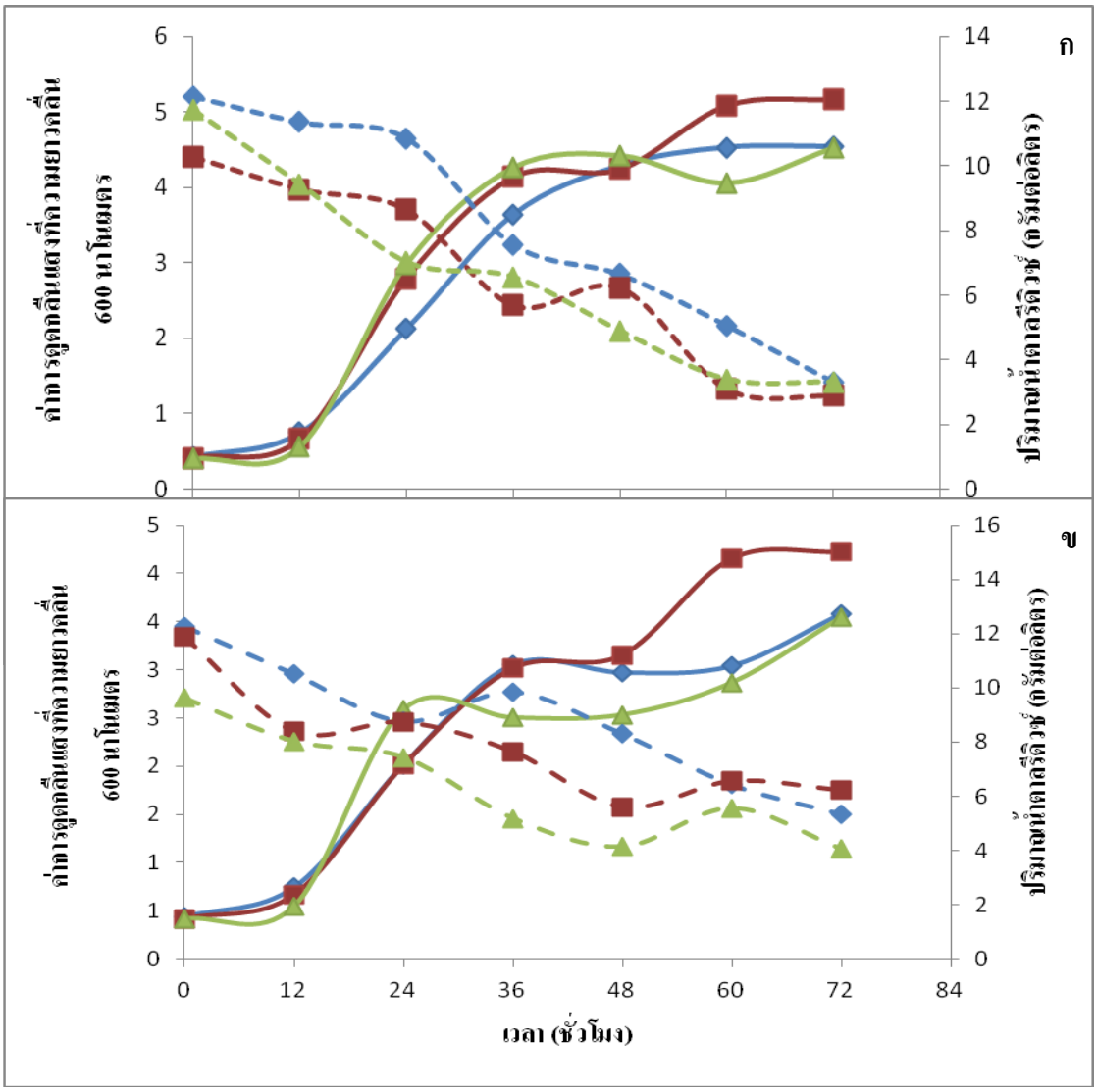
8. อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพ

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus*, *A .latus*/2AA และ *A. latus*/γ ในอาหารเลี้ยงดัดแปลงที่มีกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซตร้อยละ 25 ของอาหารเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน ซึ่งใช้แอมโมเนียมอะซิเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 , 15, 21 และ 30 ตามลำดับ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 และเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง พบว่าในอาหารที่ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 , 15, 21 และ 30 มีค่าการเจริญในระยะก้าวหน้าที่ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 1 2 และภาพที่ 1 3) แม้ว่าที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 จะมีค่าการเจริญสูงที่สุด แต่ในอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15 เข้าสู่ระยะคงที่เร็วกว่าอาหารที่ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 และในอาหารที่ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

เท่ากับ 21 และ 30 มีค่าเจริญใกล้เคียงกัน ซึ่งมีค่าต่ำกว่าอาหารที่ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 และ 15 ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 และ 15 มีค่าการลดลงใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อ โดยในอาหารที่ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 21 และ 30 มีค่าการลดลงที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งพบว่ามีการใช้น้ำตาลที่น้อยกว่าอาหารที่ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 และ 15



ภาพที่ 12 อัตราการเจริญ (—) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (---) ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์
โดยที่ เชื้อ *A. latus* (◆) เชื้อ *A. latus*/2AA (■) เชื้อ *A. latus*/γ (▲)
หมายเหตุ : ก = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10
ข = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15



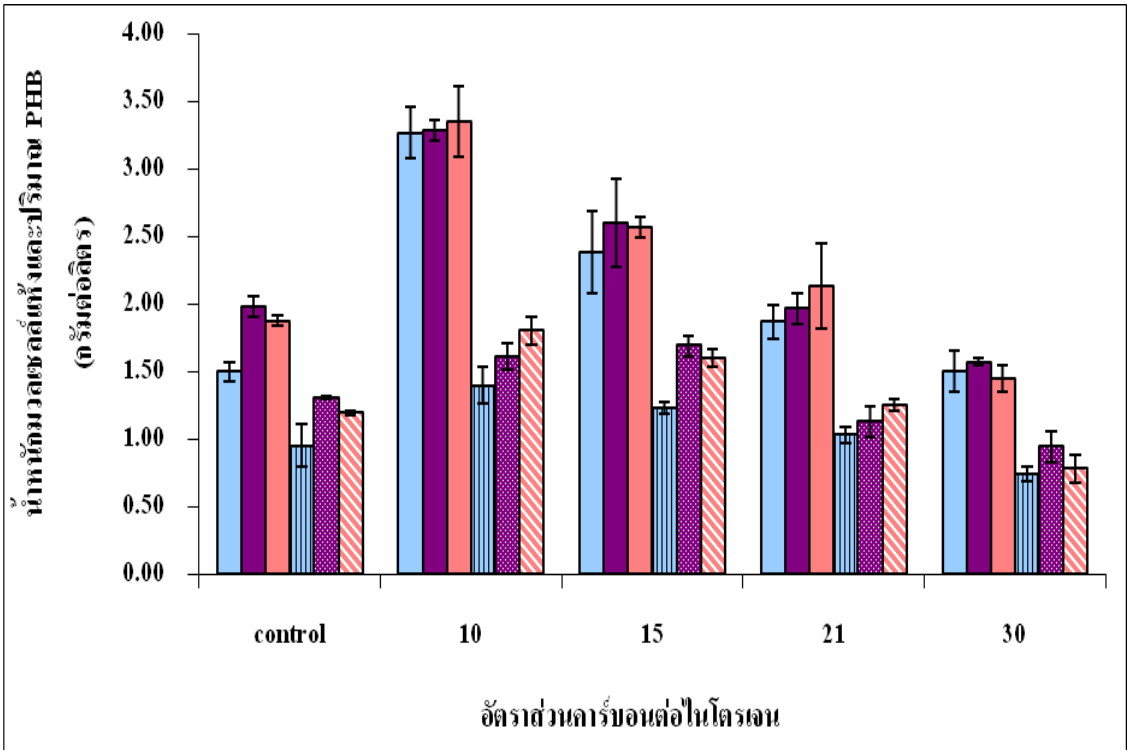
ภาพที่ 13 อัตราการเจริญ (—) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (---) ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยที่ เชื้อ *A. latus* (◆) เชื้อ *A. latus*/2AA (■) เชื้อ *A. latus*/γ (▲)

หมายเหตุ : ก = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 21

ข = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 30

จากการเลี้ยงเชื้อพบว่าชั่วโมงที่ 48 ในอาหารดัดแปลงที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15 เชื้อ *A. latus*/2AA ให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 2.60 กรัมต่อลิตรและปริมาณพลาสติกชีวภาพ เท่ากับ 1.69 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65.00 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง รองลงมาคือ *A. latus*/γ ให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 2.57 กรัมต่อลิตร และปริมาณพลาสติกชีวภาพเท่ากับ 1.60 กรัมต่อลิตรคิดเป็นร้อยละ 62.26 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (ภาพที่ 14) ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการศึกษาของ ปิยวรรณ บุญมาโค และ พิมพ์ชนก นาคราช รายงานว่า จากการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 โดยใช้กากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอน ที่

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 50 พบว่ามีการสะสมพลาสติกชีวภาพเท่ากับ 3.10 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากการศึกษานี้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15 ให้ปริมาณพลาสติกชีวภาพมากกว่าอัตราส่วนอื่นๆเมื่อคิดเป็นร้อยละต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และพบว่าเชื้อ *A. latus* ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีและรังสีแกมมามีผลต่อการสะสมพลาสติกชีวภาพ โดยเชื้อ *A. latus*/2AA จะมีการสะสมพลาสติกชีวภาพได้สูงที่สุด รองลงมาคือเชื้อ *A. latus*/γ และ *A. latus* ตามลำดับ



ภาพที่ 14 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพลาสติกชีวภาพในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกัน โดยที่

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของ *A. latus*
- ปริมาณพลาสติกชีวภาพของ *A. latus*
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของ *A .latus*/2AA
- ปริมาณพลาสติกชีวภาพของ *A. latus*/2AA
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus*/γ
- ปริมาณพลาสติกชีวภาพของ *A. latus*/γ

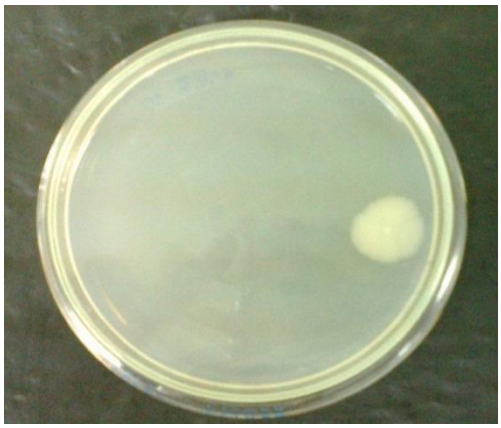
หมายเหตุ : ชุดควบคุมที่ใช้เป็นอาหารดัดแปลงที่มีกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทเข้มข้นร้อยละ 25 เป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมอะซิเตท

จากผลการศึกษาการกลายและการตรวจสอบการผลิตพลาสติกชีวภาพมีค่าต่ำมาก จึงได้ทำการวิจัยโดยนำเชื้อที่ผ่านการกลายมาทำการกลายซ้ำอีกครั้ง พร้อมทั้งศึกษาแหล่งอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพใหม่ต่อไป

ส่วนที่ 2 ผลการศึกษาการกลายซ้ำและ แหล่งอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพลาสติกชีวภาพ

1.การเหนี่ยวนำซ้ำของแบคทีเรียด้วยสารเคมี และรังสีร่วมกับสารเคมี

2.1 การเหนี่ยวนำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน (ครั้งที่ 1) จากการศึกษาการนำเชื้อ *A. latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีแกมมาตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ของขวัญใจ แก้วจันทร์ และคณะ, 2554 (*A. latus* TISTR 1403/ γ-2AA) ซึ่งใช้ชื่อเรียกว่า สายพันธุ์เดิม มาทำการเหนี่ยวนำซ้ำโดยได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาแตกต่างกันทุก 1 นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเติมสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน (2AA) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที พบว่า เชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงเป็นเวลา 12 นาที ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน มีการรอดชีวิตเพียง 1 ไอโซเลท ซึ่งมีขนาด 2.2 เซนติเมตร (ภาพที่ 15) ส่วนการสัมผัสของเชื้อที่ระยะเวลาอื่น ๆ ไม่พบการรอดชีวิตของเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 7



ภาพที่ 15 ลักษณะของโคโลนีที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงเป็นเวลา 12 นาที ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที

ตารางที่ 7 การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที (ครั้งที่ 1)

วิธีการเหนี่ยวนำ	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนโคโลนี	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
UV 1 นาที + 2AA	O	-	-
UV 2 นาที + 2AA	O	-	-
UV 3 นาที + 2AA	O	-	-
UV 4 นาที + 2AA	O	-	-
UV 5 นาที + 2AA	O	-	-
UV 6 นาที + 2AA	O	-	-
UV 7 นาที + 2AA	O	-	-
UV 8 นาที + 2AA	O	-	-
UV 9 นาที + 2AA	O	-	-
UV 10 นาที + 2AA	O	-	-
UV 11 นาที + 2AA	O	-	-
UV 12 นาที + 2AA	+	1	2.2
UV 13 นาที + 2AA	O	-	-
UV 14 นาที + 2AA	O	-	-
UV 15 นาที + 2AA	O	-	-

หมายเหตุ : + เชื้อมีการเจริญ O ไม่มีการเจริญ

ดังนั้น จึงคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์เดิม (*A. latus* TISTR 1403/γ-2AA) ที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงเป็นเวลา 12 นาที ตามด้วยการได้รับสัมผัสสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.2 การเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน (ครั้งที่ 2)

จากการนำเชื้อสายพันธุ์เดิมที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ครั้งที่ 1 ซึ่งมีเพียง 1 โคโลนี มาทำการเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาแตกต่างกันทุก 1 นาที เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที พบว่า เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน มีการรอดของเชื้อจำนวน 7 ไอโซเลท คือ ที่เวลาการได้รับสัมผัส 1 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 2 ไอโซเลท ที่เวลาการได้รับสัมผัส 2 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 3 ไอโซเลท ที่เวลาการได้รับสัมผัส 9 นาที มีการรอดของเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลท และที่เวลาการได้รับสัมผัส 14 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 1 ไอโซเลท โดย

เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสเป็นเวลา 9 นาที ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที เชื้อมีขนาดโคโลนีใหญ่ที่สุด คือ 3.0 เซนติเมตร ส่วนการได้รับสัมผัสของเชื้อที่ระยะเวลาอื่น ๆ มีขนาดของโคโลนีใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 8

ดังนั้น จึงเลือกคัดเชื้อที่มีขนาดของโคโลนีที่ใหญ่ที่สุด คือ เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงเป็นเวลา 9 นาที ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.3 การเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสารอะคริฟลาวิน รังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล สารอะคริฟลาวิน และสาร 5-โบรโมยูราซิล

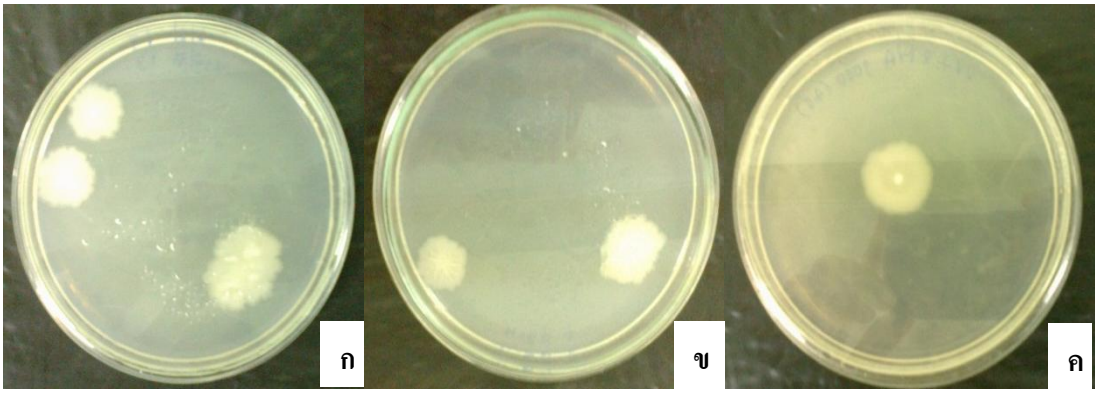
นำเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน จำนวน 2 ครั้ง ที่คัดเลือกได้มาทำการเหนี่ยวนำซ้ำด้วยวิธีการแตกต่างกัน ได้แก่ การได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสารอะคริฟลาวิน การได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล การได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวิน และการได้รับสัมผัสสาร 5-โบรโมยูราซิล ได้ผลดังนี้

การได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสารอะคริฟลาวิน โดยใช้รังสีเหนือม่วงความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาแตกต่างกันทุก 1 นาที เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยสารอะคริ ฟลาวิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที พบว่า เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสารอะคริฟลาวิน มีการรอดชีวิตของเชื้อจำนวน 6 ไอโซเลท คือ ที่เวลาการได้รับสัมผัส 1 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 3 ไอโซเลท) ที่เวลาการ ได้รับสัมผัส 5 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 2 ไอโซเลท และที่เวลาการได้รับสัมผัส 8 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 1 ไอโซเลท โดยเชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสเป็นเวลา 8 นาที ตามด้วยสารอะคริฟลาวิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที มีโคโลนีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 2.5 เซนติเมตร ส่วนการได้รับสัมผัสที่ระยะเวลาอื่น ๆ ไม่มีการรอดของเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 16 และ ตารางที่ 9

