



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเพิ่มศักยภาพการผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่มพอลิไฮดรอกซี  
อัลคาโนเอตในรูปแบบโพลิเมอร์และโคพอลิเมอร์จากแบคทีเรีย  
*Alcaligenes latus* ที่คัดเลือกจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย

ผศ. ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

ดร.สมจิตต์ ปาละกาศ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙ - ๒๕๖๑

## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเพิ่มศักยภาพการผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่มพอลิไฮดรอกซี

อัลคาโนเอตในรูปโพลิเมอร์และโคพอลิเมอร์จากแบคทีเรีย

*Alcaligenes latus* ที่คัดเลือกจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ผศ. ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้วิจัย

ดร.สมจิตต์ ปาละภาศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

## บทคัดย่อ

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากเชื้อ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 และสายพันธุ์กลาย คือ BOT I และ BOT II ที่เลี้ยงในอาหารตัดแปลงที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการชีวสังเคราะห์และการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในอาหารสูตรตัดแปลงจาก DSMZ catalogue สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ  $5.90 \pm 0.20$  และ  $4.10 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 69.49 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 20 และ 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนน้ำตาลฟรุคโตส พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ร้อยละ 90 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนการเลี้ยงด้วยน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร แบคทีเรียสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ร้อยละ 75 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมที่ใช้ฟรุคโตส (ร้อยละ 65 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ในการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารตัดแปลงทั้งหมด 3 ชุด พบว่าอาหารตัดแปลงชุดที่ 3 ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการใช้ผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด  $3.47 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด  $2.63 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 75.79 ของมวลเซลล์แห้ง ในการใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ผงชูรส 2 กรัมต่อลิตร *A. latus* สายพันธุ์ BOT II สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ  $4.53 \pm 0.32$  และ  $3.10 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 68.43 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสอัตราส่วน 0.25:2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ  $5.90 \pm 0.20$  และ  $4.10 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 69.49

จากการเติมสารตั้งต้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปโคพอลิเมอร์ของเชื้อ *A. latus* BOT II โดยเลี้ยงในอาหารตัดแปลงซึ่งเติมสารตั้งต้นที่มีผลต่อการสร้างโคพอลิเมอร์ 3 ชนิด คือ แกมมา-บิวทาโรแลกโตน 1,4-บิวเทนไดออล และกรดวาเลอริก พบว่าการเลี้ยงแบคทีเรียด้วยอาหารตัดแปลงที่เติม 1,4-บิวเทนไดออล ผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด  $7.30 \pm 0.20$  กรัมต่อลิตร และให้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ได้เท่ากับ  $6.00 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82.19 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นได้เลี้ยงแบคทีเรียด้วยน้ำมันต่าง ๆ ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวโพด น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันรำข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนร่วมกับการเติมสาร 1,4-บิวเทนไดออล พบว่าการใช้น้ำมันรำข้าวร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออล มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 87.85 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่การใช้น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปาล์ม ผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยกว่า คิดเป็นร้อยละ 79 ของน้ำหนักเซลล์แห้งอย่างไรก็ตาม การใช้น้ำมันปาล์มซึ่งมีราคาถูกกว่าน้ำมันชนิดอื่น ๆ ร่วมกับการเติม 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ ร้อยละ 15, 25, 50 และ 75 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ของแหล่งคาร์บอน พบว่า การเติม 1,4-บิวเทนไดออลความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ  $7.10 \pm 0.20$  และ

5.63±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.30 ของน้ำหมักเซลล์แห้ง ส่วนการเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนประเภทน้ำตาลร่วมกับสารตั้งต้นเพื่อการผลิตโคพอลิเมอร์ พบว่าน้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ร้อยละ 83 ของน้ำหมักเซลล์แห้ง และน้ำตาลเดกซ์โตรสความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ร้อยละ 81 ของน้ำหมักเซลล์แห้ง

การศึกษาการสกัด สำหรับวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปของกรดโครโตนิค 4 วิธี ได้แก่ วิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม วิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยไฮโปคลอไรท์ร่วมกับคลอโรฟอร์ม วิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยไฮโปคลอไรท์ และวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยไฮโปคลอไรท์ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน พบว่าการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกัน .ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด เท่ากับ 3.22±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการสกัดพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยการใช้การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ไฮโปคลอไรท์ และไฮโปคลอไรท์ร่วมกับคลอโรฟอร์ม การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก เพื่อการวิเคราะห์ปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปของกรดโครโตนิคของเชื้อ *A. lotus* BOT II พบว่า การสกัดด้วยไฮโปคลอไรท์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และใช้อัตราส่วนกรดซัลฟูริกต่อตัวอย่าง 1: 1 เป็นวิธีการที่เหมาะสมโดยใช้ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 171.81 ± 3.34 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการขยายขนาดการเลี้ยงไปสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ด้วยการเลี้ยงแบบกะเชื้อ *A. lotus* BOT II สามารถผลิตน้ำหมักเซลล์แห้งและ PHAs ได้ผลผลิตเท่ากับ 8.60±0.20 และ 6.87±0.57 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 79.88 ของน้ำหมักเซลล์แห้ง) ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 30 ชั่วโมง จากการนำมาตรวจสอบชนิดของไฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์ โดยใช้สารมาตรฐาน Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) เป็นสารอ้างอิง เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GCMS และนำโครมาโตแกรมที่ได้ไปเทียบกับมวลสเปกตรัม จาก Library search wiley7n.l พบโครมาโตแกรมที่น่าสนใจ เป็นสารดังนี้คือ dimethylsiloxane cyclic trimer, 2-Butanoic acid, 5- hydroxyhexanoic acid-methyl ester, methoxy phenyl oxime, octamethylcyclotetrasiloxane, methyl benzoate และ decamethyl cyclopentasiloxane ตามลำดับ

## Abstracts

Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by wild type and 2 mutant strains (BOT I and BOT II) of *Alcaligenes lotus* cultured in modified medium for biosynthesis and accumulation of PHAs have been investigated. The results revealed that BOT II strain of *A.*

*latus* cultured medium modified from DSMZ catalogue exhibited highest cell dried weight of  $5.90 \pm 0.20$  g/L and highest PHAs of  $4.10 \pm 0.10$  g/L (69.49% of cell dried weight). When soy bean oil was used as carbon instead of fructose, BOT II accumulated higher PHAs than that of control in the presence of fructose (75% of cell dried weight). The culture in the presence of soy bean oil of 20 and 60 g/L gave PHAs with the values of 90% of cell dried weight. While the culture in the presence of 40% soy bean oil accumulated PHAs at 75% of cell dried weight. Furthermore, modified medium containing 40 g/L of soy bean oil and 0.5 g/L of monosodium glutamate produced highest cell dried weight and PHAs of  $3.47 \pm 0.15$  g/L and  $2.63 \pm 0.06$  g/L (75.79% of cell dried weight), respectively. When monosodium glutamate (MG) was used as nitrogen source, culture of *A. latus* BOT II in the presence of 2 g/L MG exhibited highest cell dried weight and PHAs of  $4.53 \pm 0.32$  and  $3.10 \pm 0.06$  g/L (68.43% of cell dried weight), respectively. Production of cell dried weight and PHAs in the presence of MG alone was lower than that culture in the presence of ammonium chloride and MG (0.25:2 g/L) which produced highest cell dried weight and PHAs of  $5.90 \pm 0.20$  and  $4.10 \pm 0.10$  g/L (69.49% of cell dried weight), respectively.

In order to enhance production capability of PHAs co-polymer form by *A. latus* BOT II, each of 3 precursors was added to culture media including gamma-butyrolactone, 1,4-butanediol and valeric acid. *A. latus* BOT II culture in modified medium containing 1,4-butanediol gave highest cell dried weight ( $7.30 \pm 0.20$  g/L) and PHAs of  $6.00 \pm 0.10$  g/L (82.19% of cell dried weight). Subsequently, various types of oil were used as carbon sources (soy bean oil, palm oil, Mazola oil, sunflower seed oil and rice bran oil. Bacteria cultured in the presence of rice bran oil and 1,4-butanediol increased PHAs accumulation (87.85% of cell dried weight). While that cultured in the presence of soy bean oil as well as palm oil accumulated lower PHAs (79% of cell dried weight). However, using palm oil, the lowest cost oil, in various concentration of 1,4-butanediol (15-75% w/v) as carbon source was explored. The result revealed that adding 50% of various 1,4-butanediol produced highest cell dried weight and PHAs of  $7.10 \pm 0.20$  and  $5.63 \pm 0.15$  g/L (79.30% of cell dried weight). Moreover, cultured in media containing each of various sugars and precursor for co-polymer production was also investigated. It was found that that cultured in the presence of 20 and 40 g/L of fructose as well as dextrose accumulated PHAs at 83% and 81% of cell dried weight, respectively.

Four PHAs extraction methods in form of crotonic acid have been investigated including chloroform extraction, hypochlorite extraction, co-extraction of hypochlorite

and chloroform, and hypochlorite extraction. Hypochlorite extraction at different temperature and time (30°C during 10 min) gave highest PHAs content of 3.22±0.03 mg/mL. PHAs extraction using chloroform, hypochlorite and co-extraction of hypochlorite and chloroform as well as digestion in optimum ratio of sulfuric acid to sample were also investigated. It was found that hypochlorite extraction at 30°C during 20 min in the presence of sulfuric acid (1:1 of sulfuric acid to sample) gave the most satisfied result. It gave PHAs of 171.81 ± 3.34 mg/mL.

When batch cultivation was up-scaled to 5L fermenter, *A. latus* BOT II produced the highest cell dried weight and PHAs at 30 hr of 8.60±0.20 and 6.87±0.57 g/L (79.88% and cell dried weight). Moreover, homopolymers and co-polymers of PHAs using Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as reference was investigated and GC/MS chromatograms were compared to mass spectrum from Library search wiley7n.l. Interesting fragments represent dimethylsiloxane cyclic trimer, 2-Butanoic acid, 5-hydroxy hexanoic acid-methyl ester, methoxy phenyl oxime, octamethylcyclotetrasiloxane, methyl benzoate and decamethylcyclopentasiloxane were found, respectively.

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙-๒๕๖๑ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านทางสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา ๑/๒๕๖๑ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาและสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติเป็นอย่างสูง ที่เป็นผู้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ เป็นเวลา ๓ ปี เป็นการวิจัยแบบต่อเนื่อง (พ.ศ. ๒๕๕๙-๒๕๖๑) สำหรับทุนวิจัยปีที่ ๓ นี้ ในปีงบประมาณ ๒๕๖๑ งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์แต่ต้องขยายระยะเวลาและมีผลงานวิจัยบางส่วนไม่ครบถ้วน เนื่องจากความไม่พร้อมและการชำรุดของเครื่องมือที่ใช้มาเป็นเวลายาวนานกว่า ๒๐ ปี ส่งผลต่อผลงานวิจัย แต่อย่างไรก็ตาม ต้องขอขอบคุณในความอนุเคราะห์ของห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี ด้วยความอนุเคราะห์ของ ผศ.ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ และ ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา รวมทั้งห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ทำให้การดำเนินการวิจัยร่วมกันดำเนินด้วยดีตลอด

ผศ.ดร.กรองจันทร์ รัตน์ประดิษฐ์

หัวหน้าโครงการวิจัย

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	
กิตติกรรมประกาศ	
สารบัญ	
บทนำ	1
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำงานวิจัย	16
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	18
กรอบโครงการวิจัย	18
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	19
การดำเนินการวิจัย	20
รายละเอียดในการดำเนินการวิจัย	20
ผลและอภิปรายผลการวิจัย	36
สรุปการวิจัย	92
บรรณานุกรม	102
ภาคผนวก	115



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปรียบเทียบการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการกลายและการกลายซ้ำด้วยรังสีและสารเคมี	1
2	การเปรียบเทียบผลผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและแหล่งคาร์บอนที่ใช้	6
3	องค์ประกอบของอาหารของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา	24
4	องค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารดัดแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา	26
5	อัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสในอาหารดัดแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร	27
6	น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละปริมาณ การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน	38
7	น้ำหนักแห้ง ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	41
8	น้ำหนักแห้ง ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	43
9	น้ำหนักแห้ง ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ที่เลี้ยงในแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	46
10	น้ำหนักแห้ง ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ที่เลี้ยงในแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	49
11	มวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ของเชื้อ <i>A. latus</i> TISTR1403 BOT I และ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน	52
12	มวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ของเชื้อ <i>A. latus</i> TISTR1403, BOT I และ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน	55
13	องค์ประกอบแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue ของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา	56
14	มวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ของเชื้อ <i>A. latus</i> TISTR1403, BOT I และ BOT II ที่เลี้ยงในอาหารที่คาร์บอนและไนโตรเจนแตกต่างกัน	58

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
15	มวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ของเชื้อ <i>A. latus</i> TISTR1403, BOT I และ BOT II ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของผงชูรสแตกต่างกัน	61
16	มวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ของเชื้อ <i>A. latus</i> TISTR1403, BOT I และ BOT II ในอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสแตกต่างกัน	64
17	มวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ของเชื้อ <i>A. latus</i> BOT II ในอาหารที่มีสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ	65
18	มวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ของเชื้อ <i>A. latus</i> BOT II ในอาหารที่มีน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสาร 1,4-บิวเทนไดออล	67
19	มวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ของเชื้อ <i>A. latus</i> BOT II ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออลความเข้มข้นต่าง ๆ	69
20	มวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ของเชื้อ <i>A. latus</i> BOT II ในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารโพธิ์โอนิคและอะซิเตท	71
21	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต จากการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วนแตกต่างกัน	75
22	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยใช้กรดซัลฟูริกที่อัตราส่วนแตกต่างกัน	76
23	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต จากการสกัดด้วยไฮโปคลอไรท์ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	78
24	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต จากการสกัดตัวอย่างด้วยไฮโปคลอไรท์ที่เวลาแตกต่างกัน	79
25	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยไฮโปคลอไรท์โดยใช้กรดซัลฟูริกที่อัตราส่วนแตกต่างกัน	81
26	การตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ของวิธีคลอโรฟอร์มและวิธีไฮโปคลอไรท์	82

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
1	ขั้นตอนในการเก็บเกี่ยวและการแยกบริสุทธิ์ PHAs	13
2	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น LEO 1450 VP บริษัท LEO	32
3	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน รุ่น TECNAI 20 บริษัท Philips	32
4	การเจริญของเซลล์จากเชื้อ <i>A. latus</i> BOT I ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน	36
5	การเจริญของเซลล์จากเชื้อ <i>A. latus</i> TISTR 1403	37
6	การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดที่เลี้ยง ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน	38
7	การเจริญของเชื้อ <i>A. latus</i> BOT I ที่เลี้ยงด้วยน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	39
8	การเจริญของเชื้อ <i>A. latus</i> TISTR 1403 ที่เลี้ยงด้วยน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	40
9	การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดสูงสุดที่เลี้ยง ในน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นแตกต่าง	41
10	การเจริญของเชื้อ <i>A. latus</i> BOT I ในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแตกต่างกัน	42
11	การเจริญของเชื้อ <i>A. latus</i> TISTR 1403 ในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแตกต่างกัน	43
12	การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดสูงสุดที่เลี้ยง ในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	44
13	การเจริญของเชื้อ <i>A. latus</i> BOT I ที่เลี้ยงด้วยผงชูรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	45
14	การเจริญของเซลล์จากเชื้อ <i>A. latus</i> TISTR 1403 ที่เลี้ยงด้วยผงชูรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	45
15	การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดสูง ที่เลี้ยงด้วยผงชูรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	47
16	การเจริญของเชื้อ <i>A. latus</i> BOT I ที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่ ความเข้มข้นแตกต่างกัน	48
17	การเจริญของเชื้อ <i>A. latus</i> TISTR 1403 ที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	48
18	การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดสูงสุด ที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	50
19	การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ที่เลี้ยง ในสูตรอาหาร 3 สูตร	51

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
20	การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดใน สูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน	54
21	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงใน สูตรอาหารดัดแปลง 3 สูตร	57
22	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยง ในความเข้มข้นผงชูรสที่แตกต่างกัน	60
23	ปริมาณน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงในอัตราส่วน ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกัน	63
24	ปริมาณมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดในสูตรอาหารที่เติมสารตั้งต้นแตกต่างกัน	66
25	ปริมาณมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดในสูตรอาหารดัดแปลงที่เติม น้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารตั้งต้น	68
26	การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดในสูตรอาหารที่มีน้ำมันปาล์ม ร่วมกับสาร 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	70
27	การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดของเชื้อ <i>A. latus</i> สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ร่วมกับโพธิ์โอนิคและอะซิเตท	72
28	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต จากการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม โดยใช้คลอโรฟอร์ม ในการสกัดที่อัตราส่วนต่อตัวอย่างแตกต่างกัน	74
29	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างด้วยคลอโรฟอร์มโดยใช้อัตราส่วน กรดซัลฟูริกต่อตัวอย่างที่แตกต่างกัน	76
30	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) สกัดตัวอย่างด้วยไฮโปคลอไรท์ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	78
31	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) สกัดตัวอย่างด้วยไฮโปคลอไรท์ที่เวลาแตกต่างกัน	80
32	ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ที่วัดได้จากการสกัดตัวอย่างด้วยไฮโปคลอไรท์ โดยใช้อัตราส่วนกรดซัลฟูริกต่อตัวอย่างที่แตกต่างกันในการวิเคราะห์หาปริมาณ	81
33	การเจริญและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของเชื้อ <i>A. latus</i> BOT II ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	83
34	ปริมาณมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs ของเชื้อ <i>A. latus</i> BOT II ที่ เลี้ยง ใน ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	84
35	ลักษณะของเชื้อ <i>A. latus</i> BOT II และ BOT I ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (SEM)	85

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
36	ลักษณะของเชื้อ <i>A. lotus</i> BOT II และ BOT I ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	86
37	โครมาโตแกรมของสารที่พบจากการสร้างเชื้อ <i>A. lotus</i> BOT II เทียบกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)	87
38	มวลสเปกตรัมของ dimethylsiloxane cyclic trimer ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัมจาก Library search wiley7n.l	88
39	มวลสเปกตรัมของ 2-Butanoic acid ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัมจาก Library search wiley7n.l	88
40	มวลสเปกตรัมของ hydroxyhexanoic acid-methyl ester ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัมจาก Library search wiley7n.l	89
41	มวลสเปกตรัมของ methoxy phenyl oxime ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัมจาก Library search wiley7n.l	89
42	มวลสเปกตรัมของ octamethylcyclotetrasiloxane ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัมจาก Library search wiley7n.l	90
43	มวลสเปกตรัมของ methyl benzoate ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัมจาก Library search wiley7n.l	90
43	มวลสเปกตรัมของ methyl benzoate ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัมจาก Library search wiley7n.l	91

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

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

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการกลายและการกลายซ้ำด้วยรังสีและสารเคมี

