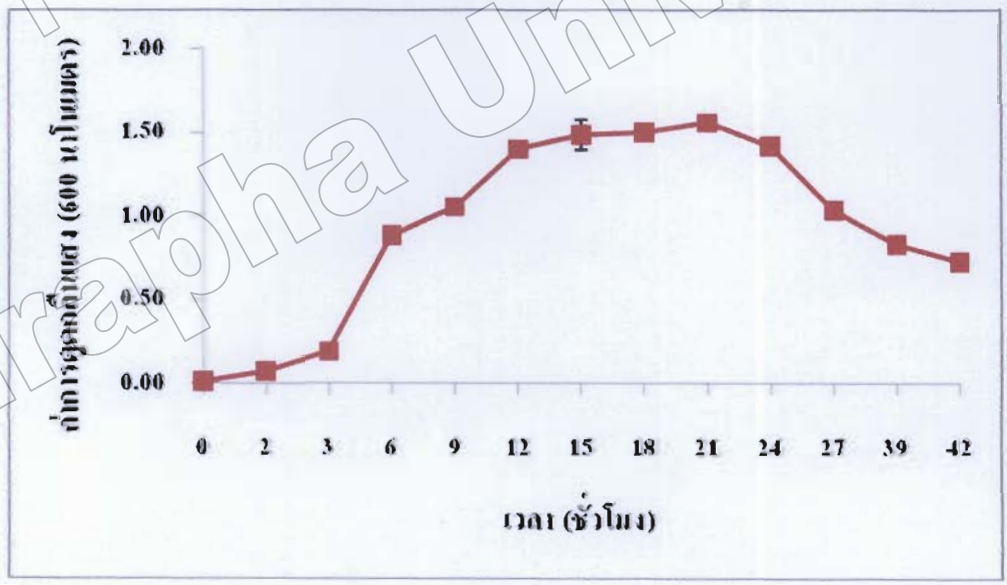
บทที่ 4
ผลการดำเนินการวิจัย

1.การเจริญของ *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำ

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 (สายพันธุ์เดิม) โดยใช้อาหารเหลวสูตร NB ที่เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ในอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่า *A. lactus* TISTR 1403 มีระยะพักตัว (lag phase) ประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นจะมีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (log phase) จนถึง 6-15 ชั่วโมง การเจริญจะเริ่มคงที่ (stationary phase) และหลังจาก 24 ชั่วโมงไปแล้วการเจริญจะค่อย ๆ ลดลง (death phase) ดังแสดงในภาพที่ 4-1 จากการศึกษาการเจริญในเบื้องต้น จึงเลือกชั่วโมงที่ 12 เป็นเวลาที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับทรีตแบคทีเรียด้วยรังสีแกมมา ใช้สาร 2-aminoanthracene (2-AA) และฉายรังสีแกมมาร่วมกับการใช้สาร 2-AA



ภาพที่ 4-1 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NB

ในการนำแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 มาทำการทรีตโดยการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีที่ 2, 4, 6, 8 และ 10.0 Gy ได้เลือกแบคทีเรียที่ได้รับปริมาณรังสีที่ 8 Gy มาใช้สำหรับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

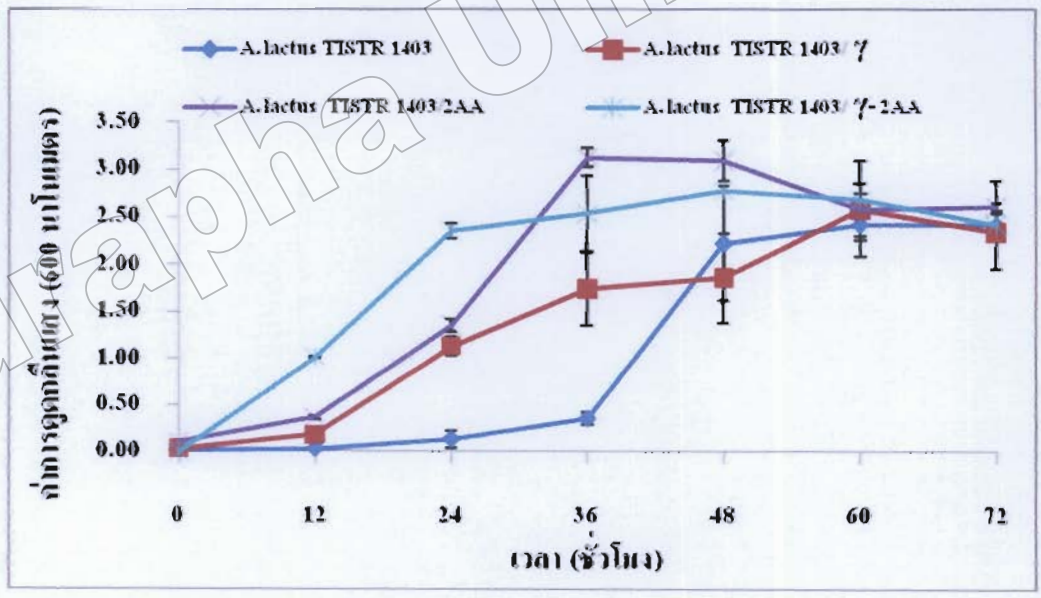
การศึกษาเนื่องจากแบคทีเรียที่ได้รับรังสี 8 Gy มีการเจริญดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NB เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ได้รับรังสีที่ความเข้มข้นอื่น ๆ

ผลจากการทรีตแบคทีเรียด้วยการฉายรังสีแกมมา ใช้สาร 2-aminoanthracene (2-AA) และการฉายรังสีแกมมาร่วมกับการใช้สาร 2-AA และนำแบคทีเรียที่ผ่านการทรีตมาเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยง ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *A. lactus* TISTR 1403/ γ, *A. lactus* TISTR 1403/2AA และ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA มีขนาดโคโลนีใหญ่กว่าโคโลนีของ *A. lactus* TISTR 1403 (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.3 เซนติเมตร) โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.75, 0.70 และ 0.50 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-2 (A-D))

ภาพที่ 4-2 ลักษณะโคโลนีของ *A. lactus* TISTR 1403 (A), *A. lactus* TISTR 1403 / γ (B) *A. lactus* TISTR 1403 /2AA (C) *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA (D) ที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

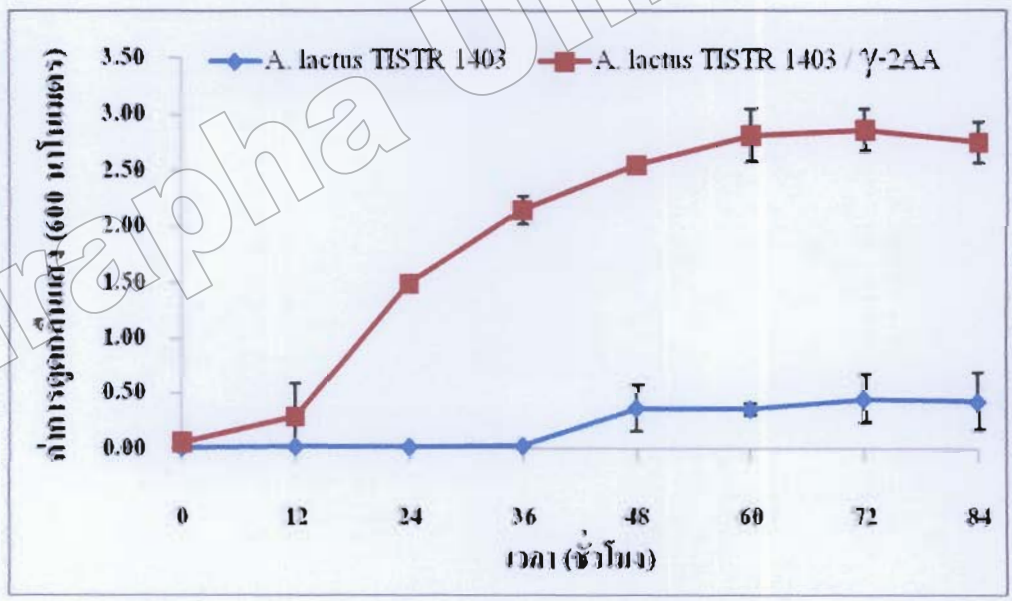
เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 (สายพันธุ์เดิม) กับแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทรีตด้วยรังสีแกมมา ใช้สาร 2-AA และฉายรังสีแกมมาร่วมกับการใช้สาร 2-AA โดยใช้อาหารเหลวสูตร NB พบว่า *A. lactus* TISTR 1403/ γ, *A. lactus* TISTR 1403/2AA และ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA สามารถเจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์เดิม (ภาพที่ 4-3) โดย *A. lactus* TISTR 1403 (สายพันธุ์เดิม) มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ สำหรับแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ และ *A. lactus* TISTR 1403/2AA มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ต่างจาก *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียมีการเจริญในระยะคงที่นานกว่าสายพันธุ์อื่น โดยในการกระบวนการสังเคราะห์ PHB ในช่วงแรกของการเจริญเป็นช่วงที่มีความเข้มข้นของสารอาหารสูงแบคทีเรียจะมีการเจริญและสร้างมวลเซลล์ เมื่อปริมาณสารอาหารลดน้อยลงจึงมีการสะสม PHB ภายในเซลล์ ซึ่งอยู่ในช่วงการเจริญคงที่จนค่อย ๆ ลดลง (Grothe et al., 1999) การที่แบคทีเรียเจริญได้รวดเร็วและมีช่วงการเจริญในระยะคงที่ยาวนาน อาจจะทำให้แบคทีเรียมีการสะสม PHB ภายในเซลล์ได้เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 4-3 การเจริญ *A. lactus* TISTR 1403, *A. lactus* TISTR 1403 / γ , *A. lactus* TISTR 1403 /2AA และ *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NB

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากการนำแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 (สายพันธุ์เดิม) มาเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงสำหรับผลิต PHB (ดัดแปลงจาก Grothe et al., 1999) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อศึกษาการเจริญรวมทั้งหาน้ำหนักเซลล์แห้งและวัดการสร้าง PHB ของแบคทีเรีย พบว่า *A. lactus* TISTR 1403 มีการเจริญอย่างช้า ๆ เริ่มเข้าสู่ระยะก้าวหน้าหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญเริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 4-4 โดยสามารถผลิตมวลเซลล์และ PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 2.50 และ 0.95 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง คิดเป็นร้อยละ 38 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ตารางที่ 4-1 และ ภาพที่ 4-5) มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.63 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง และจากการเลี้ยง *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ในสูตรอาหารดัดแปลงสำหรับผลิต PHB พบว่า *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA มีการเจริญอย่างรวดเร็วเข้าสู่ระยะก้าวหน้าหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 12 - 48 ชั่วโมง การเจริญจึงเริ่มคงที่ (ภาพที่ 4-4) โดยผลิตมวลเซลล์และปริมาณ PHB ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 1.50 และ 0.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง คิดเป็นการสะสมร้อยละ 40 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ตารางที่ 4-1 และ ภาพที่ 4-5) มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.58 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง

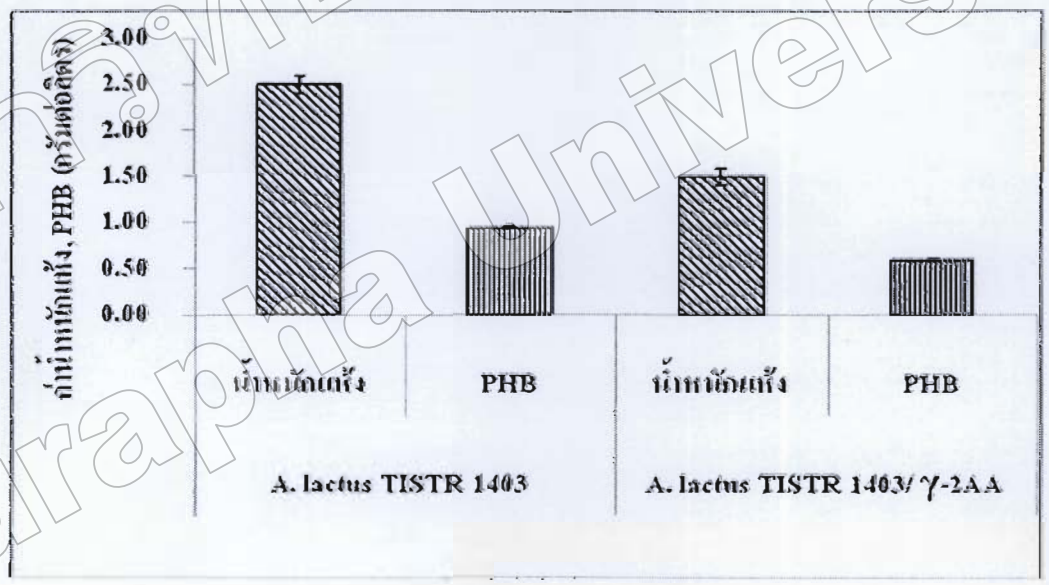


ภาพที่ 4-4 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403 และ *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงสำหรับผลิต PHB

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-1 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และ ร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ของ *A. lactus* TISTR 1403, *A. lactus* TISTR 1403/ γ, *A. lactus* TISTR 1403/ 2AA และ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงสำหรับผลิต PHB ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์แบคทีเรีย	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g /L)	PHB (g /L)	PHB (%)
A. lactus TISTR 1403	2.50	0.95	38
A. lactus TISTR 1403/ γ	2.70	0.47	17.40
A. lactus TISTR 1403/ 2AA	1.45	0.33	22.75
A. lactus TISTR 1403/ γ- 2AA	1.50	0.60	40



ภาพที่ 4-5 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403 และ *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงสำหรับผลิต PHB

จากการเปรียบเทียบการสร้าง PHB ของแบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำ พบว่า *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA สามารถผลิต PHB ได้ดีกว่าแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ, *A. lactus* TISTR 1403/ 2AA และ *A. lactus* TISTR 1403 (สายพันธุ์เดิม) (ตารางที่ 4-1) อาจเป็นผลจากการที่แบคทีเรียได้รับรังสีแกมมาที่มีคุณสมบัติทำให้เกิดไอออนไนเซชั่นแก่อะตอมหรือโมเลกุล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