ตารางที่ 8 การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที (ครั้งที่ 2)

วิธีการเหนี่ยวนำ	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนโคโลนี	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
UV 1 นาที + 2AA	+	2	1.4 และ 1.6
UV 2 นาที + 2AA	+	3	1.4, 1.5 และ 2.0
UV 3 นาที + 2AA	O	-	-
UV 4 นาที + 2AA	O	-	-
UV 5 นาที + 2AA	O	-	-
UV 6 นาที + 2AA	O	-	-
UV 7 นาที + 2AA	O	-	-
UV 8 นาที + 2AA	O	-	-
UV 9 นาที + 2AA	+	1	3.0
UV 10 นาที + 2AA	O	-	-
UV 11 นาที + 2AA	O	-	-
UV 12 นาที + 2AA	O	-	-
UV 13 นาที + 2AA	O	-	-
UV 14 นาที + 2AA	+	1	1.7
UV 15 นาที + 2AA	O	-	-

หมายเหตุ : + เชื้อมีการเจริญ O ไม่มีการเจริญ



ภาพที่ 16 ลักษณะของโคโลนีที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสารอะคริฟลาวิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที โดย (ก) 1 นาที (ข) 5 นาที และ (ค) 8

ตารางที่ 9 การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงร่วมกับสารอะคริฟลาวินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที

วิธีการเหนี่ยวนำ	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนโคโลนี	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
UV 1 นาที + Acri	+	3	1.5, 1.6 และ 2.0
UV 2 นาที + Acri	O	-	-
UV 3 นาที + Acri	O	-	-
UV 4 นาที + Acri	O	-	-
UV 5 นาที + Acri	+	2	1.2 และ 1.3
UV 6 นาที + Acri	O	-	-
UV 7 นาที + Acri	O	-	-
UV 8 นาที + Acri	+	1	2.5
UV 9 นาที + Acri	O	-	-
UV 10 นาที + Acri	O	-	-
UV 11 นาที + Acri	O	-	-
UV 12 นาที + Acri	O	-	-
UV 13 นาที + Acri	O	-	-
UV 14 นาที + Acri	O	-	-
UV 15 นาที + Acri	O	-	-

<u>หมายเหตุ</u> : + เชื้อมีการเจริญ O ไม่มีการเจริญของเชื้อ

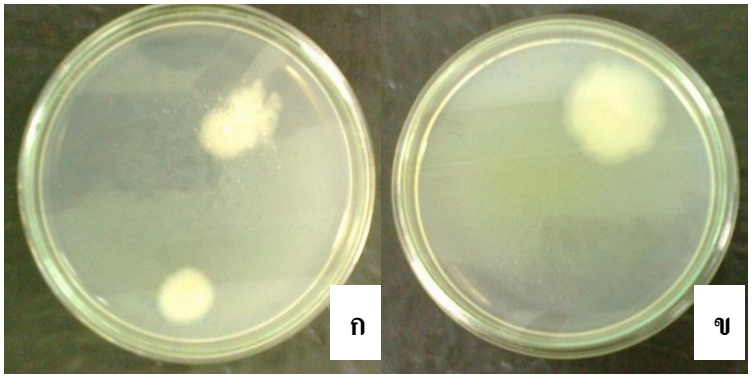
ดังนั้น จึงนำโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ที่สุด คือ เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงเป็นเวลา 8 นาที ตามด้วยสารอะคริฟลาวิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที มาเก็บรักษาไว้ในอาหารวุ้นเอียง การได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล โดยใช้รังสีเหนือม่วงความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาแตกต่างกันทุก 1 นาที เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที พบว่า เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล มีการรอดชีวิตของเชื้อจำนวน 14 ไอโซเลท คือ ที่เวลาการได้รับสัมผัส 5 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 2 ไอโซเลท ที่เวลาการได้รับสัมผัส 8 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 2 ไอโซเลท ที่เวลาการได้รับสัมผัส 11 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 1 ไอโซเลท ที่เวลาการได้รับสัมผัส 13 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 3 ไอโซเลท ที่เวลาการได้รับสัมผัส 14 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 3 ไอโซเลท และที่เวลาการได้รับสัมผัส 15 นาที มีการรอดของเชื้อ จำนวน 3 ไอโซเลท โดยเชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสเป็นเวลา 11 นาที ตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที มีโคโลนีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 2.7 เซนติเมตร ส่วนการได้รับสัมผัสของเชื้อที่ระยะเวลาอื่น ๆ มีขนาดของโคโลนีใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที

วิธีการเหนี่ยวนำ	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนโคโลนี	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
UV 1 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 2 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 3 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 4 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 5 นาที + 5-bro	+	2	1.5 และ 1.6
UV 6 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 7 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 8 นาที + 5-bro	+	2	1.9 และ 2.0
UV 9 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 10 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 11 นาที + 5-bro	+	1	2.7
UV 12 นาที + 5-bro	O	-	-
UV 13 นาที + 5-bro	+	3	0.7, 1.2 และ 1.7
UV 14 นาที + 5-bro	+	3	0.5, 0.7 และ 0.9
UV 15 นาที + 5-bro	+	3	0.7, 0.9 และ 1.0

หมายเหตุ : + เชื้อมีการเจริญ O ไม่มีการเจริญของเชื้อ

ดังนั้น จึงนำโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ที่สุด คือ เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงเป็นเวลา 11 นาที ตามด้วยสาร 5-โบรโมยูราซิล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที มาเก็บรักษาไว้ในอาหารวุ้นเอียง การได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวิน โดยใช้สารอะคริฟลาวิน ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที พบว่า เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวินทั้งสองความเข้มข้น มีการรอดชีวิตของเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลท คือ ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการรอดของเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลท และที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการรอดของเชื้อจำนวน 1 ไอโซเลท ซึ่งมีขนาดของโคโลนีใหญ่ที่สุด คือ 3.0 เซนติเมตร ดังแสดงในภาพที่ 17 และตารางที่ 11



ภาพที่ 17 ลักษณะของโคโลนีที่ได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวิน (ก) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ข) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 11 การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวิน

สารเคมี	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนโคโลนี	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
อะคริฟลาวิน (Acriflavin)	50	+	2	2.5 และ 2.8
	100	+	1	3.0

หมายเหตุ : + เชื้อมีการเจริญ O ไม่มีการเจริญ

ดังนั้น จึงนำโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ที่สุด คือ เชื้อที่ผ่านการได้รับสัมผัสสารอะคริฟลาวินที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเก็บรักษาไว้ในอาหารวุ้นเอียง

ส่วนการได้รับสัมผัสสาร 5-โบรโมยูราซิล โดยใช้สาร 5-โบรโมยูราซิลที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที พบว่า ไม่มีการรอดชีวิตของเชื้อเกิดขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 การรอดชีวิตของเชื้อที่ได้รับสัมผัสสาร 5-โบรโมยูราซิล

สารเคมี	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนโคโลนี	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)
5-โบรโมยูราซิล (5-Bromouracil)	50	O	-	-
	100	O	-	-

หมายเหตุ : + เชื้อมีการเจริญ O ไม่มีการเจริญ

จากผลการศึกษาการเหนี่ยวนำเชื้อซ้ำด้วยวิธีต่าง ๆ เพื่อเพิ่มความสามารถในการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารของ Grothe et al. (1999) พบว่า เชื้อสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่ระยะเวลาการเลี้ยงเดียวกัน คือ 48 ชั่วโมง โดยเชื้อสายพันธุ์เดิม (*A. latus* TISTR 1403/γ-2AA) ที่ผ่านการเหนี่ยวนำซ้ำโดยการได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วง ตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน จำนวน 2 ครั้ง และสารอะคริฟลาวิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุด คือ 5.45±0.14 และ 3.50±0.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 13 ดังนั้นจึงเลือกไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป ซึ่งจะใช้ชื่อเรียกว่า สายพันธุ์กลายซ้ำ ตลอดการทดลอง โดยทำการเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดิมซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม

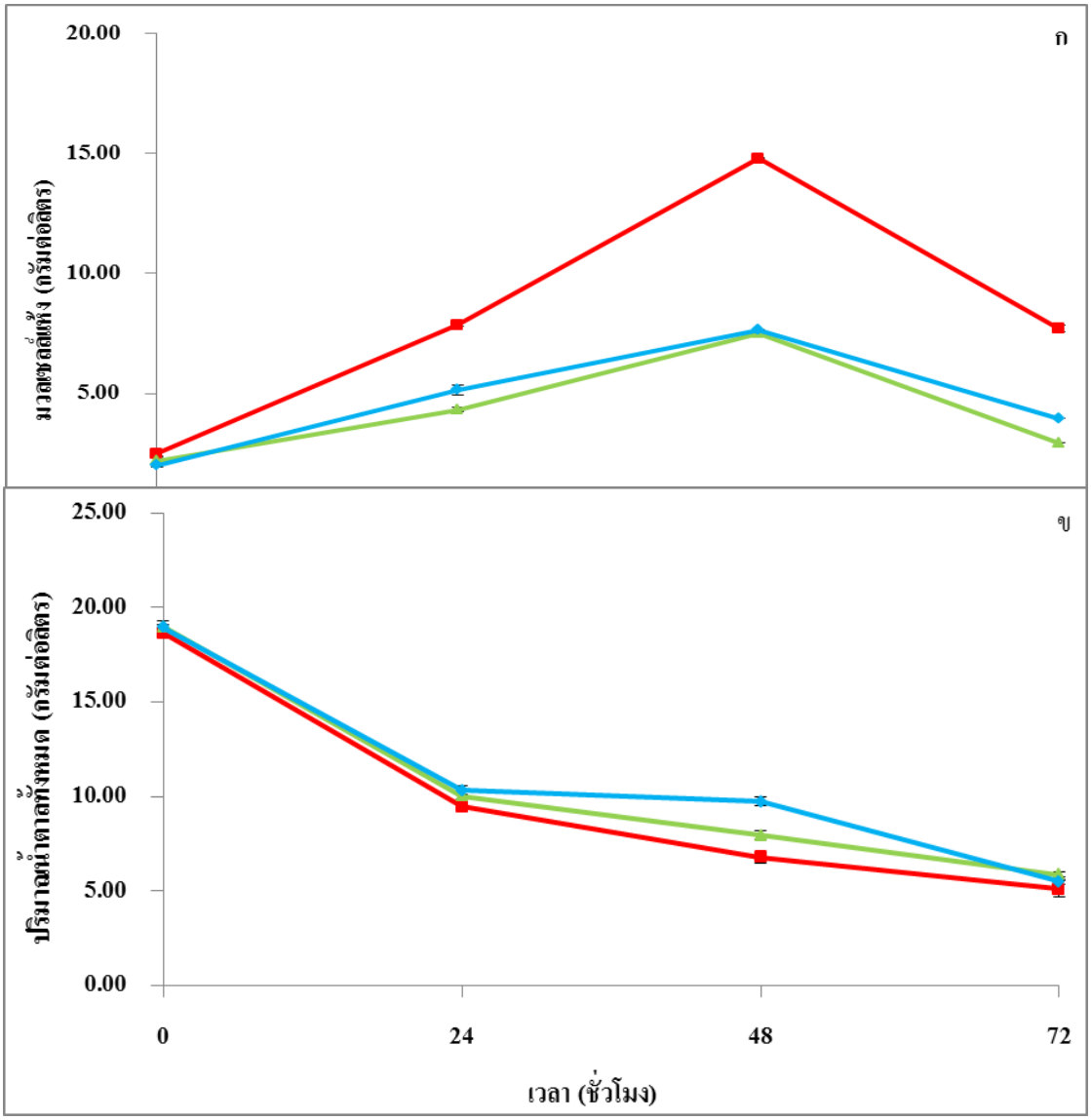
ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำซ้ำ

สายพันธุ์แบคทีเรีย	**CDW (g/l)**	**PHB (g/l)**	**PHB (%)**	**อ้างอิง**
A. latus TISTR 1403	1.50	0.60	40.00	Kaewjan et al. (2011)
A. latus TISTR 1403/γ-2AA	0.85	0.25	29.41	Kaewjan et al. (2011)
A. latus TISTR 1403/γ-2AA/ UV-2AA(1)	2.55^{a}±0.07	1.57^{a}±0.15	61.57	This study
A. latus TISTR 1403/γ-2AA/ UV-2AA(2)	3.10^{b}±0.10	1.97^{b}±0.12	63.55	This study
A. latus TISTR 1403/γ-2AA/ UV-2AA(2)/UV-Acriflavin	5.25^{c}±0.07	3.05^{c}±0.07	58.10	This study
A. latus TISTR 1403/γ-2AA/ UV-2AA(2)/UV-5-bromourasil	5.30^{c}±0.10	3.30^{d}±0.10	62.26	This study
A. latus TISTR 1403/γ-2AA/ UV-2AA(2)/Acriflavin	5.45^{c}±0.14	3.50^{e}±0.00	64.22	This study

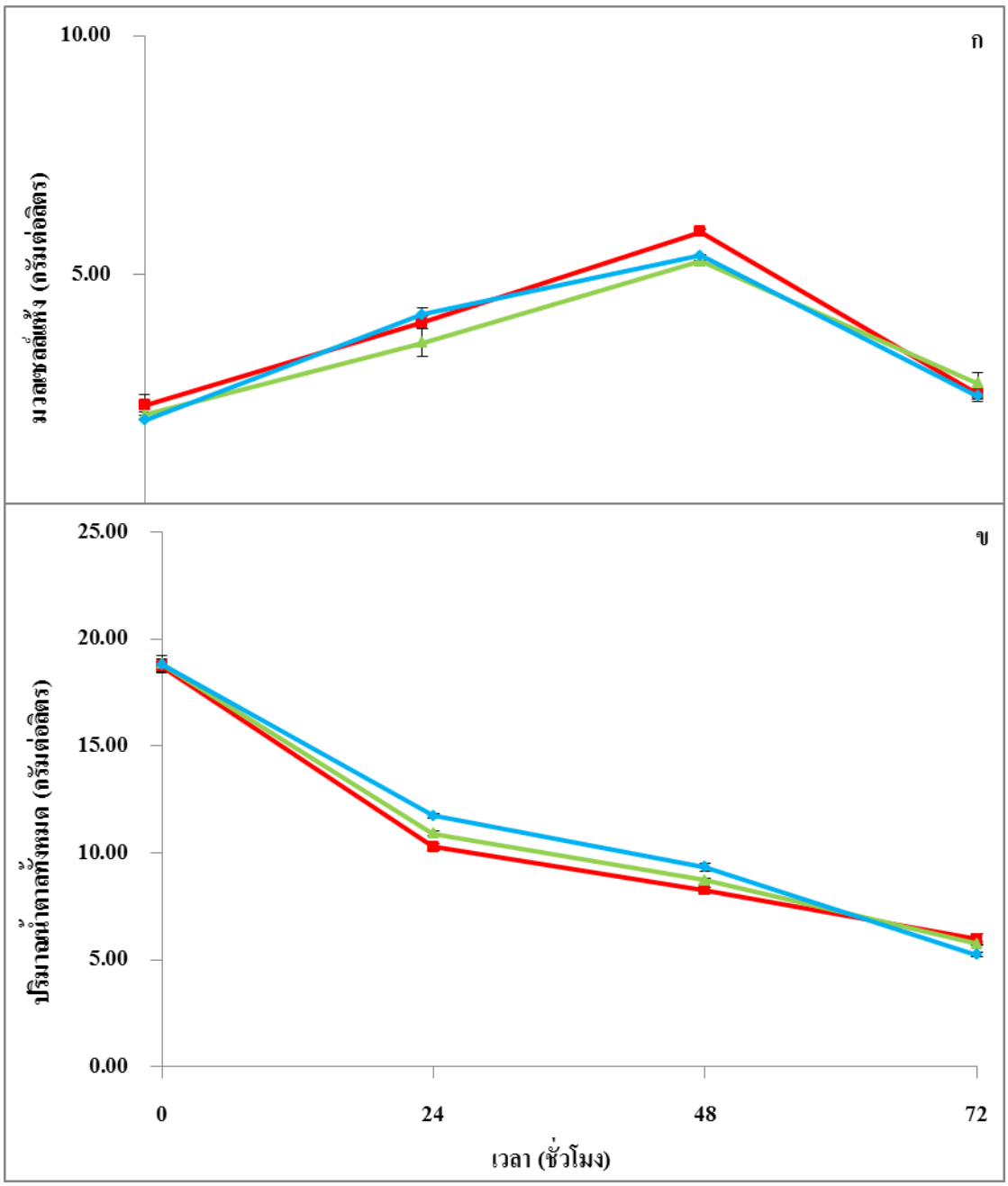
2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

2.1 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

จากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำที่ได้จากการคัดเลือก ในสูตรอาหารสำหรับผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ทั้ง 3 สูตร ได้แก่ DSMZ catalogue (1993), El-Sayed et al. (2009) และ Savenkova et al. (1999) โดยมีการปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร มีแนวโน้มการเจริญในทิศทางเดียวกัน คือ มีระยะการเจริญแบบก้าวหน้า (log phase) อยู่ในช่วงก่อน 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงระยะการเลี้ยง 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 18 และภาพที่ 19



ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน โดย DSMZ catalogue El-Sayed et al. (2009) Savenkova et al. (1999)