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

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

พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้หรือพลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) เป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ ผลิตได้จากแหล่งวัตถุดิบที่สามารถผลิตขึ้นมาทดแทนได้ (renewable resource) ในกระบวนการผลิตโดยให้พลาสติกที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงหรือเทียบเท่าพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี แต่มีข้อดีคือสามารถย่อยสลายได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยลดปัญหาของขยะพลาสติกได้สูง สำหรับพลาสติกชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีหลายชนิดที่ได้รับความสนใจได้แก่ พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (Polyhydroxyalkanoate, PHAs) และพอลิแลคติก (Poly

lactide, PLA) โดยเฉพาะกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตหรือเรียกโดยทั่วไปว่า พลาสติก PHAs ได้รับความสนใจสูง เนื่องจากผลิตภัณฑ์เม็ดพลาสติกที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นภายในเซลล์สามารถทนความร้อนได้ดี เมื่อนำมาขึ้นรูปและใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ในกลุ่มของพอลิโพรพิลีน (Polypropylene, PP) (Ojumu, et.al., 2004) ส่วนพลาสติกชนิดพอลิแลคไทด์ พบว่ามีคุณสมบัติของฟิล์มเหมาะสำหรับใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ชนิดพอลิเอทิลีน (PE) และ พอลิเอทิลีนเทเรฟทาเลต (Polyethylene terephthalate, PET) ได้

พลาสติกชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์กลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates) หรือ PHAs เป็นอะลิฟาติกพอลิเมอร์ธรรมชาติที่จุลินทรีย์ผลิตและเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสำรองจะเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่สมดุลของสารอาหารในการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะการมีปริมาณสารอาหารที่จำเป็น (essential nutrient) เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส หรือ แมกนีเซียม เป็นต้น อยู่ในปริมาณน้อย แต่มีปริมาณสารอาหารคาร์บอนสูง จึงเป็นผลให้เกิดการสะสมสารพลังงานสูงอยู่ในรูปพอลิเมอร์ (Salehizadeh & Van Loosdrecht, 2004) ที่เกิดจากการสังเคราะห์โดยทางกระบวนการทางชีวภาพ โดยกลุ่ม PHAs ได้มีการแบ่งหมวดหมู่ตามความยาวของเส้นสายของกรดไฮดรอกซีอัลคาโนอิต (hydroxyalkanoic acids) คือ พอลิเมอร์สายสั้น ซึ่งจะประกอบด้วยหมู่แอลคิลที่มีคาร์บอนสองอะตอมหรือเรียกว่าพลาสติกชนิดไฮโมพอลิเมอร์ ตัวอย่าง เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (polyhydroxybutyrate, PHB) พอลิไฮดรอกซีวาเลอเรต (polyhydroxy-valerate, PHV) และ พลาสติกโคพอลิเมอร์ของพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตกับไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxy butyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV) (Chien et al., 2007) ส่วนกลุ่มพอลิเมอร์ที่มีสายปานกลางซึ่งจะประกอบด้วยหมู่แอลคิลไม่น้อยกว่า 3 อะตอม ได้แก่พอลิไฮดรอกซีออกตาโนเอต (poly-3-hydroxyoctanoate, PHO) พอลิไฮดรอกซีโนนาโนเอต (poly-3-hydroxynonanoate, PHN) เป็นต้น ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพลาสติก PHAs มีมากมายหลายกลุ่มเช่น แบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* มีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์สายสั้นได้สูง (Lenz & Marchessault, 2005) ในขณะที่ *Pseudomonas oleovorans* และ *Pseudomonas sensu* จะผลิตพอลิเมอร์สายปานกลางได้ดี (Timm & Steinbüchel, 1990) คุณสมบัติของพลาสติก PHAs แต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับการรวมกันของชนิดและปริมาณหน่วยย่อยของโมโนเมอร์ของ 3-hydroxy-acid (Ha) เช่น poly-3-hydroxybutyrate (PHB) ซึ่งพบว่ามีหน่วยย่อย HAs มีมากกว่า 80 ชนิด เป็นสารประกอบของ PHAs โดยในการผลิตหน่วยย่อยจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และแหล่งคาร์บอนเป็นหลัก (Madison & Huisman, 1999 ; Hazer & Steinbüchel, 2007)

พลาสติกในกลุ่ม PHAs ได้รับความสนใจในวงการอุตสาหกรรมพลาสติกมากเนื่องจากมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลาสติกชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตหรือเรียกกันทั่วไปว่า พลาสติก PHB ซึ่งมีคุณสมบัติสังเคราะห์ที่ใกล้เคียงกันกับพลาสติกสังเคราะห์พอลิโพรพิลีน (polypropylene, PP) โดยพลาสติก PHB มีความสามารถทนอุณหภูมิสูงโดยมีจุดหลอมเหลวสูงถึง 180 องศาเซลเซียส และมีคุณสมบัติเป็นฟิล์มกั้นน้ำและความชื้นได้ดี แต่พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวเมื่อขาดน้อยกว่าพลาสติกพอลิโพรพิลีนมาก แต่มีข้อดีที่น่าสนใจ คือสามารถย่อยสลายได้ง่ายเป็นผลทำให้

พลาสติกชนิดนี้ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในภาคอุตสาหกรรมและนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยต่างๆ ทางการแพทย์ และการเกษตร (Zhang et al., 2004) จากรายงานการศึกษาจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้เพื่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตได้แก่ *Alcaligenes* sp., *Azobacter* sp., *Pseudomonas* sp., และ *Cupriavidus* sp. (Chee et al., 2010) สำหรับ *Alcaligenes* sp. เป็นแบคทีเรียประเภทแกรมลบมีรูปร่างเป็นท่อนกลมหรือรูปร่างกลมขนาด 0.5-1.0 x 0.5-2.6 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา 1-8 เส้น โคโลนีมีลักษณะไม่มีสี สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน แต่มีบางสายพันธุ์ที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส พบได้ทั้งในน้ำและบนบก (Holt et al., 1994) จากรายงานของ Khandenavis และคณะ (2007) ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิต PHB จากตะกอนในอุตสาหกรรมนมและอุตสาหกรรมอาหาร โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาทดลองผลิต PHB ในอาหารที่ประกอบด้วยกรดซิตริก พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณร้อยละ 40 ของน้ำหนักเซลล์แห้งส่วนการเลี้ยงเชื้อ *Ralstonia eutropha* สายพันธุ์ NRRL B14690 โดยใช้ฟรุคโตสเข้มข้น 10 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตมวลเซลล์ได้สูงสุดเท่ากับ 3.25 กรัมต่อลิตร และผลิต PHB ได้เท่ากับ 1.4 กรัมต่อลิตร และการเติมยีสต์สกัดสามารถเพิ่มผลผลิตของ PHB ได้สูงยิ่งขึ้น (Khanna & Srivastana, 2005) นอกจากนี้มีรายงานพบว่านอกจากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* และ *Alcaligenes latus* จะสามารถสร้าง PHB ได้ในปริมาณสูงแล้ว เชื้อทั้งสองยังสามารถสังเคราะห์พลาสติกชนิด P(3HB-co-3HV) ซึ่งเป็นพลาสติกชนิดทนร้อน (Thermoplastic) ที่มีคุณภาพดีกว่าพลาสติก PHB แต่มีกระบวนการผลิตด้วยเทคนิคพิเศษและมีต้นทุนในการผลิตสูงกว่าได้อีกด้วย (Lee, 1995) ส่วนรายงานของ Ramsay และคณะ (1990) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes latus* และ *Alcaligenes eutrophus* บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิต P(HB-co-HV) ได้ในปริมาณร้อยละ 43 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* และ *Alcaligenes eutrophus* นิยมนำมาใช้ในการศึกษาแล้ว พบว่าเชื้อ *Cupriavidus* sp. สามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณสูงและถูกนำมาใช้ศึกษาเพื่อผลิต PHB แล้วในปัจจุบัน (Yu, 2008 ; Lee et al., 2008 ; Cavalheiro et al., 2009)

ในการผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (Polyhydroxyalkanoates) หรือ PHAs มีการใช้สารอาหารหลากหลายชนิดที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนสูงในการผลิต เช่น ใช้แป้งและรำข้าว (Huang et al., 2006) น้ำตาลกลูโคส (Van Wegen et al., 1998) หรือน้ำมันพืชและน้ำมันถั่วเหลือง (Choi & Lee, 1997; Park & Kim, 2011) เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสร้างผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนอีกด้วย เช่น หางนมจากโรงงานผลิตเนยแข็ง (Akiyama et al., 2003) กากน้ำตาลจากอ้อย (Gouda, et al., 2001) กลีเชอรอลจากโรงงานผลิตน้ำมันต่างๆ (Ashby et al., 2004; Cavalheiro et al., 2009; Shrivastav et al., 2010; Zhu et al., 2010; Mothes et al., 2007; Kawata et al., 2010; Ashby et al., 2011 ; Hassan, et al., 1996) วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหาร (Yu, et al., 1998) น้ำทิ้งจากโรงงานแป้ง (Haas, et al., 2008) วัสดุเหลือทิ้งจากการสกัดน้ำมันมะกอก (Martinez, et al., 1995) น้ำ



ทั้งโรงงานผลิตน้ำมันมะกอก (Dionisi, et al., 2005) และน้ำทิ้งโรงงานปาล์มน้ำมัน (Alias & Tan, 2005) และกลีเซอรอลเหลือจากการผลิตน้ำมันดีเซล (Posada, et al., 2011; Palmeri et al., 2012) จำข้าวสาลี (Koutinas et al., 2007 ; Xu et al., 2010) เป็นต้น ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตลง เนื่องจากพบว่าในการผลิตพลาสติก PHAs นั้นมีต้นทุนของวัตถุดิบและค่าใช้จ่ายในการทำให้บริสุทธิ์สูง อีกทั้งยังมีรายงานการวิจัยในการคัดเลือกและปรับปรุงจุลินทรีย์ให้มีความสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้สูงและใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกเพื่อลดค่าใช้จ่ายให้ต่ำที่สุด ทั้งนี้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญ ทำให้สร้างผลิตภัณฑ์ที่มีความแตกต่างกัน มีสารอาหารเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญและมีผลต่อการสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดของจุลินทรีย์ด้วย เช่น แห่ล่งคาร์บอน แห่ล่งไนโตรเจน วิตามินและเกลือแร่ รวมทั้งสารบางชนิดที่สามารถเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ กลุ่มโคเอนไซม์หรือโคแฟกเตอร์ และสารเสริมการสังเคราะห์ เป็นต้น

ในการศึกษาปัจจัยทางกายภาพพบว่า เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ เช่น อุณหภูมิในการหมัก ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ การให้อากาศ และการกวน เป็นต้น โดยทั่วไปส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์มีผลโดยตรงต่อชนิดและปริมาณการสร้างผลิตภัณฑ์ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ต้องมีส่วน ประกอบสำคัญ 4 ส่วน คือ 1) เป็นอาหารที่มีแร่ธาตุและสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและให้พลังงาน 2) เป็นอาหารที่มีความสมดุลของธาตุอาหารเพื่อความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 3) เป็นอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ และ 4) มีสารเหนี่ยวนำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นได้ดี (Wiseman, 1995) สำหรับการสังเคราะห์พลาสติก PHAs ซึ่งเป็นกลุ่มสารพอลิเอสเทอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ (R)-3HA ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในรูป R-Configuration ซึ่งมีความจำเพาะของสเตอริโอไอโซเมอร์ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของเอนไซม์ PHA synthase (Sudesh et al., 2000) ซึ่งในการสังเคราะห์ PHAs ชนิดต่าง ๆ จะมีเอนไซม์ PHA synthase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนโดยในการสะสมพลาสติก PHAs ในเซลล์นั้นจะมีเอนไซม์อยู่รอบ ๆ พื้นผิวของ PHA granule นอกจากนี้ยังมีโปรตีน phasin เป็นตัวควบคุมแบบจำเพาะ (specific regulator protein) ซึ่งมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พลาสติกโดยตรง ในการสังเคราะห์จะมีเอนไซม์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความหลากหลาย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยมียืนมากกว่า 60 ชนิด ที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์พลาสติกกลุ่ม PHAs ซึ่งในการสังเคราะห์พลาสติกชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตหรือเรียกกันทั่วไปว่า PHB จะเกี่ยวข้องกับตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ โดยเริ่มจากอะซิติลโคเอนไซม์เอ (acetyl-co A) ถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ (acetoacetyl-co A) และไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอนไซม์เอ (hydroxybuacetyl-co A) โดยการทำงานของเอนไซม์เบต้าคีโธไทโอเลส ( $\beta$ -ketothiolase enzyme) และเอนไซม์อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (acetoacetyl-coA reductase enzyme) จากนั้นจึงเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ไฮดรอกซีบิวทีริลโคเอนไซม์เอเปลี่ยนไปเป็นพอลิ ไฮดรอกซีบิวทีเรตโดยเอนไซม์ PHB synthase (Sudesh et al., 2000) ในกรณีที่มีปริมาณของอะซิติลโคเอนไซม์เอมากเกินไป ซึ่งจะส่งผลทำให้การสังเคราะห์ลดลง

รวมถึงสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมก็เป็นสาเหตุสำคัญต่อชนิดของ PHAs ที่สังเคราะห์ได้เช่นเดียวกัน (Luengo et al., 2003)

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

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

จากรายงานการวิจัยที่น่าสนใจเมื่อมีการเติมเอทานอลร้อยละ 1 สามารถเพิ่มผลผลิตได้ของการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยที่ผ่านการทรีตด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่าสามารถผลิต PHAs ได้ร้อยละ 54.1 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นได้ทำการปรับปรุงสูตรอาหารโดยการเติมเอทานอลร้อยละ 1 ร่วมกับการเติมแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด คือแอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรทอย่างละ 1 กรัมต่อลิตร เป็นผลทำให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 62.21 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (Gomaa, 2014) ส่วนในการผลิต PHB จากแบคทีเรีย *Vibrio spp* ที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเลจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ M11, M14, M20 และ M31

โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน และความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า สายพันธุ์ M11 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้โซเดียมอะซิเตตเข้มข้นสูงถึง 7.8 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิต PHB ได้มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 30.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนการใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสายพันธุ์ M14 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 12.3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงที่สุด คิดเป็นร้อยละ 45.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สำหรับสายพันธุ์ M20 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 15.5 กรัมต่อลิตร โดยผลิต PHB ได้สูงสุดร้อยละ 42.8 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ M31 ที่เจริญได้ดีเมื่อใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 14.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน แต่ผลิต PHB ได้ปริมาณต่ำคิดเป็นร้อยละ 24.0 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Chien, et al., 2007) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กัน มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงได้แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและแหล่งคาร์บอนที่ใช้

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

ในการผลิต PHB ของเชื้อ *Halomonas boliviensis* ได้สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 56 เมื่อใช้แป้งที่ผ่านการย่อยสลาย (starch hydrolysate) เป็นแหล่งคาร์บอน (Quillaguaman, et al., 2005) ส่วนในการ

เลี้ยง *Burkholderia megaterium* ด้วยกากน้ำตาลอ้อย พบว่าเชื้อสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับร้อยละ 46.2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงด้วยน้ำแช่ข้าวโพด (Mona, et al., 2001) และการเลี้ยง *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*) โดยใช้ไขมันพืชที่ผ่านการทอดมาเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าให้ปริมาณ PHAs ได้ใกล้เคียงกับการเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสคือ 1.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงด้วยน้ำมันบริสุทธิ์และน้ำมันที่ผ่านความร้อนซึ่งให้ปริมาณ PHAs 0.62 และ 0.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Verlinden et al. 2011) ส่วนการนำเซลลูโลสที่ผ่านการย่อยสลาย (cellulose hydrolysate) มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHA จากเชื้อ *Burkholderia cepacia* และ *Burkholderia sacchari* พบว่าสามารถ PHA ได้ปริมาณสูงร้อยละ 53 และ 62 ตามลำดับ (Silva, et al., 2004) ส่วนการศึกษาของ Mona Azza & Sanna (2001) พบว่า *B. megaterium* สามารถเจริญในกากน้ำตาลอ้อย (Cane sugar molasses) ได้ดีกว่าในน้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor) โดยสามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 46.2 ของมวลเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้นร้อยละ 2 ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Chaijumrus & Udpuay (2008) เชื้อ *B. megaterium* ATCC 6748 โดยใช้กากน้ำตาล และน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 ชั่วโมง พบว่า หลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 45 ชั่วโมง การใช้ปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 4 และน้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 4 สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุด คือ 7.2 กรัมต่อลิตร และมวลเซลล์แห้งเท่ากับ 16.74 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 43 ของมวลเซลล์แห้ง จากรายงานของ Yezza และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenas latus* ATCC 29714 ด้วยการใช้น้ำตาลเมเปิลเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมไดเอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.8 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร และธาตุอาหารรองปริมาณรวม 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 33±1 องศาเซลเซียส อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 27 ชั่วโมง พบว่ามีมวลเซลล์ 4.4±0.5 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตคิดเป็นร้อยละ 77.6±1.5 ของมวลเซลล์แห้ง

**แหล่งไนโตรเจน** จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนได้แตกต่างกันซึ่งมักอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ เช่น แบคโตเปปโตน (Bactopeptone) ยีสต์สกัด (Yeast extract) เคซีน (Casein) เนื้อสกัด (Beef extract) และทริปโตน (Tryptone) ส่วนสารประกอบอินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมไนเตรต (Ammonium nitrate) ยูเรีย (Urea) แอมโมเนียมออกซาเลต (Ammonium oxalate) และแอมโมเนียมอะซิเตต (Ammonium acetate) (Grothe et al., 1999; Khanna & Srivastava, 2005) ดังตัวอย่างเช่น Montaser และคณะ (2011) ศึกษาการเลี้ยง *Azotobacter Beijerinckii* DSMZ 1041 เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยใช้สูตรอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็น

แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.5, 1 และ 2 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การใช้กลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 6.5 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 2.95 กรัมต่อลิตร ส่วน Wang และคณะ (2013) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ATCC 29714 โดยใช้น้ำตาลหัวปีทความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.97 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่า มีมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ  $10.30 \pm 1.01$  กรัมต่อลิตร ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ  $4.01 \pm 0.95$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ  $36.66 \pm 7.28$  ของมวลเซลล์แห้งและอัตราการผลิตเท่ากับ  $0.22 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในการเลี้ยงด้วยแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนของ Grothe และคณะ (1999) ซึ่งได้ศึกษาเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรีย *A. latus* ATCC 29714 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรีย พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.4 กรัม สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 4.6 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ได้มีการศึกษาแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเปรียบเทียบกับอนินทรีย์ไนโตรเจนจากรายงานการวิจัยของ Khannafari และคณะ (2006) ได้ทำการเลี้ยง *Azotobacter chroococum* โดยใช้โปรตีนในหางนม (Milk whey) เป็นส่วนประกอบของอาหารแล้วเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แบคโตเปปโตเน เคซีน ยีสต์สกัด เนื้อสกัด โปรทีเอสเปปโตเน และทริป โตน เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ในอัตราเร็ว 122 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่า การเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นเนื้อสกัดจะผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงที่สุดในปริมาณร้อยละ 75 ของมวลเซลล์แห้ง มีรายงานวิจัยความสำคัญของสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยพบว่าการใช้จุลินทรีย์ระบบตะกอนเร่งโรงงานผลิตอาหารความเข้มข้นตะกอนเริ่มต้นเท่ากับ 3.15 กรัมต่อลิตร ซึ่งเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 500 ถึง 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 24, 96, 120, 144 และ 168 (โมลต่อโมล) ตามลำดับ พบว่า เมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น ชุดทดลองที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 144 มีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุกร้อยละ 33 (Kumar, 2004) ส่วนรายงานของ Khanna และ Srivastava (2006) ซึ่งทำการศึกษาความเหมาะสมในการเติมความเข้มข้นของไนโตรเจน และระยะเวลาของการเติม โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *R. eutropha* NRRL B14690 ในถังปฏิกรณ์ โดยทำการเติมไนโตรเจน (7 กรัมต่อลิตร) ที่อัตราการเติม 70 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 50 เชื้อ *R. eutropha* มีการผลิตมวลเซลล์ได้มากถึง 32 กรัมต่อลิตร มีปริมาณ PHB 14 กรัมต่อลิตร ดังนั้น จึงพบว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน จะทำให้ได้ปริมาณของพลาสติกแตกต่างกันด้วย

**แหล่งแร่ธาตุอาหารอื่นๆ** ในการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจะเกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ เป็นต้น พบว่า ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และซัลเฟอร์นั้นจัดเป็นแร่ธาตุหลักที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณที่มากพอ โดยเฉพาะฟอสฟอรัสและแมกนีเซียม เนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้างและการถ่ายเทพลังงานต่อจุลินทรีย์และพลังงานในเซลล์ โดยอยู่ในรูปของพอลิเมอร์ในการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น เมื่อมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปแต่มีการจำกัดปริมาณของฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอื่นๆ เพื่อให้เหมาะสมกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต เช่น รายงานการศึกษาของ Ryu และคณะ (1997) ในการเลี้ยง *A. eutrophus* ในสภาวะกึ่งกะที่มีการจำกัดปริมาณฟอสเฟต มีการควบคุมความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.8 อุณหภูมิในการหมัก 34 องศาเซลเซียส ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการศึกษาที่ความเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 2.2, 3.1, 4.3 และ 5.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นสูงขึ้นสามารถผลิตเซลล์และพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตเริ่มต้น 5.5 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณของเซลล์และพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูงสุดเท่ากับ 2.81 และ 2.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน Grothe และคณะ (1999) ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลการเติมและไม่มีการเติมธาตุอาหารเสริมต่อการเจริญและการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *A. latus* โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าการเติมธาตุอาหารเสริมที่ประกอบด้วย  $C_6H_{11}O_7FeNO_7$  6 มิลลิกรัมต่อลิตร  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  10 มิลลิกรัมต่อลิตร  $H_3BO_3$  0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร  $CoCl_2 \cdot H_2O$  0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร  $NiSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงขึ้นถึง 3.2 กรัมต่อลิตร

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

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

**การขยายขนาดเพาะเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ** ในการเพิ่มปริมาณการผลิต PHAs เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงขึ้นในถังหมัก มีปัจจัยที่สำคัญคือการควบคุมสภาวะการเลี้ยงในถังหมัก โดยการควบคุมอุณหภูมิและความเป็นกรดต่าง เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 7 จะผลิตพลาสติกชีวภาพได้ดี ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาเช่นกัน จากรายงานการศึกษาของ Grothe และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดยการเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes latus* พบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB ได้แก่ ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสหรือผันแปรได้ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม คือ 6.5 โดยมีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.075 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณ PHB ร้อยละ 63 ของน้ำหนักเซลล์แห้งนอกจากนี้พบว่าปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHB ด้วย ทั้งนี้เนื่องจากในสภาวะออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซีเตรทซินเทสและไอโซซีเตรทดีไฮโดรทีเนสจะถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิทิโคเอนไซม์เอไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอ เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยเอนไซม์เบต้าคีโตโธโอเลสจึงมีการสะสม PHB แทน (Luego et al., 2003) จากรายงานของ Tripathi และคณะ (2013) ในการเลี้ยง *Alcaligenes* sp. NCIM 5085 แบบกะ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7.5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่มีกากน้ำตาลอ้อยความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 34 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ  $11.0 \pm 0.5$  กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดเท่ากับ  $8.58 \pm 0.4$  กรัมต่อลิตร ผลผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตสูงสุดและความสามารถในการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.78 และ 0.19 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนรายงานการศึกษาของ El-sayed และคณะ (2009) เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Ralstonia eutropha* ATCC 17697 และ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงแบบกะและเติมกะ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิในถังเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ  $7 \pm 0.1$  และความเร็วของใบพัดเท่ากับ 750 รอบต่อนาที ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 100 ชั่วโมง พบว่า *R. eutropha* ATCC 17697 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 10.18 และ 0.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน *A. latus* ATCC 29714 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 8.73 และ 4.94 กรัมต่อลิตร ตามลำดับและเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร ปริมาณการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 1.2 ลิตร ซึ่งใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และเติมน้ำตาลกลูโคสในชั่วโมงที่ 25 และ 35 พบว่า *R. eutropha* ATCC 17697 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 16.32 และ 10.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน *A. latus* ATCC 29714 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้เท่ากับ 15.21 และ 8.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Park & Kim (2011) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยเชื้อ *Ralstonia eutropha* KCTC 2662 โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียม

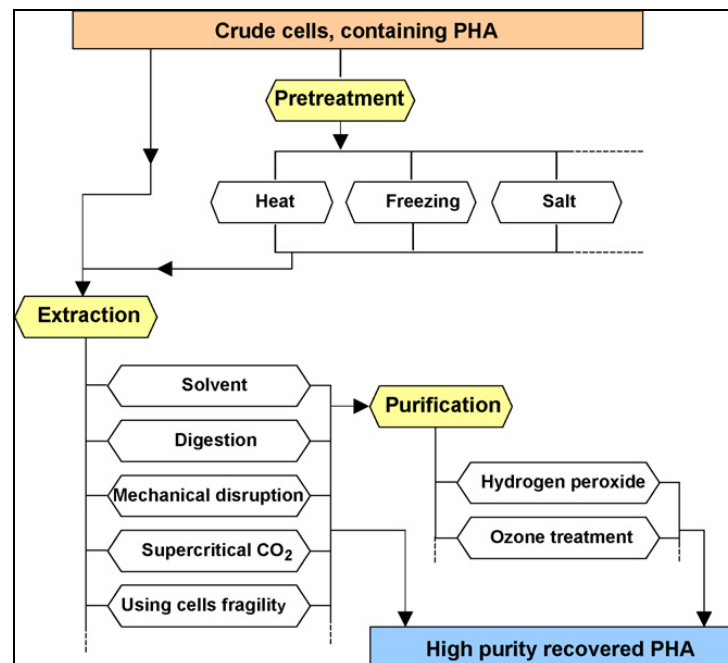


ซัลเฟตความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.8 เติมาอากาศที่ 1 vvm และปรับความเร็วของใบพัดเท่ากับ 700-1300 รอบต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 100 ชั่วโมง พบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 87 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 13 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2.5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 1 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 100 ชั่วโมง และเติมน้ำมันถั่วเหลืองในชั่วโมงที่ 18 และ 50 พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 32 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ส่วน Gahlawat and Srivastava (2013) ศึกษาการเลี้ยง *Azohydromonas australica* เพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7 ลิตร ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 33 องศาเซลเซียส และปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่า ผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.71 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 6.24 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 72 ของมวลเซลล์แห้ง และทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 2 ลิตร ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีการเติมสารอาหารตั้งแต่ชั่วโมงที่ 20-35 เป็นเวลา 15 ชั่วโมง และทำการเพาะเลี้ยงจนครบ 38 ชั่วโมง พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 29.71 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 22.65 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 76 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ผลิตได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ 3.6 เท่า ส่วน Jiang และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* A2a5 ซึ่งเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 3 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้สูตรอาหารที่มีน้ำตาลอ้อย (Sugarcane Liquor) ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และโมโนโซเดียมกลูตาเมตความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด คือ 32 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต 22 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ด้วยสูตรอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ามีมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.80 กรัมต่อลิตร และปริมาณ พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ 5.41 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 61.60 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 2.5 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 ชั่วโมงโดยเติมน้ำตาลความเข้มข้น 400 กรัมต่อลิตรตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 พบว่า สามารถผลิตมวลเซลล์

แห้งสูงสุดเท่ากับ 72.60 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเอสเตอร์ไฮดรอกซีบีวทิเรตเท่ากับ 30.50 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 42.1 ของมวลเซลล์แห้ง (Kulpreecha, et.al., 2009)

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

ในการเก็บเกี่ยวผลผลิตที่อยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย จะเก็บเกี่ยวเมื่อเซลล์เข้าสู่ในระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) โดยแยกส่วนของน้ำหมักออกจากตัวเซลล์ หลังจากนั้นนำมาเซลล์มีให้แตกเพื่อให้ผลิตภัณฑ์หรือพลาสติกถูกปลดปล่อยออกมา โดยจะมีกระบวนการเริ่มต้นจากการเตรียมตัวเซลล์ (Pretreatment) ก่อนการสกัดเช่น การทรีตด้วยความร้อน ความเย็นหรือสารละลายเกลือ ก่อนเข้าสู่กระบวนการสกัดและแยกบริสุทธิ์ (Jacquel, et al., 2008) ซึ่งมีรายงานการวิจัยการเตรียมตัวเซลล์หลายวิธีเช่น จากการศึกษาของ Kapitchkoff และคณะ (2006) ได้นำเซลล์ *R.eutropha* DSM545 ซึ่งแขวนลอยในอาหารมาทรีตด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปทำการสกัด ส่วนการศึกษาของ De Koning & Witholt (1997) ได้ทำการทรีตเซลล์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำเซลล์ *Pseudomonas* ไปทำการสกัดพอลิเมอร์นอกจากนี้พบว่ามี การใช้การทรีตด้วยความร้อนร่วมกับการใช้สารอื่นผสมด้วยเช่นกัน ในการศึกษาของ Steinbuchel (1996) ซึ่งได้ใช้ความร้อน 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ร่วมกับการใช้เอนไซม์ PHB depolymerase เพื่อย่อยพอลิเมอร์ภายในเซลล์ของ *R. eutropha* DSM545 ให้หลุดออกมา นอกจากนี้พบว่ามีการใช้ต่าง คือ



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

sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.4 กิโลกรัมต่อกิโลกรัม ในการทรีต *A. latus* เพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยโปรตีนออกมาก่อนใช้เครื่องบดให้เซลล์แตก ซึ่งให้ผลดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เกลือ sodium chloride (Khosravi-Darani et al., 2004 ; Tamer et al., 1998) ส่วนการศึกษาการใช้วิธีการแช่แข็งก่อนนำมาย่อยพบว่าสามารถช่วยย่นระยะเวลาในการย่อยด้วยสาร SDS and NaClO ได้สั้นลง (Dong, & Sun, 2000) แต่พบว่าการเตรียมเซลล์ในสภาพเยือกแข็งแห้ง (freeze-dried) ได้ถูกนำมาใช้ได้ในงานวิจัย (Hahn et al., 1994 ; Chen et al., 2001) แต่ไม่เหมาะในการขยายขนาด โดยพบว่าการใช้การแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Ghatnekar et al., 2002 ; Linget al., 1997) ซึ่งให้ผลดีกว่าการแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Tamer et al., 1998)

ขั้นตอนในการเก็บเกี่ยวไบโอพอลิเมอร์ด้วยการสกัดโดยใช้วิธีการย่อย (Digestion methods) ซึ่งแบ่งการย่อยได้เป็นการย่อยด้วยสารเคมีและการย่อยด้วยเอนไซม์ ตัวอย่างเช่นจากรายงานการศึกษาของ Kunasundari & Sudesh (2011) พบว่าวิธีได้รับความสนใจมากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลาย ทั้งนี้ในการสกัดเพื่อย่อยสลายส่วนใหญ่ เป็นการย่อยส่วนประกอบของเซลล์ที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ เพื่อปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ออกมา ส่วนการสกัดด้วยตัวทำละลายได้รับนิยมสูงในระดับห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและทำได้รวดเร็ว (Kunasundari & Sudesh, 2011) ซึ่งตัวทำละลายที่ถูกนำมาใช้งานมีหลายชนิด เช่น คลอโรฟอร์ม (chloroform), 1,2-dichloroethane (Valappil et al., 2007 ; Ramsay, et al., 1994) acetone (Elbahloul & Steinbüchel et al., 2009) 1,2 propylene carbonates และ ethylene carbonates (Fiorese et al., 2009; Lafferty & Heinzle, 1979) และการใช้ตัวทำละลายในรูปแบบ non-halogenated solvent ได้แก่ isoamy propionate, propylbutyrate, isoamyl valerat (Mantelatto et al., 2008) ในการศึกษาของ Zinn และคณะ (2003) ใช้ตัวทำละลายเมทิลคลอไรด์ (methylene chloride) ในการสกัดพอลิเมอร์ poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-co-HV) ที่ผลิตโดย *R. eutropha* สามารถให้พอลิเมอร์ที่มีความบริสุทธิ์ได้ถึงร้อยละ 98 จากนั้นเมื่อนำสารสกัดนั้นไปทำการกลั่นและตกตะกอนด้วยเมทานอลเย็นจัดก่อนนำมาตกผลึกอีกครั้ง ส่วนการสกัดด้วยสารเคมี ตัวอย่างเช่น การใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Hahn et al., 1995) การใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ร่วมกับสารลดแรงตึงผิว เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) (Ramsay, et al., 1995 ; Chen et al., 1999) การใช้สารลดแรงตึงผิว palmitoyl carnitine โดยใช้ 1mM palmitoyl carnitine ที่ละลายด้วยบัฟเฟอร์ 0.1M Tris-HCl ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่าสามารถสกัดพอลิเมอร์ *R.eutropha* และ *A. latus* ได้ร้อยละ 70 และมากกว่าร้อยละ 85 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวเพียงอย่างเดียวส่งผลทำให้คุณภาพของ PHAs ที่แยกได้บริสุทธิ์น้อยกว่าการใช้ร่วมกับไฮโปคลอไรต์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Kim et al., 2003) ส่วน Lu (2006) ได้ใช้สารโซเดียมไฮโปคลอไรต์ร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในการสกัดพลาสติกชีวภาพจาก *Cupriavidus taiwanensis* 184 ได้สูงถึงร้อยละ 94 และมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99 นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาการย่อยโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ร้อยละ 30 ร่วมกันตัวทำละลายคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1 : 1 ในการสกัด

P(3HB) จาก *R.eutropha* เพื่อแยกส่วนที่ต้องการคือ P(3HB) ละลายอยู่กับคลอโรฟอร์มและส่วนอื่น ๆ ของเซลล์จะแขวนลอยอยู่ในส่วนของโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Hahn et al., 1994 ; Hahn et al., 1993) โดยค่าที่ได้มีความบริสุทธิ์ของ P(3HB) ประมาณร้อยละ 97 เช่นเดียวกับการเก็บเกี่ยวพอลิเมอร์จาก P(3HB) จากเชื้อ *R. eutropha* หลังจากผ่านการทรีตด้วยอะลูมิเนียมและเหล็ก ก่อนนำมาย่อยต่อด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรด์และคลอโรฟอร์ม (Ryu et al., 2000)

จากการศึกษาของ Dong&Sun (2000) ในการเก็บเกี่ยว PHAs โดยการใช้ปริมาณเซลล์ 30 กรัมต่อ ลิตร นำไปทำการแช่เยือกแข็งก่อนนำมาสกัดโดยการเติมสารลดแรงตึงผิวคือ SDS ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำมาเติมสารโซเดียมไฮโปคลอไรด์ร้อยละ 30 เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ร่วมกับการใช้สารไฮโปคลอไรด์สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ ร้อยละ 86.6 และสารที่ได้มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 98 วิธีนี้มีข้อดีคือ ต้นทุนค่าใช้จ่ายต่ำและลดปัญหาการ เสื่อมสภาพของ PHAs ลงได้ ส่วนการย่อยด้วยการใช้สารคีเลต (chelate) ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวพบว่า จะช่วยให้สารพอลิเมอร์ PHAs หลุดออกมาเพิ่มขึ้น เมื่อใช้กับแบคทีเรียที่เป็นแกรมลบ คือ *R.eutropha* ซึ่งมีไอออนของแคลเซียมและแมกนีเซียมอยู่ที่ด้านนอกของเมมเบรน โดยพอลิเมอร์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง ร้อยละ 98.7 เมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวต่อเซลล์แห่งอัตราส่วน 0.12:1 และใช้เกลือ EDTA disodium ต่อ เซลล์แห่งอัตราส่วน 0.08:1 บ่มที่ค่าความเป็นกรดต่าง 13 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งมีข้อดีของการย่อยด้วยวิธีนี้คือ ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดี มีปัญหาหาเรื่องต่อสิ่งแวดล้อมน้อย แต่มี ส่วนของเหลวเหลือทิ้งที่ต้องนำเข้าสู่ระบบบำบัดสูง (Chenet al., 2001)

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

การเก็บเกี่ยวด้วยวิธีทางกล เป็นการย่อยอีกอย่างหนึ่งที่ได้รับความสนใจในการศึกษา โดยสามารถใช้วิธีการได้หลายแบบ เช่น การใช้ลูกปัดบด (Bead mill) มีปัจจัยสำคัญที่ควรทำการศึกษาก่อนนำมาใช้ งานคือ ความเข้มข้นของตัวอย่าง อัตราการใส่ตัวอย่าง ความเร็วของการหมุนของลูกปัดเป็นหลักสำคัญที่ ต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานเช่นเดียวการใช้เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Tamer, et al., 1998) จาก รายงานการใช้เครื่องอัลตราโซนิก (ultrasonic) เพื่อสกัด PHAs จากเชื้อ *Haloferax mediterranei* ได้ถูก นำเสนอโดย Hwanget al. (2006) พบว่าสามารถใช้ได้ดีในระดับห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ได้มีการใช้ หลายวิธีร่วมกันเพื่อสกัดพลาสติกออกจากเซลล์ เช่นการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงร่วมกับการใช้สารเคมีในการเก็บ เกี่ยว P(3HB) (Van Wegen et al, 1998) การใช้การเก็บเกี่ยวด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ก่อนนำมาเข้า เครื่องปั่นเหวี่ยงร่วมกับการใช้สาร sodium hypochlorite ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตที่มีความบริสุทธิ์สูง