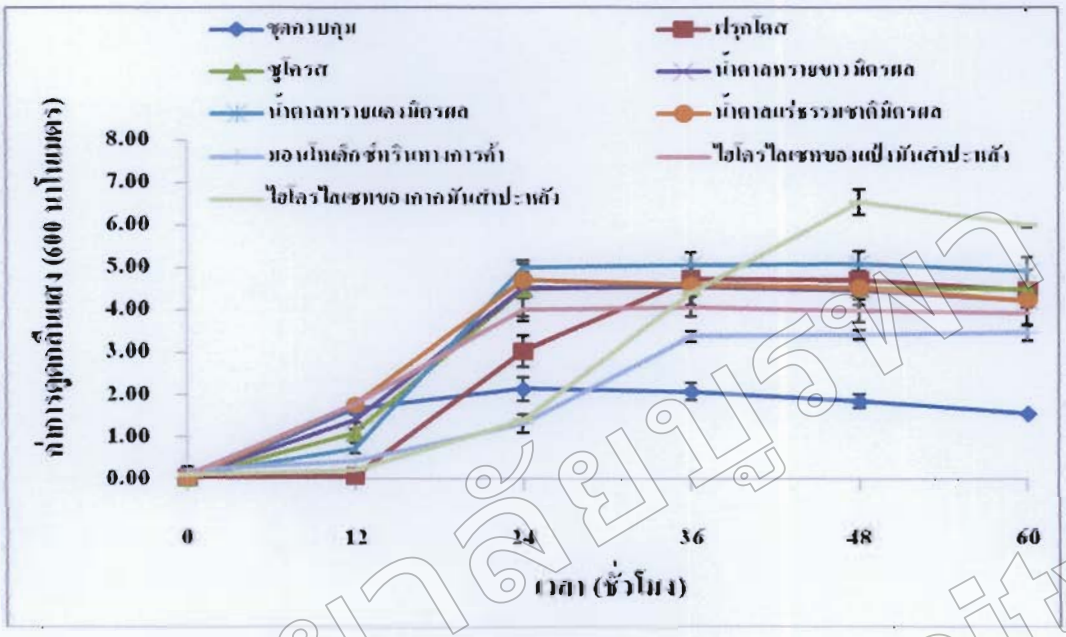
ที่ได้รับรังสี (สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540) และร่วมกับได้รับสาร 2-AA จากรายงาน ของ Gato and Means (2011) ระบุว่าสาร 2-AA เป็นสารจำพวกเดียวกับอะโรเมติก เอมีน (aromatic amine) หรือ แอริลลามีน (arylamine) ซึ่งอยู่ในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรเมติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon) ซึ่งถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตยา สารเคมี สีและพอลิเมอร์ เป็นสารมีฤทธิ์ก่อให้เกิดการกลาย โดยแสดงออกในระดับยีน แบบ Frameshift mutation สอดคล้องกับรายงานของ Evandri et al. (2005) พบว่าสาร 2-aminoantracene ชักนำแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* TA100 และ *E. coli* WP2 uvrA ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในลักษณะการแทนที่คู่เบส (base-pair substitution) ส่งผลให้เกิดการกลาย ดังนั้นการทรีตแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 โดยการฉายรังสีแกมมาร่วมกับใช้สาร 2-AA มีผลทำให้เกิดการกลายในแบคทีเรียได้ดีกว่าการใช้รังสีแกมมา หรือสาร 2-AA เพียงอย่างเดียว ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA มาศึกษาเพียงชนิดเดียวมาทำการศึกษา

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB

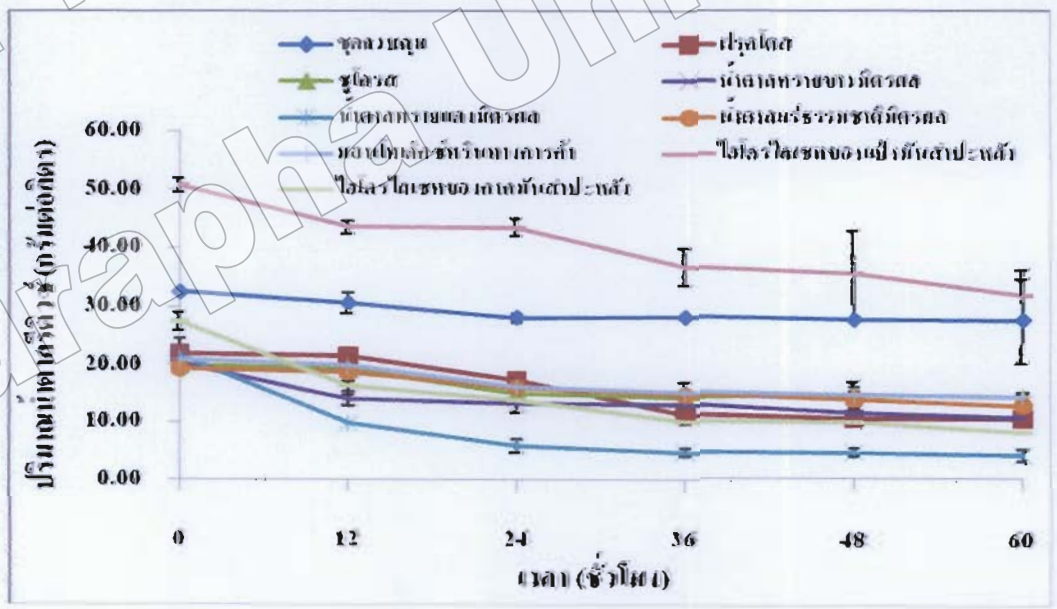
2.1 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของ *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA

จากการเลี้ยงแบคทีเรียในสูตรอาหารดัดแปลงสำหรับผลิต PHB โดยใช้ฟรุคโตส ซูโครส (Lab garde) ซูโครสทางการค้า (น้ำตาลทรายขาวมิตรผล น้ำตาลทรายแดงมิตรผล น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล) มอลโทเด็กซ์ทรินทางการค้า ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง และไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งใช้กลูโคสโดยปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร พบว่า *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ฟรุคโตส ซูโครส น้ำตาลทรายขาวมิตรผล น้ำตาลทรายแดงมิตรผล น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล มอลโทเด็กซ์ทรินทางการค้า ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 12 - 36 ชั่วโมง การเจริญจะเริ่มคงที่ ส่วนในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง แบคทีเรียจะมีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว หลังจากระยะเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่และลดลง (ภาพที่ 4-6) เช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชุดการทดลองจะมีแนวโน้มลดลงและปริมาณจะเริ่มคงที่หลังจากระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-7) โดยพบว่าในอาหารที่ใช้น้ำตาลทรายแดงมิตรผลเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียใช้น้ำตาลสำหรับการเจริญดีที่สุด โดยมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 4.13 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-6 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ



ภาพที่ 4-7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อพิจารณาค่ามวลเซลล์แห้งและ PHB สูงสุดที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4-2 และภาพที่ 4-8 พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้มอลโทเด็กซ์ทรินทางการค้า เท่ากับ 6.43 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือการใช้ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง (4.83 กรัมต่อลิตร) น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล (4.70 กรัมต่อลิตร) น้ำตาลทรายขาวมิตรผล (4.69 กรัมต่อลิตร) น้ำตาลทรายแดงมิตรผล (4.48 กรัมต่อลิตร) ฟรุคโตส (4.28 กรัมต่อลิตร) ซูโครส (3.30 กรัมต่อลิตร) ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง (2.08 กรัมต่อลิตร) และชุดควบคุม (1.83 กรัมต่อลิตร) สอดคล้องกับรายงานของ ปิยวรรณ บุญมาโค และพิมพ์ชนก นาคราช (2548) ในการผลิต PHB จาก *A. eutrophus* NCIMB 11599 โดยไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรีย *A. eutrophus* NCIMB 11599 สามารถผลิต PHB ได้สูงเท่ากับ 3.10 กรัมต่อลิตร

คารางที่ 4-2 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และ ร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร (20 g/L)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g /L)	PHB (g /L)	PHB (%)
ชุดควบคุม (กลูโคส)	1.83*	0.70**	50.72
ฟรุคโตส	4.28***	1.72***	40.18
ซูโครส (AR garde)	3.30**	2.63***	80.67
น้ำตาลทรายขาวมิตรผล	4.69****	2.17****	46.26
น้ำตาลทรายแดงมิตรผล	4.48*	1.33*	29.68
น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล	4.70***	2.73*	83.18
มอลโทเด็กซ์ทรินทางการค้า	6.43****	0.34***	7.69
ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง	4.83**	2.80****	72.53
ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง	2.08***	0.72**	57.60

* ที่ 24 ชั่วโมง, ** ที่ 36 ชั่วโมง, *** ที่ 48 ชั่วโมง, **** ที่ 60 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 4-8 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

เมื่อวัดการสร้างพลาสติกชีวภาพชนิด PHB แบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA สามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง มีค่าเท่ากับ 2.80 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 72.53 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมาคือ น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล (2.77 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 83.18 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ซูโครส (2.63 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 80.67 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) น้ำตาลทรายขาวมิตรผล (2.17 กรัมต่อลิตรคิดเป็นร้อยละ 46.26 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ฟรุคโตส (1.72 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 40.18 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) น้ำตาลทรายแดงมิตรผล (1.33 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 29.68 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง (0.72 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 57.60 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ชุดควบคุม (0.70 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 50.72 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) และในอาหารที่ใช้มอลโทเด็กซ์ทรินทางการค้า สามารถผลิต PHB ได้น้อยที่สุด เท่ากับ 0.34 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 7.69 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ตารางที่ 4-2 และภาพที่ 4-8) ซึ่งต่างจากรายงานของ Nisha et al. (2009 a) ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน คือ ไฮโดรไลเซทของรำข้าวสาลี (Wheat bran) ไฮโดรไลเซทของแป้งมันฝรั่ง (Potato starch) ไฮโดรไลเซทของกากงา (Sesame oil cake) ไฮโดรไลเซทของกากถั่วลิสง (Groundnut oil cake) ไฮโดรไลเซทของผงมันสำปะหลัง (Cassava powder) ไฮโดรไลเซทของผงเม็ดขนุน (Jackfruit seed powder) และไฮโดรไลเซทของแป้งข้าวโพด (Corn flour) ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* NCIM 5149 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้ไฮโดรไลเซทของแป้งมันฝรั่งผลิตมวลเซลล์แห้งและPHB ได้สูงสุดเท่ากับ 1.50 และ 0.71 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 47.0 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้ไฮโดรไลเซทของผงเม็ดขนุนผลิตมวลเซลล์แห้งและ PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 1.50 และ 0.69 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 46.0 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่พบว่าการใช้ไฮโดรไลเซทของผงมันสำปะหลังแบคทีเรียสามารถผลิตมวลเซลล์ได้สูงสุดเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งสะสม PHB ได้เพียง 0.16 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 6.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยแบคทีเรียผลิต PHB ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมงจากนั้นปริมาณผลิตPHB จะลดลง โดยมากกว่าผลการศึกษาของ Tanamool et al. (2009) ได้เลี้ยงแบคทีเรีย *A. lactus* ATCC 29714 และ *A. eutrophus* TISTR 1095 ในอาหารที่ประกอบด้วย น้ำข้าวฟ่างหวาน เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร แบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 0.68 และ 0.34 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และรายงานของ Fatemeh and Ebrahim (2002) ศึกษาการผลิต PHB จาก *R. eutropha* ในอาหารที่ใช้ ฟรุคโตสเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญและผลิต PHB ได้สูง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 4-3 พบว่าการเลี้ยงแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/γ-2AA ในอาหารที่ใช้น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) สูงสุดเท่ากับ 0.63 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งการใช้มอนโทเด็กซ์ทรินทางการค้ามีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหารรองลงมาเท่ากับ 0.48 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ 60 ชั่วโมง ส่วนการใช้ฟรุคโตส ซูโครส น้ำตาลทรายขาวมิตรผล น้ำตาลทรายแดงมิตรผล ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง และไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง มีค่าเท่ากับ 0.14, 0.26, 0.18, 0.12, 0.16 และ 0.09 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ตามลำดับ ที่ระยะเวลาของการเลี้ยงที่แตกต่างกันออกไป สำหรับในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.28 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ในการคำนวณสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) พบว่าในอาหารที่ใช้น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผลมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.54 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ 24 ชั่วโมง รองลงมาคือการใช้ฟรุคโตส ซูโครส น้ำตาลทรายขาวมิตรผล น้ำตาลทรายแดงมิตรผล มอลโทเด็กซ์ทรินทางการค้า ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง และไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังมีค่าเท่ากับ 0.49, 0.25, 0.13, 0.04, 0.04, 0.03 และ 0.02 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ตามลำดับ ที่ระยะเวลาของการเลี้ยงที่แตกต่างกัน และในชุดควบคุมพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดเท่ากับ 0.16 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป (ตารางที่ 4-3) แตกต่างจากการศึกษาของ Plangklang et al. (2009) โดยเลี้ยง *Cupriavidus* sp. KKU38 ในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลังสามารถผลิต PHB ได้โดยคิดเป็นค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.24 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) พบว่ามีค่าสูงสุดเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 0.97 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมาคือในอาหารชุดควบคุมซึ่งใช้กลูโคสมีค่าเท่ากับ 0.89 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยในอาหารที่ใช้ ฟรุคโตส น้ำตาลทรายขาวมิตรผล น้ำตาลทรายแดงมิตรผล น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล มอลโทเด็กซ์ทรินทางการค้า ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง และไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง มีท่ากับ 0.07, 0.70, 0.36, 0.82, 0.19, 0.49 และ 0.45 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์ ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน (ตารางที่ 4-3) แสดงให้เห็นว่าการใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ส่งผลให้แบคทีเรียผลิตมวลเซลล์แห้งและ PHB ได้แตกต่างกัน โดยการใช้น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล ส่งผลให้แบคทีเรียผลิตมวลเซลล์แห้งและ PHB ได้ดี เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จาก

สารอาหาร (Yx/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุด แต่พบว่าการใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนแบคทีเรียสามารถสะสม PHB ภายในเซลล์ได้ดีที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุด เนื่องแบคทีเรีย *A. lactus* สามารถเจริญเติบโตและใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ได้ดี (Wang et al., 1997; Lee, 1996)

จากเป้าหมายของการศึกษาที่ต้องการนำวัตถุดิบที่มีราคาถูกมาใช้ประโยชน์ จึงนำกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนสำหรับผลิต PHB ได้เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุดเท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีการสะสม PHB ได้คิดเป็นร้อยละ 57.60 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นจึงเลือกใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 4-3 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (20 g/L)	Yp/x (g PHB/g Cell)	Yp/s (g PHB/g substrate)	Yx/s (g Cell/g substrate)
ชุดควบคุม (กลูโคส)	0.89**	0.16**	0.28*
ฟรุคโตส	0.07***	0.49***	0.14***
ซูโครส (AR garde)	0.97***	0.25***	0.26***
น้ำตาลทรายขาวมิตรผล	0.70****	0.13****	0.18****
น้ำตาลทรายแดงมิตรผล	0.36*	0.04*	0.12*
น้ำตาลแร่ธรรมชาติมิตรผล	0.82*	0.54*	0.63***
มอนโทเด็กซ์ทรินทางการค้า	0.19***	0.04***	0.48****
ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง	0.49****	0.03****	0.16**
ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง	0.45**	0.02**	0.09***
ผลได้ตามทฤษฎี (theoretical yield) (เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, 2551)	~ 0.8 - 0.9	0.38	~ 0.45

* ที่ 24 ชั่วโมง, ** ที่ 36 ชั่วโมง, *** ที่ 48 ชั่วโมง, **** ที่ 60 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2 ผลความเข้มข้นของไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

กากมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง เมื่อนำไปตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีกายภาพของกากมันสำปะหลัง พบว่ามีแป้งเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 58.97 โดยน้ำหนักแห้ง และมีส่วนเส้นใยประมาณร้อยละ 16.05 โดยน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบอื่น ๆ ที่นำมาใช้ประโยชน์ได้หลงเหลืออยู่ด้วย ดังแสดงในตารางที่ 4-4 สอดคล้องกับรายงานของ Pandey et al. (2000) ระบุว่ากากมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง เป็นวัตถุดิบอีกอย่างหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากมีแป้งเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 50 โดยน้ำหนักแห้ง และมีส่วนเส้นใยประมาณร้อยละ 20 โดยน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบอื่นๆ ที่เป็นสารอินทรีย์หลงเหลืออยู่ จากนั้นนำมาย่อยสลายที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมากรองแยกส่วนของเหลวที่ย่อยสลายได้เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเรียกว่า ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง จากการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งความเข้มข้นร้อยละ 10 น้ำหนักต่อปริมาตรของถังหมัก ผลปรากฏได้น้ำตาลที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.77 คิดเป็นสัมประสิทธิ์ผลได้ของการย่อยกากมันสำปะหลังให้ได้น้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.67 และมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.4-4.0 ก่อนนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต้องปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 7

ตารางที่ 4-4 องค์ประกอบทางเคมีกายภาพของกากมันสำปะหลังแห้ง*

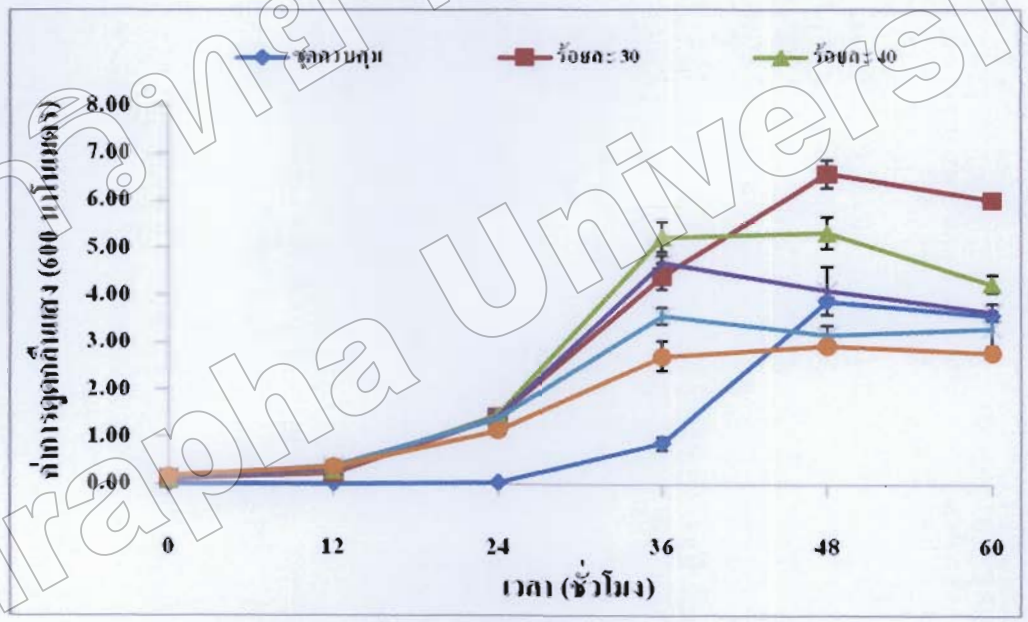
องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง	ปริมาณองค์ประกอบ (%)
เถ้า	1.76 ± 0.01
โปรตีน	2.05 ± 0.09
ไขมัน	0.37 ± 0.06
เส้นใย	16.05 ± 0.02
แป้ง	58.97 ± 0.02

หมายเหตุ *ผลการวิเคราะห์จากหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลังและแป้ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ปริมาตรของแหล่งคาร์บอนเข้มข้นร้อยละ 30, 40, 50, 60 และ 70 ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ คิดเป็นความเข้มข้นของ

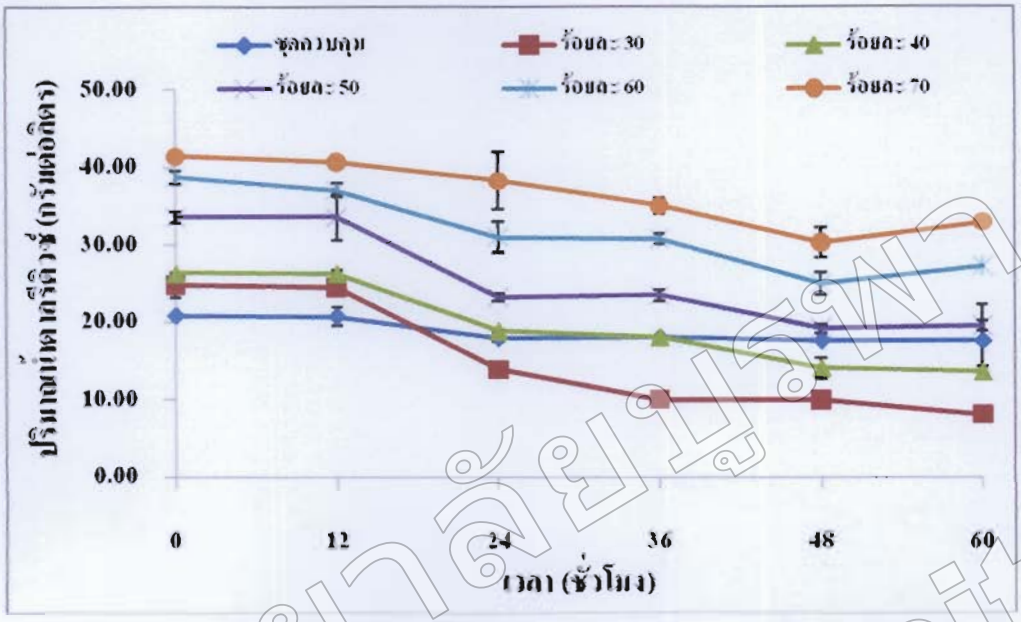
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

น้ำตาลเริ่มต้น เท่ากับ 24.80, 26.36, 33.58, 38.75 และ 41.40 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นเริ่มคงที่และการเจริญลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 36 ยกเว้นในความเข้มข้นร้อยละ 30 แบคทีเรียมีการเจริญลดลงหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-9 เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แสดงให้เห็นว่าเมื่อการเจริญของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลจะมีค่าลดลงตามระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ โดยปริมาณน้ำตาลจะลดลงจนเริ่มคงที่หลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง เท่ากับ 7.30, 11.20, 16.89, 26.45 และ 31.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในอาหารชุดควบคุมมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ เท่ากับ 18.18 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4-10



ภาพที่ 4-9 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นแตกต่างกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการศึกษาแบคทีเรียผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเข้มข้นร้อยละ 30 เท่ากับ 2.08 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4-5 และภาพที่ 4-11) รองลงมาคือร้อยละ 70, 50, 40 และ 60 มีค่าเท่ากับ 2.00, 1.66, 1.61 และ 1.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่พบว่าแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารชุดควบคุมสามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง เท่ากับ 3.98 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในทุกความเข้มข้น (ตารางที่ 4-5 และภาพที่ 4-11) โดยที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 แบคทีเรียผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 94.73 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 12 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 30, 40 และ 60 มีค่าใกล้เคียงกัน เท่ากับ 0.72, 0.64 และ 0.71 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 57.60, 39.75 และ 49.65 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ยกเว้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 70 มีค่าเท่ากับ 0.61 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 46.56 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงในตารางที่ 4-5 และภาพที่ 4-11 สำหรับอาหารชุดควบคุมแบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้ 0.57 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 14.32 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

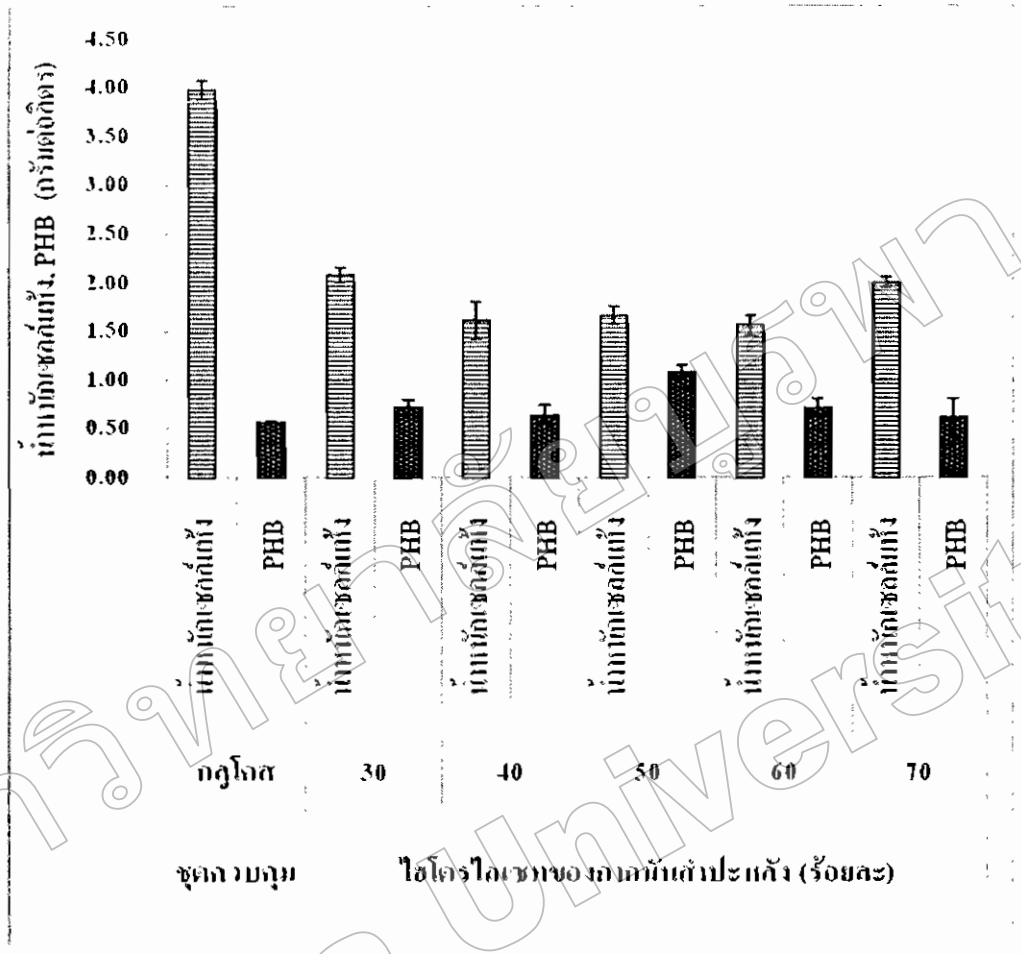
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-5 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของ*A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นและระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน

ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง	ความเข้มข้น (g/L)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g /L)	PHB (g /L)	PHB (%)
ชุดควบคุม	20	3.98***	0.57***	14.32
30	24.80	2.08****	0.72***	57.60
40	26.36	1.61***	0.64***	39.75
50	33.58	1.66**	1.08*	94.73
60	38.75	1.56****	0.71***	49.65
70	41.40	2.00**	0.61****	46.56

*ที่ 12 ชั่วโมง, ** ที่ 24 ชั่วโมง, *** ที่ 36 ชั่วโมง, **** ที่ 48 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-11 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากปริมาณของมวลเซลล์แห้งและ PHB ที่แบคทีเรียผลิตได้ คิดเป็นสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 4-6 โดยค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.09, 0.09, 0.08, 0.16 และ 0.47 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ความเข้มข้นร้อยละ 30, 40, 50, 60 และ 70 ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน ส่วนในชุดควบคุมพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.96 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ซึ่งมากกว่าในแต่ละชุดการทดลอง (ตารางที่ 4-6) ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) พบว่าในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังร้อยละ 50 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.34 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ซึ่งในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 30, 40, 60 และ 70 มีค่าเท่ากับ 0.02, 0.05, 0.08 และ 0.04 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน (ตารางที่ 4-6) สำหรับในอาหารชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.05 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) พบว่าการใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 50 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.79 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมาคือความเข้มข้นร้อยละ 70, 30, 40 และ 60 มีค่าเท่ากับ 0.70, 0.60, 0.56 และ 0.54 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4-6) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าในชุดควบคุมมีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.16 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ 4-6 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และ สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นและที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน

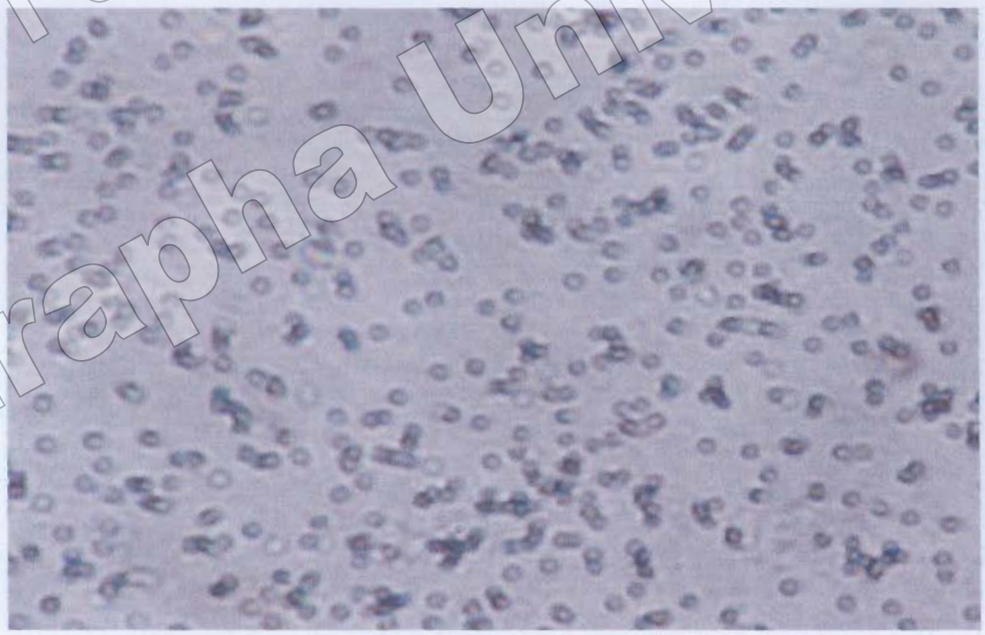
ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง *	ความเข้มข้น (g/L)	Yp/x (g PHB/g Cell)	Yp/s (g PHB/g substrate)	Yx/s (g Cell/g substrate)
ชุดควบคุม	20	0.17*****	0.05*****	0.96***
30	27.5	0.60***	0.02***	0.09****
40	26.36	0.56***	0.05***	0.09***
50	33.09	1.79*	0.34*	0.08**
60	38.75	0.54***	0.08***	0.16**
70	40.95	0.70****	0.04****	0.47**
ผลได้ตามทฤษฎี (theoretical yield)		~ 0.8 -0.9	0.38	~ 0.45

*ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 (W/V)

*ที่ 12 ชั่วโมง, ** ที่ 24 ชั่วโมง, *** ที่ 36 ชั่วโมง, **** ที่ 48 ชั่วโมง, ***** ที่ 60 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังไปศึกษาโดยใช้การย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย sudan black B เพื่อตรวจสอบการผลิต PHB ภายในเซลล์ ซึ่ง จากการทดสอบพบว่าแบคทีเรียมีลักษณะเป็นเซลล์รูปไข่สามารถย้อมติดสีของ sudan black B แสดงว่าแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิต PHB ภายในเซลล์ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4-12 เนื่องจาก Sudan black B ($C_{26}H_{24}N_4O$) เป็นสีย้อมสารที่ไม่มีขั้ว ละลายในไขมันได้ ทำให้สามารถติดไขมันได้สูง จึงใช้ Sudan black B เพื่อย้อมทดสอบไตรกลีเซอไรด์ ลิพิด และไลโปรโปรตีนบางตัว (Wikipedia, 2011) และสอดคล้องกับรายงานของ Palleroni and Palleroni (1978) ระบุว่าแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* มีลักษณะเซลล์ท่อนกลมสั้นจับเป็นคู่หรือในห่วงโซ่สั้น มีเฟลเจลลา 5 ถึง 10 เส้นใช้ในการเคลื่อนที่ สามารถใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ สารอะโรเมติกและกรดอะมิโน เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังที่แบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้สูงสุด คือความเข้มข้นร้อยละ 50 ไปใช้สำหรับศึกษาสภาวะเหมาะสมในข้อต่อไป

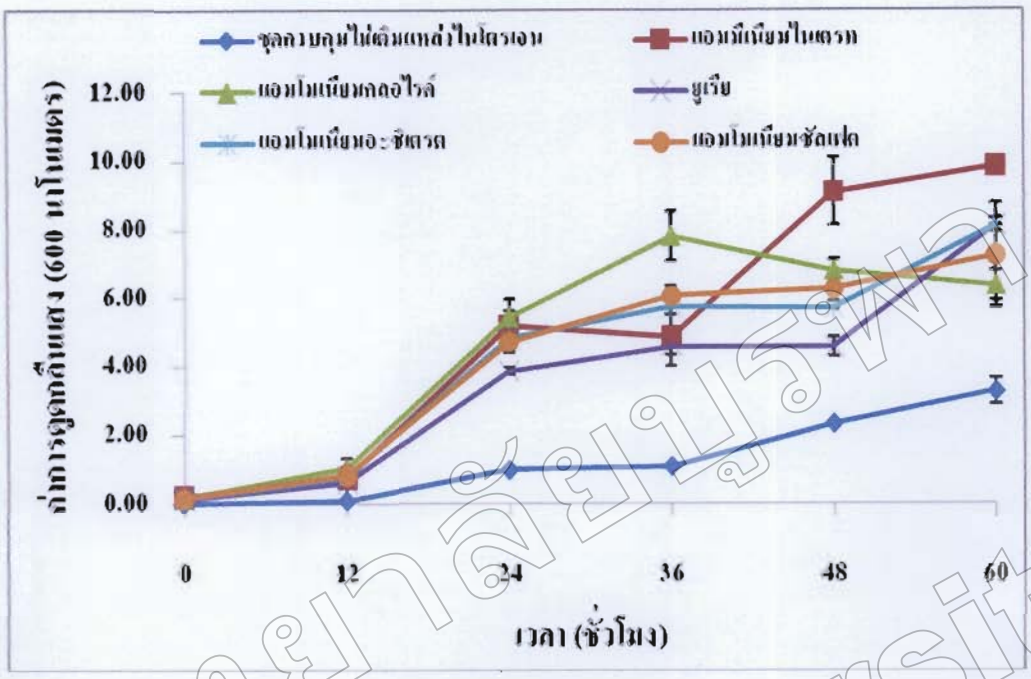


ภาพที่ 4-12 ลักษณะของแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนโดยย้อมสีเซลล์ด้วย sudan black B ที่กำลังขยาย 100 เท่า

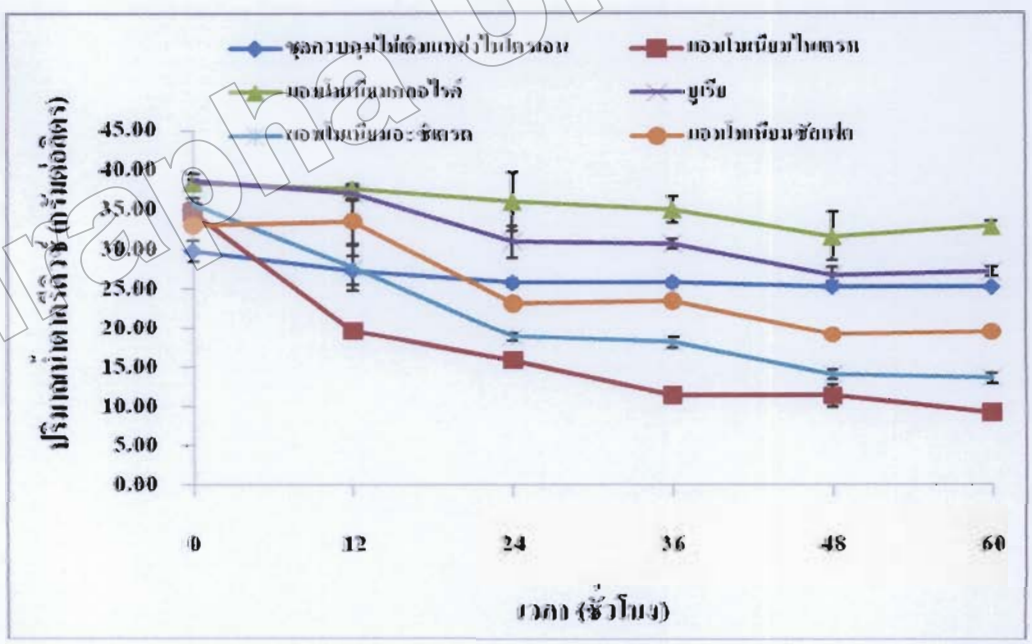
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.3 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์

ในการศึกษาเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงสำหรับผลิต PHB โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซิเตรต และยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน และปรับความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1.4 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 50 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนพบว่า *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง โดยมีการเจริญเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ที่การเจริญมีค่าลดลงหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ส่วนในอาหารชุดควบคุมพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้น้อยกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ (ภาพที่ 4-13) เช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลในชุดควบคุม พบว่ามีการลดลงเพียงเล็กน้อยจนเกือบคงที่ตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแตกต่างกับปริมาณน้ำตาลในชุดการทดลองอื่น ๆ ที่ปริมาณน้ำตาลจะลดลงตามการเจริญที่เพิ่มขึ้น โดยในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรท มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลืออยู่น้อยที่สุดเท่ากับ 9.27 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-14) ส่วนปริมาณไนโตรเจนจะลดต่ำลงหลังจากระยะเวลาการเลี้ยงที่ 12 ชั่วโมง และเริ่มคงที่หลังจากระยะเวลาการเลี้ยง 36 ชั่วโมงยกเว้นในอาหารที่ใช้ยูเรีย พบว่าปริมาณไนโตรเจนจะลดลงและคงที่หลังจากระยะเวลาการเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมงถึง 60 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-15) สอดคล้องกับรายงานของ Indu et al. (2009) ระบุว่าเมื่อปริมาณของไนโตรเจนลดน้อยลงปริมาณ NADH/NAD^+ จะมีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นการเพิ่มอัตราการผลิต PHB ของ *Alcaligenes* sp.

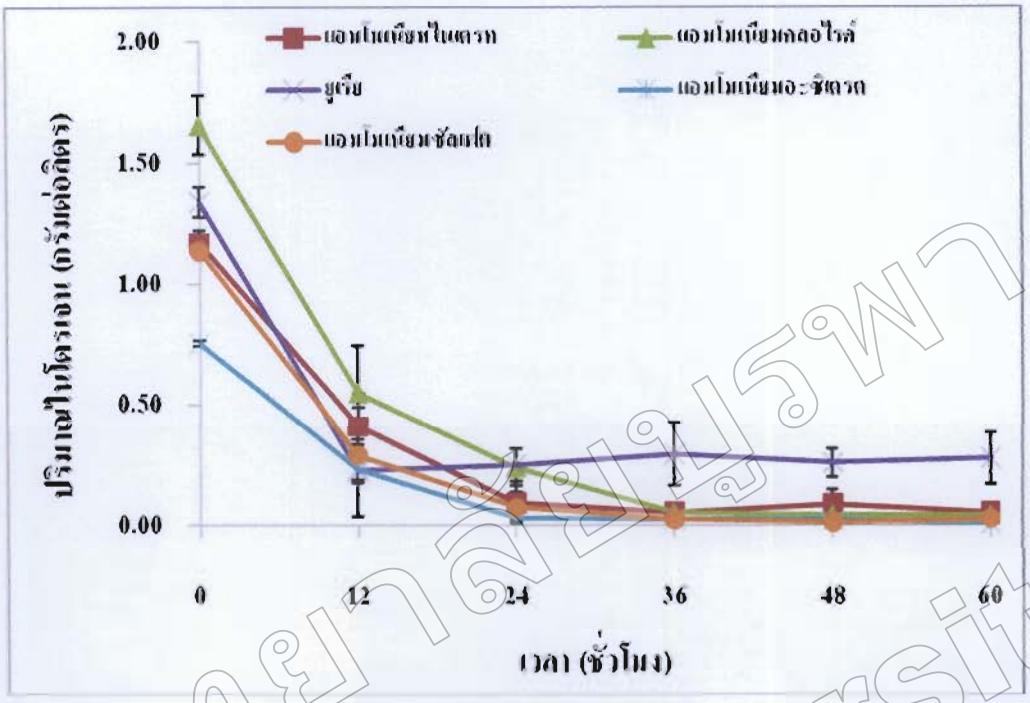


ภาพที่ 4-13 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่ง ไนโตรเจนต่างชนิดกัน



ภาพที่ 4-14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของ *A. lactus* TISTR 1403/γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-15 ปริมาณไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน

จากการศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 / γ-2AA ในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรทสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 6.60 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4-7 และภาพที่ 4-16 รองลงมาคือการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมอะซิเตรต และยูเรีย ให้มวลเซลล์เท่ากับ 5.37, 2.55, 2.18 และ 1.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน ส่วนในชุดควบคุมแบคทีเรียสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้น้อยที่สุด เท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4-7 และภาพที่ 4-16) ส่วนปริมาณ PHB พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรทให้ค่าเท่ากับ 2.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 39.61 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง รองลงมาคืออาหารที่ใช้แอมโมเนียมอะซิเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย มีค่าเท่ากับ 1.65, 1.61, 1.17 และ 0.65 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 75.68, 29.98, 70.05 และ 55.55 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4-7 และภาพที่ 4-16) เมื่อเปรียบเทียบชุดควบคุมพบว่าในชุดควบคุมสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 0.30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 69.76 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งปริมาณ PHB ที่แบคทีเรียผลิตได้มีค่าน้อยกว่าทุกชุดการทดลอง จากการศึกษาพบว่าการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ไนโตรเจนช่วยส่งเสริมให้ผลิตมวลเซลล์ได้ดี แต่ไม่ส่งเสริมให้เกิดการสะสม PHB ภายในเซลล์ ส่วนการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมอะซิเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจนช่วยให้แบคทีเรียเจริญและสะสม PHB ภายในเซลล์ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nisha et al. (2009 b) ระบุว่าการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียผลิตมวลเซลล์ได้เพิ่มขึ้น แต่ไม่ส่งเสริมให้แบคทีเรียสะสม PHB ภายในเซลล์ เช่นเดียวกันกับการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่ 4-7 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน

แหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น (1.4 g/L)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g /L)	PHB (g /L)	PHB (%)
ชุดควบคุม (ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน)	0.95*	0.30****	69.76
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.55*****	1.17***	70.05
แอมโมเนียมคลอไรด์	5.37***	1.61***	29.98
แอมโมเนียมไนเตรท	6.60****	2.08*****	39.61
แอมโมเนียมอะซิเตรต	2.14*****	1.65*****	75.68
ยูเรีย	1.17*****	0.65*****	55.55

*ที่ 12 ชั่วโมง, ** ที่ 24 ชั่วโมง,***ที่ 36 ชั่วโมง,****ที่ 48 ชั่วโมง, *****ที่ 60 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 4-16 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดของ *A. lacus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่ลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากการศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) สูงสุดเท่ากับ 1.56 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 36 ชั่วโมง ส่วนในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมอะซิเตรต และยูเรีย มีค่าเท่ากับ 0.28, 0.18, 0.10 และ 0.09 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4-6 โดยในอาหารชุดควบคุมมีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.38 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 12 ชั่วโมง (ตารางที่ 4-8) สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) มีค่าสูงสุดเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เท่ากับ 0.45 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 36 ชั่วโมง รองลงมาคือการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต มีค่าเท่ากับ 0.12 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 36 ชั่วโมง ส่วนในอาหารที่ใช้ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซิเตรต และยูเรีย มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.08, 0.07 และ 0.05 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 ชั่วโมง สำหรับในอาหารชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.07 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4-8) สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมอะซิเตรต พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/x) สูงสุดเท่ากับ 0.90 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมาคือการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ มีค่าเท่ากับ 0.70, 0.58, 0.39 และ 0.29 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่ระยะเวลาของการเลี้ยงแตกต่างกัน ส่วนในชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/x) สูงสุดเท่ากับ 0.69 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4-8)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-8 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) ของ*A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน

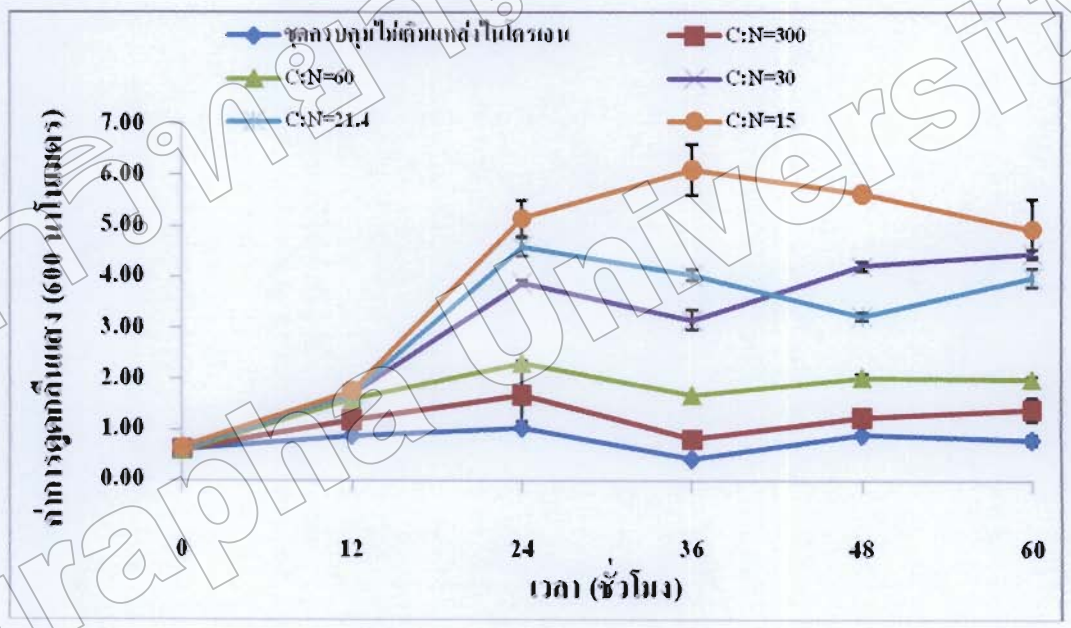
แหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น (1.4 g/L)	Yp/x (g PHB/g Cell)	Yp/s (g PHB/g substrate)	Yx/s (g Cell/g substrate)
ชุดควบคุม (ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน)	0.69****	0.07****	0.38*
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.70***	0.12***	0.18*****
แอมโมเนียมคลอไรด์	0.29***	0.45***	1.56***
แอมโมเนียมไนเตรท	0.39*****	0.08*****	0.28****
แอมโมเนียมอะซิเตรต	0.90*****	0.07*****	0.10**
ยูเรีย	0.58*****	0.05*****	0.09******
ผลได้ตามทฤษฎี (theoretical yield)	~ 0.8 -0.9	0.38	~ 0.45

*ที่ 12 ชั่วโมง, ** ที่ 24 ชั่วโมง, *** ที่ 36 ชั่วโมง, **** ที่ 48 ชั่วโมง, ***** ที่ 60 ชั่วโมง

2.4 ผลอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์

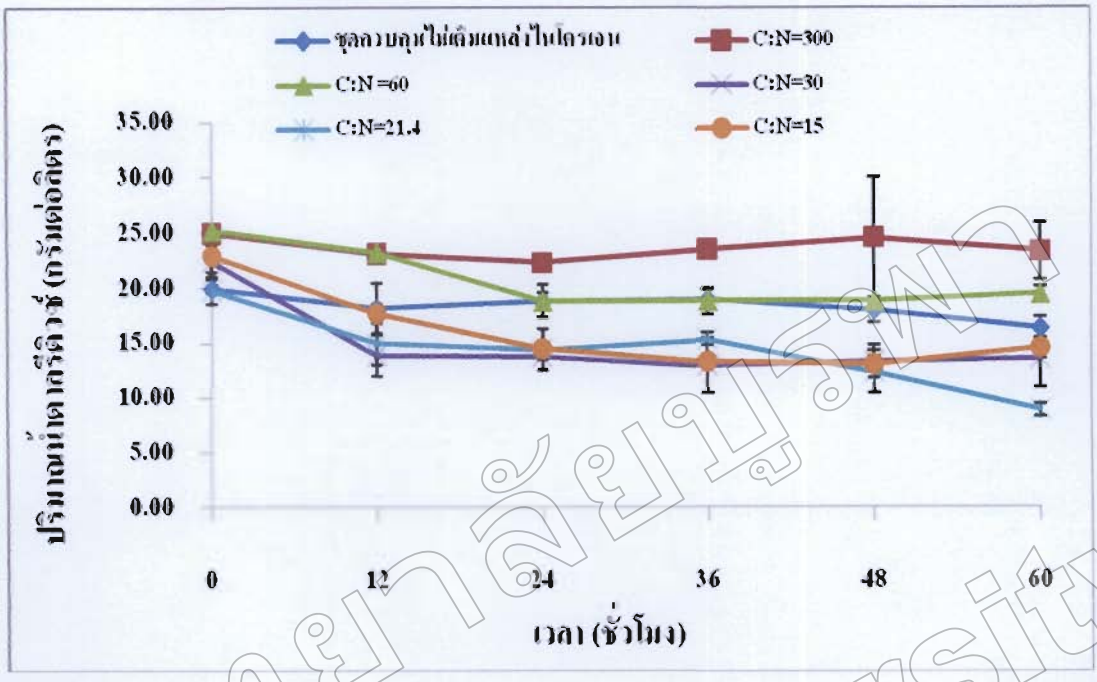
ในการหาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) เลือกใช้แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนแบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้ดี คิดเป็นร้อยละ 70.05 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.70 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งจากรายงานของ Beaulieu et al. (1995) (อ้างอิงจาก Mona et al. (2001)) ระบุว่าแบคทีเรีย *Alcaligenes eutrophus* สามารถผลิต PHB ได้ดีในอาหารที่ใช้กลูโคสเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกันการใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปเกลือแอมโมเนียมต่าง ๆ โดยการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตและผลิต PHB ได้ดีที่สุด ดังนั้นในการศึกษาจึงเลือกใช้ร่วมกับไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับอัตราส่วน C:N เท่ากับ 15, 21.4, 30, 60 และ 300 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่

ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน พบว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างกัน ส่งผลให้การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA แตกต่างกัน พบว่าเมื่อเลี้ยง *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ในอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15 มีค่าการเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง รองลงมาคือในอัตราส่วน 21.4, 30, 60 และ 300 ตามลำดับ ส่วนในชุดควบคุมแบคทีเรียสามารถเจริญได้น้อยกว่าชุดทดลองอื่น ๆ ดังแสดงในภาพที่ 4-17 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาพที่ 4-18) ซึ่งปริมาณน้ำตาลในอาหารที่ใช้อัตราส่วน C:N เท่ากับ 21.4 แบคทีเรียมีการนำไปใช้ในระหว่างการเจริญมากที่สุด โดยปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือเท่ากับ 8.84 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 ชั่วโมง ส่วนปริมาณไนโตรเจนจะลดต่ำลงตามระยะเวลาของการเลี้ยงแบคทีเรียเช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาล ดังแสดงในภาพที่ 4-19

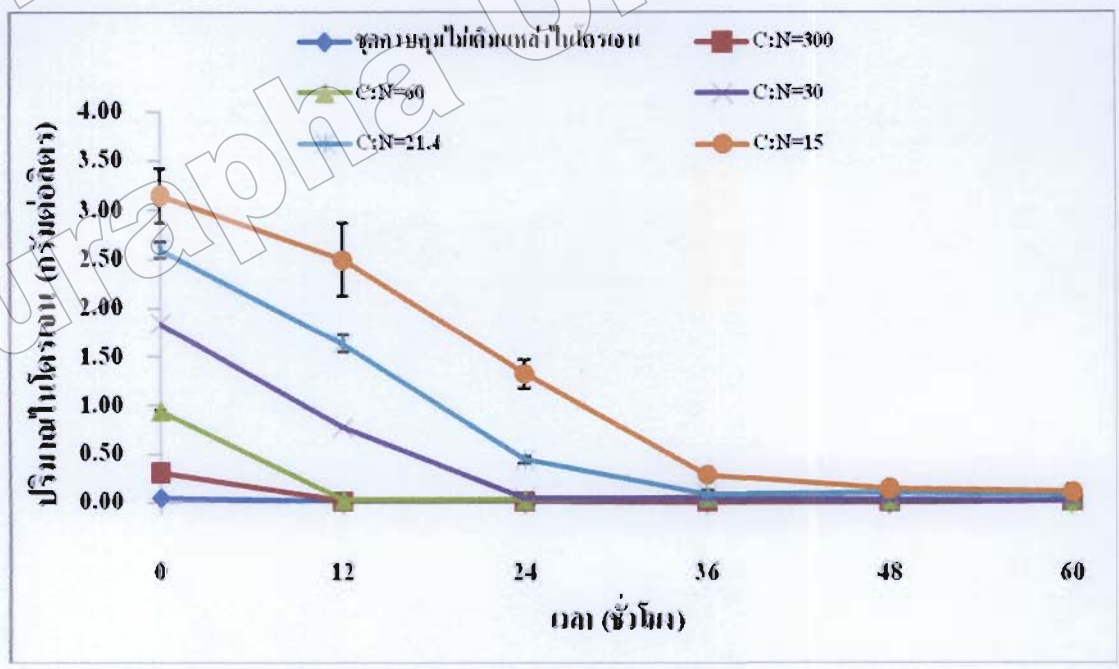


ภาพที่ 4-17 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) แตกต่างกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-18 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) แตกต่างกัน



ภาพที่ 4-19 ปริมาณไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) แตกต่างกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

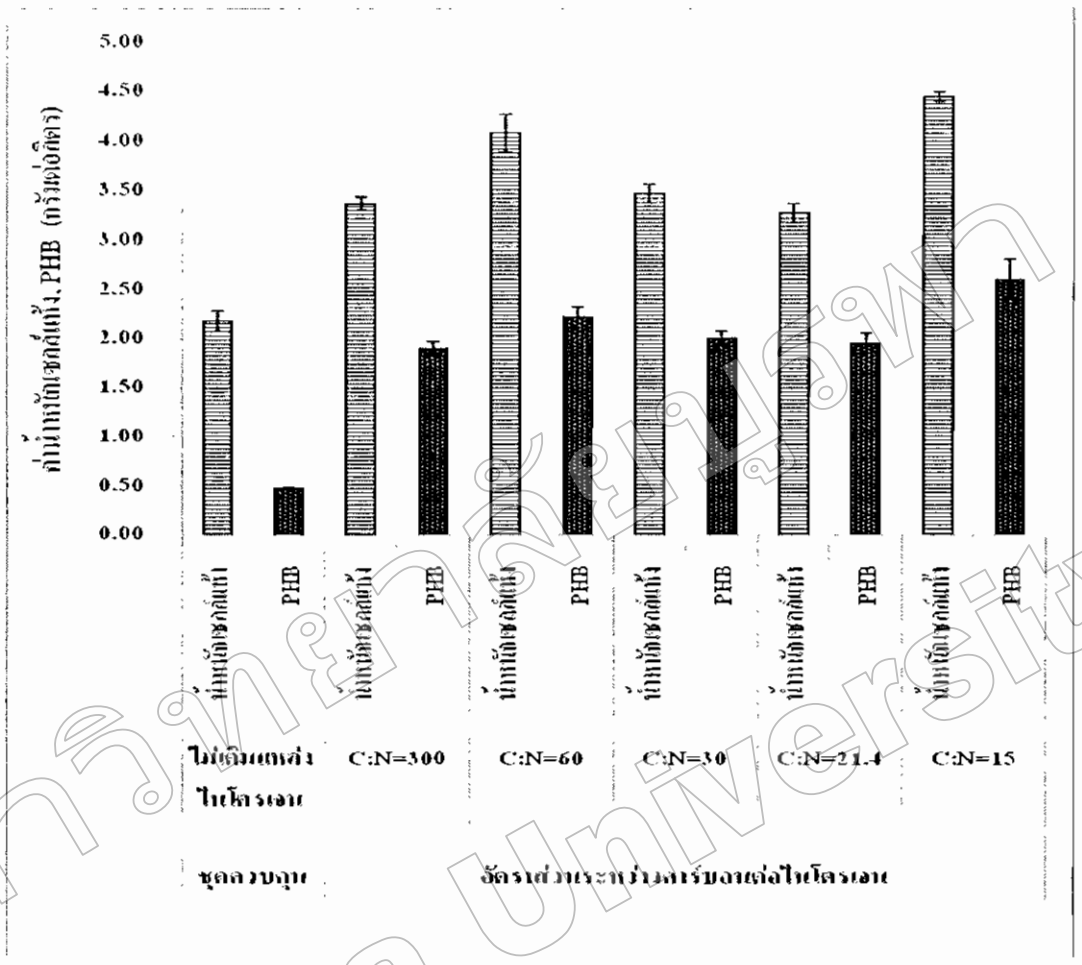
จากการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง C:N แบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้ในปริมาณใกล้เคียงกันโดยอัตราส่วน C:N เท่ากับ 15 สามารถผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 4.44 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ อัตราส่วน C:N เท่ากับ 60, 30, 300 และ 21.4 ให้มวลเซลล์เท่ากับ 4.08, 3.47, 3.37 และ 3.27 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน (ตารางที่ 4-9 และภาพที่ 4-20) สำหรับปริมาณ PHB พบว่าการใช้อัตราส่วน C:N เท่ากับ 15 ส่งเสริมให้แบคทีเรียมีการผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.60 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 58.55 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 36 ชั่วโมง ส่วนในอัตราส่วน C:N เท่ากับ 300, 60, 30 และ 21.4 มีค่าเท่ากับ 1.90, 2.22, 2.00 และ 1.95 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 59.19, 54.41, 57.63 และ 63.31 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่ระยะเวลาของการเลี้ยง 24 ชั่วโมง ซึ่งเห็นได้ว่าแบคทีเรียมีการสะสม PHB ภายในเซลล์ได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากแบคทีเรียผ่านการปรับปรุงยีนทางพันธุกรรม แบคทีเรียที่ไม่ต้องจำกัดปริมาณสารอาหาร

ตารางที่ 4-9 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และ ร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) แตกต่างกัน ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน

อัตราส่วนระหว่างคาร์บอน:ไนโตรเจน	ความเข้มข้นของคาร์บอน (g/L)	ความเข้มข้นของไนโตรเจน (g/L)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g /L)	PHB (g /L)	PHB (%)
ชุดควบคุม	30	-	2.27*	0.48***	22.01
C:N=300	30	0.1	3.37**	1.90*	59.19
C:N=60	30	0.5	4.08*	2.22*	54.41
C:N=30	30	1	3.47*	2.00*	57.63
C:N=21.4	30	1.4	3.24**	1.95*	63.31
C:N=15	30	2	4.44**	2.60**	58.55

*ที่ 24 ชั่วโมง, ** ที่ 36 ชั่วโมง,***ที่ 48 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-20 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) แตกต่างกัน

จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอัตราส่วน C:N เท่ากับ 300, 30, 60, 21.4 และ 15 มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 1.14, 0.43, 0.26, 0.48 และ 0.34 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน ส่วนในชุดควบคุมมีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 1.37 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 24 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4-10 โดยเมื่อเลี้ยงในอัตราส่วน C:N เท่ากับ 300 มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุด เท่ากับ 0.40 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง รองลงมาคือในอัตราส่วน เท่ากับ 21.4, 15, 60 และ 30 มีค่าเท่ากับ 0.31, 0.26, 0.25 และ 0.12 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลาการแตกต่างกัน โดยในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.25 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเลี้ยง 36 ชั่วโมง (ตารางที่ 4-10) ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุดเท่ากับ 0.73 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วน C:N เท่ากับ 15 รองลงมาคือ อัตราส่วน C:N เท่ากับ 300, 21.4, 60 และ 30 เท่ากับ 0.67, 0.64, 0.58 และ 0.51 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (ตารางที่ 4-10) ส่วนในอาหารชุดควบคุม พบว่าสะสม PHB ภายในเซลล์โดยคิดเป็นสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.28 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 36 ชั่วโมง