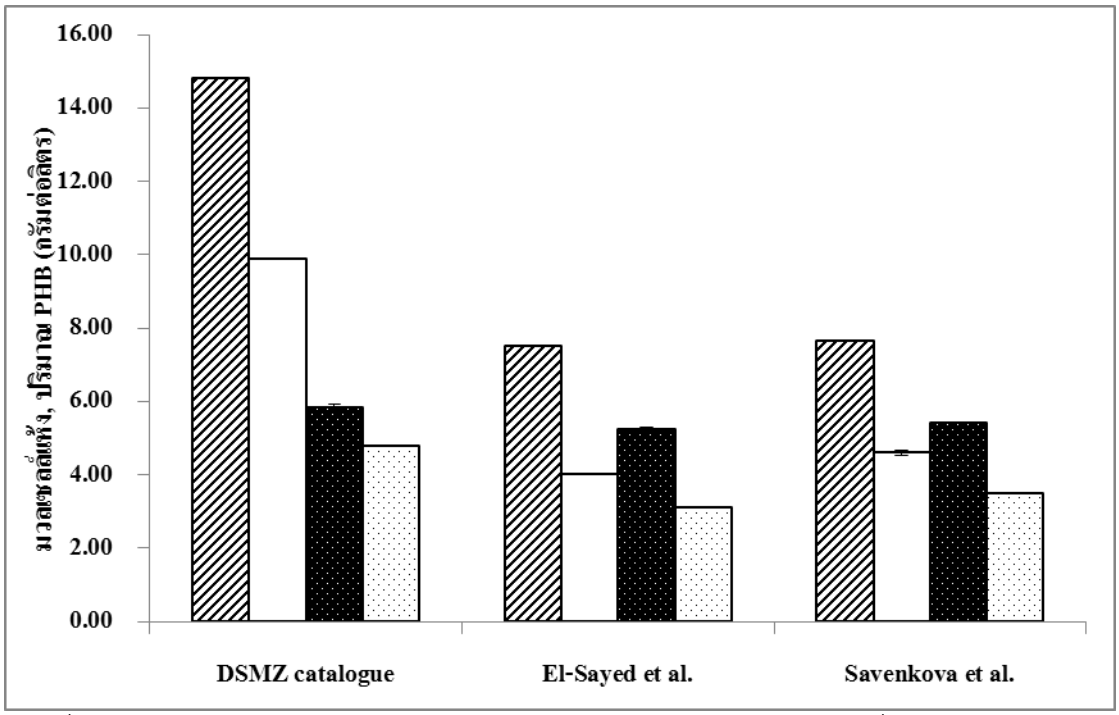
ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน โดย DSMZ catalogue (1993) El-Sayed et al. (2009) Savenkova et al. (1999)

อย่างไรก็ตามจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่แตกต่างกันเพื่อตรวจสอบความสามารถในการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า มีค่าที่แตกต่างกัน กล่าวคือ เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.80±0.01 กรัมต่อลิตร และผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้เท่ากับ 9.90±0.01 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 66.89 ของมวลเซลล์แห้ง รองลงมาคือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน คือ มีค่ามวลเซลล์แห้งเท่ากับ 7.65±0.00 และ 7.52±0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 4.60±0.07 และ 4.00±0.00 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 60.13 และ 53.19 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์เดิม พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1999) เช่นเดียวกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.90±0.06 และ 4.80±0.00 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 81.36 ของมวลเซลล์แห้ง รองลงมา คือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) มีค่ามวลเซลล์แห้งเท่ากับ 5.40±0.01 และ 5.28±0.03 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 3.50±0.01 และ 3.10±0.01 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 64.81 และ 58.71 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 14 และนำมาเปรียบเทียบให้เห็นชัดเจนในรูปความสัมพันธ์ระหว่างมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ดังแสดงในภาพที่ 20

ตารางที่ 14 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน

สูตรอาหาร	**มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)**		**PHB (กรัมต่อลิตร)**		**PHB (ร้อยละ)**	
	สายพันธุ์เดิม	**สายพันธุ์กลายซ้ำ**	**สายพันธุ์เดิม**	**สายพันธุ์กลายซ้ำ**	**สายพันธุ์เดิม**	**สายพันธุ์กลายซ้ำ**
DSMZ catalogue	5.90±0.06 ^{c}	14.80 ±0.01^{c}	4.80±0.00^{c}	9.90 ±0.01^{c}	81.36	66.89
El-Sayed et al.	5.28±0.03^{a}	7.52 ±0.01^{a}	3.10±0.01^{a}	4.00 ±0.00^{a}	58.71	53.19
Savenkova et al.	5.40±0.01^{b}	7.65 ±0.00^{b}	3.50±0.01^{b}	4.60 ±0.07^{b}	64.81	60.13

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 20 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน โดย มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์เดิม ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์เดิม

ในการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) ดังแสดงในตารางที่ 4-9 พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) ในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) และ Savenkova et al. (1999) มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.84 และ 0.80 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และสูตรอาหาร El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.66 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) มีค่าสูงสุดเช่นเดียวกัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.64 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ รองลงมา คือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.59 และ 0.54 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ และการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.68 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.37 และ 0.27 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) เช่นเดียวกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.31 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.30 และ 0.21 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.07 กรัมเซลล์ต่อกรัม

ของสารอาหาร รองลงมา คือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.63 และ 0.51 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ DSMZ catalogue (1993) และ Savenkova et al. (1999) มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหารเท่ากัน คือ 0.38 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร และสูตรอาหาร El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.32 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร (ตารางที่ 4-9)

เมื่อคำนวณอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (*Qp*) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาคือ สูตรอาหาร Savenkova et al. (1999) และ El-Sayed et al. (2009) มีค่าเท่ากับ 0.10 และ 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 15) จะเห็นได้ว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในสูตรอาหาร DSMZ catalogue (1993) เชื้อสามารถเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสูตรอาหารนี้ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 15 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (*Qp*) ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน

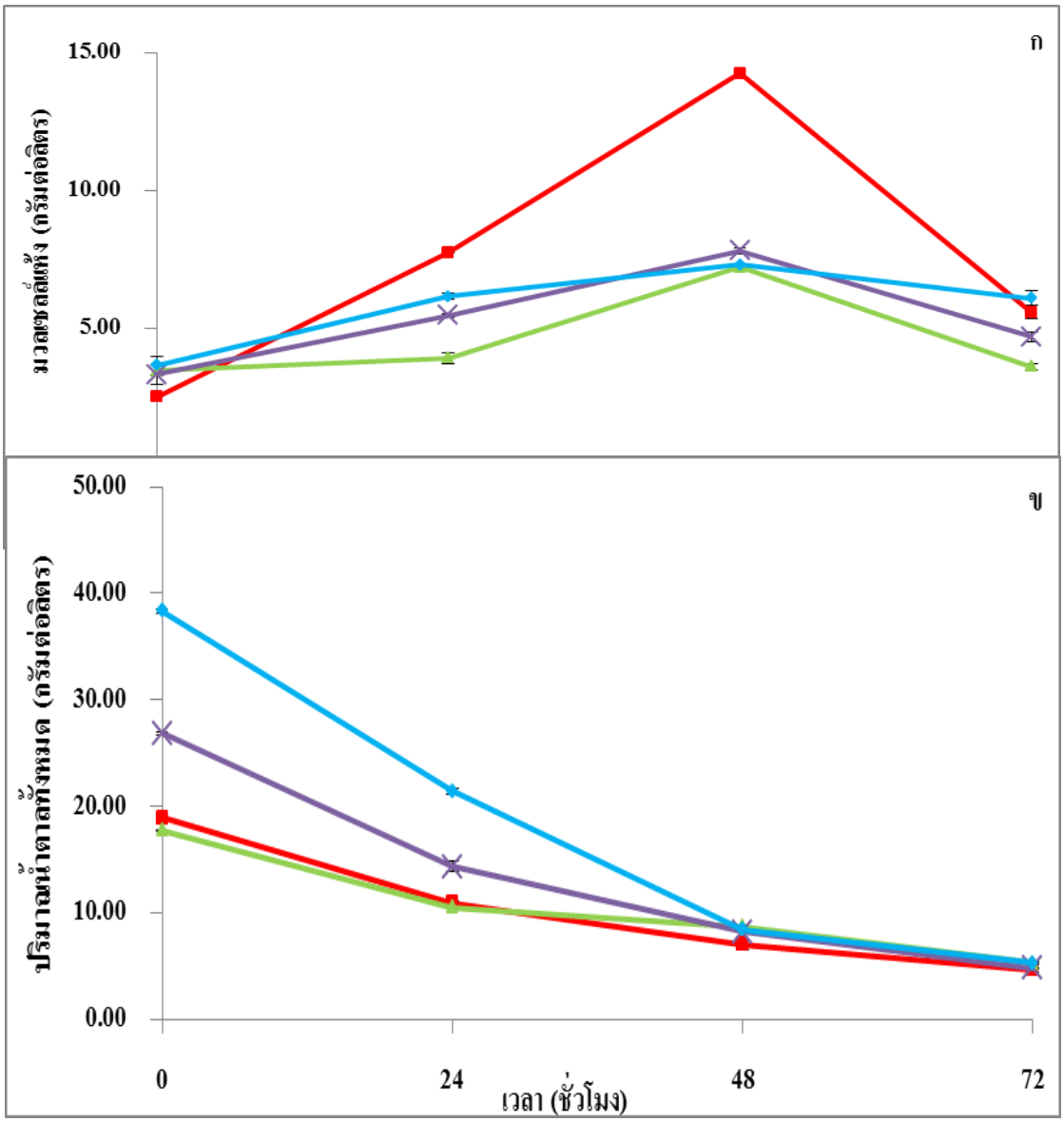
สูตรอาหาร	Yp/x (g PHB/g cell)		Yp/s (g PHB/g substrate)		Yx/s (g cell/g substrate)		*Qp* (g/l/h)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
DSMZ catalogue	0.64	0.84	0.31	0.68	0.38	1.07	0.10	0.21
El-Sayed et al.	0.54	0.66	0.21	0.27	0.32	0.51	0.06	0.08
Savenkova et al.	0.59	0.80	0.30	0.37	0.38	0.63	0.07	0.10

2.2 ผลของการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

จากเป้าหมายของการศึกษาที่ต้องการใช้สารอาหารราคาถูกเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์และนำไปสู่ระดับอุตสาหกรรม ในครั้งนี้ได้เลือกใช้กากน้ำตาลมาเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำตาล ซึ่งแบ่งได้ 2 ชนิด ตามวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำตาล ได้แก่ กากน้ำตาลอ้อย (cane molasses) และกากน้ำตาลจากหัวบีท (beet molasses) โดยองค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อยจะมีค่าสูงกว่ากากน้ำตาลจากหัวบีท ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคส น้ำตาลอินเวิท ไนโตรเจน และมีสารประกอบอื่นปะปนอยู่ (Okafor , 2007)

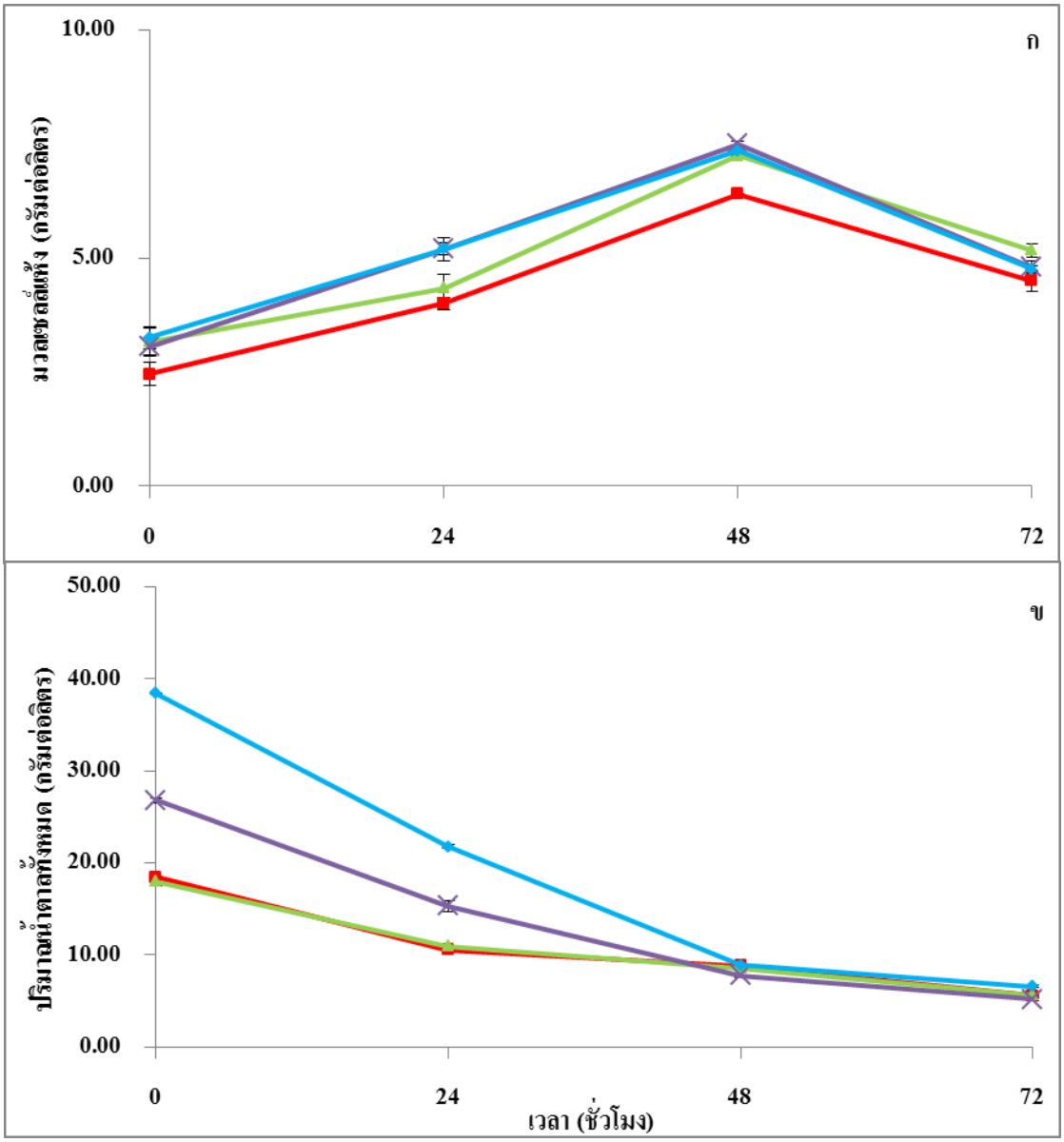
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ ในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue ซึ่งใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมสูตร DSMZ catalogue (1993) ซึ่งใช้น้ำตาล ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีอัตราการเจริญระยะก้าวหน้าในช่วงก่อน 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารชุดควบคุมมีการเจริญสูงสุด ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงมากที่ระยะการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์เดิมทุกชุดการทดลอง มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน โดยมีการเจริญระยะก้าวหน้าในช่วงก่อน 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงมากที่ระยะการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 21 และภาพที่ 22

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 7.80±0.11 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง รองลงมา คือ ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 40 และ 20 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 7.30±0.01 และ 7.20±0.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารชุดควบคุมสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 14.25±0.01 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในทุกความเข้มข้น และสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชุดควบคุม คือ 9.15±0.01 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 64.21 ของมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ผลิตได้ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 5.27±0.12, 6.20±0.14 และ 5.54±0.05 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 73.19, 79.49 และ 75.89 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 7.50±0.06 และ 5.45±0.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 72.67 ของมวลเซลล์แห้ง รองลงมา คือ อาหารที่ใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 40 และ 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 7.36±0.00 และ 7.25±0.01 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 5.30±0.09 และ 5.07±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 72.01 และ 69.93 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีค่าต่ำกว่าในอาหารชุดควบคุมคือ 78.13 ของมวลเซลล์แห้ง ดังแสดงในตารางที่ 16 และภาพที่ 23



ภาพที่ 21 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน โดย

ชุดควบคุม
30 กรัมต่อลิตร
20 กรัมต่อลิตร
40 กรัมต่อลิตร



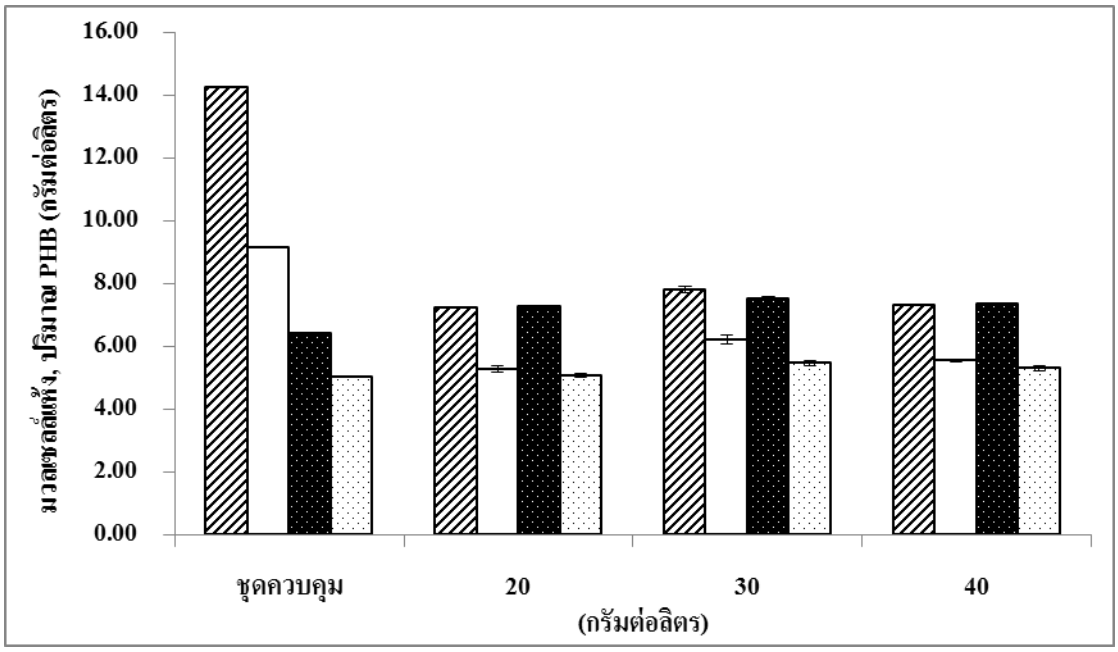
ภาพที่ 22 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน โดย