ถึงร้อยละ 96.5 (Ling et al., 1997) รวมทั้งมีได้รายงานการใช้รังสีแกมมาที่ระดับ 5-40 กิโลเกรย์ ในการทำให้เซลล์แตกและแยกส่วนพลาสติกออกมาได้ (Divyashree & Shamala, 2008) ทั้งนี้จะเห็นได้ว่า การเก็บเกี่ยวพลาสติกชีวภาพภายในเซลล์จุลินทรีย์มีวิธีการหลากหลาย แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน (Jacquel et al., 2008)

## 2. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์พลาสติกได้เข้ามามีบทบาทต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์เป็นอันมาก โดยการนำมาใช้ในการผลิตอุปกรณ์เครื่องใช้ต่างๆ เนื่องจากมีความคงทน แข็งแรง น้ำหนักเบา ราคาถูก และสามารถปรับแต่งให้มีลักษณะตามต้องการได้ เม็ดพลาสติกที่นำมาใช้ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี สามารถนำมาผลิตได้อย่างรวดเร็วมีปริมาณมากและต้นทุนต่ำจากรายงานประมาณการการผลิตพลาสติกทั่วโลกใน 1 ปี มีการผลิตมากกว่า 100 ล้านตัน ซึ่งส่งผลเสียคือทำให้เกิดขยะพลาสติกเป็นจำนวนมาก แม้ว่าขยะพลาสติกบางส่วนสามารถนำมาแปรรูปกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่พบว่ากระบวนการในการนำกลับไปใช้ใหม่นี้ยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากยังต้องใช้พลังงานความร้อนสูงในการนำพลาสติกกลับมาใช้ใหม่ อีกทั้งในกระบวนการผลิตจะเกิดการปลดปล่อยสารพิษออกมาด้วย และขยะพลาสติกส่วนที่เหลือก็เป็นปัญหาใหญ่ในการกำจัดเพราะใช้เวลาในการย่อยสลายนาน จึงส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอันมาก โดยเฉพาะการเผาส่งผลกระทบต่อภาวะโลกร้อนเช่น ถุงพลาสติก 1 ใบ ต้องใช้เวลาย่อยสลายถึง 450 ปี หากนำไปเผาก็จะทำให้เกิดสารประกอบไฮโดรคาร์บอนเกิดมลภาวะต่อโลก ทำให้โลกร้อนขึ้นดังที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน พลาสติกชีวภาพเป็นพลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบธรรมชาติที่ได้จากการหมักน้ำตาลจากพืชด้วยจุลินทรีย์และคุณสมบัติต่างๆ ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เช่นเดียวกับพลาสติกสังเคราะห์ และในปัจจุบันได้ถูกนำมาใช้งานแทน เพื่อลดปัญหาต่างๆ ลง ทั้งนี้เนื่องจากพลาสติกชีวภาพนั้นสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบที่เป็นประเภททรัพยากรทดแทน (renewable resources) ไม่ได้ใช้แล้วหมดไปเหมือนกับปิโตรเคมี พลาสติกชีวภาพแบ่งออกได้หลายชนิด เช่น พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate, PHAs) พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB) พอลิบิวทีวซัคซิเนต (Polybutylsuccinate, PBS) และพอลิแลคไทด์ (Polylactide, PLA) เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลาสติกชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์กลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates) หรือ PHAs เป็นอะลิฟาติกพอลิเมอร์ธรรมชาติที่จุลินทรีย์ผลิตและเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์เพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำรอง โดยการผลิตจะเกิดขึ้นเมื่อสภาวะที่ไม่สมดุลของสารอาหาร (Salehizadeh & Van Loosdrecht, 2004) ปัจจุบันพลาสติกกลุ่มนี้ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ประโยชน์เป็นอันมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลาสติก PHAs ชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (poly hydroxybutyrate, PHB) และพลาสติกชนิดโคพอลิเมอร์ของพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตกับไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV) ทั้งนี้เนื่องจากมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์พอลิโพรพิลีน (polypropylene) มีความสามารถทนอุณหภูมิสูง มีจุดหลอมเหลวสูง และมีคุณสมบัติเป็นฟิล์มกั้นน้ำและความชื้นได้ดี และมีข้อดีคือสามารถย่อยสลายได้ง่าย ทำให้พลาสติกชนิด

นี้ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง ทั้งในภาคอุตสาหกรรมและนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยต่าง ๆ ทั้งทาง การแพทย์ และการเกษตร (Chien et al., 2007)

ในการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพจะเกิดขึ้นได้ง่าย เมื่อมีการจัดการให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม คือมีแบคทีเรียและเอนไซม์เข้ามาย่อยสลาย อีกทั้งไม่ทิ้งสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม จึงมี ความสำคัญในการช่วยป้องกันหรือลดอุณหภูมิของโลกและเป็นการประหยัดทรัพยากรน้ำมันและเป็น มิตรต่อสุขภาพของผู้บริโภคอีกด้วย ทั้งนี้เนื่องจากพลาสติกชีวภาพจะไม่ปล่อยสารเคมีที่เป็นพิษต่อร่างกาย ซึ่งมักก่อให้เกิดมะเร็งในระยะยาว จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้มีการนำพลาสติกชีวภาพมาใช้กันอย่าง แพร่หลายโดยเฉพาะด้านบรรจุภัณฑ์อาหาร และเพื่อใช้บรรจุสินค้าทางการเกษตร เช่นผักและผลไม้ ถุงใส่ ของ กล่องอาหาร รวมทั้งใช้เป็นแคปซูลบรรจุยา เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีปัญหาหลักคือต้นทุน ค่าใช้จ่ายสูงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นทุนพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี สำหรับประเทศ ไทยมีศักยภาพเพียงพอในการผลิตพลาสติกชีวภาพ เนื่องจากมีแหล่งวัตถุดิบมากมายและมีราคาถูก แหล่ง วัตถุดิบดังกล่าวอาจได้รับมาจากภาคเกษตรและภาค อุตสาหกรรมเกษตรหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้เป็น สารตั้งต้น เพื่อการผลิตพลาสติกได้ ได้แก่ มันสำปะหลัง อ้อย ปาล์ม หรือของเหลือทิ้งจากโรงงาน อุตสาหกรรม เช่น กากมันสำปะหลัง กากชานอ้อย กากปาล์ม และส่วนเหลือทิ้งจากขยะชุมชน น้ำมันที่ เหลือทิ้งจากการทอด เป็นต้น ซึ่งเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรม เกษตรที่มีอยู่ในประเทศ และการลดปริมาณการนำเข้าวัตถุดิบเพื่อใช้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพจาก ต่างประเทศลง อีกทั้งเป็นการสร้างเทคโนโลยีที่เกิดขึ้นเองภายในประเทศเพื่อเป็นทางเลือกที่สำคัญในการ ปรับเปลี่ยนโครงสร้างอุตสาหกรรมพลาสติกสังเคราะห์เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพ ซึ่งจะส่งผล ต่ออุตสาหกรรมภายในประเทศอีกด้วย ตัวอย่างเช่น อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ อุตสาหกรรมเส้นใยสิ่งทอ อุตสาหกรรมยานยนต์ อุตสาหกรรมพลาสติก ชิ้นส่วนอุปกรณ์ไฟฟ้า และบรรจุภัณฑ์ต่าง ๆ เป็นต้น

สำหรับในการวิจัยครั้งนี้จะมุ่งเน้นการต่อยอดงานวิจัยการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. ที่ถูก ปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการกลายและกลายซ้ำ ทำให้ปริมาณของพลาสติกในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (Poly hydroxyalkanoate, PHAs) เพิ่มสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม โดยเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำสามารถผลิต PHB คิดเป็น 3.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์เดิมที่ให้ผลผลิต 0.60 กรัมต่อลิตร และเมื่อพัฒนา ความสามารถสุตรอาหารแล้วพบว่าสามารถผลิต PHB ได้เพิ่มสูงขึ้นถึง 9.73 กรัมต่อลิตร แต่เนื่องจากการ พัฒนาเบื้องต้นยังใช้สารอาหารบางส่วนที่มีราคาสูงมาก ควรมีการพัฒนาสภาวะในการเลี้ยงด้วยสารอาหาร ราคาถูกและการเก็บเกี่ยวที่ส่งผลดีทั้งคุณภาพและปริมาณในขั้นตอนต่อไป รวมทั้งสนใจในการพัฒนาการ สังเคราะห์พลาสติกชีวภาพทั้งชนิดโฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์ คือ พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต(polyhydro xybutyrate, PHB) หรือ P(3HB) และพลาสติกชนิดโคพอลิเมอร์ของพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตกับไฮดรอกซีวา เลอเรต (poly-3-hydroxybuty rate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่ได้รับความ นิยมสูงในปัจจุบัน เนื่องจากทนต่อความร้อนได้ดี และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่สังเคราะห์จาก ปิโตรเคมีมุ่งเน้นในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงด้วยสารอาหารราคาถูกได้แก่ กลุ่มแป้ง กลุ่ม

น้ำตาล กลุ่มน้ำมัน วัสดุเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมต่าง ๆ และสิ่งสำคัญคือการปรับสารเสริมการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพของแบคทีเรีย ได้แก่ สาร precursor กรดอะมิโน กรดไขมัน และแร่ธาตุต่างๆ เพื่อส่งเสริมให้จุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์ที่ต้องการได้สูงขึ้นทำการศึกษาวิจัยการควบคุมสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตชนิดของพลาสติกที่ต้องการ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง การให้อากาศ และชนิดของการเลี้ยงในถังหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง ตลอดจนสิ่งที่สำคัญคือการศึกษาวิธีการเก็บเกี่ยวการสกัดและการแยกบริสุทธิ์ เพื่อให้ได้ทั้งผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี

### 3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อพัฒนาแหล่งของสารอาหาร สารอาหารเสริม precursor กรดอะมิโน กรดไขมัน และแร่ธาตุที่มีผลต่อการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพชนิดไฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์ของแบคทีเรียที่ผ่านการกลาย
- 2) เพื่อพัฒนาการเก็บเกี่ยวเริ่มตั้งแต่การเตรียมเซลล์วิธีการสกัด และการแยกบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีมีปริมาณสูง
- 3) เพื่อปรับปรุงสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตถังหมัก เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช การให้อากาศ และชนิดของการเลี้ยงในถังหมักแบบกะ (batch fermentation)

### 4. กรอบแนวความคิดในการต่อยอดงานวิจัย

ในการต่อยอดงานวิจัยในเรื่องของแหล่งสารอาหารและสารอาหารเสริมต่างๆ การควบคุมสภาวะการเลี้ยงและวิธีการเก็บเกี่ยวผลผลิตที่เหมาะสมต่อไป โดยได้วางกรอบวิจัยดังนี้ คือ

- 1) การพัฒนาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีราคาถูกต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพของแบคทีเรียที่ได้จากการกลายซ้ำโดยจะให้ความสำคัญกับการศึกษาแหล่งคาร์บอนกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่มแป้งมันสำปะหลังและกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย ทั้งในรูปเด็กตริน และน้ำเชื่อม กลุ่มของกากน้ำตาล น้ำตาลที่ผ่านการทรีตด้วยวิธีต่าง ๆ และกลุ่มของน้ำมันและน้ำมันที่ผ่านการใช้แล้ว น้ำมันที่พบทั่วไปในท้องตลาด น้ำมันที่เหลือจากการทอดและน้ำมันที่เหลือจากอุตสาหกรรมต่างๆ ตัวอย่าง เช่น อุตสาหกรรมน้ำมันพืช อุตสาหกรรมผลิตอาหาร อุตสาหกรรมพลาสต์ เป็นต้น ชนิดและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนทั้งในรูปอินทรีย์สารและอนินทรีย์สาร ผลของสารเสริมต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสังเคราะห์พลาสติก เช่น สาร precursor วิตามิน เอทานอล กรดไขมัน กรดอะมิโน และแร่ธาตุที่ต้องการปริมาณน้อยบางชนิด ที่ส่งผลต่อการสร้างชนิดของพอลิเมอร์ของเซลล์จุลินทรีย์
- 2) การพัฒนาวิธีการเก็บเกี่ยวผลผลิตเริ่มต้นจากการเตรียมเซลล์ การสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ และการแยกบริสุทธิ์ เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี พร้อมทั้งตรวจสอบชนิดและปริมาณของพลาสติก PHAs ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นด้วยการใช้ GCMS และการตรวจสอบรูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั้งชนิด TEM และ SEM
- 3) การพัฒนาสภาวะอื่นๆ ที่มีผลต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการกลาย ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าพีเอช ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ปริมาณออกซิเจน เป็นต้น เมื่อเลี้ยงในถังหมักทั้งในสภาวะกะ

(batch fermentation) คำนวณผลของการผลิตได้แก่ ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ ปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

## 5.ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

การดำเนินงานวิจัยตามโครงการวิจัยที่เสนอนี้คาดว่าจะมีศักยภาพในการอำนวยความสะดวกด้านต่างๆ ดังนี้

- 1) การสร้างองค์ความรู้เพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาการใช้สารอาหารเพื่อสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพของจุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณสูง โดยสามารถเผยแพร่องค์ความรู้ในวารสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้อง และการเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการภายในประเทศ
- 2) ประโยชน์ด้านการบริการความรู้แก่ประชาชน การบริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ
- 3) ประโยชน์ด้านการพัฒนาการเรียนการสอนสำหรับนิสิต นักศึกษาที่กำลังศึกษาด้านวิทยาศาสตร์
- 4) ประโยชน์ด้านการสร้างและพัฒนานักวิจัย ผ่านกระบวนการฝึกหัดทำวิจัยในรายวิชาปัญหาพิเศษสำหรับนิสิตปริญญาตรีและการทำวิจัยประกอบวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตบัณฑิตศึกษา



## บทที่ 2

### การดำเนินการวิจัย

#### รายละเอียดในการดำเนินการวิจัย

##### 1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 *Alcaligene latus* TISTR 1403 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

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

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

##### 2. วัสดุและอุปกรณ์

2.1 เครื่องชั่ง METTLER รุ่น AE 200 และ OHAUS รุ่น Adventurer

2.2 กล้องจุลทรรศน์ Olympus รุ่น CH-2

2.3 เครื่อง Vortex Heidolph รุ่น REAX 2000 และรุ่น CERTOMAT

2.4 เครื่อง Hot plate รุ่น VELP scientific

2.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง HERMLE รุ่น z 323 k

2.6 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง SHIMADZU รุ่น UV-1601 UV-visible spectrophotometer

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

2.8 หม้อนึ่งความดันไอ HIRAYAMA รุ่น HA-300 MII

2.9 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ SHEL LAB รุ่น Sheldon manufacturing Model 1265 และรุ่น YCW-4M

2.10 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ SHEL LAB รุ่น Sheldon manufacturing Inc. Model 1925

2.11 เครื่อง Sonicator Cole-Parmer รุ่น 8893

2.12 เครื่อง dispenser BioHT Roline prosenser

2.13 ปิเปตดูดสารปริมาณน้อย รุ่น BiOHIT ขนาด 20-200  $\mu$ L และ 100-1000  $\mu$ L

- 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 คอลัมน์ HP-5 ความยาว 30 เมตร หนา 0.32 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร
- 2.20 หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
- 2.21 ปิเปต (Pipette) ขนาด 10 มิลลิลิตร
- 2.22 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 25 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร
- 2.23 เครื่องเขย่า (Shaker) NB-101M

### 3. สารเคมี

- 3.1  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  บริษัท Ajax Laboratory Chemicals
- 3.2  $(\text{NH}_4\text{NO}_3)$  บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.
- 3.3  $(\text{NH}_4\text{Cl})$  บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.
- 3.4  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.
- 3.5  $(\text{KH}_2\text{PO}_4)$  บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.
- 3.6  $(\text{K}_2\text{HPO}_4)$  บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.
- 3.7  $(\text{NaHCO}_3)$  บริษัท QRëC™
- 3.8  $(\text{Na}_2\text{HPO}_4)$  บริษัท QRëC™
- 3.9  $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$  บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.
- 3.10  $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$  บริษัท QRëC®
- 3.11  $(\text{CaCl}_2)$  บริษัท อินเตอร์เอ็ดดูเคชั่น ซัพพลายส์ จำกัด
- 3.12  $(\text{H}_3\text{BO}_3)$  บริษัท QRëC™
- 3.13  $(\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$  บริษัท APS Finechem
- 3.14  $(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$  บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.
- 3.15  $(\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$  บริษัท Ajax Laboratory Chemicals
- 3.16  $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$  บริษัท Ajax Laboratory Chemicals
- 3.17  $(\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$  บริษัท Ajax Chemicals
- 3.18  $(\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$  บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

- 3.19 (NiSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.
- 3.20 (CuCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O) บริษัท QRëC®
- 3.21 คอปเปอร์ซัลเฟต 5 ไฮเดรต (CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O) บริษัท Ajax Chemicals
- 3.22 เฟอร์รัสคลอไรด์ไฮเดรต (FeCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O) บริษัท APS Finechem
- 3.23 เฟอร์รัสซัลเฟต 7 ไฮเดรต (FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) ) บริษัท QRëC®
- 3.24 เฟอร์ริกซิเตรท (Ferric citrate) บริษัท Fluka
- 3.25 โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) บริษัท FARMITALIA CARLO ERBA
- 3.26 โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรท (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> · 4H<sub>2</sub>O) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.
- 3.27 โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl)
- 3.28 Tween 80
- 3.29 น้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.
- 3.30 น้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil) ยี่ห้อฮงุ่น บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด
- 3.31 น้ำมันปาล์ม (Palm oil) ยี่ห้อหยก บริษัท สหอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม จำกัด (มหาชน)
- 3.32 น้ำมันข้าวโพด (Corn oil) ยี่ห้อฮงุ่น บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด
- 3.33 น้ำมันทานตะวัน (Sunflower oil) ยี่ห้อฮงุ่น บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด
- 3.34 น้ำมันรำข้าว (Rice Barn Oil) ยี่ห้อคิง บริษัท น้ำมันปริโภคไทย จำกัด
- 3.35 ผงชูรส ยี่ห้อ ถ้วยแดง บริษัท อายิโนะโมะไตะ
- 3.36 แกมม่า-บิวทาโรแลกโตน บริษัท Aldrich
- 3.37 1,4-บิวเทนไดออล บริษัท Sigma-Aldrich
- 3.38 กรดวาเลอริก บริษัท Aldrich
- 3.39 โพรพิโอเนต บริษัท Aldrich
- 3.40 อะซิเตท บริษัท Aldrich

#### 4. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 DSMZ catalogue (1993)
- 4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ดัดแปลงมาจาก DSMZ Catalogue (1993)
- 4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 Park and Kim (2011)