ดังนั้นจึงเลือกชุดการทดลองที่ให้ปริมาณ PHB มากที่สุด คือ สูตรอาหารที่มีอัตราส่วน C:N เท่ากับ 15 ไปใช้ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

ตารางที่ 4-10 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) แตกต่างกัน ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน

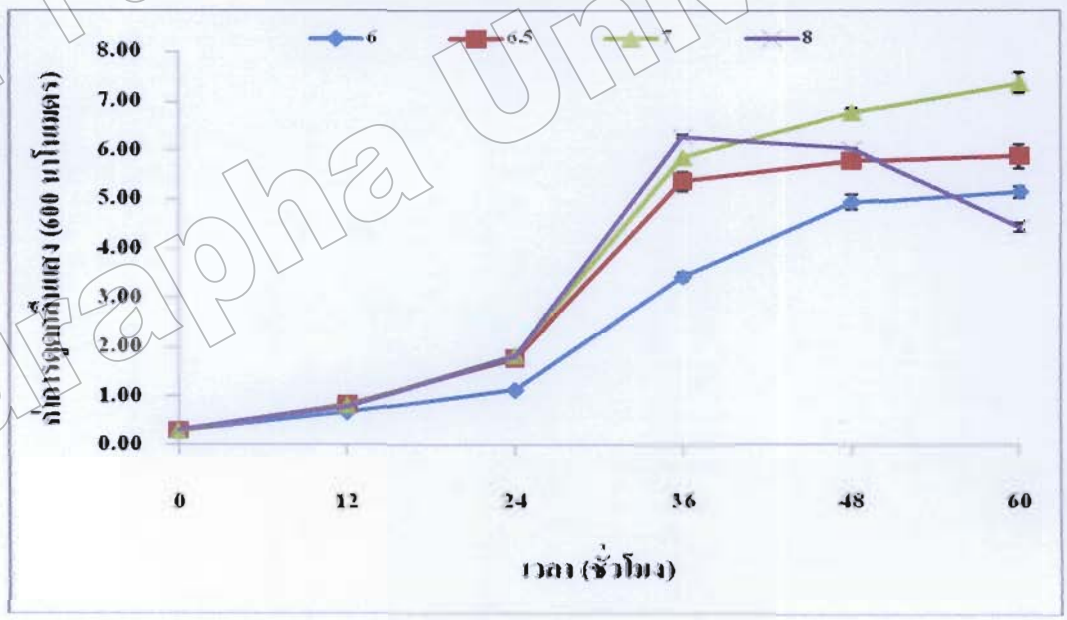
อัตราส่วนระหว่างคาร์บอน: ไนโตรเจน	ความเข้มข้นของคาร์บอน (g/L)	ความเข้มข้นของไนโตรเจน (g/L)	Yp/x (g PHB/g Cell)	Yp/s (g PHB/g substrate)	Yx/s (g Cell/g substrate)
ชุดควบคุม	30	-	0.28**	0.25**	1.37*
C:N=300	30	0.1	0.67*	0.40*	1.14**
C:N=60	30	0.5	0.58*	0.25*	0.43*
C:N=30	30	1	0.51**	0.12**	0.26*
C:N=21.4	30	1.4	0.64**	0.31**	0.48**
C:N=15	30	2	0.73**	0.26**	0.34**
ผลได้ตามทฤษฎี (theoretical yield)			~ 0.8 -0.9	0.38	~ 0.45

*ที่ 24 ชั่วโมง, ** ที่ 36 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

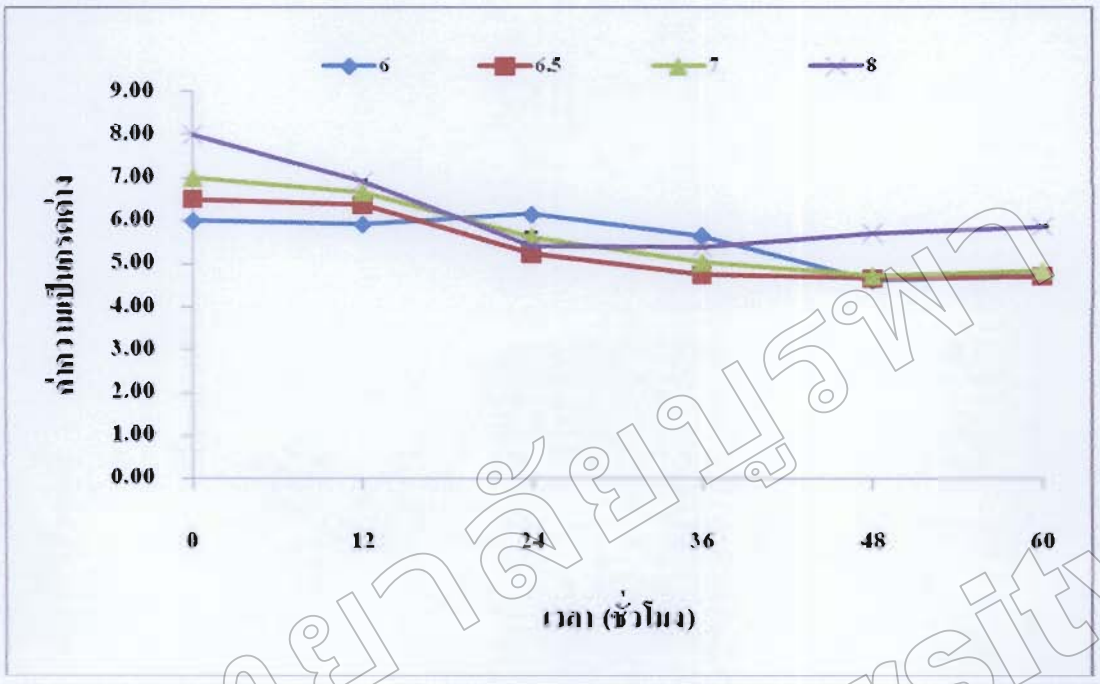
2.5 ผลของความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างต่อการเจริญและการผลิต PHB โดยปรับอาหารเลี้ยงที่ใช้ให้มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6, 6.5, 7 และ 8 ทำการเลี้ยง *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ในสูตรอาหารสำหรับผลิต PHB ในอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 15 จากการศึกษาแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA มีแนวโน้มการเจริญในทางเดียวกัน คือมีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-21) ซึ่งเมื่อการเจริญสูงขึ้นค่าความเป็นกรดด่างในแต่ละชุดการทดลองจะมีค่าลดลง ดังแสดงในภาพที่ 4-22 และเริ่มคงที่เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนปริมาณน้ำตาลจะค่อยๆ ลดลง ตามระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 พบว่าปริมาณน้ำตาลจะค่อนข้างคงที่ลดลงเพียงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 4-23 ซึ่งปริมาณไนโตรเจนจะมีค่าลดลงเช่นเดียวกัน โดยมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วจนคงที่เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ยกเว้นอาหารที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 8 เริ่มลดลงจนคงที่เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-24)

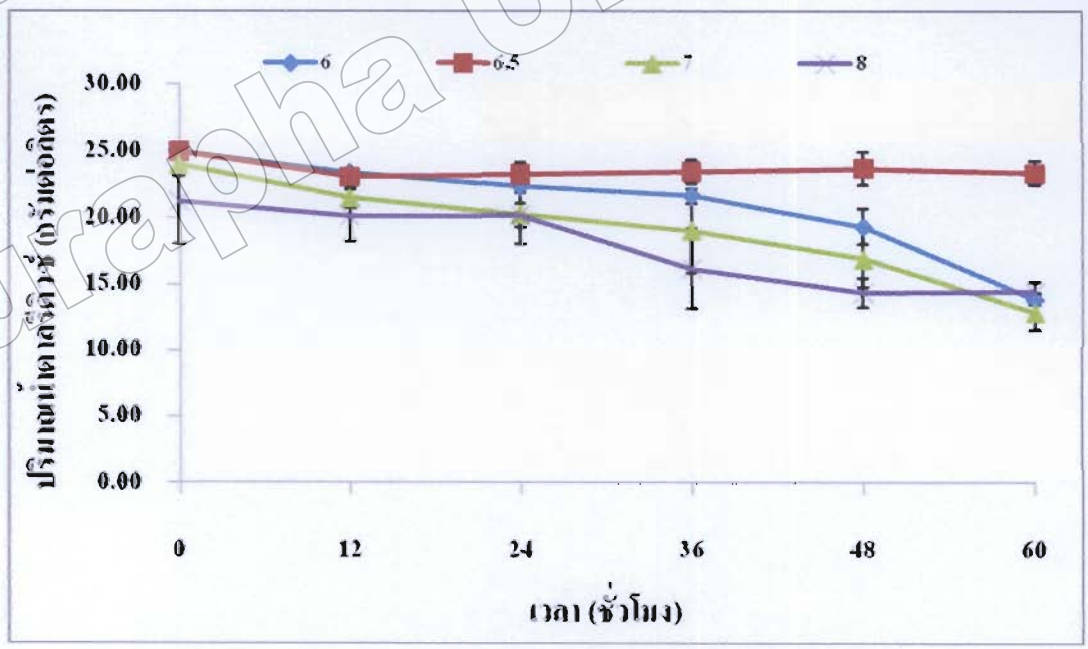


ภาพที่ 4-21 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

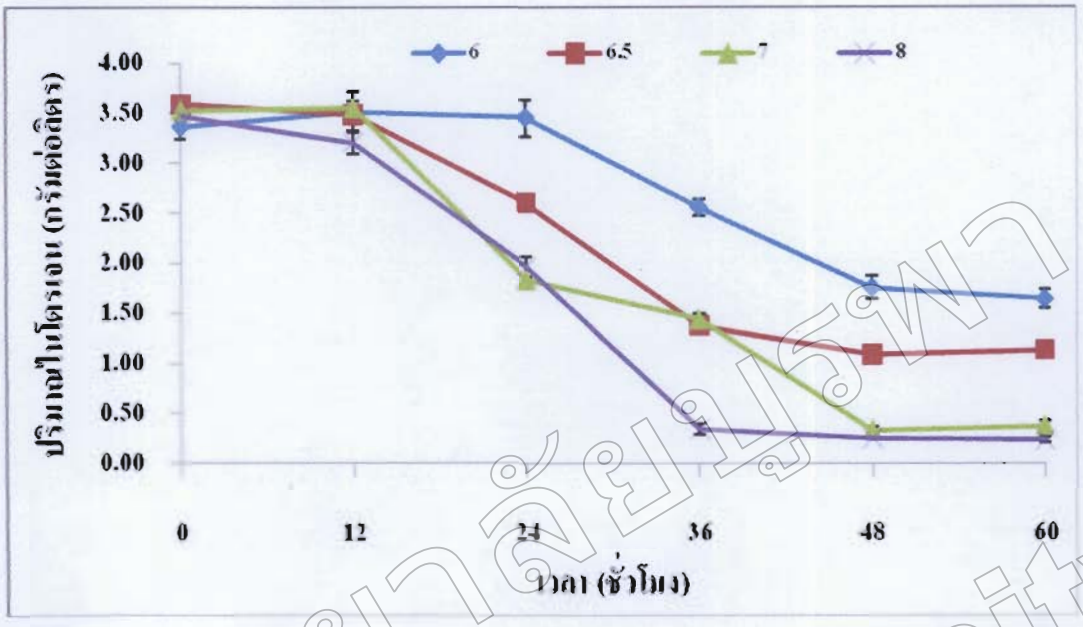


ภาพที่ 4-22 ค่าความเป็นกรดด่างของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน



ภาพที่ 4-23 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-24 ปริมาณไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปของ *A. lactus* TISTR 1403/γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน

แบคทีเรียผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 โดยให้มวลเซลล์เท่ากับ 4.95 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-25 โดยในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6, 6.5 และ 8 สามารถผลิตมวลเซลล์ได้เท่ากับ 3.38, 3.34 และ 2.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน สำหรับปริมาณ PHB ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6, 6.5, 7 และ 8 แบคทีเรียสามารถผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 1.90, 1.98, 2.07 และ 1.51 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 56.21, 60.73, 69.00 และ 59.21 ของน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (ตารางที่ 4-11 และภาพที่ 4-25) จะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHB จะอยู่ในช่วง 6.5-7 เช่นเดียวกับรายงานของ Grothe et al. (1999) ทำการศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการเจริญและผลิต PHB ของ *Alcaligenes lactus* ATCC29714 ระบุว่าค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลต่อการผลิตมวลเซลล์และ PHB เพียงเล็กน้อย โดยส่งผลต่อการดูดซึมสารอาหาร ซึ่งพบว่าค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHB ของ *A. lactus* ATCC29714 มากที่สุด และสอดคล้องกับรายงานของ Palleroni and Palleroni (1978) ระบุว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียมีค่าอยู่ในช่วง 6.0-7.5 โดยพบว่าแบคทีเรีย *Alcaligenes eutrophus*

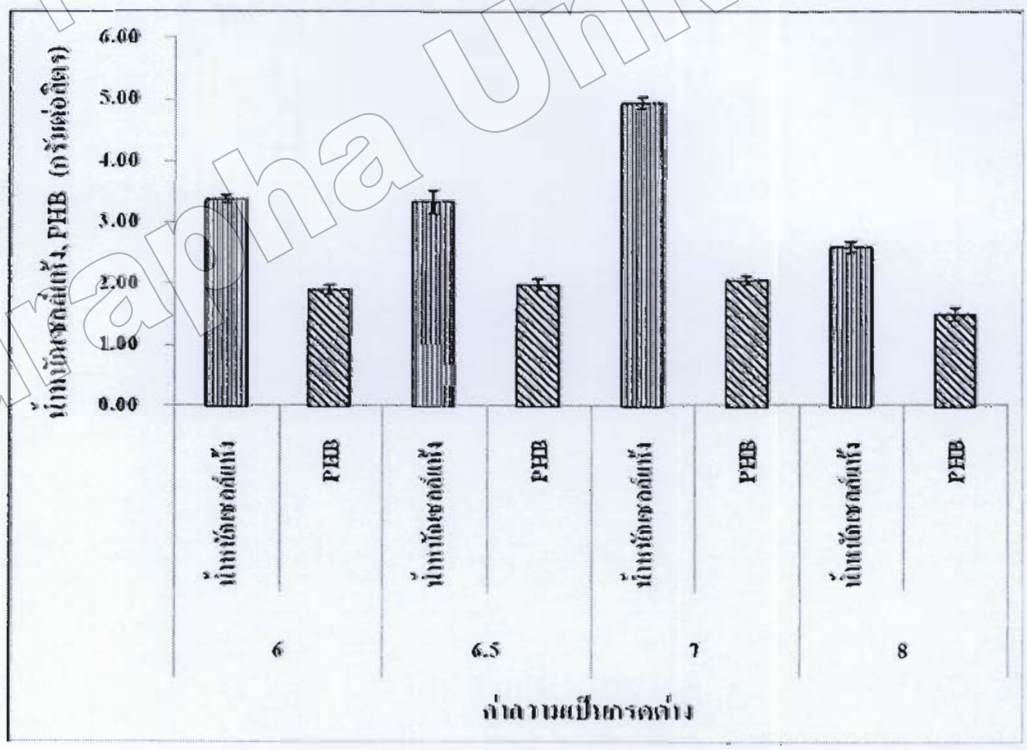
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สามารถเจริญและสะสม PHB ได้สูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.9 จากนั้นการเจริญจะลดลง เมื่อค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5.4