ชุดควบคุม
30 กรัมต่อลิตร
20 กรัมต่อลิตร
40 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 16 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน

กากน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		PHB (กรัมต่อลิตร)		PHB (ร้อยละ)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
ชุดควบคุม	6.40±0.00[a]	14.25±0.01[d]	5.00±0.01[a]	9.15±0.01[d]	78.13	64.21
20	7.25±0.01[b]	7.20±0.00[a]	5.07±0.06[b]	5.27±0.12[a]	69.93	73.19
30	7.50±0.06[d]	7.80±0.11[c]	5.45±0.07[d]	6.20±0.14[c]	72.67	79.49
40	7.36±0.00[c]	7.30±0.01[b]	5.30±0.09[c]	5.54±0.05[b]	72.01	75.89

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 23 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน โดยที่

มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์เดิม

ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์เดิม

จากปริมาณของมวลเซลล์แห้งและพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ผลิตได้นำมาคิดเป็นค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) โดยเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.85 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ส่วนในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 40 และ 20 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.83 และ 0.72 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่ามีค่าต่ำกว่า โดยชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 1.08 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.70 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ รองลงมา คือ ความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.65 และ 0.60 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุม มีค่าเท่ากับ 0.61 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 17

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.33 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ส่วนในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 20 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.29 และ 0.21 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ ซึ่งทุกความเข้มข้นของกากน้ำตาลมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม คือ 0.59 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.26 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และในอาหารที่ใช้กากน้ำตาล 20 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.23 และ 0.16 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ (ตารางที่ 17)

ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.42 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ ความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.33 และ 0.23 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ส่วนชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.98 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงในกากน้ำตาลทุกความเข้มข้น และเชื้อสายพันธุ์เดิมมีค่าเท่ากับ 0.28, 0.32 และ 0.21 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

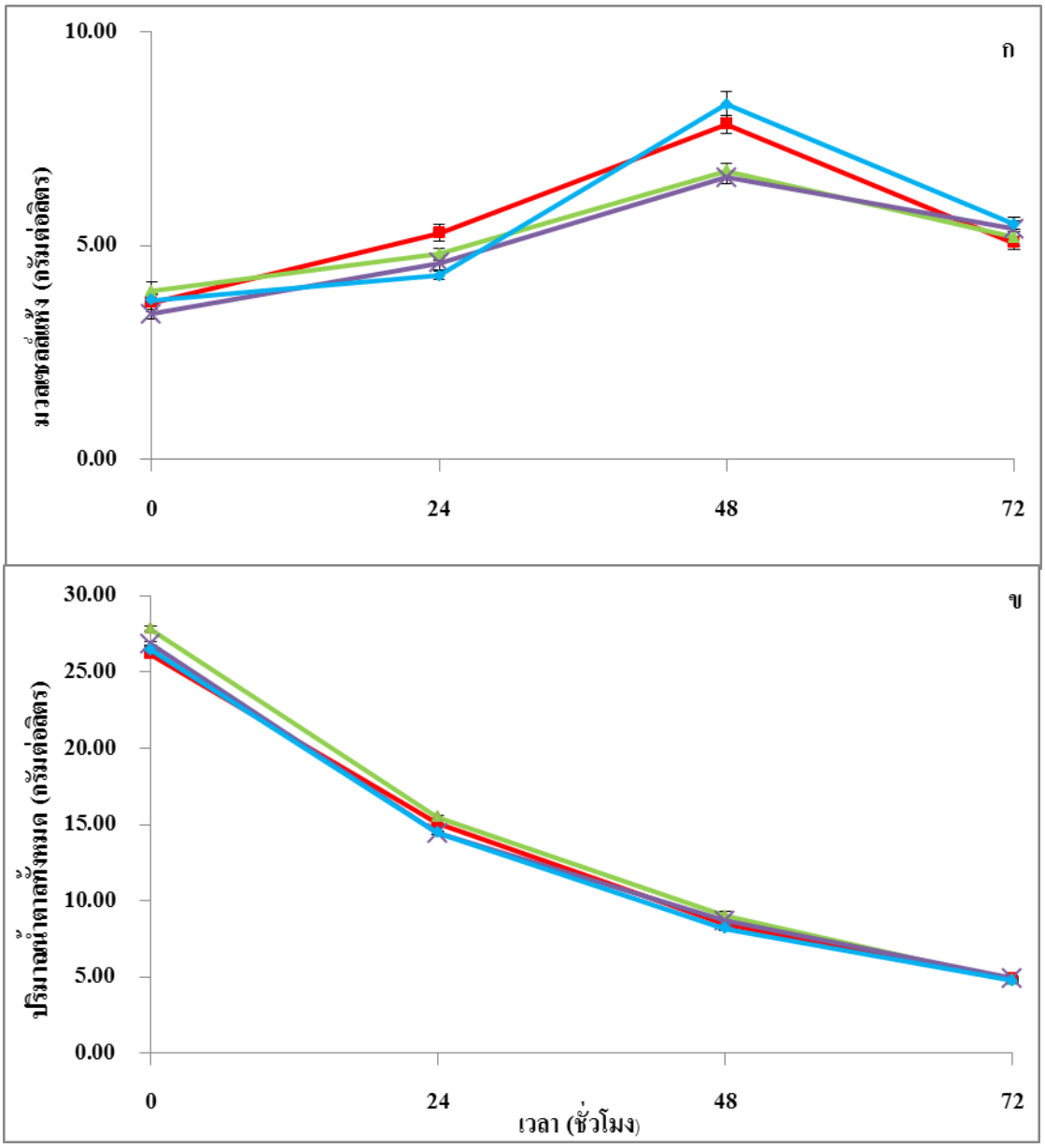
จากการคำนวณอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (*Qp*) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมา คือ ความเข้มข้น 40 และ 20 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.12 และ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิมมีอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงกันในทุกชุดการทดลอง จากผลการศึกษา พบว่า การเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถเจริญและผลิต พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูง ดังนั้นจึงเลือกไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 17 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (*Qp*) ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลแตกต่างกัน

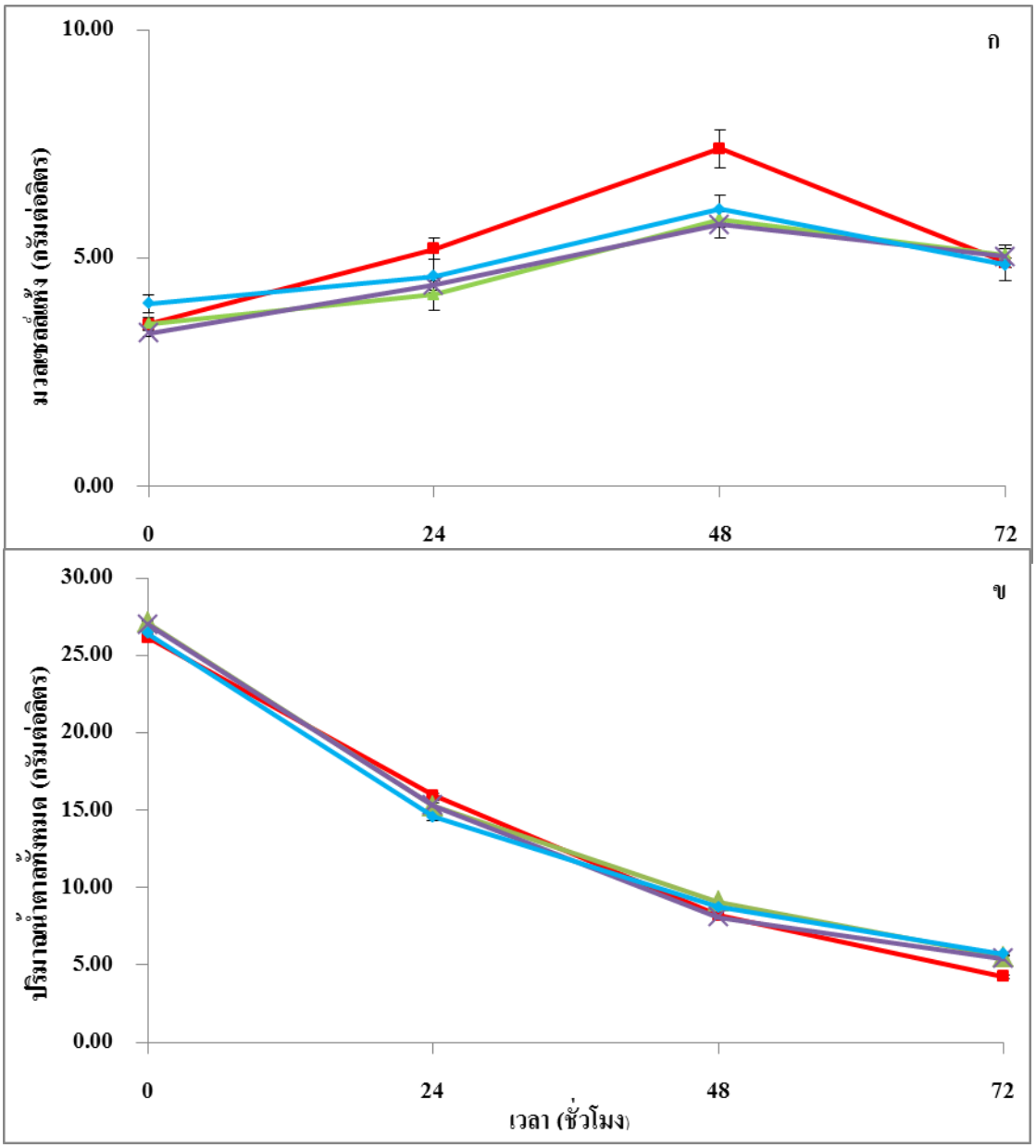
กากน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	Yp/x (g PHB/g cell)		Yp/s (g PHB/g substrate)		Yx/s (g cell/g substrate)		*Qp* (g/l/h)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
ชุดควบคุม	0.61	1.08	0.42	0.59	0.39	0.98	0.10	0.20
20	0.65	0.72	0.23	0.29	0.28	0.33	0.10	0.11
30	0.70	0.85	0.26	0.33	0.32	0.42	0.11	0.13
40	0.60	0.83	0.16	0.21	0.21	0.23	0.11	0.12

2.3 ผลของการใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ในการศึกษาความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ โดยการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue (1993) ซึ่งปรับความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดที่แตกต่างกัน คือ 2, 3 และ 4 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีอัตราการเจริญระยะก้าวหน้าในช่วงก่อน 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารชุดควบคุมมีการเจริญสูงสุด และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า เมื่อเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลจะลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยมีค่าลดลงมากที่ระยะการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิมมีอัตราการเจริญสูงสุดในอาหารชุดควบคุมเช่นเดียวกัน และพบว่าในทุกชุดการทดลองมีการเจริญระยะก้าวหน้าในช่วงก่อน 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยลดลงมากที่ระยะการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 24 และภาพที่ 25



ภาพที่ 24 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน โดย



ภาพที่ 25 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน โดย

ชุดควบคุม 3 กรัมต่อลิตร
2 กรัมต่อลิตร 4 กรัมต่อลิตร

จากการเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด 8.30±0.30 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 18 และภาพที่ 24 รองลงมา คือ อาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 2 และ 3 กรัมต่อลิตร ให้มวลเซลล์แห้งเท่ากับ 6.75±0.18 และ 6.60±0.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในชุดควบคุมสามารถผลิตได้ 7.85±0.21 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า เชื้อสามารถผลิตได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงใน

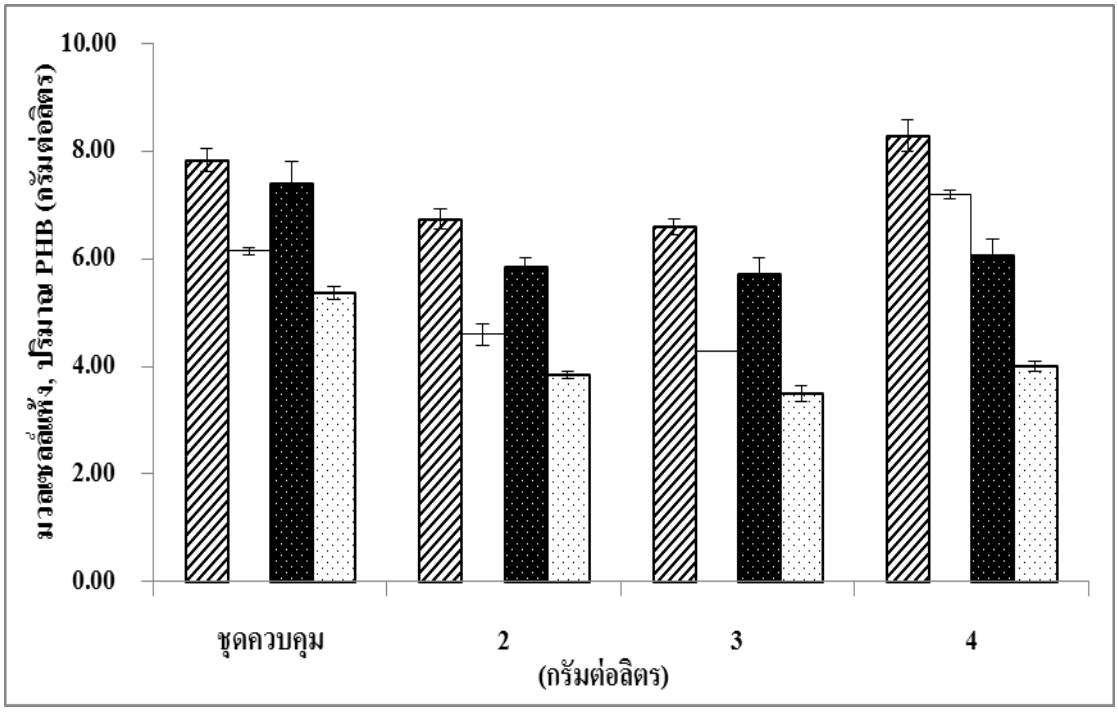
อาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 7.20±0.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 86.75 ของมวลเซลล์แห้ง รองลงมา คือ อาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 2 และ 3 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 4.60±0.20 และ 4.30±0.00 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 68.15 และ 65.15 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 18 และภาพที่ 26) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่า ชุดควบคุมสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 6.15±0.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 78.34 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 6.07±0.03 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 4.00±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65.90 ของมวลเซลล์แห้ง รองลงมา คือ อาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 2 และ 3 กรัมต่อลิตร โดยสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 5.85±0.18 และ 5.73±0.29 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้เท่ากับ 3.85±0.07 และ 3.50±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65.81 และ 61.08 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ และพบว่าในทุกชุดการทดลองมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม (ตารางที่ 19 และภาพที่ 26)

ตารางที่ 18 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน

น้ำแช่ข้าวโพด (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		PHB (กรัมต่อลิตร)		PHB (ร้อยละ)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
ชุดควบคุม	7.40±0.42^{d}	7.85±0.21^{c}	5.37±0.12^{d}	6.15±0.07^{c}	72.57	78.34
2	5.85±0.18^{b}	6.75±0.18^{b}	3.85±0.07^{b}	4.60±0.20^{b}	65.81	68.15
3	5.73±0.29^{c}	6.60±0.14^{a}	3.50±0.14^{c}	4.30±0.00^{a}	61.08	65.15
4	6.07±0.03^{a}	8.30±0.30^{d}	4.00±0.10^{a}	7.20±0.07^{d}	65.90	86.75

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากการศึกษา พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุด เท่ากับ 1.06 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง ส่วนในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 2 และ 3 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.68 และ 0.47 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 20 โดยในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.92 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และเชื้อสายพันธุ์เดิม พบว่า มีค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในชุดควบคุม คือ 0.75 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ส่วนในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4, 2 และ 3 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.68, 0.50 และ 0.44 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ



ภาพที่ 26 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ P H B สูงสุดที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน โดยที่

มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์เดิม

ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์เดิม

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 0.37 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ อาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 3 และ 2 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.18 และ 0.17 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ส่วนชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.31 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และเชื้อสายพันธุ์เดิมจะมีค่าสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.18 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 และ 3 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.17 และ 0.16 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่ามีค่าต่ำกว่า (ตารางที่ 20)