## วิธีดำเนินการวิจัย

### การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น

ทำการกระตุ้นเชื้อแบคทีเรีย *A. latus* ทุกสายพันธุ์ที่ทำการศึกษา ซึ่งเชื้อทั้งหมดจะถูกที่เก็บรักษาบนอาหารวุ้นเยียง Nutrient agar (NA) จำนวน 2-3 ครั้ง จากนั้นนำเชื้อที่ได้ใส่ลงในอาหารเหลว Nutrient-rich medium ซึ่งประกอบด้วยเปปโตน (Peptone) 10 กรัมต่อลิตร, ยีสต์สกัด (yeast extract) 5 กรัมต่อลิตร และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5 กรัมต่อลิตร ที่บรรจุขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน  $1 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้นร้อยละ 7 ในทุกการทดลอง

### ส่วนที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการศึกษาเบื้องต้นได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 และสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายโดยให้ชื่อว่าสายพันธุ์ BOT I โดยเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น และนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยการนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมทั้งหาน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณของสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยได้ศึกษาดังนี้

#### 1.1 การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

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

#### 1.2 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

คัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 6.3.1 จากนั้นใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยปรับความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10, 20, 40

และ 60 กรัมต่อลิตร แล้วนำมาเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

### 1.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

คัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 1.1 และความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดจาก ข้อ 1.2 จากนั้นทำการปรับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นทั้งหมด 3 ชุด คือ 1. ความเข้มข้นน้ำตาลฟรุกโตส 40 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร 2. ความเข้มข้นน้ำตาล ฟรุกโตส 40 กรัมต่อลิตรและผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร 3. น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรและผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำชุดที่ 3 มาเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเปรียบเทียบหาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของอาหารของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา

องค์ประกอบของสูตรอาหาร	สูตรที่ 1 (DSMZ catalogue, 1993)	สูตรที่ 2 (ดัดแปลง DSMZ catalogue, 1993)	สูตรที่ 3 (Park & Kim, 2011)
Fructose (g/ L)	20	-	-
Soybean oil (g/ L)	-	20	20
CaCl <sub>2</sub> (g/ L)	0.001	0.001	-
Ferric citrate (g/ L)	0.005	0.005	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/ L)	2.3	2.3	1.5
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O (g/ L)	0.5	0.5	0.2
NaHCO <sub>3</sub> (g/ L)	0.5	0.5	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/ L)	2.3	2.3	9
NH <sub>4</sub> Cl (g/ L)	0.5	0.5	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/ L)	-	-	1
Tween 80 (ml)	-	1	1
Trace element (ml/ L)	5	5	10

#### 1.4 การศึกษาความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

คัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 1.1 และความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 1.2 ทำการเลี้ยงเชื้อโดยปรับความเข้มข้นของผงชูรส (อานีโนะโมะไตอะ) เริ่มต้นเท่ากับ 0.5, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

#### 1.5 การศึกษาอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

คัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 1.1 ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 1.2 และความเข้มข้นผงชูรสที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 1.4 ทำการเลี้ยงเชื้อโดยปรับอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2, 0.25:2, 0.10:2, 0.5:1, 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสม

### ส่วนที่ 2 การศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากผลการศึกษางานวิจัย 2559 ซึ่งได้ศึกษาในเชื้อ *A. latus* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ BOT I และ TISTR 1403 ได้ประสบกับปัญหา เชื้อมีความอ่อนแอและปนเปื้อน จึงทำการทรีตเชื้อขึ้นมาใหม่ นอกจากนี้ได้ทำการกลายซ้ำเชื้อเพิ่มเติม พบเชื้อที่น่าสนใจอีก 1 สายพันธุ์ คือ *A. latus* BOT II จึงนำมาทำการศึกษาเพิ่มเติมร่วมกันอีกครั้ง เพื่อเปรียบเทียบร่วมกับสายพันธุ์ใหม่ โดยทำการศึกษาดังนี้

#### 2.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสูตรอาหารสำหรับผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต 3 สูตรที่แตกต่างกัน ได้แก่ อาหารดัดแปลงจาก DSMZ catalogue (1993), อาหารที่ใช้ น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยการดัดแปลงสูตรอาหารของ DSMZ catalogue (1993) และสูตรอาหารของ Park and Kim (2011) เพื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ดังแสดงในตารางที่ 3

## 2.2 การศึกษาการใช้ไขมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

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

## 2.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจาก ข้อ 2.1.2 จากนั้นทำการปรับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นทั้งหมด 3 ชุด ดังแสดงในตารางที่ 4 และเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ตารางที่ 4 องค์ประกอบแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารดัดแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา

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

## 2.4 การศึกษาความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

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

## 2.5 การศึกษาอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด ที่ได้จากข้อ 2.4 จากนั้นทำการปรับอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2, 0.25:2, 0.10:2, 0.5:1, 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 อัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสในอาหารดัดแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร

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

## ส่วนที่ 3 การศึกษาการเติมสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

### 3.1 การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

ทำการคัดเลือกอาหารเลี้ยงของเชื้อ *A. latus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด จากส่วนที่ 2 ข้อ 2.5 มาทำการเปรียบเทียบชนิดของสารกระตุ้นให้เกิดการสร้าง 3 ชนิด คือ แกมมา-บิวทาโรแลกโตน ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ดัดแปลงจากวิธีของ Park and Kim (2011) 1,4-บิวเทนไดออล ปริมาณร้อยละ 25 ของแหล่งคาร์บอน ดัดแปลงจาก Chanprateep et al. (2010) และกรดวาเลอริก ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ดัดแปลงจาก Chanprateep and Kulpreecha (2006) เพื่อเปรียบเทียบสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ที่เหมาะสม

### 3.2 การศึกษาเปรียบเทียบน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกสารกระตุ้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์สูงสุดจากข้อ 3.1 โดยทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงในน้ำมันชนิดต่าง ๆ ทั้ง 5 ชนิด คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวโพด น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันรำข้าวที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์



### 3.3 การศึกษาการใช้ไขมันปาล์มร่วมกับสารกระตุ้นความเข้มข้นต่าง ๆ ให้เกิดการสร้างที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์

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

### 3.4 การศึกษาการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนประเภทน้ำตาลร่วมกับสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II โดยปรับแหล่งคาร์บอนเป็นเด็กซ์โตรส น้ำตาลที่ผ่านการย่อยจากแป้ง และฟรุคโตสความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมสารโพธิ์ไอออนิกและอะซิเตท ปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร โดยอะซิเตทและโพธิ์ไอออนิกมีปริมาณ 28.75 และ 1.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ Reddy et al. (2016) เพื่อเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนประเภทน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการสร้างโคพอลิเมอร์

## ส่วนที่ 4 การศึกษาวิธีการตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ทำโดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักลงหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง และเก็บตะกอนเซลล์แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการตรวจสอบหาปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

### 4.1 การศึกษาวิธีการตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

#### 4.1.1 การสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม (ดัดแปลงจาก Rawte และ Mavinkurve, 2002)

นำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยใช้อัตราส่วนของคลอโรฟอร์มต่อตัวอย่างน้ำหมักที่ 1: 1 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการกรองเพื่อเก็บส่วนคลอโรฟอร์มมาตกตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์เย็น 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และเก็บส่วนตะกอนไปล้างด้วยอะซิโตน 1 มิลลิลิตร จากนั้นละลายตะกอนในคลอโรฟอร์มอุ่น แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนคลอโรฟอร์มระเหยออกหมด เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ดัดแปลงจาก Nabila และ Veena, 2016) โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม มาทำการเติมกรด

ซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้กรดโครโทนิค (Crotonic acid) ที่ทราบความเข้มข้นเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) โดยมีการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ดังนี้

#### 4.1.2 อัตราส่วนที่เหมาะสมของคลอโรฟอร์มที่ใช้ในการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม

นำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยใช้อัตราส่วนของคลอโรฟอร์มต่อตัวอย่างน้ำหมักที่อัตราส่วนต่างๆ คือ 0.5: 1, 1: 1 และ 2: 1 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการกรองเพื่อเก็บส่วนคลอโรฟอร์มมาตกตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์เย็น 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างตะกอนด้วยอะซิโตน 1 มิลลิลิตร จากนั้นละลายตะกอนด้วยคลอโรฟอร์มอุ่น แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนคลอโรฟอร์มระเหยออกหมด เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ดัดแปลงจาก Nabila และ Veena, 2016)

#### 4.1.3 อัตราส่วนกรดซัลฟิวริกที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มในอัตราส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 4.1.1 มาทำการเติมกรดซัลฟิวริกที่อัตราส่วนของกรดต่อตัวอย่างที่แตกต่างกัน คือ 1: 1, 2.5: 1, 5:1, 7.5: 1 และ 10: 1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้กรดโครโทนิค (Crotonic acid) ที่ทราบความเข้มข้นเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

#### 4.2 การสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ (ดัดแปลงจาก Rawte & Mavinkurve, 2002)

นำตะกอนเซลล์มาทำการเติมโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการล้างตะกอนด้วยการเติมไดเอทิลอีเทอร์เย็น 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อนำตะกอนไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ดัดแปลงจาก Nabila และ Veena, 2016) โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ มาทำการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเทียบกับ

กราฟมาตรฐาน โดยใช้กรดโครโตนิก (Crotonic acid) ที่ทราบความเข้มข้นเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) โดยมีการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ดังนี้

#### 4.2.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์

นำตะกอนเซลล์มาทำการเติมโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการล้างตะกอนด้วยการเติมไดเอทิลอีเทอร์เย็น 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที เพื่อนำตะกอนไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ดัดแปลงจาก Nabila & Veena, 2016)

#### 4.2.2 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์

นำตะกอนเซลล์มาทำการเติมโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัด จากข้อ 5.4.2.1 ที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ ที่เวลา 5, 10, 20 และ 30 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการล้างตะกอนด้วยการเติมไดเอทิลอีเทอร์เย็น 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที เพื่อนำตะกอนไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ดัดแปลงจาก Nabila & Veena, 2016)

#### 4.2.3 อัตราส่วนกรดซัลฟูริกที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการสกัดที่เหมาะสมจากข้อ 5.4.2.2 มาทำการเติมกรดซัลฟูริกที่อัตราส่วนต่อตัวอย่างที่แตกต่างกัน คือ 1: 1, 2.5: 1, 5: 1, 7.5: 1 และ 10: 1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้กรดโครโตนิก (Crotonic acid) ที่ทราบความเข้มข้นเป็นสารมาตรฐาน

## ส่วนที่ 5 การศึกษาการขยายขนาดการผลิตการเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ (Batch Culture)

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

## ส่วนที่ 6 การศึกษาลักษณะพื้นฐานของแบคทีเรีย

### 6.1 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาดึ่งน้ำออกจากเซลล์ (Dehydrate) โดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) แล้วนำตัวอย่างไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical point drying) ติดตัวอย่างลงบน Stub แล้วเคลือบด้วยทอง (ดัดแปลงจากวิธีของ Nunoy et al., 2011) จากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น LEO 1450 VP บริษัท LEO (ภาพที่ 2)

### 6.2 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

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



ภาพที่ 2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น LEO 1450 VP บริษัท LEO



ภาพที่ 3 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน รุ่น TECNAI 20 บริษัท Philips

### ส่วนที่ 7 การตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต

การตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ทำโดยนำตัวอย่างไประเหยแห้ง (Freeze dry) จากนั้นนำเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัม ละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสาร esterification fluid 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยกรดเบนโซอิก 0.025 กรัม เมทานอล ปริมาตร 242 มิลลิลิตร และกรดซัลฟูริก เข้มข้นร้อยละ 95-98 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่น

ปราศจากไอออนปริมาณ 1 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันและเก็บตัวอย่างที่เกิดจากการแยกชั้น โดยนำส่วนของคลอโรฟอร์มที่มี  $\beta$ -hydroxymethyl ester ละลายอยู่ นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (gas chromatography-mass spectrophotometry, GC-MS)

สถานะของแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatograph) จะควบคุมโดยใช้อุณหภูมินำเข้าไปที่ 250 องศาเซลเซียส กำหนดให้อุณหภูมิของ Oven เริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 70 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการเพิ่ม 5 องศาเซลเซียสต่อนาทีและอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นเป็น 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 คอลัมน์ที่ใช้คือ HP-5MS, ความยาวเท่ากับ 30 เมตร ความหนาเท่ากับ 0.25 ไมโครเมตรและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.25 มิลลิเมตร

สถานะของ Mass Spectrometer ควบคุมโดยใช้ ระบบ Electron Ionization: Acquisition mode; Sim mode ใช้ Detector ชนิด MDS, Scan mass : 30-400 amu

สารมาตรฐานใช้สาร PHBV Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) , natural origin ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทมัลติแบกซ์ มหาชน จำกัด

ในการวิเคราะห์กำหนดระบบการฉีดสารตัวอย่างแบบ Splitless ใช้ปริมาตรสารตัวอย่าง 0.2 ไมโครลิตร

## วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ข้อมูลในแต่ละการศึกษา จะทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยแต่ละชุดของการทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

### 1. วัดการเจริญของเซลล์

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

ค่าการดูดกลืนแสง = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร  $\times$  อัตราการเจือจาง

## 2. น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (Cell Dry Weight, CDW)

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

น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง = น้ำหนักหลอดที่มีส่วนของตะกอน - น้ำหนักหลอดเปล่า (กรัมต่อลิตร)

## 3. วิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธี Gravimetric method (Grotheและคณะ, 1999)

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

ปริมาณของ PHA = น้ำหนักหลอดที่มีส่วนของตะกอน - น้ำหนักหลอดเปล่า (กรัมต่อลิตร)

## 4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ DNS assay (Miller, 1959)

(ภาคผนวก)

## 5. การคำนวณจลนพลศาสตร์ของการผลิต (กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์, 2557)

นำค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ที่ได้จากการศึกษามาคำนวณหาค่าดัชนีจลนพลศาสตร์ คือ สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร ( $Y_{x/s}$ ) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร ( $Y_{p/s}$ ) สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากเซลล์ ( $Y_{p/x}$ ) และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ ( $Q_p$ )

1. สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร ( $Y_{x/s}$ ) มีหน่วยเป็นกรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร

$$(Y_{x/s}) = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

2. สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร ( $Y_{p/s}$ ) มีหน่วยเป็นกรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร

$$(Y_{p/s}) = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

3. สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากเซลล์ มีหน่วยเป็นกรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์

$$(Y_{p/x}) = \frac{P - P_0}{X - X_0}$$

4. อัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

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

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)



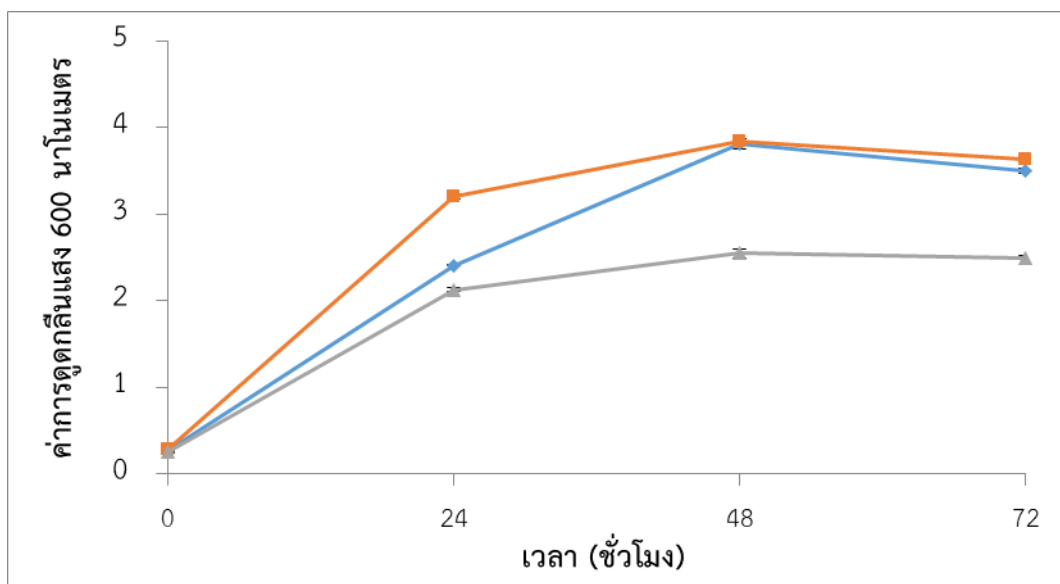
## ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ในการทำงานวิจัยในปี 2559 ได้ทำการทดลองโดยใช้เชื้อ 2 สายพันธุ์ คือ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 และ *Alcaligenes latus* BOT I TISTR 1403 ในการวิจัย โดยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารอาหารต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยมีผลการวิจัยในส่วนของ

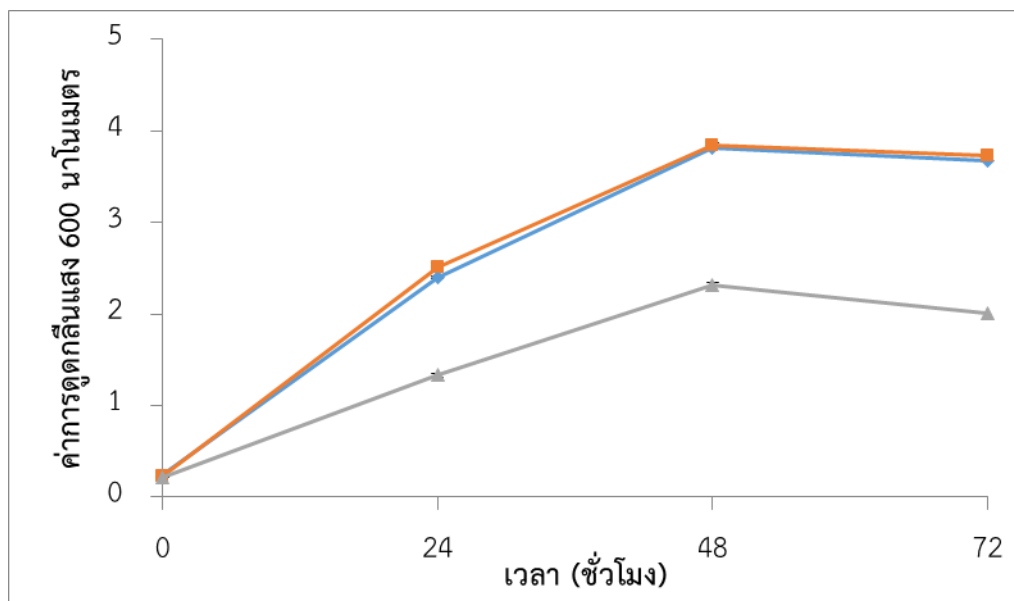
### ส่วนที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