ตารางที่ 4-11 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB สูงสุด และ ร้อยละปริมาณการสะสม PHB ภายในเซลล์ ของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน และที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน

ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	PHB (g/L)	PHB (%)
6	3.38*	1.90*	56.21
6.5	3.34*	1.98***	60.73
7	4.95***	2.07*	69.00
8	2.60***	1.51**	59.21

*ที่ 24 ชั่วโมง, ** ที่ 36 ชั่วโมง,*** ที่ 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-25 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 4-12 ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.82, 0.67, 0.55 และ 0.26 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป และคิดเป็นสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yp/s) เท่ากับ 0.48, 0.67, 0.40 และ 0.12 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6, 6.5, 7 และ 8 ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4-6 ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/x) สูงสุดเท่ากับ 0.81 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง ส่วนในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6, 7 และ 8 มีค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.59, 0.76 และ 0.34 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4-12) ที่ระยะเวลาของการเลี้ยงแตกต่างกัน

ตารางที่ 4-12 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ Y-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน ที่ระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกัน

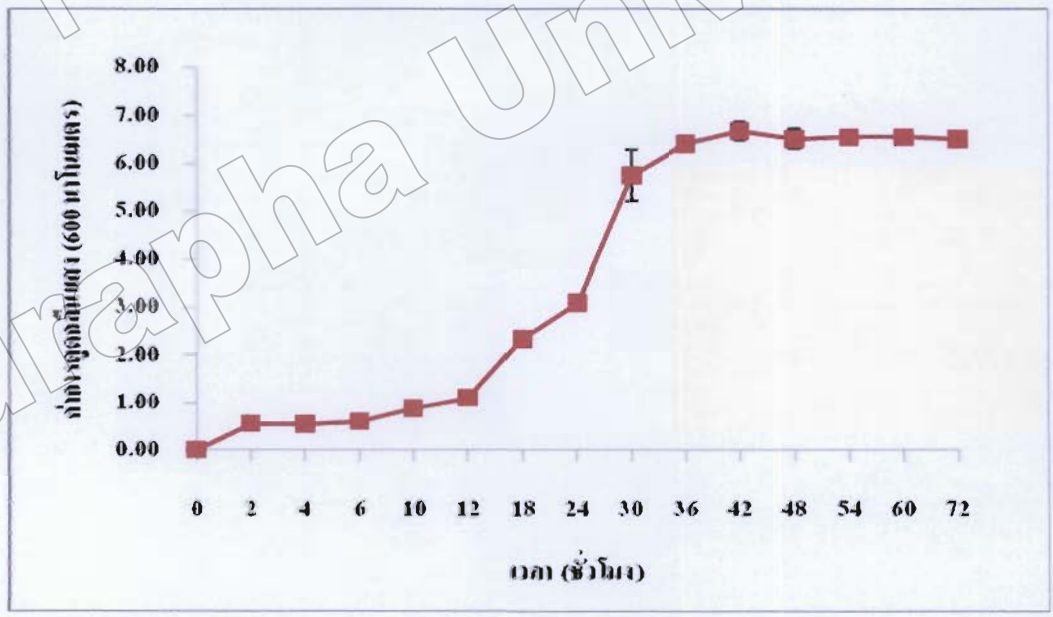
ค่าความเป็นกรดด่าง	Yp/x (g PHB/g Cell)	Yp/s (g PHB/g substrate)	Yx/s (g Cell/g substrate)
6	0.59*	0.48*	0.82*
6.5	0.81***	0.67***	0.67*
7	0.76*	0.40*	0.55***
8	0.34**	0.12**	0.26***
ผลได้ตามทฤษฎี (theoretical yield)	~ 0.8 -0.9	0.38	~ 0.45

*ที่ 24 ชั่วโมง, ** ที่ 36 ชั่วโมง,*** ที่ 48 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

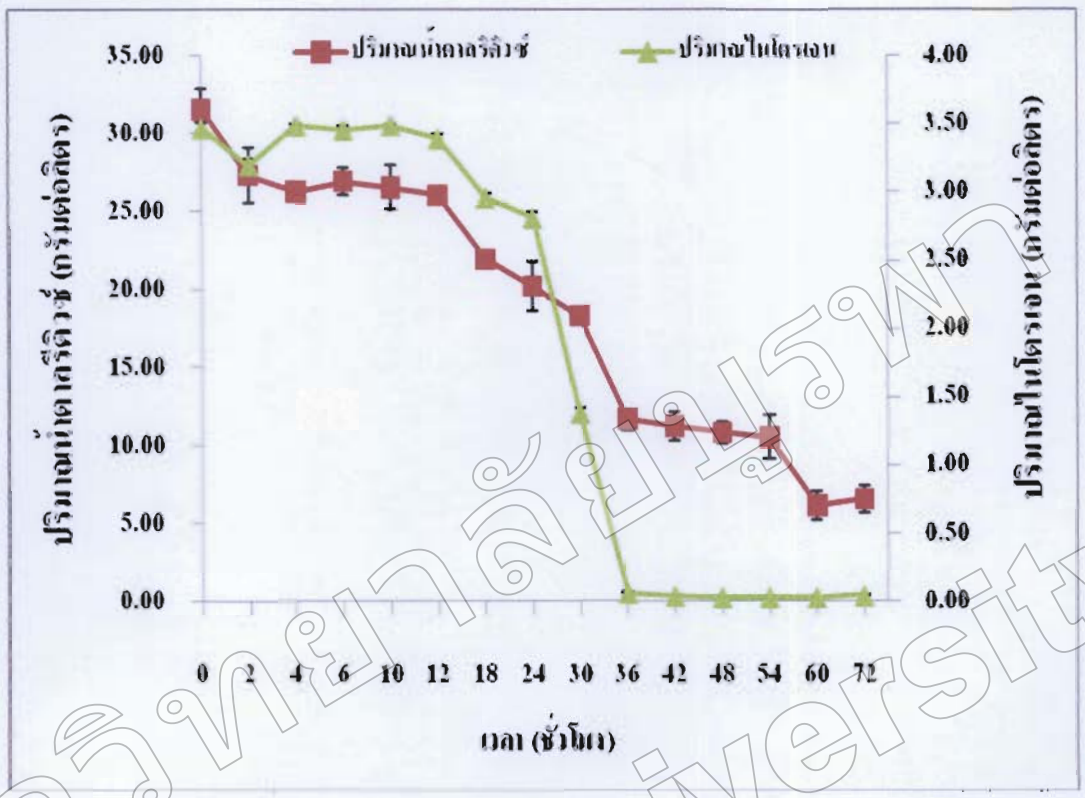
3. ความสามารถในการผลิต PHB ของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

จากการทดลองเลี้ยง *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ในถังหมักแบบกะ (Batch culture) ขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เติมในอาหารปริมาตร 3 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 100-200 รอบต่อนาที กำหนดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1-2 vvm และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 6.5-7 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 นอร์มอล ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 12 - 36 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 4-26 ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แบคทีเรียมีการนำไปใช้เพื่อการเจริญโดยปริมาณน้ำตาลจะลดลงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือภายในถังหมัก เท่ากับ 6.57 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-27) และพบว่าปริมาณไนโตรเจนภายในถังหมักมีค่าลดต่ำลงและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีแนวโน้มเดียวกันกับการเจริญของแบคทีเรียที่เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (ภาพที่ 4-27)



ภาพที่ 4-26 การเจริญของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ-2AA ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

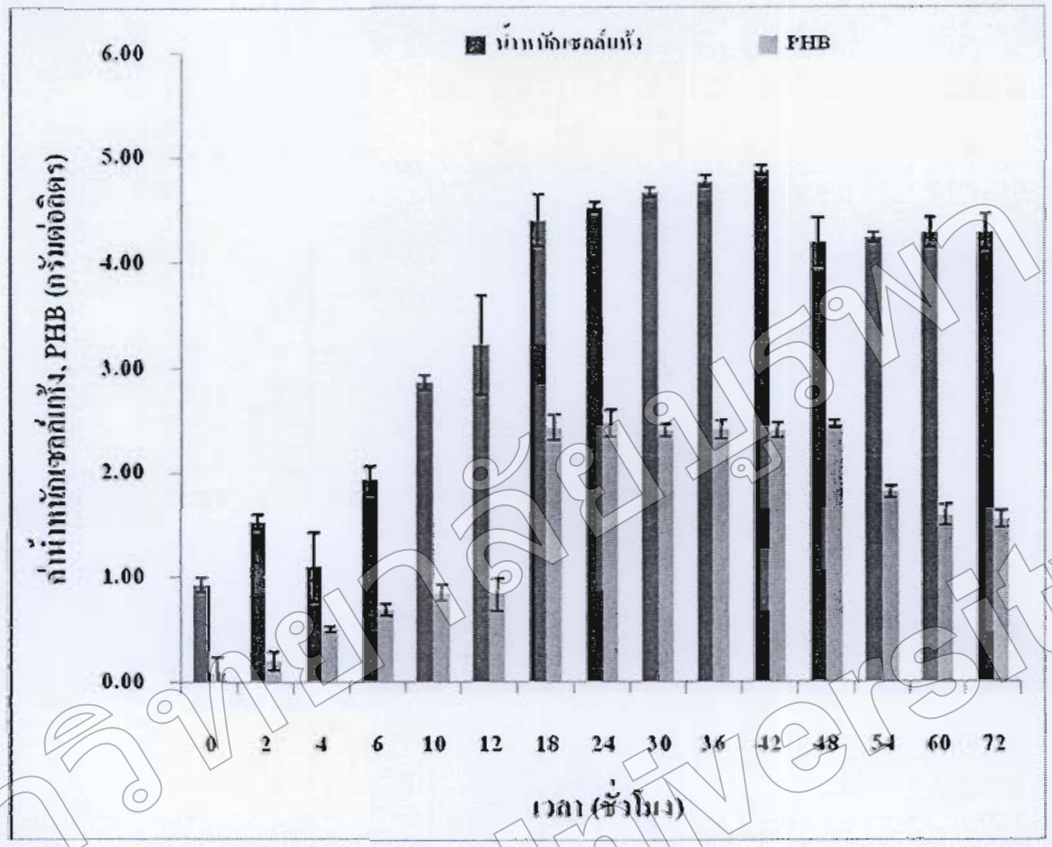
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-27 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือและปริมาณไนโตรเจนที่ถูกใช้ไปของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร

จากการศึกษาแบคทีเรียผลิตมวลเซลล์และ PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 4.53 และ 2.47 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 54.52 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ 4-28) จากการคิดค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) เท่ากับ 0.66 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) เท่ากับ 0.32 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร(Yp/s) เท่ากับ 0.24 กรัมต่อกรัมของปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-28 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ของ *A. lactus* TISTR 1403/γ- 2AA ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 4-13 สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB (Yp/x) สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Yx/s) และสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร (Yp/s) สูงสุดของ *A. lactus* TISTR 1403/ γ- 2AA ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 24 ชั่วโมง

สายพันธุ์แบคทีเรีย	Yp/x (g PHB/g Cell)	Yp/s (g PHB/g substrate)	Yx/s (g Cell/g substrate)
A.lactus TISTR 1403/ γ- 2AA	0.66	0.24	0.32
ผลได้ตามทฤษฎี (theoretical yield)	~ 0.8 -0.9	0.38	~ 0.45

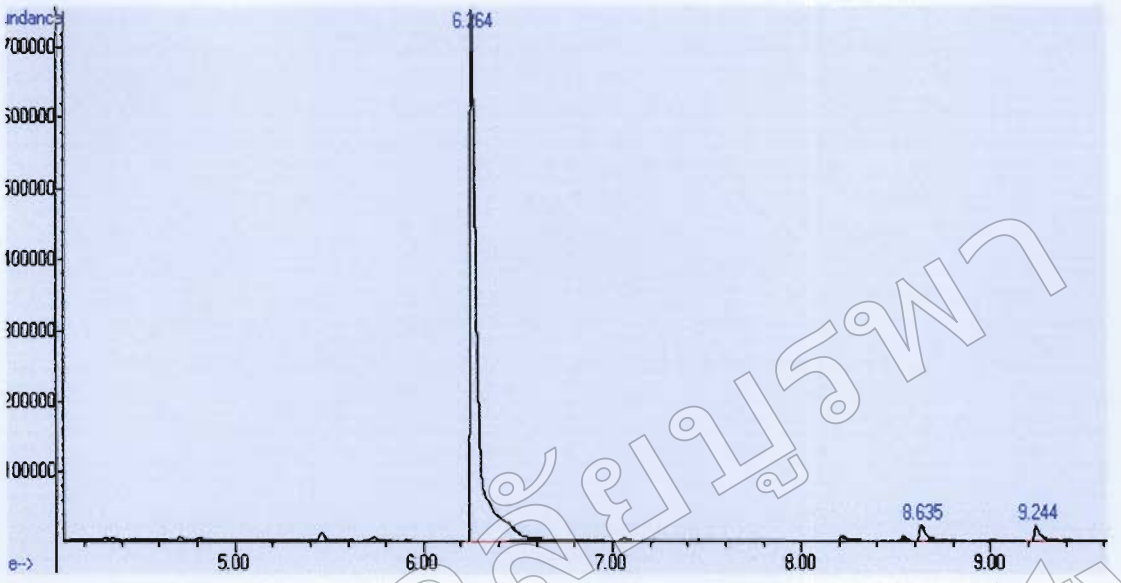
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. การตรวจสอบชนิดและปริมาณของ PHB