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yp/s) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุด คือ 0.35 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ส่วนในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 3 และ 2 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.28 และ 0.25 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ โดยในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.42 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร และเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.32 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ ในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพด

ความเข้มข้น 3, 2 และ 4 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.25, 0.23 และ 0.20 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ

เมื่อคำนวณอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (*Qp*) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนในชุดการทดลองอื่นมีค่าใกล้เคียงกัน และเชื้อสายพันธุ์เดิมมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารชุดควบคุม ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 19) จากผลการศึกษา พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน เชื้อสามารถเจริญและมีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูง ดังนั้นจึงเลือกไปใช้ในการศึกษาต่อไป

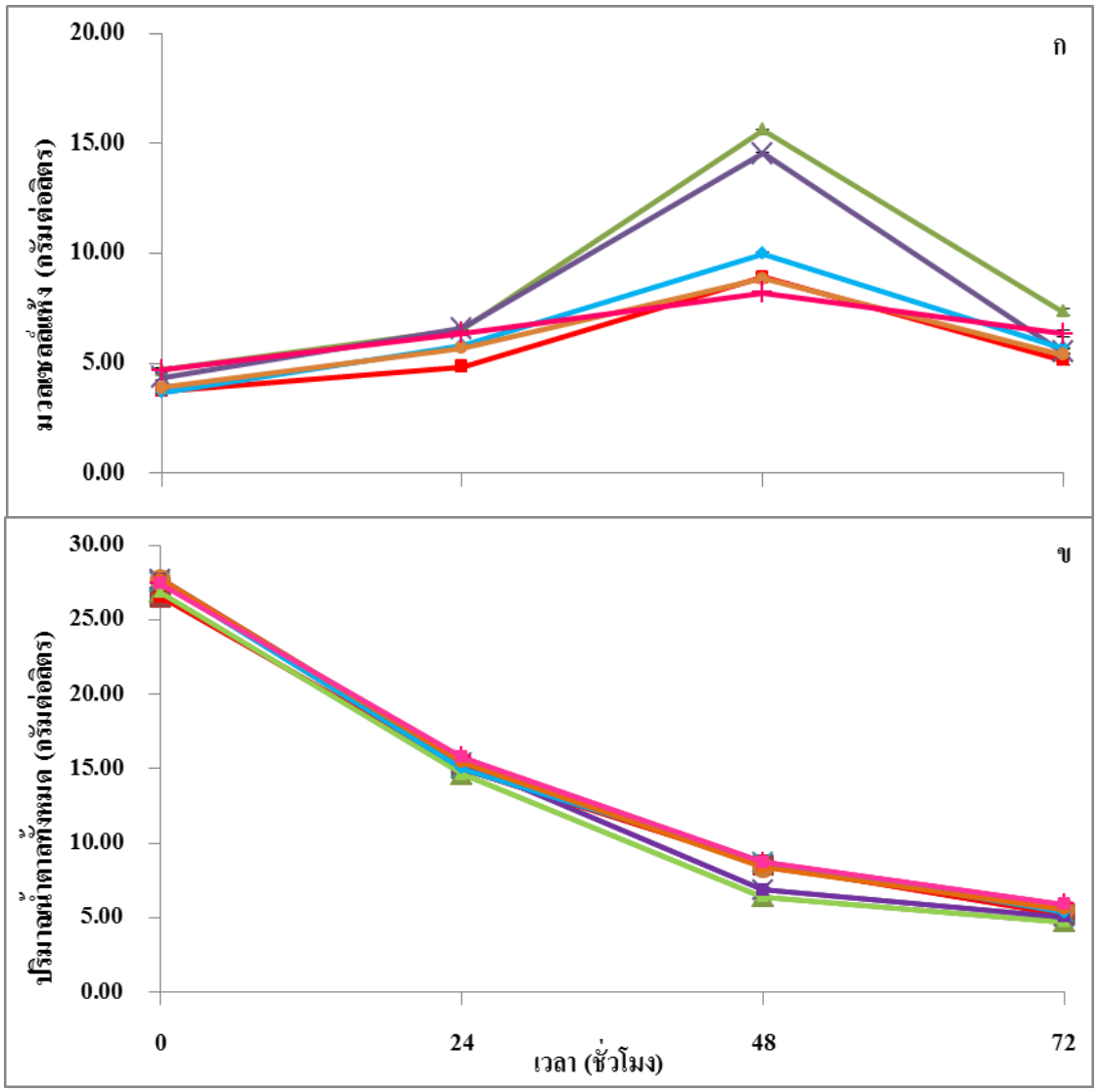
ตารางที่ 19 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และอัตราจำเพาะของการ เกิดผลิตภัณฑ์ (*Qp*) ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพดแตกต่างกัน

น้ำแช่ข้าวโพด (กรัมต่อลิตร)	Yp/x (g PHB/g cell)		Yp/s (g PHB/g substrate)		Yx/s (g cell/g substrate)		*Qp* (g/l/h)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
ชุดควบคุม	0.75	0.92	0.26	0.31	0.22	0.42	0.11	0.13
2	0.50	0.68	0.18	0.17	0.23	0.25	0.08	0.10
3	0.44	0.47	0.16	0.18	0.25	0.28	0.07	0.09
4	0.68	1.06	0.17	0.37	0.20	0.35	0.08	0.15

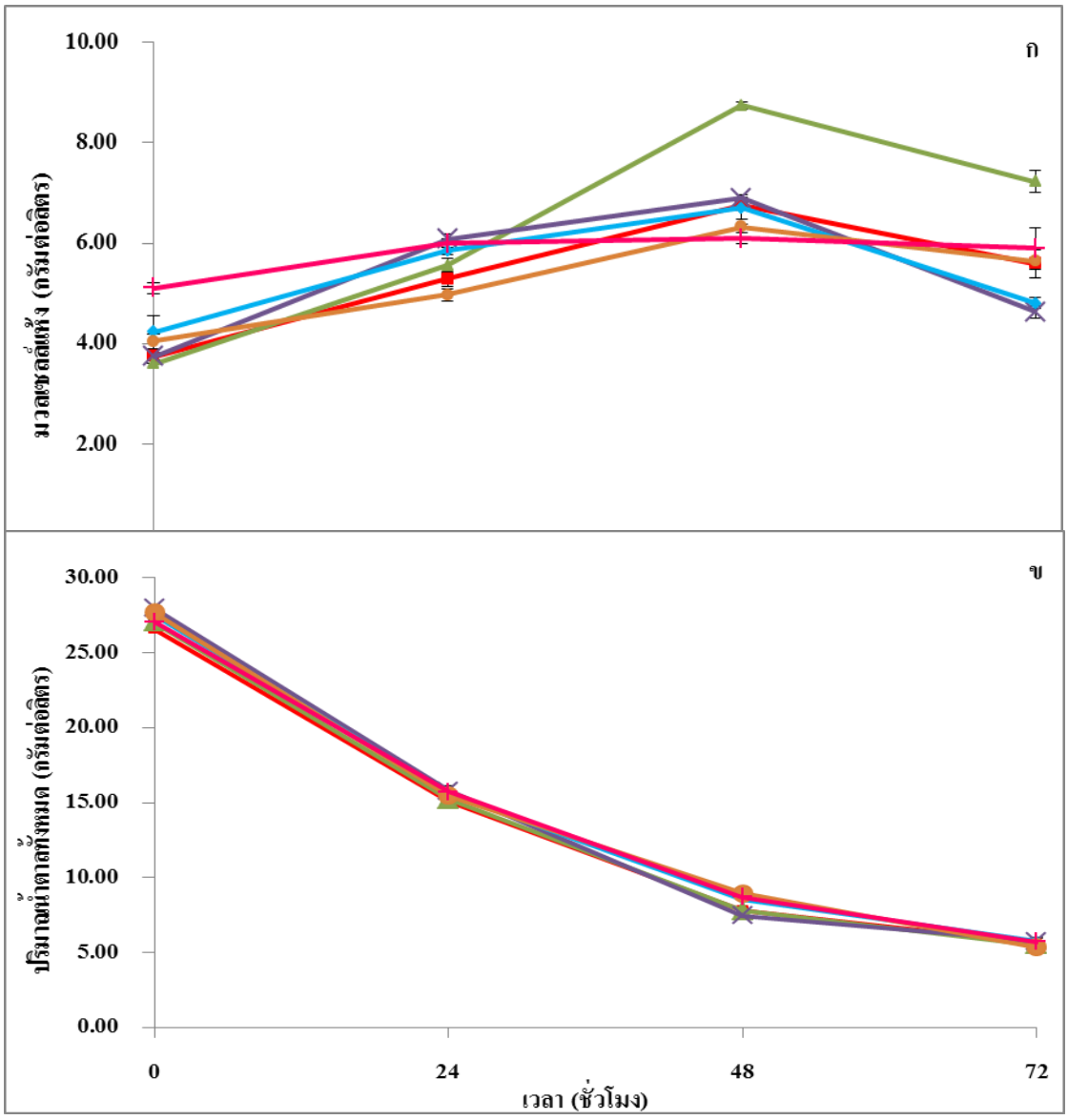
2.4 ผลของความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

ในการศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ ด้วยการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue (1993) โดยปรับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร ร่วมกับกากน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนทดแทน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 2.3 กรัมต่อลิตร กากน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนทดแทน ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก

24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งการเจริญมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน คือ มีระยะการเจริญก้าวหน้าในช่วงก่อน 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการลดลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งลดลงมากที่ระยะการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 27 และภาพที่ 28



ภาพที่ 27 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน โดย



ภาพที่ 28 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน โดย

ชุดควบคุม
2.5 กรัมต่อลิตร
3.0 กรัมต่อลิตร
3.5 กรัมต่อลิตร
4.0 กรัมต่อลิตร
5.0 กรัมต่อลิตร

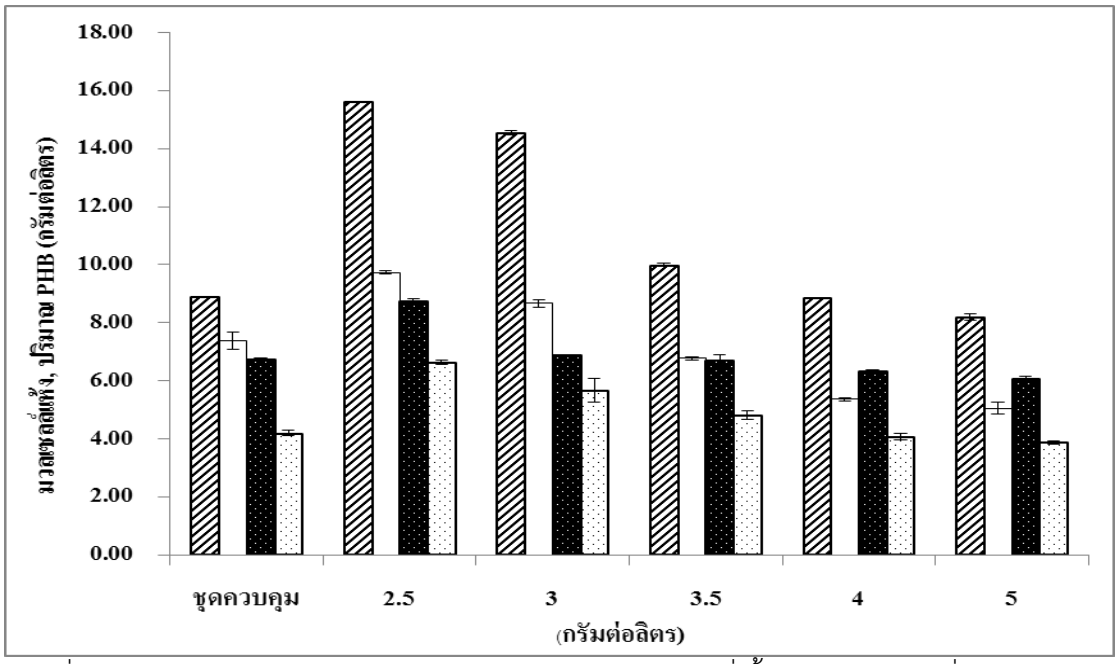
จากการเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 15.62±0.00 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4-14 และภาพที่ 4-17 รองลงมา คือ อาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร ผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 14.55±0.07,

9.99±0.06, 8.85±0.01 และ 8.20±0.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และชุดควบคุมผลิตได้ 8.90±0.02 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า เชื้อสามารถผลิตได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร ผลิตได้ 9.73±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 62.29 ของมวลเซลล์แห้ง รองลงมา คือ อาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร ผลิตได้ 8.67±0.12, 6.77±0.06, 5.37±0.06 และ 5.05±0.21 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 59.59, 67.77, 60.68 และ 61.59 ของมวลเซลล์แห้ง (ตารางที่ 20 และภาพที่ 29) ส่วนชุดควบคุมสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ 7.37±0.30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82.80 ของมวลเซลล์แห้ง และการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 8.75±0.07 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 6.65±0.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 76.00 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่าในชุดควบคุม ส่วนในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 6.90±0.07, 6.70±0.21, 6.33±0.05 และ 6.10±0.10 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ได้เท่ากับ 5.67±0.40, 4.83±0.15, 4.07±0.12 และ 3.87±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82.17, 72.09, 64.30 และ 63.44 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 20 และภาพที่ 29)

ตารางที่ 20 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		PHB (กรัมต่อลิตร)		PHB (ร้อยละ)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
ชุดควบคุม	6.75±0.04^{d}	8.90±0.02^{c}	4.20±0.10^{c}	7.37±0.30^{d}	62.22	82.80
2.5	8.75±0.07^{f}	15.62±0.00^{f}	6.65±0.07^{f}	9.73±0.06^{f}	76.00	62.29
3.0	6.90±0.07^{e}	14.55±0.07^{e}	5.67±0.40^{e}	8.67±0.12^{e}	82.17	59.59
3.5	6.70±0.21^{b}	9.99±0.06^{d}	4.83±0.15^{d}	6.77±0.06^{c}	72.09	67.77
4.0	6.33±0.05^{c}	8.85±0.01^{b}	4.07±0.12^{b}	5.37±0.06^{b}	64.30	60.68
5.0	6.10±0.10^{a}	8.20±0.10^{a}	3.87±0.06^{a}	5.05±0.21^{a}	63.44	61.59

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 29 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน โดยที่

มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มวลเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์เดิม
ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ปริมาณ PHB ของเชื้อสายพันธุ์เดิม

จากการคำนวณค่าจลนพลศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุดเท่ากับ 0.98 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง รองลงมา คือ ในอาหารที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.78, 0.75, 0.74 และ 0.67 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ ส่วนในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.86 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 22 และเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสูงสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.63 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ และในอาหารที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.58, 0.55, 0.52 และ 0.48 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ ส่วนในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.51 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุด คือ 0.39 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ อาหารที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.33, 0.31, 0.25 และ 0.21 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ โดยในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.34 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร และเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.30 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร รองลงมา คือ อาหารที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.22,

0.19, 0.19 และ 0.15 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.17 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5, 3, 3.5, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.53, 0.48, 0.43, 0.35 และ 0.29 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.38 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร (ตารางที่ 21) ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.37, 0.25, 0.24, 0.22 และ 0.16 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.27 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร

เมื่อคำนวณอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (*Qp*) พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5, 3, 3.5, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.20, 0.18, 0.14, 0.11 และ 0.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 21) ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 0.14, 0.12, 0.10, 0.08 และ 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

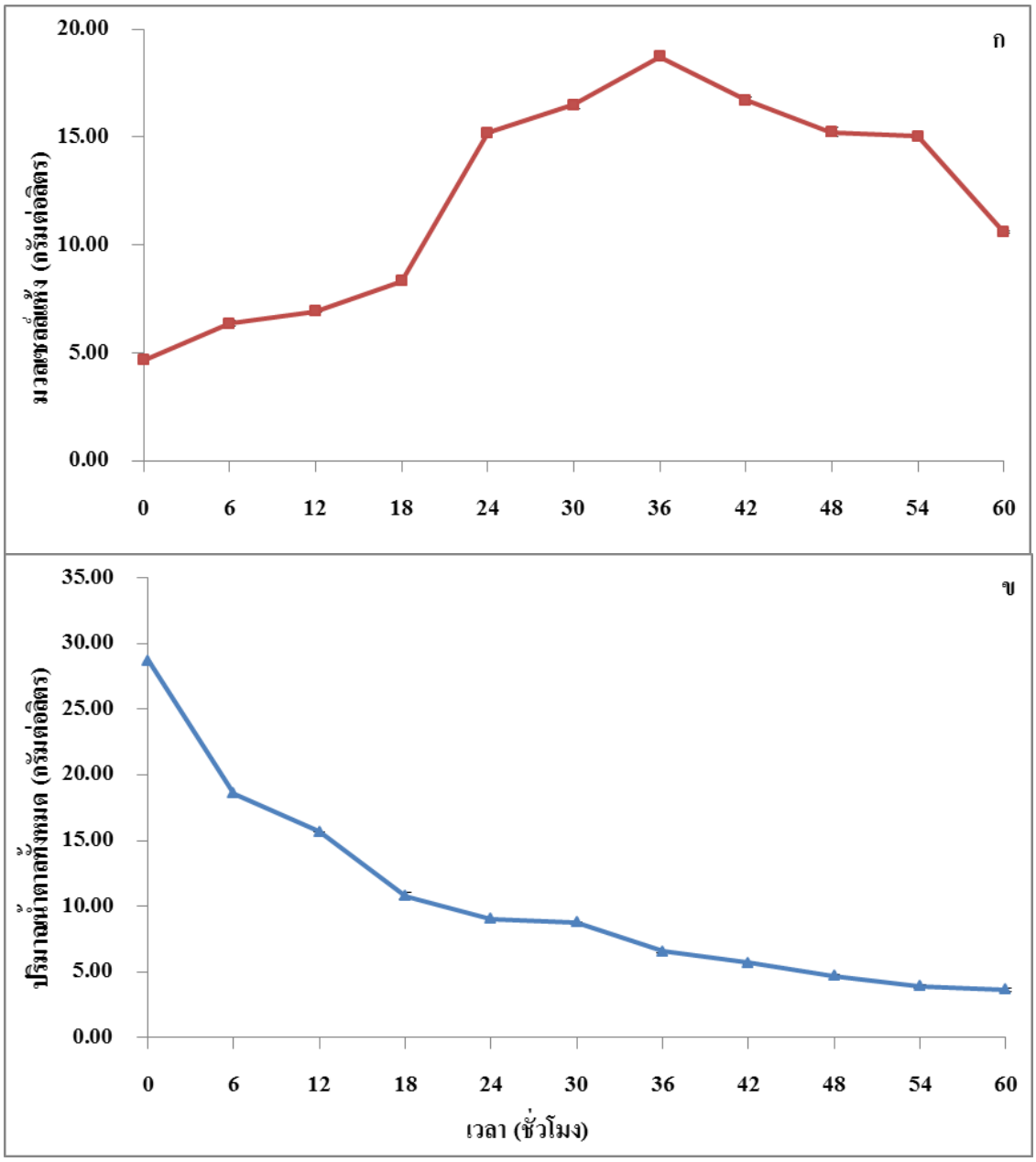
ตารางที่ 21 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (*Qp*) ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแตกต่างกัน