#### 1.1 การคัดเลือกสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *A. latus* BOT I และ *A. latus* TISTR 1403 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร ได้แก่ อาหารสูตรที่ 1 DSMZ catalogue และคณะ (1993) อาหารสูตรที่ 2 ดัดแปลงจาก DSMZ catalogue และคณะ (2009) อาหารสูตรที่ 3 Park and Kim (2011) โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายและเชื้อสายพันธุ์เดิมมีอัตราการเจริญสูงสุดที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้อาหารสูตรที่ 1 และอาหารสูตรที่ 2 รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 3 ดังแสดงในภาพที่ 4 และภาพที่ 5



ภาพที่ 4 การเจริญของเซลล์จากเชื้อ *A. Latus* BOT I ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ดังนี้ คืออาหารสูตรที่ 1 (—◆—) อาหารสูตรที่ 2 (—■—) อาหารสูตรที่ 3 (—▲—)

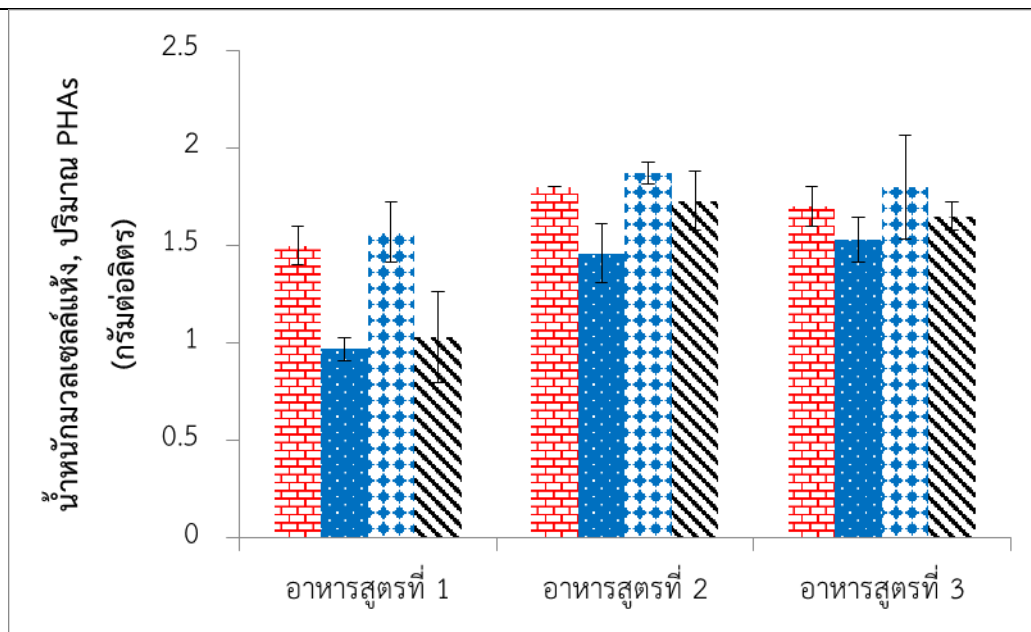


ภาพที่ 5 การเจริญของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403 ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ดังนี้ คือ อาหารสูตรที่ 1 (◆) อาหารสูตรที่ 2 (■) อาหารสูตรที่ 3 (▲)

ในการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่แตกต่างกันพบว่าเชื้อสายพันธุ์ BOT I สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 มีค่าเท่ากับ 1.73 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 1.87 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 92.51 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้งที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง แต่เชื้อสายพันธุ์ TISTR 1403 สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 มีค่าเท่ากับ 1.53 กรัมต่อลิตร ผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 1.70 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 90.00 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากในสูตรที่ 2 เป็นการดัดแปลงจากสูตรอาหาร DSMZ โดยดัดแปลงแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลฟรุกโตสเป็นน้ำมันถั่วเหลือง จึงให้พลังงานสูงกว่าในอาหารสูตรที่ 1 ที่ใช้น้ำตาล และอาหารสูตรที่ 2 มีการใช้ทวิน 80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว ทำให้จุลินทรีย์ได้รับสารอาหารได้ดีมากขึ้น และยังคงมีสารอาหารที่ต้องการปริมาณน้อย (Micronutrients) ครบถ้วนและมีปริมาณสารอาหารดังกล่าวสูงกว่าในสูตรที่ 3 ที่มีส่วนประกอบของสารอาหารน้อยชนิดกว่า (ตารางที่ 2) ส่วนในอาหารสูตรที่ 1 พบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและมวลเซลล์แห้งที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 6 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 6 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละปริมาณ การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ของ *A. latus* BOT I และ *A. Latus* TISTR 1403 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ร้อยละ)	
	<i>A. latus</i> TISTR 1403	<i>A. latus</i> BOT I	<i>A. latus</i> TISTR 1403	<i>A. latus</i> BOT I	<i>A. latus</i> TISTR 1403	<i>A. latus</i> BOT I
	อาหารสูตรที่ 1	1.50±0.10	1.57±0.15	0.97±0.06	1.03±0.23	64.66
อาหารสูตรที่ 2	1.80±0.00	1.87±0.06	1.46±0.15	1.73±0.15	81.11	92.51
อาหารสูตรที่ 3	1.70±0.10	1.80±0.26	1.53±0.12	1.65±0.07	90.00	91.67

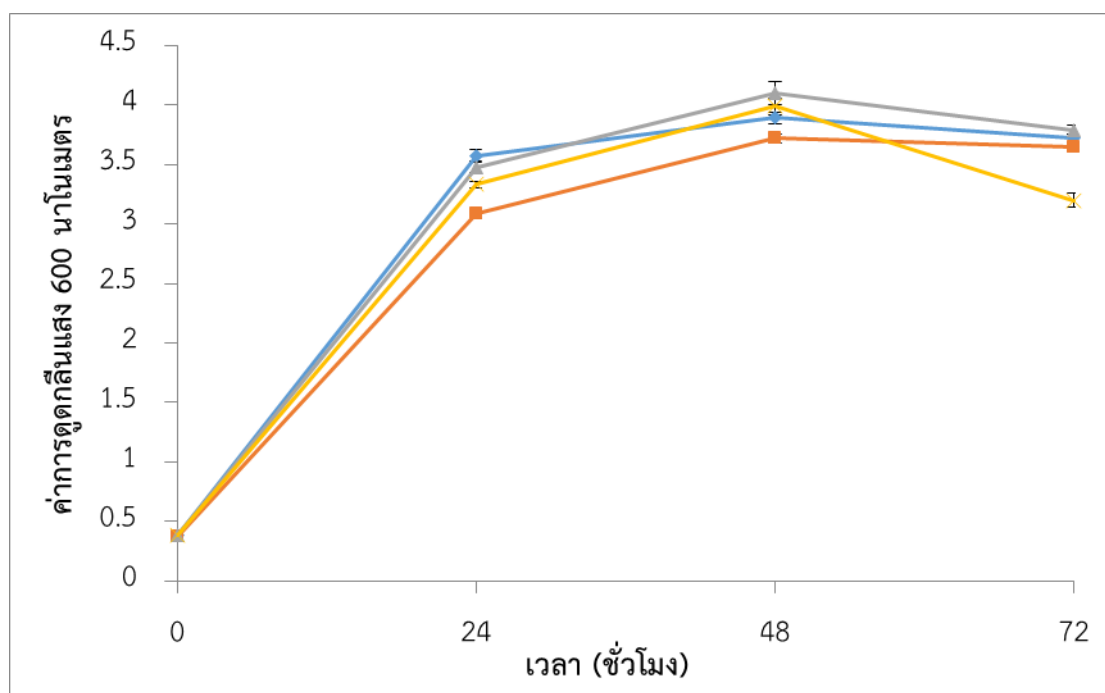


ภาพที่ 6 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน โดยที่

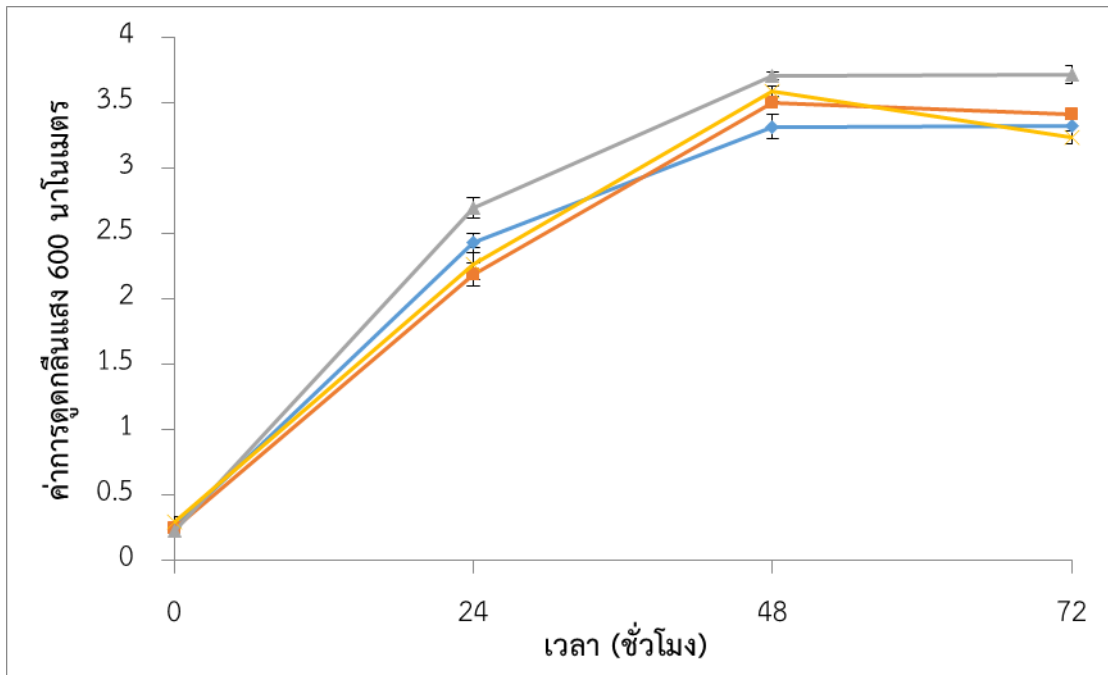
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403
- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* BOT I
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* BOT I

## 1.2 ผลของการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Alcaligenes latus* BOT I และ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ (สูตรที่ 2) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ให้ผลผลิตสูงสุดจากข้อ 4.1 จากนั้นเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 10, 20, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลง DSMZ ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 20 กรัมต่อลิตรเป็นชุดควบคุม ปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเท่ากับ 7.0 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการเจริญได้ดีในแหล่งคาร์บอนชนิดน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 60, 20 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 7 และภาพที่ 8



ภาพที่ 7 การเจริญของเชื้อ *A. Latus* BOT I เลี้ยงด้วยน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ ชุดควบคุม 20 กรัมต่อลิตร (◆) 10 กรัมต่อลิตร (■) 40 กรัมต่อลิตร (▲) และ 60 กรัมต่อลิตร (✕)



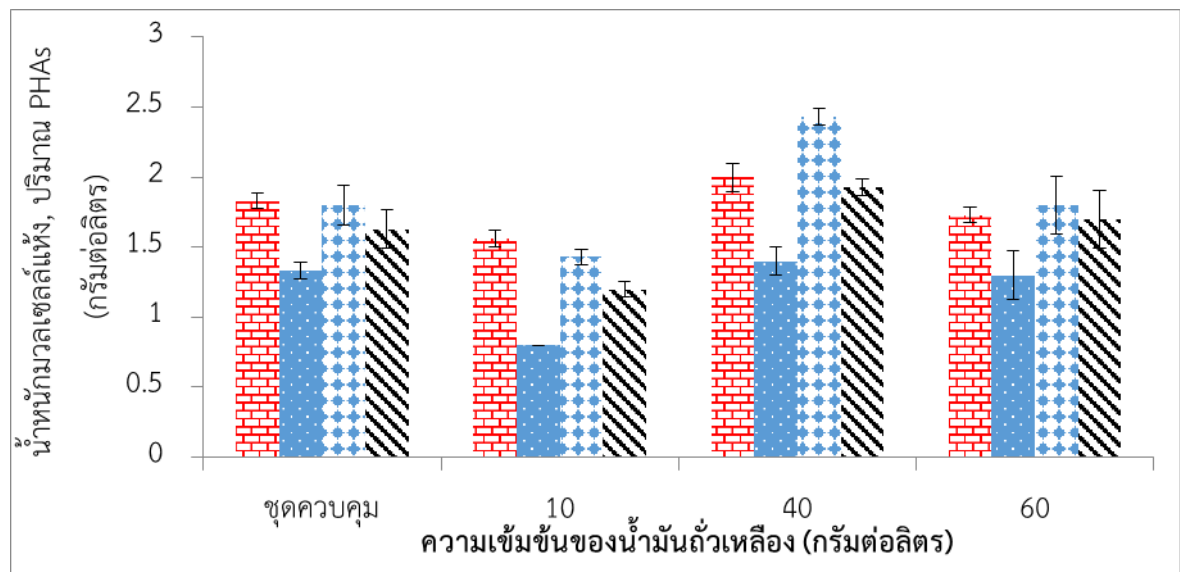
ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403 ที่เลี้ยงด้วยน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ ชุดควบคุม 20 กรัมต่อลิตร (◆) 10 กรัมต่อลิตร (■) 40 กรัมต่อลิตร (▲) และ 60 กรัมต่อลิตร (✕)

ผลของการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่แตกต่างกัน พบว่าเชื้อ BOT I และเชื้อสายพันธุ์ TISTR 1403 สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในน้ำมันถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 1.93 และ 1.40 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 2.43 และ 2.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 79.51 และ 70.00 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 60 กรัมต่อลิตร จะสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองมากเกินไป อาจส่งผลให้ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทำให้สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ปริมาณที่น้อยลง ส่วนน้ำมันถั่วเหลืองที่มีความเข้มข้น 10, 20 และ 60 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีการผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและปริมาณน้ำหนักมวลเซลล์แห้งที่แตกต่างกันดังตารางที่ 7 และ ภาพที่ 9

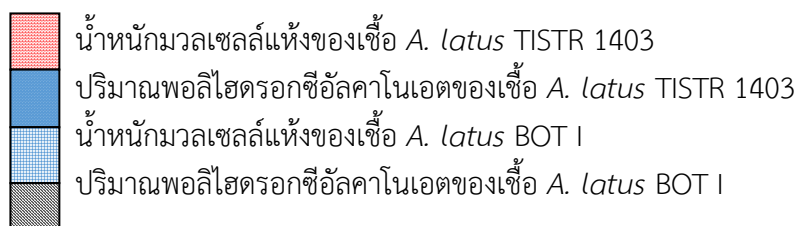
ตารางที่ 7 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละปริมาณการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ของ *A. latus* BOT I และ *A. latus* TISTR 1403 ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนชนิดน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

น้ำมันถั่วเหลือง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ร้อยละ)	
	<i>A. latus</i> TISTR	<i>A. latus</i> BOT I	<i>A. latus</i> TISTR	<i>A. latus</i> BOT I	<i>A. latus</i> TISTR	<i>A. latus</i> BOT I
	1403		1403		1403	
10	1.56±0.06	1.43±0.06	0.80±0.00	1.20±0.20	51.28	83.92
40	2.00±0.10	2.43±0.06	1.40±0.10	1.93±0.06	70.00	79.42
60	1.73±0.06	1.80±0.21	1.30±0.17	1.70±0.10	75.14	94.44
ชุดควบคุม	1.83±0.06	1.80±0.14	1.33±0.06	1.63±0.06	72.68	90.56

20



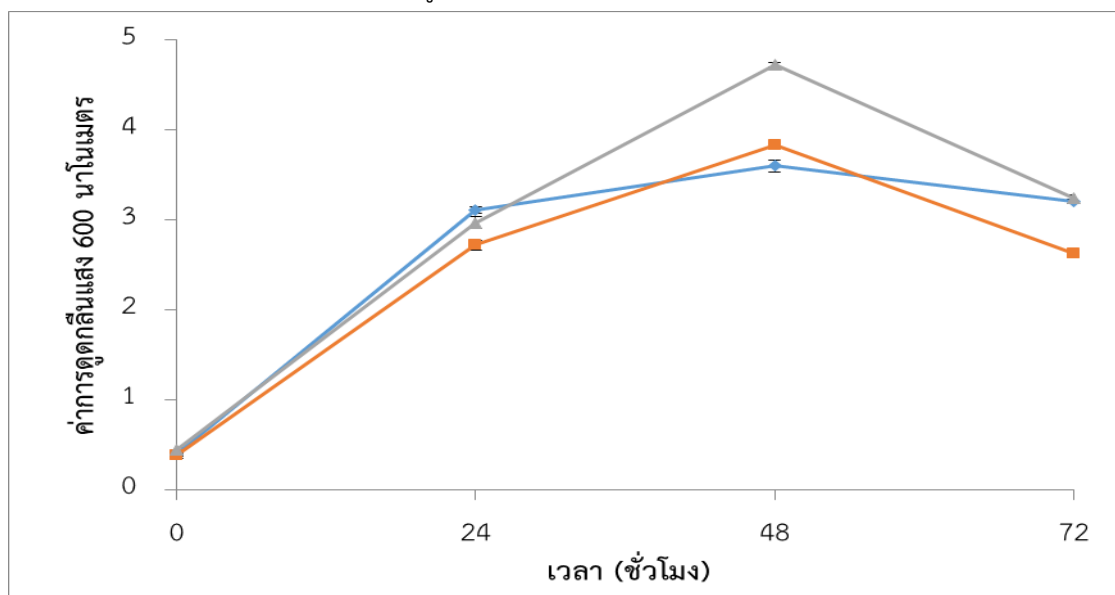
ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดสูงสุดที่เลี้ยงด้วยน้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นแตกต่างกันโดยที่



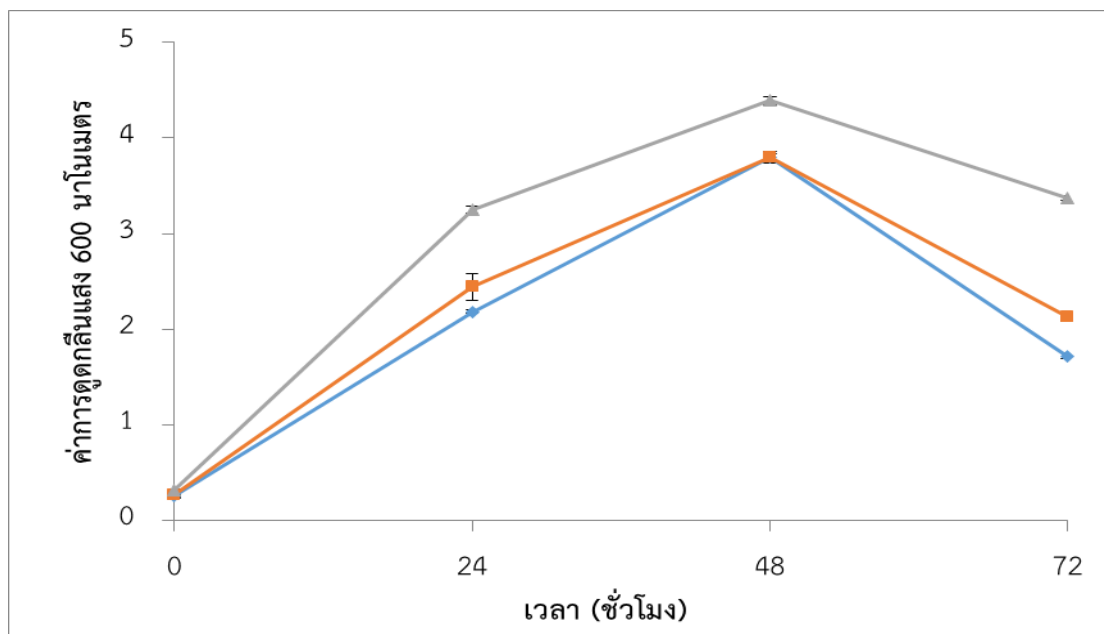
### 1.3 ผลของการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