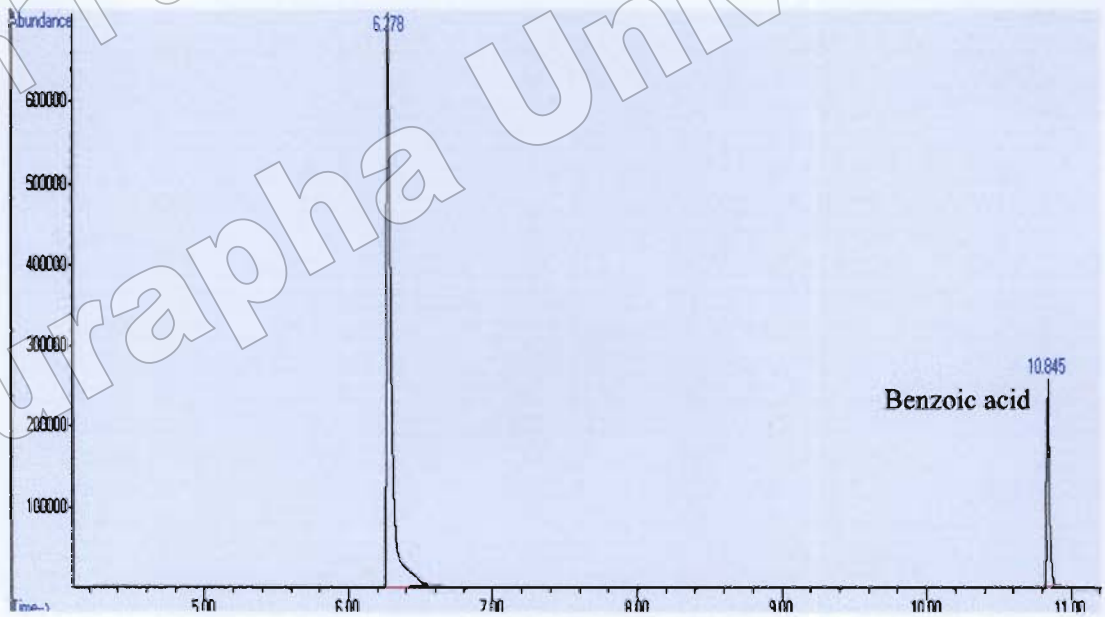
จากการเตรียม methyl ester ของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดเซลล์แบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทดสอบด้วยเครื่อง GC-MS พบว่าโครมาโตแกรม 3 โครมาโตแกรม โดยมีโครมาโตแกรมเด่นเพียงชนิดเดียว ปรากฏที่ retention time เท่ากับ 6.264 นาที ดังแสดงในภาพที่ 4-29 เมื่อพิจารณาเทียบกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Poly[(R)-4-hydroxybutyric acid] (ภาพที่ 4-30) พบว่าโครมาโตแกรมของพอลิเมอร์ทั้งสองมีความคล้ายกัน โดยปรากฏโครมาโตแกรมที่ retention time เดียวกัน โดยสามารถคำนวณพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียมีพื้นที่เป็นร้อยละ 95 ของพื้นที่ทั้งหมด ในการตรวจดูค่ามวลสเปคตรัม (Mass spectra) ของโครมาโตแกรมของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย โดยเทียบจาก Library search NIST08 พบว่าโครมาโตแกรมที่ retention time เท่ากับ 6.26 นาที คือ โครมาโตแกรมของสาร Butanoic acid 4- hydroxy-methyl ester มีค่ามวลสเปคตรัม (mass spectra) เท่ากับ 74, 87 และ103 (ภาพที่ 4-31 และภาพที่ 4-32) นอกจากนี้พบโครมาโตแกรมที่ retention time เท่ากับ 8.63 นาที และ 9.24 นาที (ภาพที่ 4-29) เมื่อเทียบจาก Library search NIST08 เป็นโครมาโตแกรมของพอลิเมอร์ชนิด Pentanoic acid, 4- hydroxy-methyl ester และ Pentanoic acid, 4-oxo-, methyl ester ตามลำดับ ผลของโครมาโตแกรมสามารถคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเป็นร้อยละ 2.5 และ 2.2 ของพื้นที่ เมื่อตรวจสอบค่ามวลสเปคตรัม พบว่าค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของสารที่ retention time เท่ากับ 8.63 นาที มีค่าเท่ากับ 59, 71 และ103 (ภาพที่ 4-33 และภาพที่ 4-34) และ retention time เท่ากับ 9.24 นาที มีค่าเท่ากับ 55, 88, 99 และ105 (ภาพที่ 4-35 และภาพที่ 4-36) ซึ่งจากผลการทดสอบที่ได้สรุปได้ว่าแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตพอลิเมอร์ ชนิด PHB สะสมภายในเซลล์เป็นส่วนใหญ่

จากการคำนวณปริมาณของ PHB ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ โดยเทียบกับสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich พบว่าเมื่อเลี้ยง *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ในอาหารที่ใช้กลูโคสสามารถผลิต PHB ได้ใกล้เคียงกับ *A. lactus* TISTR 1403 (สายพันธุ์เดิม) เท่ากับ 0.003 และ 0.004 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ โดยพบว่าการใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนแบคทีเรียผลิต PHB ได้มากกว่า 76.6 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 4-14

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

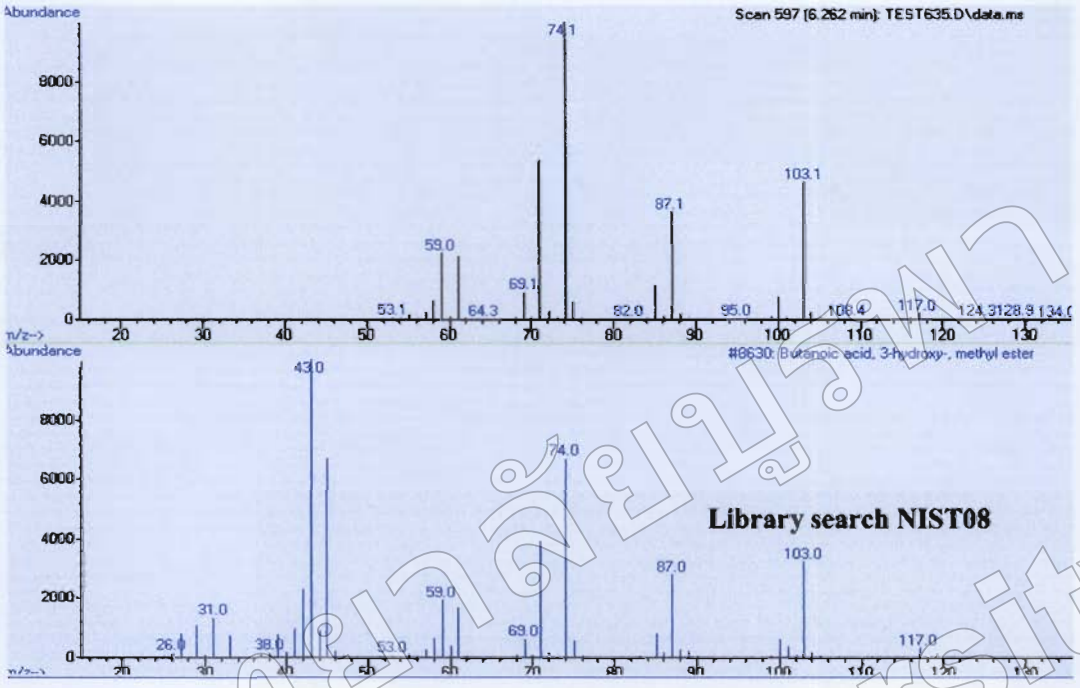


ภาพที่ 4-29 โครมาโตแกรมของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

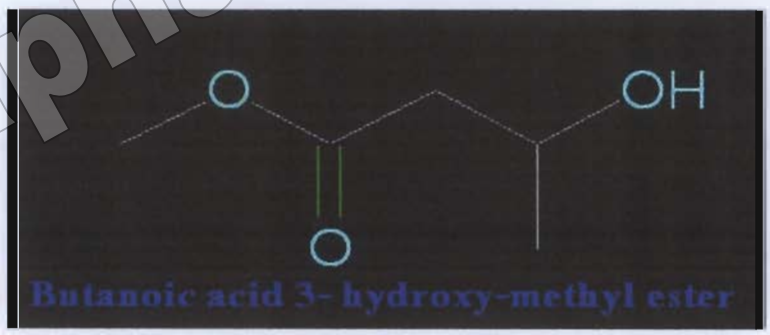


ภาพที่ 4-30 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich โดยใช้กรดเบนโซอิก เป็น internal standard

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

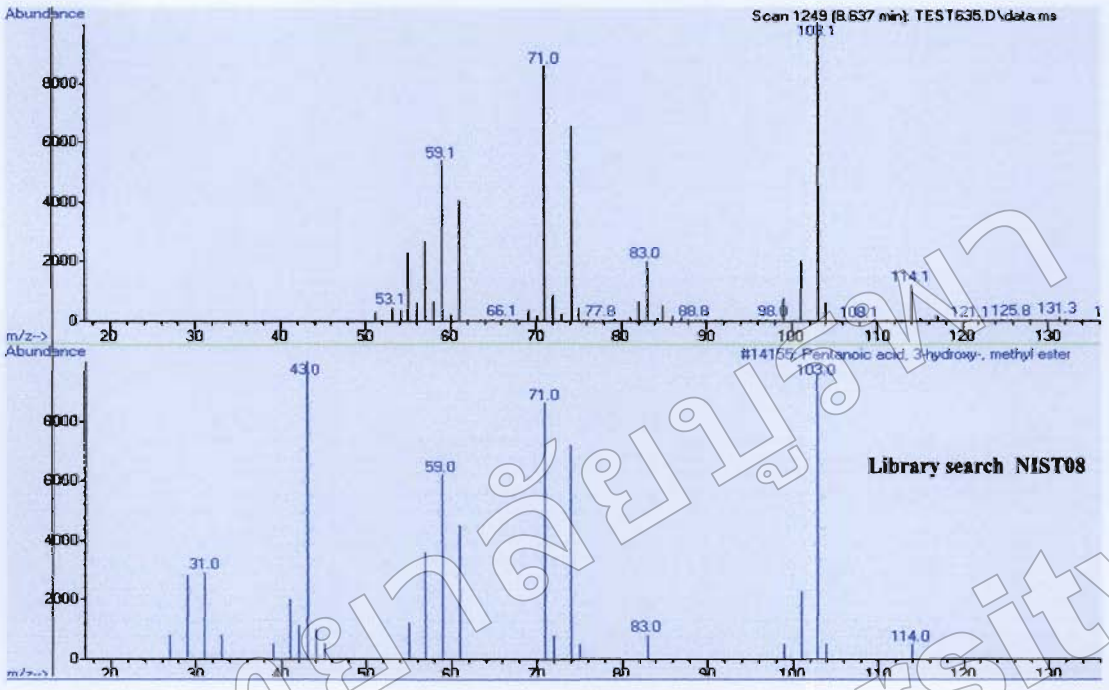


ภาพที่ 4-31 มวลสเปคตัมของ Butanoic acid 4- hydroxy-methyl ester ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *A.lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเทียบกับมวลสเปคตัมของสาร PHB จาก Library search NIST08

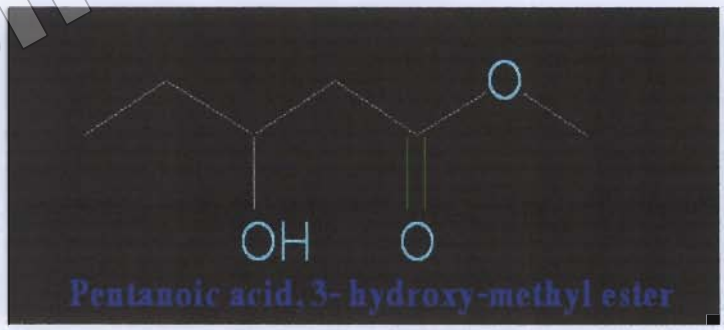


ภาพที่ 4-32 สูตรโครงสร้างของ Butanoic acid, 4- hydroxy-methyl ester ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

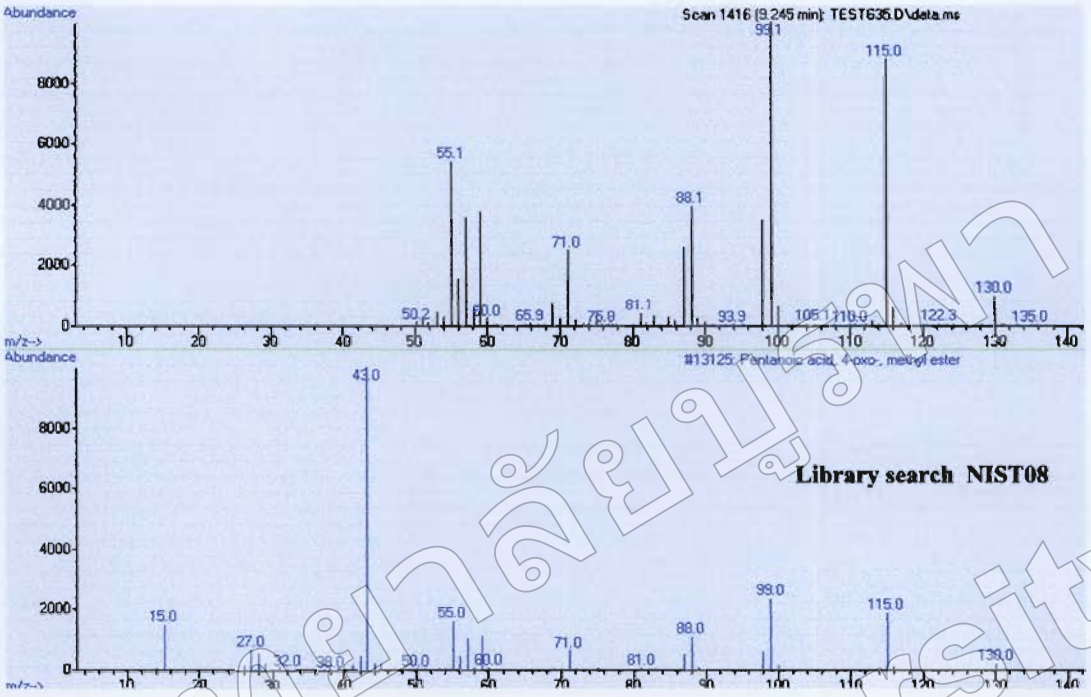


ภาพที่ 4-33 มวลสเปคตัมของ Pentanoic acid, 4- hydroxy-methyl ester ที่ retention time เท่ากับ 8.63 ที่สกัดได้จาก แบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับมวลสเปคตัมของสาร PHB จาก Library search NIST08

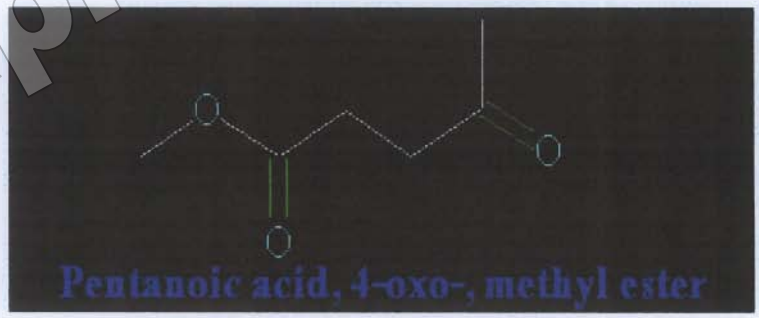


ภาพที่ 4-34 สูตรโครงสร้างของ Pentanoic acid, 4- hydroxy-methyl ester ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-35 มวลสเปคตัมของ Pentanoic acid, 4-oxo-, methyl ester ที่ retention time เท่ากับ 9.24 นาทีที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับมวลสเปคตัมของสาร PHB จาก Library search NIST08



ภาพที่ 4-36 สูตรโครงสร้างของ Pentanoic acid, 4-oxo-, methyl ester ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-14 ปริมาณของ PHB ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของ *A. lactus* TISTR 1403 และ *A. lactus* TISTR 1403 /γ-2AA โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน PHB จาก Aldrich

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ปริมาณ PHB (กรัมต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง)	
	กลูโคส	ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง
A. lactus TISTR 1403	0.004	ตรวจไม่พบ
A. lactus TISTR 1403 /γ-2AA	0.003	0.23

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University