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจน (กรัมต่อลิตร)	Yp/x (g PHB/g cell)		Yp/s (g PHB/g substrate)		Yx/s (g cell/g substrate)		*Qp* (g/l/h)	
	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ	สายพันธุ์เดิม	สายพันธุ์กลายซ้ำ
ชุดควบคุม	0.51	0.86	0.17	0.34	0.27	0.38	0.09	0.15
2.5	0.63	0.98	0.30	0.39	0.37	0.53	0.14	0.20
3	0.58	0.78	0.22	0.33	0.25	0.48	0.12	0.18
3.5	0.55	0.75	0.19	0.31	0.24	0.43	0.10	0.14
4	0.52	0.74	0.19	0.25	0.22	0.35	0.08	0.11
5	0.48	0.67	0.15	0.21	0.16	0.29	0.08	0.10

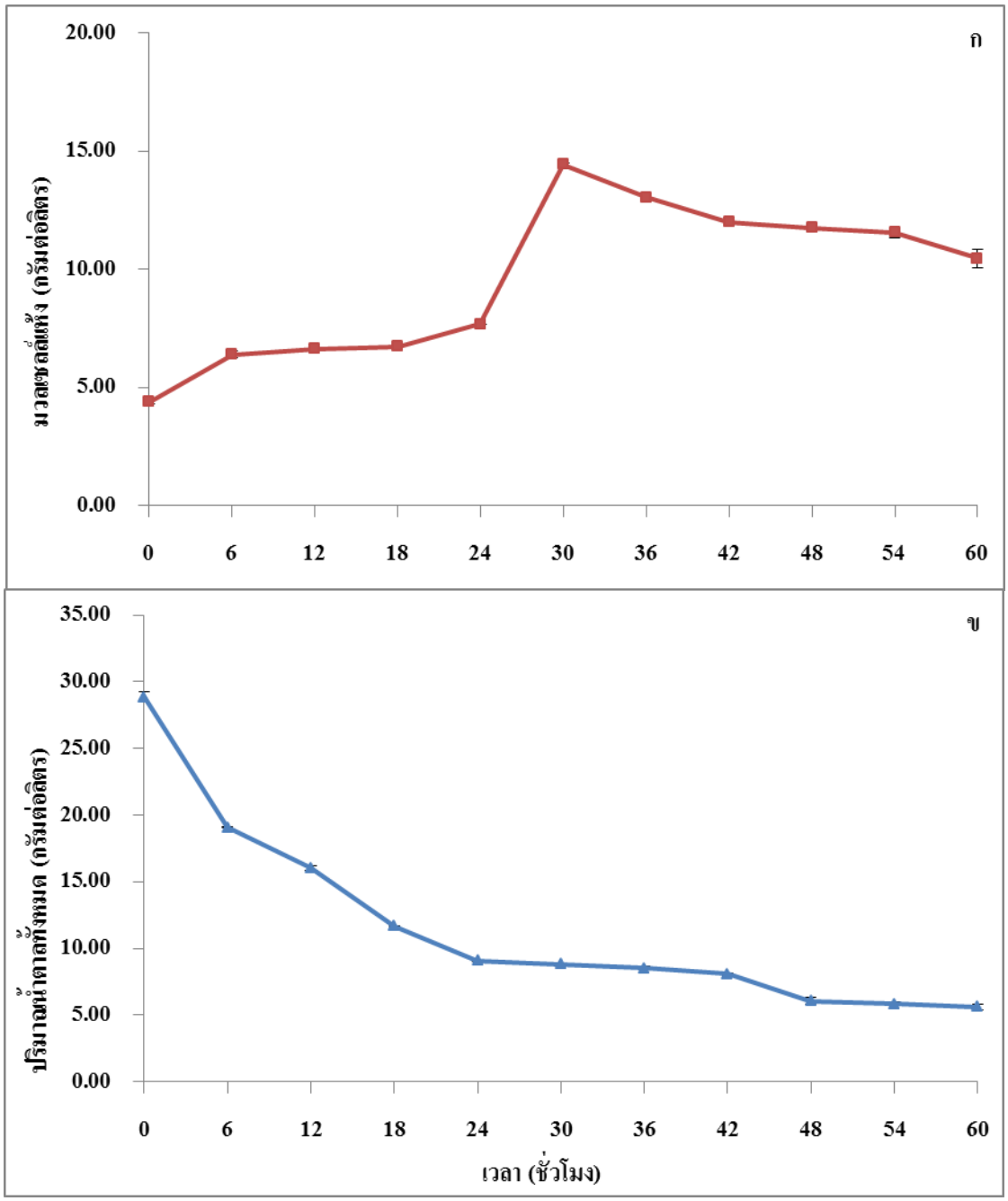
ส่วนที่ 3 การเลี้ยงขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

1. ผลของการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch Culture)

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ขนาด 5 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เติมลงในอาหารปริมาตร 3 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 100-200 รอบต่อนาที กำหนดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 นอร์มอล ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 18-30 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 30 ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการลดลงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดคงเหลือภายในถังเท่ากับ 3.64±0.03 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 28) ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 18-30 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการลดลงตลอดระยะเวลาการเลี้ยง โดยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดคงเหลือเท่ากับ 5.60±0.25 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 31



ภาพที่ 30 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์ กลาย ที่เพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ



ภาพที่ 31 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

จากการศึกษาการผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 18.73±0.06 และ 11.83±0.29 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 63.16 ของมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 36 ชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 14.45±0.07 และ 8.70±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 60.21 ของมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 30 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สายพันธุ์แบคทีเรีย	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	PHB (ร้อยละ)
สายพันธุ์เดิม	14.45 ± 0.07^{a}	8.70 ± 0.06^{b}	60.21
สายพันธุ์กลายซ้ำ	18.73 ± 0.06^{c}	11.83 ± 0.29^{d}	63.16

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีค่าเท่ากับ 0.78 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.37 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.43 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q*p*) เท่ากับ 0.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 36 ชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.69 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.29 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.40 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q*p*) เท่ากับ 0.29 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่ระยะเวลาการเลี้ยง 30 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 23

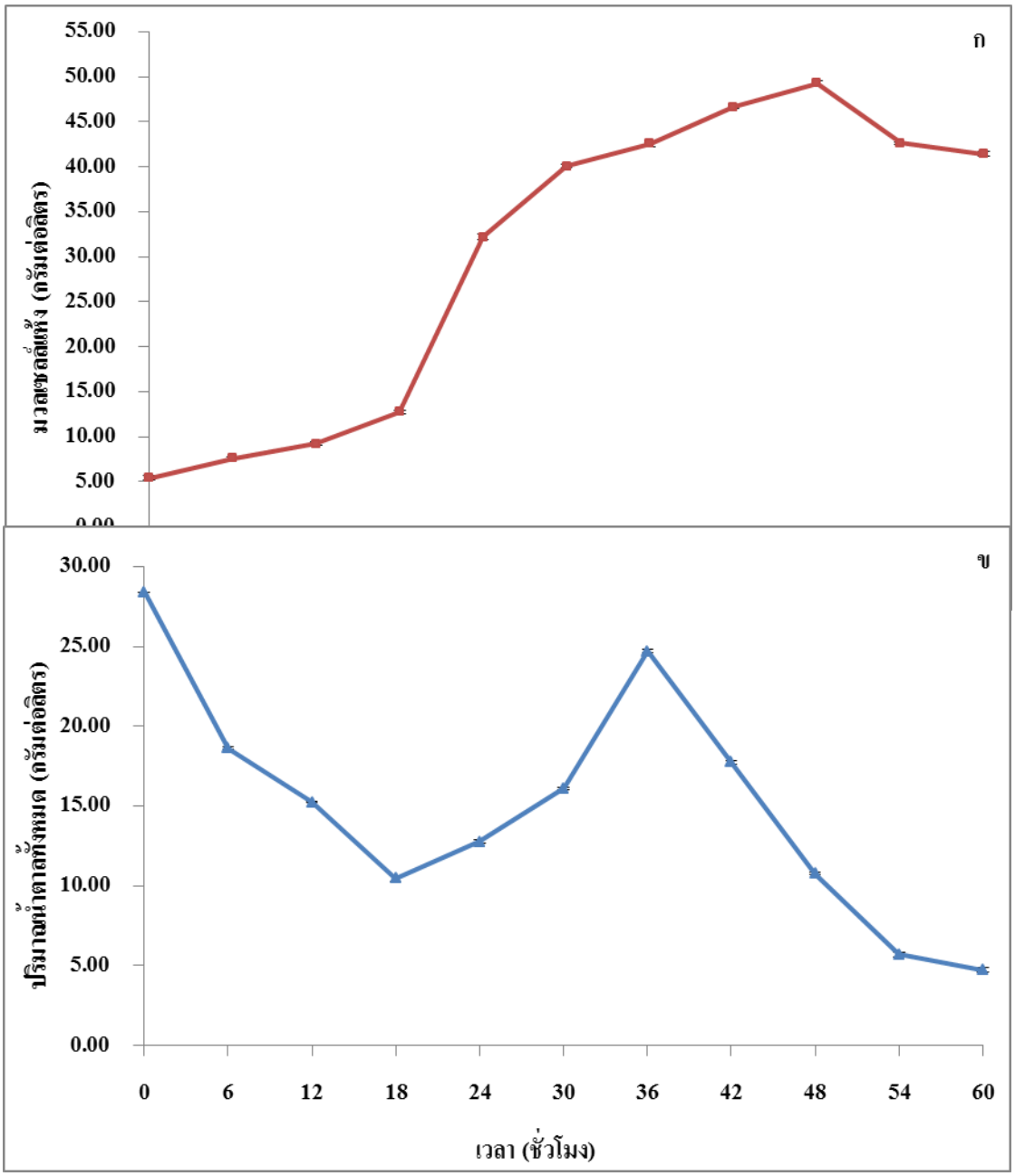
ตารางที่ 23 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q*p*) ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สายพันธุ์	Yp/x (g PHB/g Cell)	Yp/s (g PHB/g substrate)	Yx/s (g Cell/g substrate)	Q*p* (g/l/h)
พันธุ์เดิม	0.69	0.29	0.40	0.29
พันธุ์กลายซ้ำ	0.78	0.37	0.43	0.33

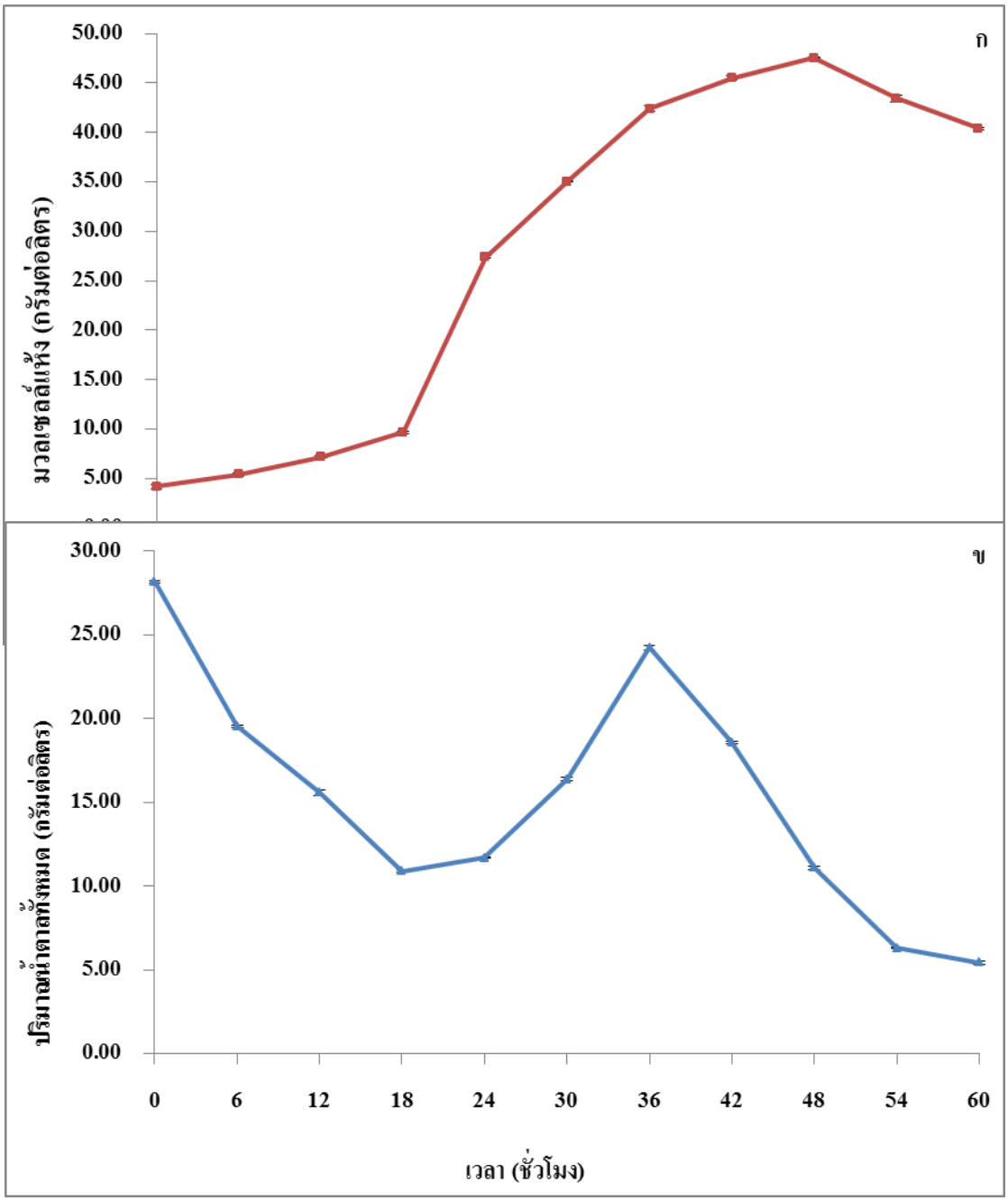
2. ผลของการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-Batch Culture)

การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ จะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงแบบกะ แต่จะใช้ปริมาตรในการผลิตเริ่มต้น (Initial Volumn) 1 ลิตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ลงในอาหาร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 100-200 รอบต่อนาที กำหนดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะจากชั่วโมงที่ 0-18 จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ โดยเติมสารอาหาร (feed medium) ปริมาตร 2 ลิตร ที่อัตราการเติม (feed rate) 79 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากชั่วโมงที่ 18 ถึง 42 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้มีปริมาตรในการหมักทั้งหมดเท่ากับ 3 ลิตร และทำการเพาะเลี้ยงจนครบ 60 ชั่วโมง พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลาย

ซ้ำ มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18-42 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 32 ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง พบว่า มีปริมาณคงเหลือภายในถังหมักเท่ากับ 4.72±0.14 กรัมต่อลิตร ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18-42 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ เช่นเดียวกับเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดคงเหลือภายในถังหมักเท่ากับ 5.43±0.12 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 33



ภาพที่ 32 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่เพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ



ภาพที่ 33 การเปลี่ยนแปลงของมวลเซลล์แห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ข) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 49.30±0.06 และ 32.20±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65.31 ของมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณ พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 47.53±0.06 และ 29.43±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 61.91 ของมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 24

ตารางที่ 24 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สายพันธุ์แบคทีเรีย	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	PHB (ร้อยละ)
สายพันธุ์เดิม	47.53 ± 0.06^{a}	29.43 ± 0.15^{c}	61.91
สายพันธุ์กลายซ้ำ	49.30 ± 0.20^{b}	32.20 ± 0.10^{c}	65.31

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สำหรับการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีค่าเท่ากับ 0.75 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.35 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.40 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Qp) เท่ากับ 0.67 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) มีค่าเท่ากับ 0.67 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.30 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.36 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Qp) เท่ากับ 0.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 25