เมื่อนำเชื้อ *A. latus* BOT I และ *A. latus* TISTR 1403 เลี้ยงในสูตรอาหาร ดัดแปลง DSMZ (สูตรที่ 2) ที่มีความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็น 3 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 น้ำตาลฟรุกโตสและแอมโมเนียมคลอไรด์ ชุดที่ 2 น้ำตาลฟรุกโตสและผงชูรส และชุดที่ 3 น้ำมันถั่วเหลืองและผงชูรส โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายซ้ำและเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมมีอัตราการเจริญเติบโตที่สุดในชุดที่ 3 รองลงมาคือชุดที่ 2 และ 1 ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 10 และภาพที่ 11

ผลจากการเลี้ยงเชื้อในชุดอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแตกต่างกัน พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในชุดที่ 3 นั่นคือ น้ำมันถั่วเหลืองและผงชูรสความเข้มข้น 40 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าเท่ากับ 2.63 และ 1.40 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 3.47 และ 1.66 กรัมต่อลิตรคิดเป็นร้อยละ 75.79 และ 84.34 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากการใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเพิ่มสูงขึ้น (ตารางที่ 8 และภาพที่ 12)



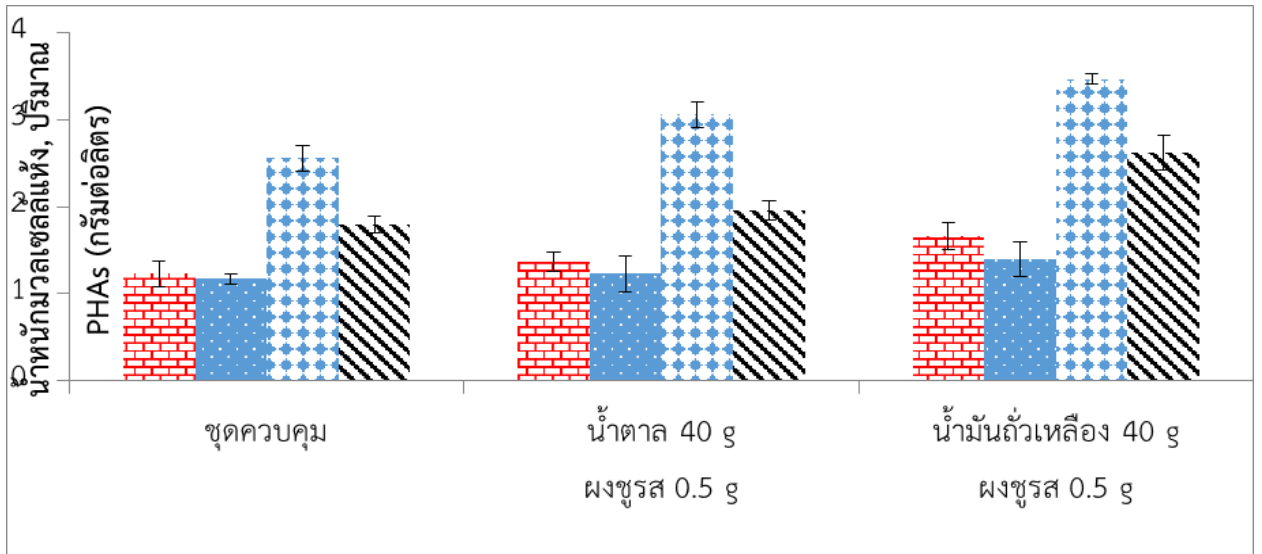
ภาพที่ 10 การเจริญของเชื้อ *A. latus* BOT I ในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแตกต่างกัน คือ น้ำตาลและแอมโมเนียมคลอไรด์ (●) น้ำตาลและผงชูรส (■) น้ำมันถั่วเหลืองและผงชูรส (▲)



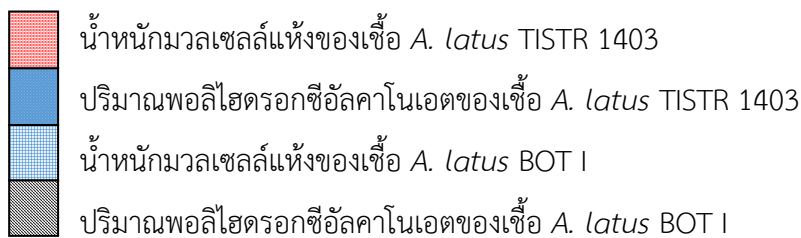
ภาพที่ 11 การเจริญของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403 ในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแตกต่างกัน คือ น้ำตาลและแอมโมเนียคลอไรด์ (◆) น้ำตาลและผงชูรส (■) น้ำมันถั่วเหลืองและผงชูรส (▲) ตารางที่ 8 น้ำหนักมวลเซลล์แห้งปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์สูงสุดและร้อยละปริมาณการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ภายในเซลล์ของ *A. latus* BOT I และ *A. latus* TISTR 1403 ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

ชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน	น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (ร้อยละ)	
	<i>A. latus</i> TISTR 1403	<i>A. latus</i> BOT I	<i>A. latus</i> TISTR 1403	<i>A. latus</i> BOT I	<i>A. latus</i> TISTR 1403	<i>A. latus</i> BOT I
ฟรุกโตส 40 g. และผงชูรส 0.5 g.	1.37±0.11	3.06±0.15	1.23±0.20	1.96±0.11	89.78	64.05
น้ำมันถั่วเหลือง 40 g. และผงชูรส 0.5 g.	1.66±0.15	3.47±0.06	1.40±0.20	2.63±0.20	84.34	75.79
ชุดควบคุม น้ำตาลฟรุกโตส 40 g. และ NH <sub>4</sub> Cl 0.5 g.	1.23±0.15	2.56±0.15	1.17±0.06	1.80±0.10	95.12	70.31



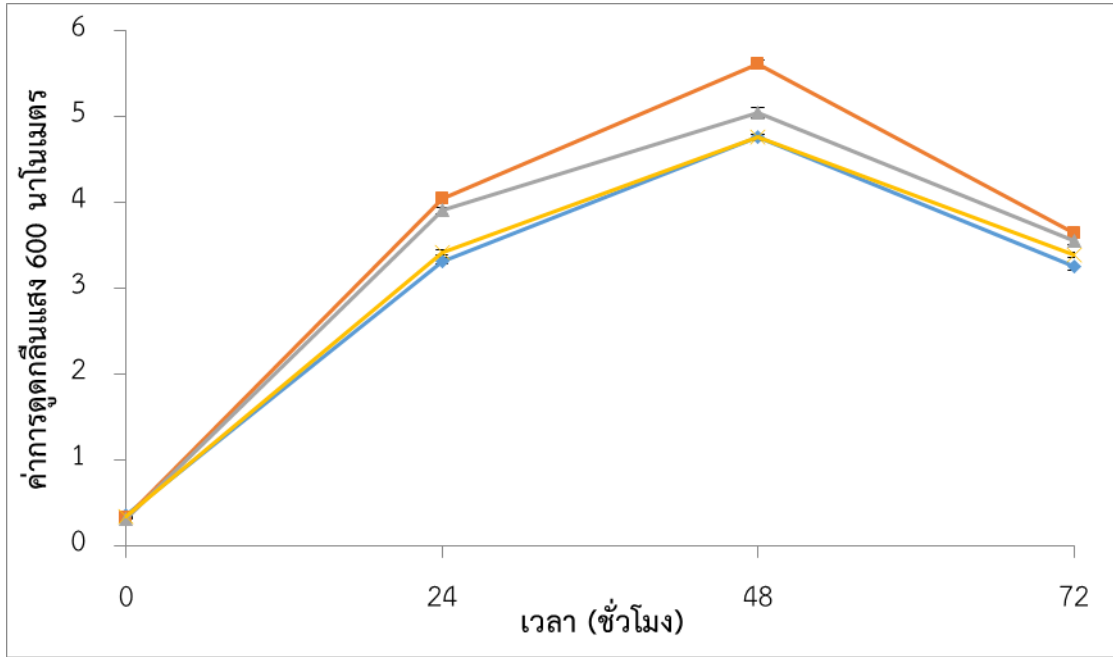


ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยที่

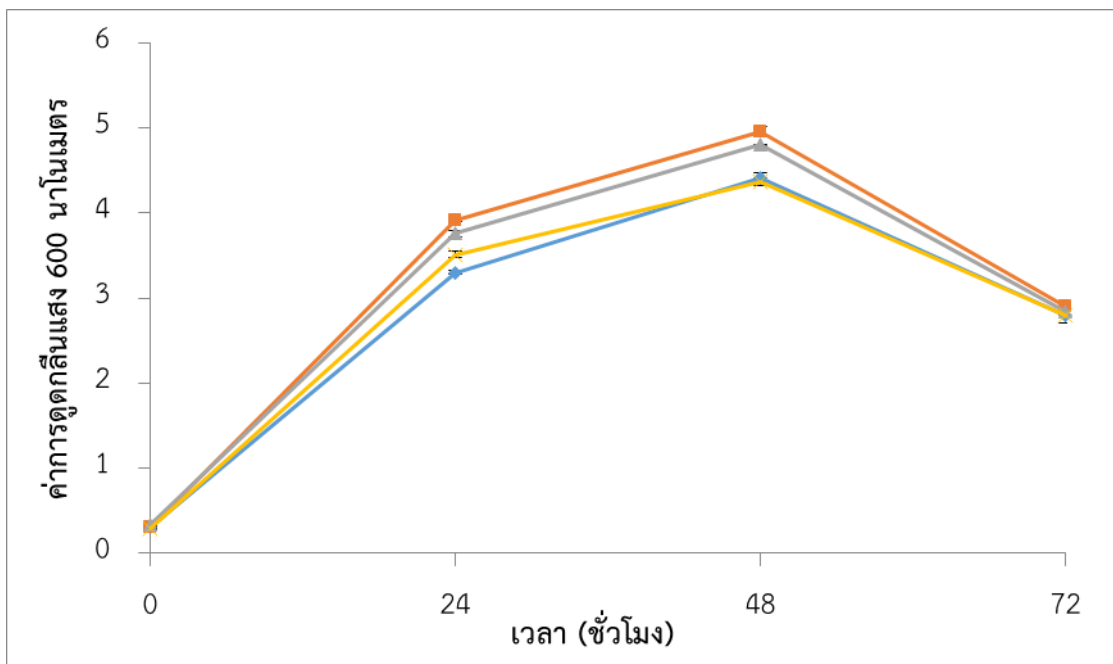


#### 1.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* BOT I และ *A. latus* TISTR 1403 ในอาหารดัดแปลง DSMZ (สูตรที่ 2) โดยทำการปรับแหล่งคาร์บอนโดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรและแหล่งไนโตรเจนเป็นผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม จากนั้นทำการศึกษาความเข้มข้นของผงชูรส เท่ากับ 0.5, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน ปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเท่ากับ 7.0 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ BOT I และเชื้อ TISTR 1403 มีอัตราการเจริญได้ดีในอาหารที่มีผงชูรสความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารที่มีผงชูรสความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร และสุดท้ายมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกันในอาหารที่มีผงชูรสความเข้มข้น 0.5 และ 6 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 13 และภาพที่ 14



ภาพที่ 13 การเจริญของเชื้อ *A. latus* BOT I ที่เลี้ยงด้วยผงชูรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้ ชุดควบคุม 0.5 กรัมต่อลิตร (◆) 2 กรัมต่อลิตร (■) 4 กรัมต่อลิตร (▲) และ 6 กรัมต่อลิตร (✕)

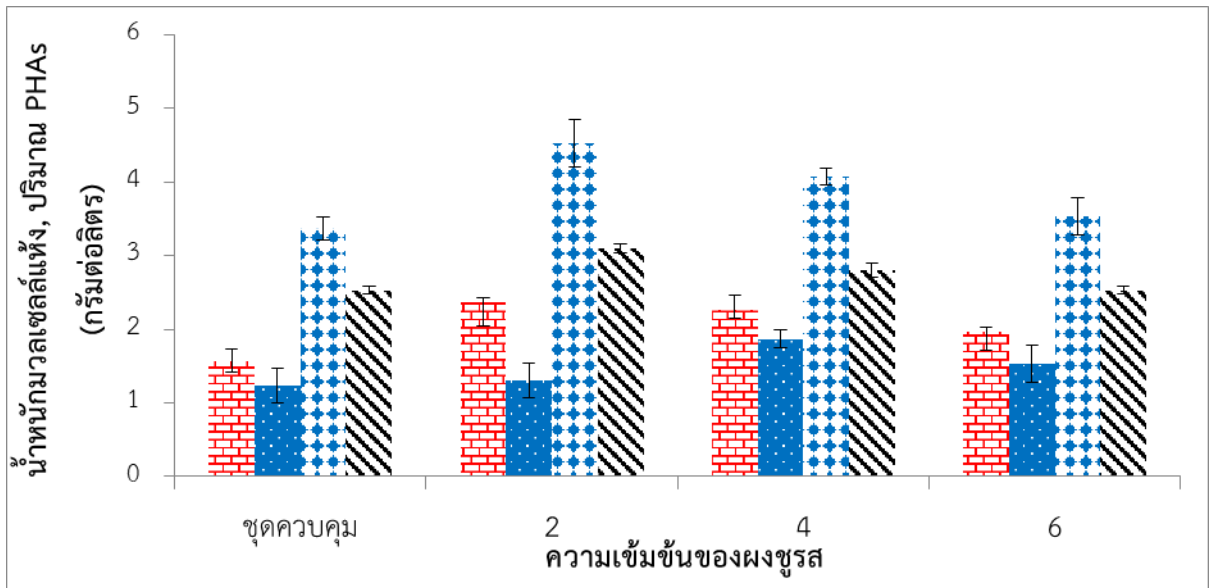


ภาพที่ 14 การเจริญของเซลล์จากเชื้อ *A. latus* TISTR 1403 ที่เลี้ยงด้วยผงชูรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้ ชุดควบคุม 0.5 กรัมต่อลิตร (◆) 2 กรัมต่อลิตร (■) 4 กรัมต่อลิตร (▲) และ 6 กรัมต่อลิตร (✕)

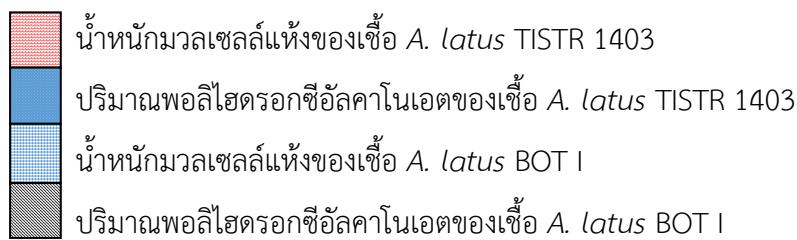
จากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของผงชูรสที่แตกต่างกันพบว่าเชื้อ BOT I สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดอาหารที่มีผงชูรสความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 3.10 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 4.53 คิดเป็นร้อยละ 68.43 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง และเชื้อสายพันธุ์ TISTR 1403 สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดอาหารที่มีผงชูรสความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 1.87 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 2.26 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82.74 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีและมีการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมากที่สุดเพราะในผงชูรยังมีสารอื่นๆ เช่น กรดอะมิโนชนิดต่างๆ จึงทำให้มีการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนอาหารที่มีความเข้มข้นของผงชูรส 0.5, 4, และ 6 เชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและมวลเซลล์แห้งได้แตกต่างกัน ดังตารางที่ 9 และภาพที่ 15

ตารางที่ 9 ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละปริมาณ การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ของ *A. latus* BOT I และ *A. latus* TISTR 1403 ที่เลี้ยงในแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ผงชูรส (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ร้อยละ)	
	<i>A. latus</i> TISTR 1403	<i>A. latus</i> BOT I	<i>A. latus</i> TISTR 1403	<i>A. latus</i> BOT I	<i>A. latus</i> TISTR 1403	<i>A. latus</i> BOT I
	2	2.37±0.06	4.53±0.32	1.30±0.23	3.10±0.06	54.85
4	2.26±0.21	4.07±0.11	1.87±0.11	2.80±0.10	82.74	68.80
6	1.97±0.06	3.53±0.25	1.53±0.25	2.53±0.06	77.66	71.67
ชุดควบคุม 0.5	1.57±0.15	3.37±0.15	1.23±0.23	2.53±0.05	78.34	75.07

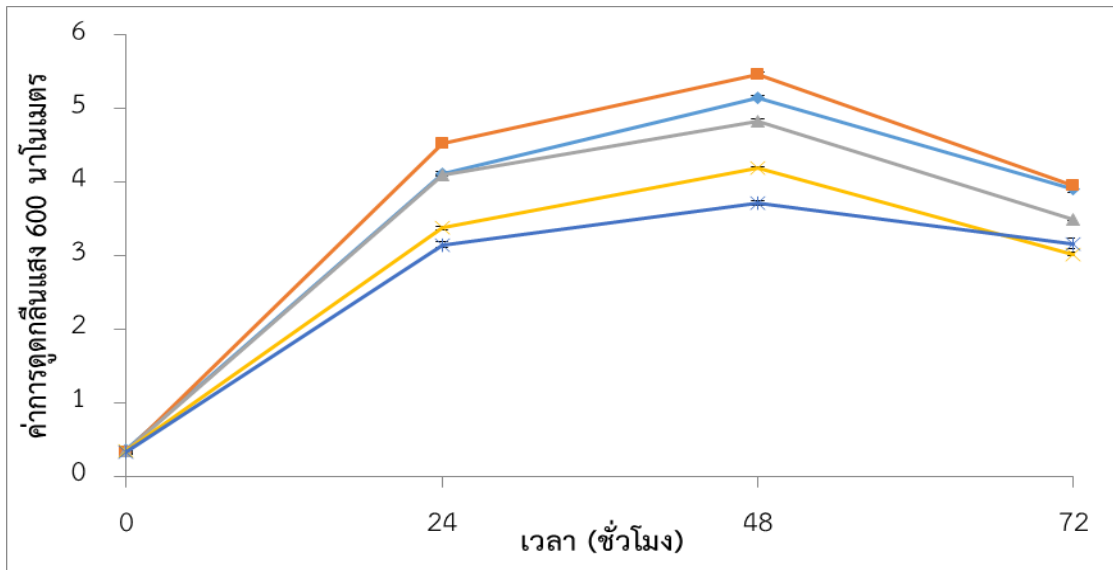


ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดสูง ที่เลี้ยงด้วยผงชูรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยที่