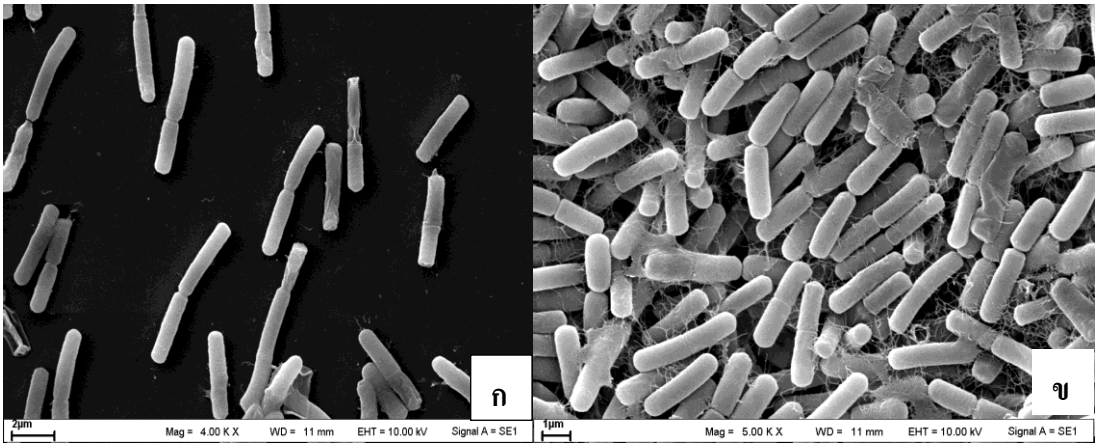
ตารางที่ 25 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Qp) ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สายพันธุ์ แบคทีเรีย	Yp/x (g PHB/g Cell)	Yp/s (g PHB/g substrate)	Yx/s (g Cell/g substrate)	Qp (g/l/h)
สายพันธุ์เดิม	0.67	0.30	0.36	0.61
สายพันธุ์กลายซ้ำ	0.75	0.35	0.40	0.67

ส่วนที่ 4 การศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรีย และการตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

1. การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

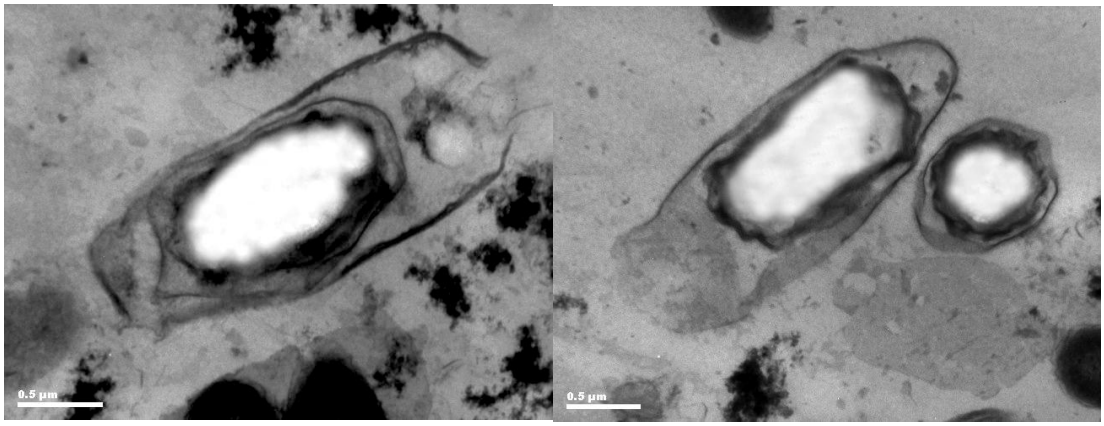
จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ดังแสดงในภาพที่ 32 พบว่า รูปร่างของเชื้อสายพันธุ์เดิม มีลักษณะเป็นท่อนยาว ส่วนเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีลักษณะรูปร่างเปลี่ยนไป คือ เป็นท่อนสั้น แต่มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากมีการสะสมของ PHB เกิดขึ้น



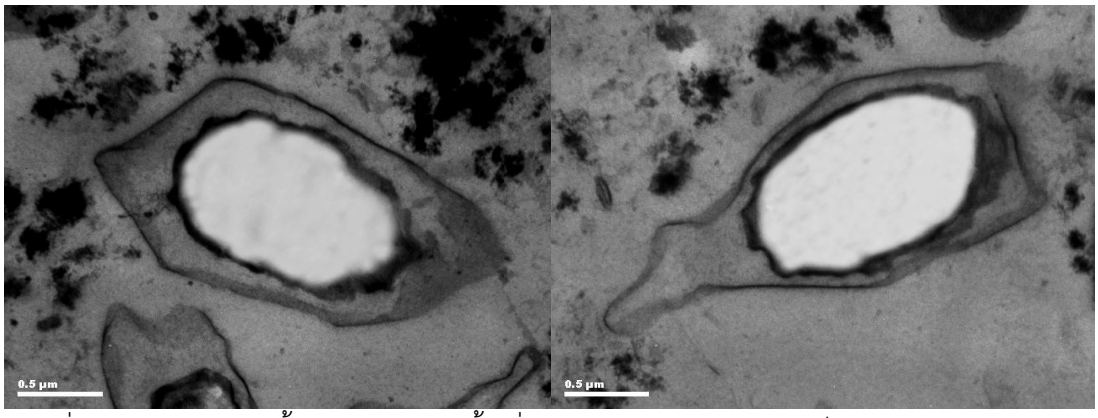
ภาพที่ 34 ลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีการสะสม PHB (ก) เชื้อสายพันธุ์เดิม และ (ข) เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

2. การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่า เชื้อสายพันธุ์เดิม มีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในแกรนูลปริมาณน้อย และลักษณะของผนังเซลล์ยังคงรูปร่างเดิม (ภาพที่ 33) ส่วนเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ มีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ภายในแกรนูลปริมาณสูงกว่าเชื้อสายพันธุ์เดิม โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางสูงกว่า และพบว่าลักษณะของผนังเซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนไป เนื่องจากเชื้อถูกเหนี่ยวนำซ้ำด้วยรังสีและสารเคมี ซึ่งมีผลให้เชื้อมีรูปร่างเปลี่ยนไปและมีการสะสม พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงขึ้น (ภาพที่ 34) สอดคล้องกับการศึกษาของ Luengo et al. (2003) ที่พบว่า ถ้าเซลล์มีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตในปริมาณมากจะทำให้รูปร่างเปลี่ยนแปลงไป และการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจะหยุดที่ปริมาณหนึ่งแม้ว่าเอนไซม์และสารตั้งต้นที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ยังคงมีอยู่ ทั้งนี้เนื่องจากเนื้อที่ภายในเซลล์ที่มีอยู่จำกัด



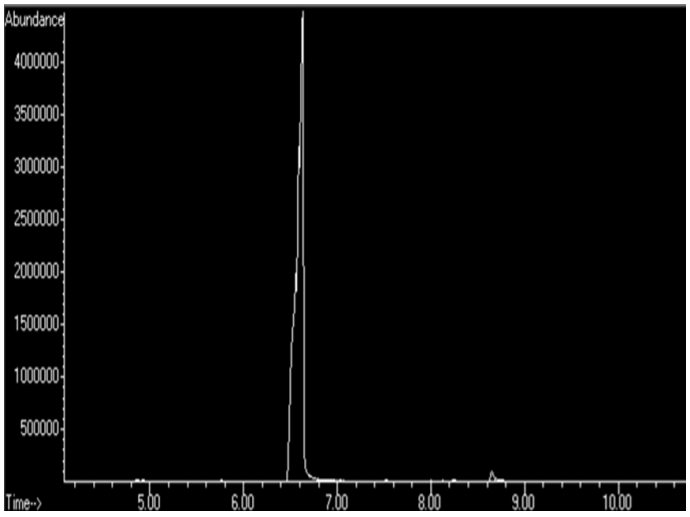
ภาพที่ 35 ลักษณะของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)



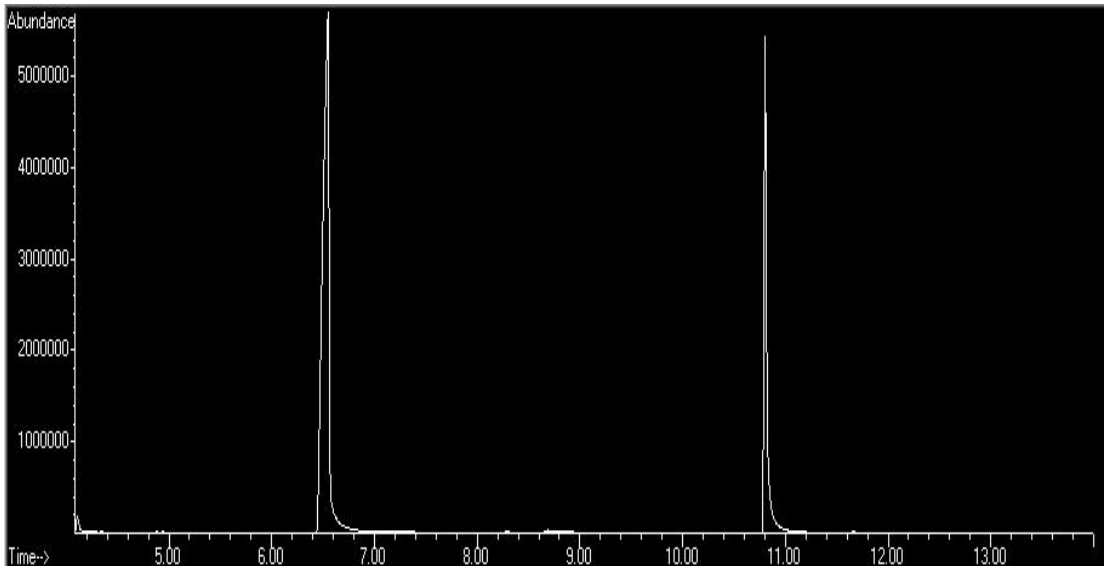
ภาพที่ 36 ลักษณะของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

3. การตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

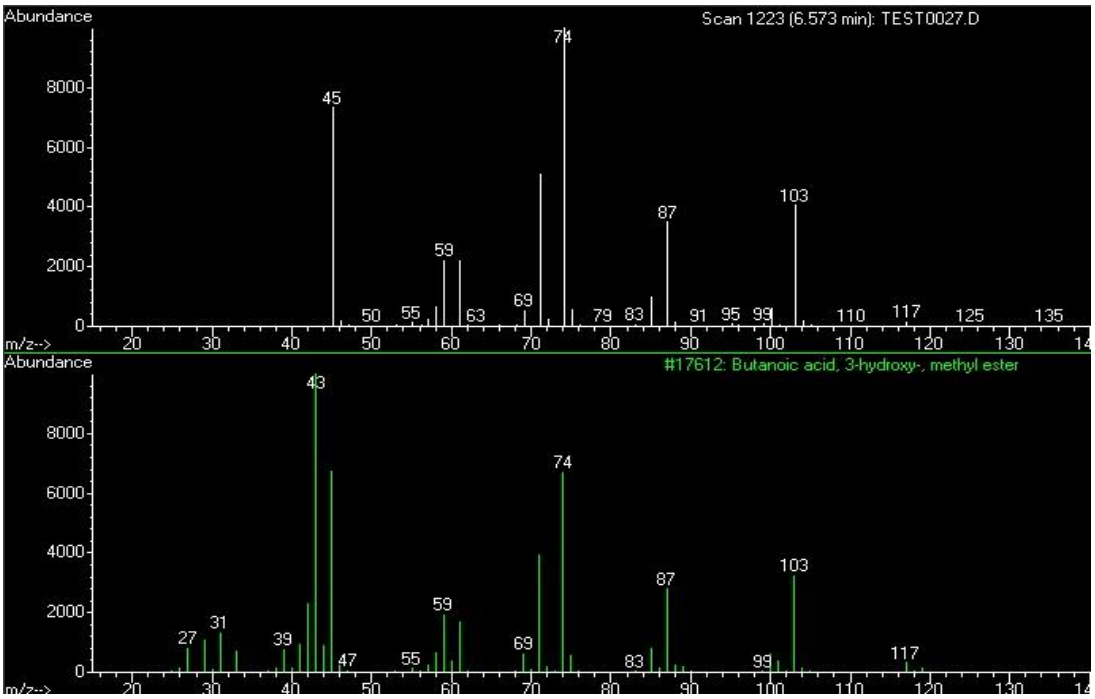
จากการเตรียม methyl ester (เมธิล เอสเทอร์) ของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำและสายพันธุ์เดิมที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทดสอบด้วยเครื่อง GC-MS พบ โครมาโตแกรม 1 โครมาโตแกรม โดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีโครมาโตแกรมเด่นเพียงชนิดเดียวที่ retention time เท่ากับ 6.573 นาที ดังแสดงในภาพที่ 4-25 ซึ่งเป็น retention time เดียวกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Poly [(R)-3-hydroxybutyric acid] (ภาพที่ 4-26) เมื่อตรวจสอบค่ามวลสเปคตรัม (Mass spectra) ของโครมาโตแกรมที่สกัดได้โดยเทียบกับ Library search NIS08 พบว่า ที่ retention time เท่ากับ 6.573 คือ พอลิเมอร์ชนิด Butanoic acid, 3-hydroxy-methyl ester ซึ่งมีค่ามวลสเปคตรัมเท่ากับ 74, 87 และ 103 (ภาพที่ 37 และภาพที่ 38) ซึ่งสรุปได้ว่า เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตพอลิเมอร์ชนิดพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสะสมภายในเซลล์เป็นส่วนใหญ่



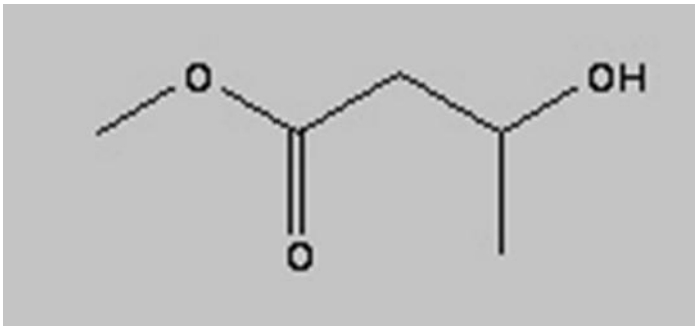
ภาพที่ 37 โครมาโตแกรมของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 38 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็น internal standard



ภาพที่ 39 มวลสเปคตรัมของ Butanoic acid, 3-hydroxy-methyl ester ที่สกัดได้จากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเทียบกับมวลสเปคตรัมของสาร PHB จาก Library search NIST08



ภาพที่ 40 สูตรโครงสร้างของ Butanoic acid, 3-hydroxy-methyl ester ที่สกัดได้จากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการคำนวณปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ผลิตได้ภายในเซลล์โดยเทียบกับสารมาตรฐานพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ในสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำสามารถผลิตได้ เท่ากับ 0.70 กรัมต่อกรัมของมวลเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิมผลิตได้ เท่ากับ 0.58 กรัมต่อกรัมของมวลเซลล์แห้ง ดังแสดงในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ภายในเซลล์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณ PHB (กรัมต่อกรัมของมวลเซลล์แห้ง)
สายพันธุ์เดิม	0.58
สายพันธุ์กลายซ้ำ	0.70

บทที่ 5

สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

ส่วนที่ 1

จากการศึกษาการผลิตพลาสติกชีวภาพจากเชื้อ *Alcaligenes latus* TISTR 1403, *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านเหนี่ยวนำด้วยสาร 2-aminoanthracene (2AA), *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านเหนี่ยวนำด้วยรังสีแกมมาที่ 0.8 KGy โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็นเท่ากับ 7.0 และเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง สรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

1. จากการเปรียบเทียบสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร พบว่าเชื้อ *A. latus*/2AA ในอาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณ พลาสติกชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 0.97 กรัมต่อลิตรคิดเป็นร้อยละ 66.74 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง
2. ในการศึกษาความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทที่เหมาะสมต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพพบว่าที่ความเข้มข้นกากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทร้อยละ 25 ต่อปริมาตรอาหาร เชื้อ *A. latus*/2AA ให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.60 กรัมต่อลิตรและปริมาณพลาสติกชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 1.12 กรัมต่อลิตรคิดเป็นร้อยละ 70.00
3. แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพพบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมอะซิเตทเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *A. latus*/2AA ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งสูงที่สุดเท่ากับ 1.98 กรัมต่อลิตร และปริมาณพลาสติกชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 1.31 คิดเป็นร้อยละ 66.16 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง
4. จากการศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพจากการใช้กากมันสำปะหลังไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมอะซิเตทเป็นแหล่งไนโตรเจนในอัตราส่วนที่ 15 พบว่า *A. latus*/2AA ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.6 กรัมต่อลิตร และปริมาณพลาสติกชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 1.69 กรัมต่อลิตรคิดเป็นร้อยละ 65.00 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

ส่วนที่ 2

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

การเหนี่ยวนำซ้ำเชื้อด้วยวิธีต่าง ๆ โดยการนำเชื้อสายพันธุ์เดิม (*A. latus* TISTR 1403/γ-2AA) มาทำการเหนี่ยวนำซ้ำโดยได้รับสัมผัสรังสีเหนือม่วงตามด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน จำนวน 2 ครั้ง และสารอะคริฟลาวิน ซึ่งใช้ชื่อเรียกว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ พบว่า เชื้อสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด คือ 5.45±0.14 และ 3.50±0.00 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 64.22 ของมวลเซลล์แห้ง

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต เชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญและผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue (1993) โดยการใช้กากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร และเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 15.62±0.00 และ 9.73±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 62.29 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 8.75±0.07 และ 6.65±0.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 76.00 ของมวลเซลล์แห้ง

เมื่อทำการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะและเติมกะ พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบกะ เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เท่ากับ 18.73±0.06 และ 11.83±0.29 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 63.16 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 14.45±0.07 และ 8.70±0.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 60.21 ของมวลเซลล์แห้ง ในขณะที่ การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลายซ้ำ สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด เท่ากับ 49.30±0.20 และ 32.20±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65.31 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนเชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 47.53±0.06 และ 29.43±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 61.91 ของมวลเซลล์แห้ง

บรรณานุกรม

Anderson, A.J., & Dawes, E.A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Review*, 54, 450-472.

Baltus, W. (2013). The Asian bioplastic resin market-An analysis. InnoBioPlast 2013, January 24, 2013.

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

Chamsart, S., Sawanwon, C., Thungkao, S., & Waiprib, Y. (2006). Enzymatic hydrolysis of cassava starch in a stirred tank lysis reactor. *In Proceeding of 15th Thai Chemical In Proceeding of 15th Thai Chemical Engineering and Applied Chemistry Conference : October 27-28, 2005*. Jomtien Palm Beach Hotel & resort : Chonburi.

Choi, J., & Lee, S. Y. (1997). Process analysis and economic evaluation for Poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 17, 335-342.

Chomchai, S., & Chongcharoen, R. (2012). Effect of carbon and nitrogen sources on growth and polyhydroxybutyrate production by *Alcaligenes latus* ATCC 29714. In *Proceeding of 50th Kasetsart University Annual Conference: Natural Resources and Environment, February 1-2, 2012*. (pp. 32-39).

Divyashree, M. S., & Shamala, T. R. (2009). Effect of gamma irradiation on cell lysis and polyhydroxyalkanoate produced by *Bacillus flexus. Radiation Physica and Chemistry*, 78, 147-152.

DSMZ catalogue. (1993). Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Culture Collection of Microorganisms and Cell Cultures), Fifth Edition.

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

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

Flechter, A. (1993). In : plastics from bacteria and for bacteria : PHA as natural, biodegradable polyesters. Springer Verlag, New York, (pp. 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.J., Hagen, A. V., Agteren, M.H.V., Koning, W.D., & UiterKamp, A.J.M.S. (1999) Upgrading of organic waste: production of the copylymer poly-3-hydroxybutyrate-co-valerate by *Ralstonia eutrophus* with organic wastes 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 (ß-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology,* 25, 132-141.

Hikmet, K., Belma, A., Zehra, N. Y., Nazime, M., & Yavuz, B. (2003). Production of poly-ß-hydroxybutyrate (PHB) and differentiation of putative Bacillus mutant strains by SDS-PAGE of total cell protein. *African Journal of Biotechnology*, 2(6), 147-149.

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

Jacquel, N., Chi, W. L., Yu, H. W., Ho, S. W., & Shaw, S. W. (2008). Isolation and purification of bacterial poly (3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39, 15-27.

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

Jogdand, S. N. (2004). *Welcome to the Eco-Friendly Plastic (online).* Retrieved December 25, 2010, from http://www.biotechsupportindae.com/jogsn/.html.

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

Jung, Y.M, J.S. Park & Y.H. Lee. (2000). Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned phbCAB genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Enzyme and Microbial Technology*. 26, 201-208.

Kaewjan, K., Palakas, S., Pattanasupong, A., & Ratanaphadit., K. (2011). Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes latus* TISTR 1403 treated with gamma radiation and 2-aminoanthracene. In *Proceeding of 49th Kasetsart University Annual Conference: Natural Resources and Environment, February 1-4, 2011*. (pp. 193-201).

Kecskemeti, G., Smausz, T., Kresz, N., Toth, Zs., Hopp, B., Chrisey, D., & Berkesi, O. (2006). Pulsed laser deposition of polyhydroxybutyrate biodegradable polymer thin films using ArF excimer laser. *Applied Surface Science*, 253, 1185-1189.

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

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

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

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

Kinoshita, S., Kulprecha, K. & Chao, A. (1991). Microbial Production of Poly-ß-Hydroxybutyric Acid. *In Annual Report of IC Biotech* (Oshima, Y., ed). Osaka : Osaka University. (pp. 347-349).

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

Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., & Thongchul, N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production

by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 240-245.

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

Li, Z. J., Shi, Z. Y., Jian, J., Guo, Y. Y., Wu, Q., & Chen, G. Q. (2010). Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*. Metabolic Engineering, 12, 352-359.

Luengo, J. M., García, 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 production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1004-1011.

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

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

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.

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

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

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

Nunoy, P., Tuntiwaranuruk, C., Noparatarpakul, J., & Meepool, A. (2011). Observationa on Protozoa parasite nematopsis in green tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) from Ang-sila pier, Chonburi province, Thailand. *Journal of the Microscopy Society of Thailand*, 4, 79-83.

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

Okafor, N. (2007). Modern industrial microbiology and biotechnology. Science Publishers, Enfield. NH, USA.

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

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

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

Ramchander, M., Girisham, S., & Reddy, S. M. (2010). Production of PHB (Polyhydroxybutyrate) by *Rhodopseudomonas palustris* KU003 and *Rhodobacter capsulatus* KU002 under phosphate limilation. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. 3: (pp. 847-850).

Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, V.C., & Kalai. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87, 137-146.

Ryn, H. W., Sei, K. H., Yong, K. C., & Ho, H. 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. (2008). Nutrient optimization for production of polyhydroxybutyrate from halotolerant photosynthetic bacteria cultivated under aerobic-dark condition. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11, 1-12.

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

Savenkova, L., Z. Gercberga, V. Nikolaeva, A. Dzene, I.biber & M. Kalnin. (2000). Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films. *Process Biochem*istry, 35, 573-579.

Seo, J. K., Yoon, J. Y., Oh, J. T., & Kim, W. S. (1998). Optimum growth conditions and pH control solution for PHB biosynthesis in *Alcaligenes 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(2), (pp. 63-83).

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 plants A review. *Biotechnology Advances*, 25, 148-175.

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

Tokiwa, Y., & Ugwu, C. U. (2007). Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acidmonomer. *Journal of Biotechnology*, 132, 264-272.

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

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.

Vu, V.H., Phan, T.A., & Kim, K. (2009). Fungal strain improve for cellulose production using repeated and sequential mutagenesis. *Mycobiology,* 37(4), 267-271.

Wang, F., & Lee, S. Y. (1997). Poly (3-Hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a Fed-Batch culture 0f *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied and Environmental Microbiology,* 63, 3707-3706.

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

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

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

Yüksekdag, Z.N., Aslim, B., Beyatil, Y., & Mercan, N. (2004). Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. African Journal of Biotechnology, 3, 63-66.

Zhang, S., Norrlöw, O., Wawrzynczyk, J., & Dey, E, S. (2004). Poly (3-Hydroxybutyrate) Biosynthesis in the biofilm of *Alcaligenes eutrophus,* using glucose enzymatically released from pulp fiber sludge. *Applied and Environmental Microbiology,* 70, 6776-6782.

ภาคผนวก

การเตรียมสารและการวิเคราะห์

การเตรียมสารละลาย

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS)

ชั่ง SDS 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้เข้ากันจนสารละลายใส ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้ SDS ความเข้มข้นร้อยละ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะใช้งาน

2. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดย DNS (Miller, 1995)

การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซาลิก (Dinitrosaliccylid acid : DNS)

ชั่ง DNS (3,5 dinitrosalicylid acid) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) ทีละน้อย คนให้เข้ากันจนสารละลายใสโดยให้ความร้อน จากนั้นเติมโพแทสเซียมทาร์เทรต (NA-K tartrate) 300 กรัม ตามลำดับ รอให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนใช้งาน

การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์มวลเซลล์แห้ง (Dry cell weight, DCW)

1.1 นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว

1.2 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง (resuspension)

1.3 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

1.4 นำค่าน้ำหนักที่ได้ มาคำนวณมวลเซลล์แห้งตามสูตรดังต่อไปนี้

มวลเซลล์แห้ง (มก./มล.) = (เซลล์ + น้ำหนักหลอด) - น้ำหนักหลอด

2. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยวิธี Gravimetric method

2.1 นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว

2.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วนำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง

2.3 เติมสารละลายโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.4 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.5 ส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ (ทางการค้ามีส่วนผสมของคลอรีนร้อยละ 6) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.6 ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นและนำมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักที่แท้จริงของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยคำนวณตามสูตรดังต่อไปนี้

ปริมาณ PHB (มก./มล.) = (PHB + น้ำหนักหลอด) - น้ำหนักหลอด

ร้อยละการสะสม PHB (% PHB) = $\frac{\text{ปริมาณ PHB}}{\text{ค่ามวลเซลล์แห้ง}} \times 100$

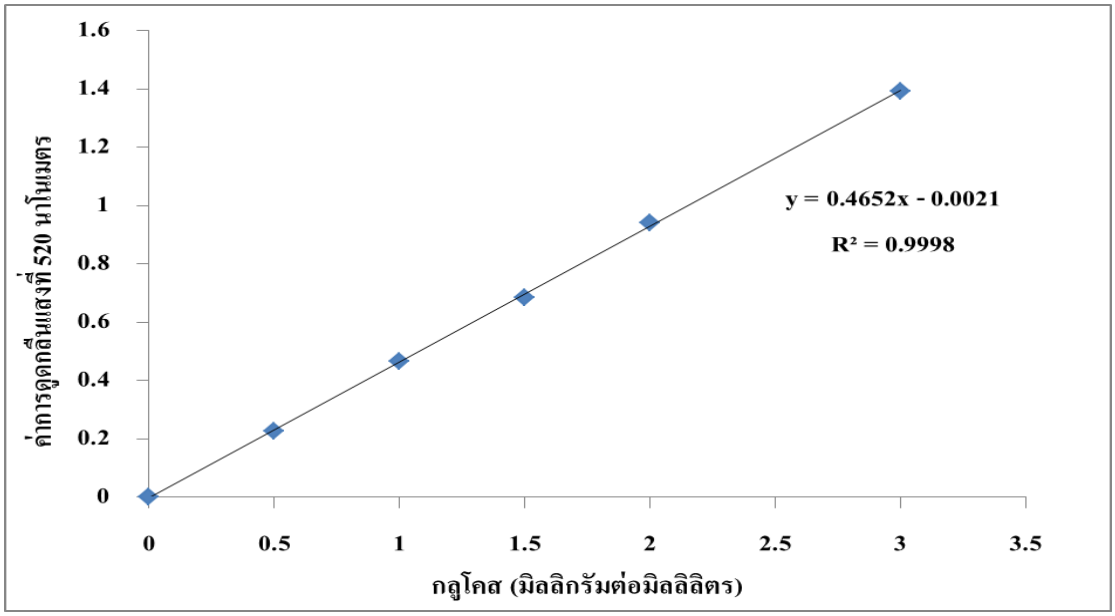
3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ DNS assay (Miller, 1959)

3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายกลูโคสให้ได้ความเข้มข้นดังตารางต่อไปนี้

หลอดที่	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายกลูโคส (ไมโครลิตร)
1	0.0	500	0
2	0.5	475	25
3	1.0	450	50
4	1.5	425	75
5	2.0	400	100
6	3.0	350	150

จากนั้นนำสารละลายทั้ง 6 หลอด ตามปริมาตรข้างต้น เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน



ภาพภาคผนวก ข-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

3.2 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของตัวอย่างด้วยวิธี DNS

นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง มาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอส (3,5 dinitrosalicylid acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่น้ำเย็น เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยคำนวณเทียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ซึ่งคำนวณจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{อัตรการการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกลูโคส}}$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

1. ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปริมาตร ที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
2. เติมกรดซัลฟูริค (Sulfuric) ลงในส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยงให้มีความเข้มข้นเหลือสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 0.5
3. นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
5. ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนซ้ำอีกครั้งเพื่อนำตะกอนต่าง ๆ ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาในการย่อยสลายออก
6. วัดปริมาณน้ำตาลที่ได้ด้วยวิธี DNS (ข้อ 3)

5. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยใช้เครื่อง gas chromatography-mass spectrophotometry

การเตรียมสารมาตรฐาน Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid], natural origin จาก Aldrich Product number 363502 ดังนี้

1. ชั่งสารมาตรฐาน PHB 10 มิลลิกรัม ละลายในคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนสารละลายหมด

2. ทิ้งให้สารละลายเย็นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยคลอโรฟอร์ม จะได้สารละลายมาตรฐาน PHB เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร

3. ดูดสารมาตรฐาน PHB ปริมาตร 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 และ 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิด ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 มิลลิลิตรด้วยคลอโรฟอร์ม

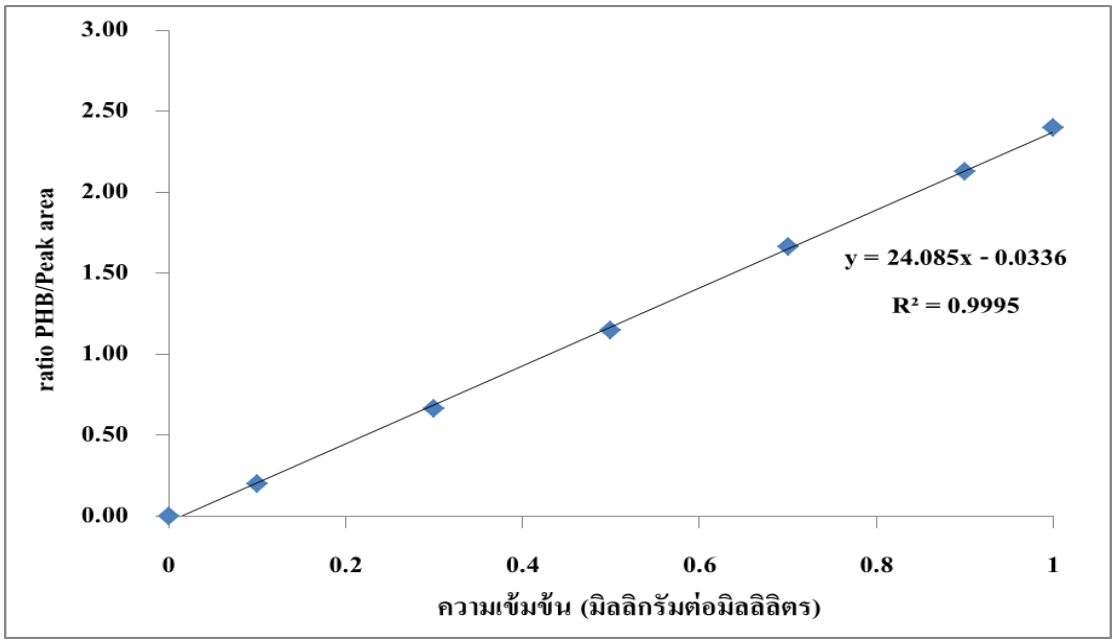
4. เติมสาร esterification fluid 1 มิลลิลิตร (กรดเบนโซอิก 0.025 กรัม เมทานอล ปริมาตร 242 มิลลิลิตร และกรดซัลฟุริก เข้มข้นร้อยละ 95-98 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร)

5. นำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง

6. ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

7. เก็บตัวอย่างที่เกิดจากการแยกชั้น โดยนำส่วนของคลอโรฟอร์มที่มี β-hydroxymethyl ester ละลายอยู่

8. วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรมิตรี (gas chromatography-mass spectrophotometry, GC-MS)



ภาพภาคผนวก ข-2 กราฟมาตรฐานจากสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich

วิธีการคำนวณ

ความเข้มข้น PHB (มก./มล.) = สัดส่วนพื้นที่ของสารมาตรฐาน (peak area of standard) / สัดส่วนพื้นที่ของสาร internal standard (peak area of internal standard)

การคำนวณ

1. การคำนวณอัตราการเติมอาหารในการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

สูตร

$$F_0 = \frac{\mu V_0 X_0}{S_{F0} Y_{x/s}}$$

โดย

อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) = 0.12 ต่อชั่วโมง

ปริมาตรสารอาหารเริ่มต้น (V) = 1 ลิตร

ปริมาณมวลเซลล์ (X_0) = 4.9 กรัมต่อลิตร

ปริมาณการใช้น้ำตาล (S_{F0}) = 150 กรัมต่อลิตร

สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร ($Y_{x/s}$) = 0.43 กรัมต่อกรัม

ดังนั้น

$$F_0 = \frac{0.12 \times 1 \times 4.9}{150 \times 0.43}$$

$$= 0.0091 \text{ ลิตรต่อชั่วโมง}$$

นำค่าที่ได้มาคำนวณอัตราการเติมอาหารตามสูตรดังนี้

$$F = F_0 e^{\mu t}$$

$$= 0.0091 \times 2.72^{0.12(18)}$$

$$= 0.0790 \text{ ลิตรต่อชั่วโมง}$$

$$= 79 \text{ มิลลิลิตรต่อชั่วโมง}$$