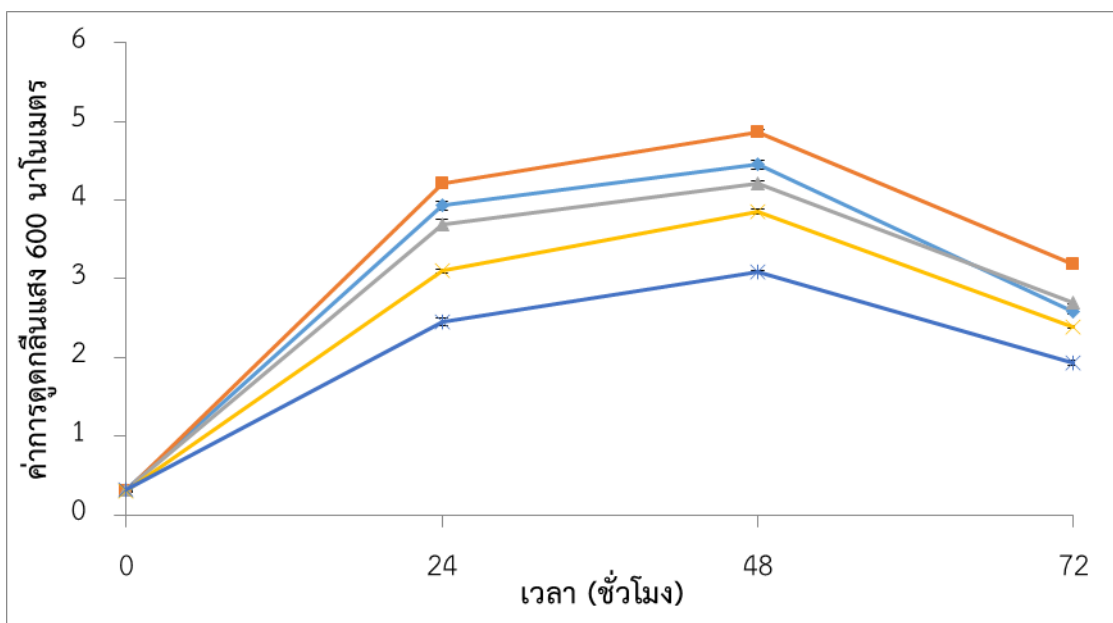


### 1.5 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ร่วมกับผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการศึกษาเลี้ยงเชื้อ *A. latus* BOT I และ *A. latus* TISTR 1403 ในอาหารดัดแปลง DSMZ (สูตรที่ 2) โดยใช้ไขมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาทำการศึกษาต่อโดยเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจากผงชูรสเพียงอย่างเดียวเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ร่วมกับผงชูรสในอัตราส่วนแตกต่างกัน เท่ากับ 0.25:2, 0.10:2, 0.5:1, 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเท่ากับ 7.0 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการเจริญได้ดีในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสความเข้มข้น 0.25:2 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือผงชูรสความเข้มข้น 0.5:2 กรัมต่อลิตร 0.10:2 0.5:1 และ 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 16 และภาพที่ 17



ภาพที่ 16 การเจริญของเชื้อ *A. latus* BOT I ที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้ 0.5:2 กรัมต่อลิตร (◆) 0.25:2 กรัมต่อลิตร (■) 0.10:2 กรัมต่อลิตร (▲) 0.5:1 กรัมต่อลิตร (×) 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร (✱)

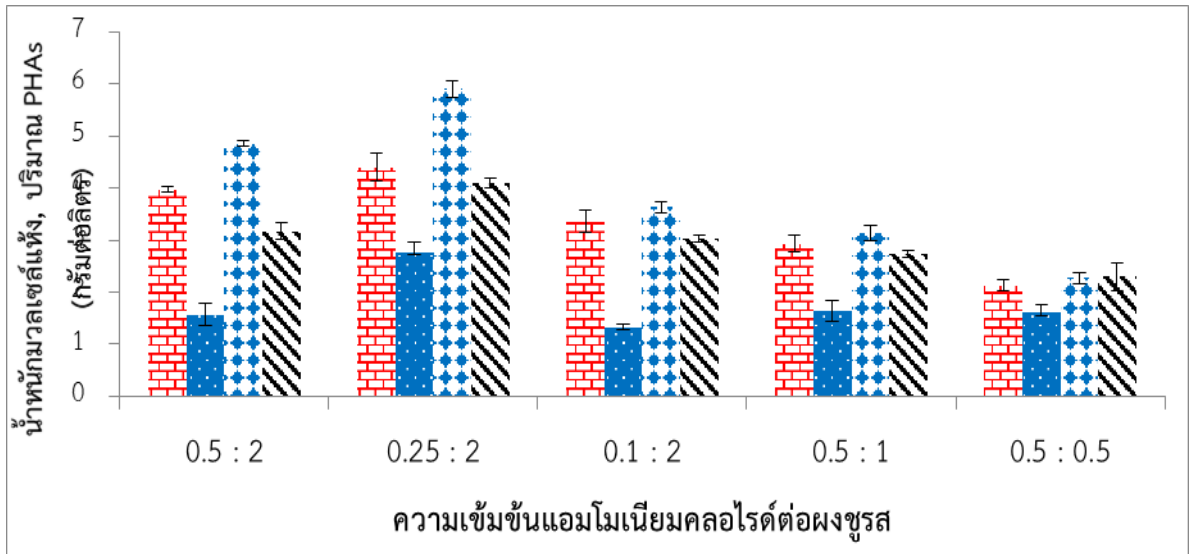


ภาพที่ 17 การเจริญของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403 ที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้ 0.5:2 กรัมต่อลิตร (◆) 0.25:2 กรัมต่อลิตร (■) 0.10:2 กรัมต่อลิตร (▲) 0.5:1 กรัมต่อลิตร (×) 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร (✱)





ผลของการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่แตกต่างกันพบว่าสายพันธุ์ BOT I และ TISTR 1403 สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดในแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสความเข้มข้น 0.25:2 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 4.10 และ 2.77 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้เท่ากับ 5.90 และ 4.40 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 69.49 และ 62.39 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสในอัตราส่วน 0.25:2 กรัมต่อลิตร เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมทำให้สามารถผลิตสามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ร่วมกับผงชูรสยังสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้เพราะแอมโมเนียมคลอไรด์มีราคาต้นทุนที่สูงกว่าผงชูรส และนอกจากนี้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส 0.10:2 , 0.5:1 , 0.5:0.5 และ 0.5:2 พบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและมวลเซลล์แห้งแตกต่างกัน ดังตารางที่ 10 และภาพที่ 18

ตารางที่ 10 ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดและร้อยละปริมาณ การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ของ *A. latus* BOT I และ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิมเลี้ยงในแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

แอมโมเนียมคลอไรด์และผงชูรส (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักมวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (กรัมต่อลิตร)		พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (ร้อยละ)	
	<i>A. latus</i> TISTR 1403	<i>A. latus</i> BOT I	<i>A. latus</i> TISTR 1403	<i>A. latus</i> BOT I	<i>A. latus</i> TISTR 1403	<i>A. latus</i> BOT I
0.5 : 2	3.97±0.06	4.86±0.21	2.57±0.06	3.17±0.15	64.73	65.22
0.25 : 2	4.40±0.26	5.90±0.20	2.77±0.15	4.10±0.10	62.95	69.49
0.10 : 2	3.36±0.21	3.63±0.06	2.33±0.12	3.03±0.06	69.35	83.47
0.5 : 1	2.93±0.15	3.13±0.21	2.63±0.15	2.73±0.06	89.76	87.22
0.5 : 0.5	2.13±0.12	2.97±0.15	1.60±0.10	2.30±0.26	75.12	77.44



ภาพที่ 18 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดสูงสุดที่เลี้ยงด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยที่

-  น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. lotus* TISTR 1403
-  ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. lotus* TISTR 1403
-  น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. lotus* BOT I
-  ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. lotus* BOT I

## ส่วนที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

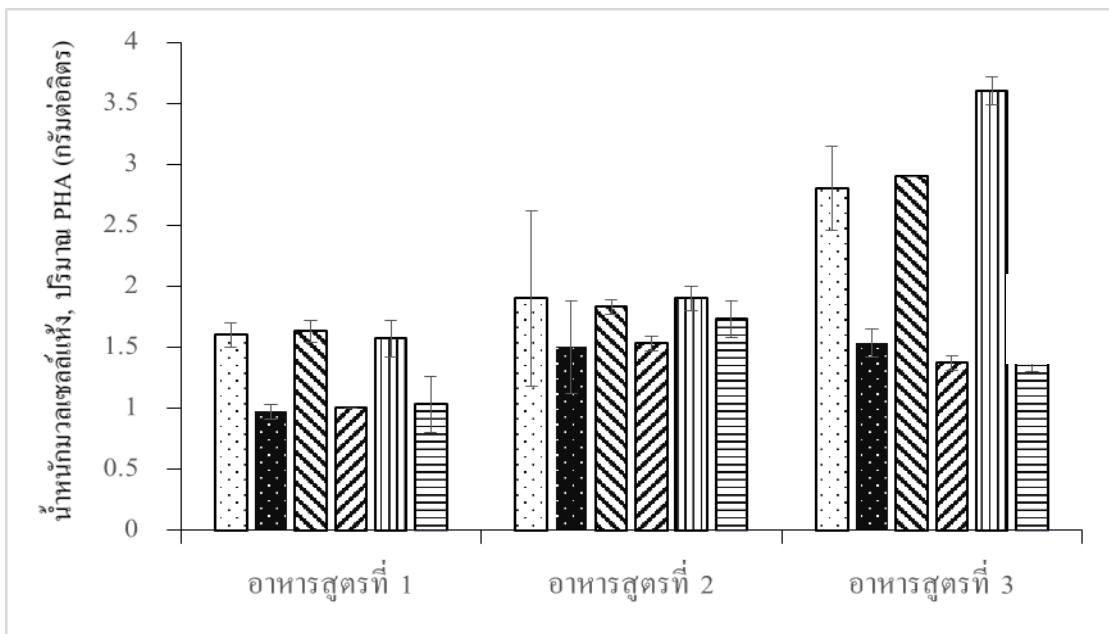
เป็นการทำวิจัยที่เปรียบเทียบเพิ่มอีก 1 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *A. lotus* TISTR 1403 สายพันธุ์ BOT I และ BOT II ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้จากการกลายซ้ำและมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ได้สูง โดยทำการวิจัยซ้ำเช่นเดียวกับส่วนที่ 1 โดยเปรียบเทียบเชื้อ 3 สายพันธุ์

### 2.1 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. lotus* TISTR 1403 , BOT I และ BOT II ในสูตรอาหารสำหรับผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตทั้ง 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 ดัดแปลงจาก DSMZ catalogue และคณะ (1993) สูตรอาหารที่ใช้ไขมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรที่ 2 ดัดแปลงจาก DSMZ catalogue และคณะ (1993) และสูตรที่ 3 ดัดแปลงจาก Park & Kim (2011) ทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 และเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในสูตรอาหารที่ 2 จากนั้นทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อทั้งสามสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร มีการเจริญสูงสุดในอาหารสูตรที่ 2

รองลงมา คือ อาหารสูตรที่ 1 และ 3 ตามลำดับ โดยมีการเจริญในทิศทางเดียวกัน คือ มีระยะเวลาเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6-12 ชั่วโมงของการเลี้ยง โดยเริ่มคงที่หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* TISTR 1403 , BOT I และ BOT II มาเลี้ยงในสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดในอาหารสูตรที่ 3 แต่มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 โดยเชื้อ *A. latus* BOT II เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ มีค่าเท่ากับ  $1.87 \pm 0.10$  และ  $1.73 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 92.51 ของมวลเซลล์แห้ง ส่วนในเชื้อ *A. latus* TISTR 1403 และ BOT I พบว่า เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่ 2 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ  $1.90 \pm 0.72$  และ  $1.83 \pm 0.09$  กรัมต่อลิตร มีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ  $1.55 \pm 0.37$  และ  $1.53 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 81.58 และ 94.55 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 19 และตารางที่ 11



ภาพที่ 19 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงในสูตรอาหาร 3 สูตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403
- ▨ น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* BOT I
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* BOT I
- ▨ น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* BOT II
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* BOT II



ตารางที่ 11 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงช่วงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403, BOT I และ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารแตกต่างกัน

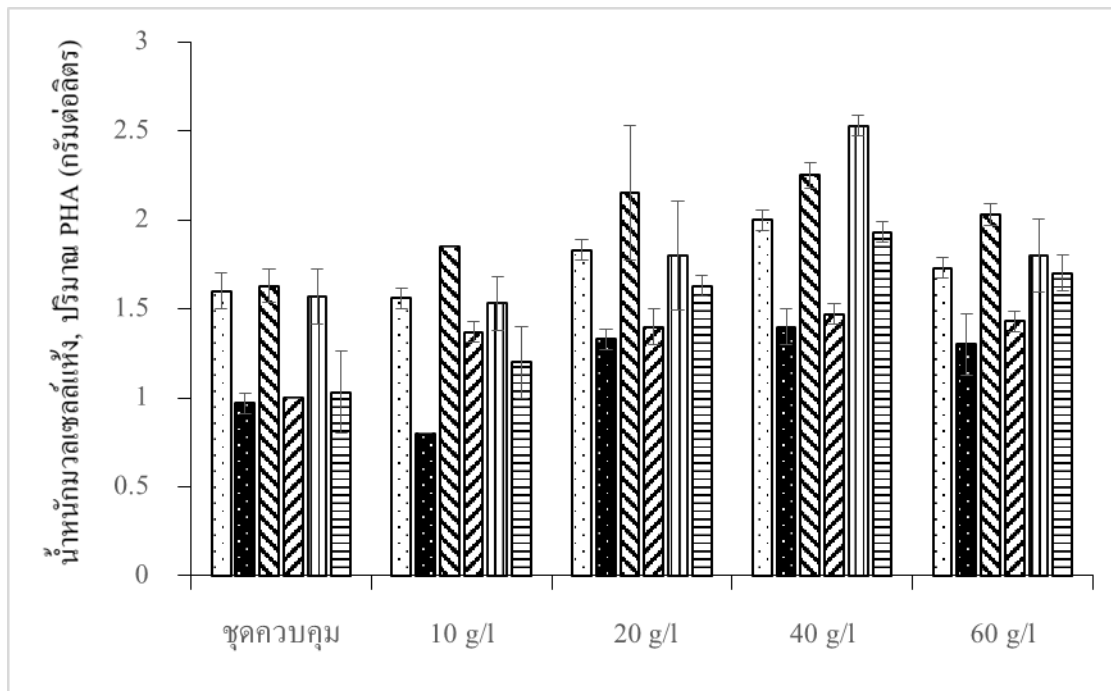
สูตรอาหาร	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร)			PHAs (ร้อยละ)		
	TISTR			TISTR			TISTR		
	1403	BOT I	BOT II	1403	BOT I	BOT II	1403	BOT I	BOT II
สูตรที่ 1	1.60±0.10	1.63±0.09	1.57±0.15	0.97±0.06	1.00±0.00	1.03±0.23	60.63	61.35	65.61
สูตรที่ 2	1.90±0.72	1.83±0.09	1.90±0.37	1.55±0.37	1.53±0.06	1.73±0.15	81.58	94.55	91.05
สูตรที่ 3	2.80±0.35	2.90±0.00	3.60±0.12	1.53±0.12	1.37±0.06	1.65±0.35	54.64	47.24	45.83

## 2.2 ผลการใช้ไขมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากจุดประสงค์ของการศึกษาเพื่อต้องการใช้สารอาหารราคาถูกมาเป็นสารตั้งต้นให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในกระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ดังนั้นในครั้งนี้ได้เลือกใช้น้ำมันถั่วเหลืองมาเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน เนื่องจากน้ำมันถั่วเหลืองมีปริมาณคาร์บอนมากกว่าน้ำตาลฟรุกโตส จึงคาดว่าจะมีผลทำให้มีพลังงานในการเจริญเติบโตและผลิตผลิตภัณฑ์ได้มากกว่า

ในการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* TISTR 1403, BOT I และ BOT II ในสูตรอาหารที่ 2 ซึ่งใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยทำการปรับความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองเป็น 10, 20, 40 และ 60 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่มีน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการปรับค่าความเป็นกรดต่าง เริ่มต้นเท่ากับ 7 จากนั้นทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ มีการเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตรสูงกว่าชุดควบคุม โดยมีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง และมีการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง ในทุกชุดการทดลอง

จากการศึกษา เชื้อ *A. latus* BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ  $2.53 \pm 0.06$  และ  $1.93 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 76.28 ของมวลเซลล์แห้ง และพบว่าที่ความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 60 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้รองลงมา มีค่าเท่ากับ  $1.85 \pm 0.21$  และ  $1.70 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่มากเกินไปอาจส่งผลให้ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (substrate inhibition) ทำให้สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยลง ดังนั้นความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ส่วนในเชื้อ *A. latus* TISTR 1403 และสายพันธุ์ BOT I พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ  $2.00 \pm 0.06$  และ  $2.27 \pm 0.07$  กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ  $1.40 \pm 0.10$  และ  $1.47 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 70.00 และ 65.33 ของมวลเซลล์แห้ง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 20 และตารางที่ 12



ภาพที่ 20 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์สูงสุดในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน ที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403
- ▨ น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* BOT I
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ของเชื้อ *A. latus* BOT I
- ▨ น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* BOT II
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ของเชื้อ *A. latus* BOT II

ตารางที่ 12 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงข้าวโมงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403, BOT I และ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองแตกต่างกัน

ความเข้มข้น น้ำมันถั่วเหลือง (กรัม ต่อลิตร)	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			PHAs (กรัมต่อลิตร)			PHAs (ร้อยละ)		
	TISTR 1403	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II	TISTR 1403	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II	TISTR 1403	สายพันธุ์ BOT I	สายพันธุ์ BOT II
ชุดควบคุม	1.60±0.10	1.63±0.09	1.57±0.15	0.97±0.06	1.00±0.00	1.03±0.23	60.63	61.35	65.61
10	1.56±0.02	1.85±0.00	1.53±0.15	0.80±0.00	1.37±0.06	1.20±0.20	51.28	74.05	78.43
20	1.83±0.06	2.15±0.38	1.80±0.31	1.33±0.06	1.40±0.10	1.63±0.06	72.68	65.12	90.56
40	2.00±0.06	2.27±0.07	2.53±0.06	1.40±0.10	1.47±0.06	1.93±0.06	70.00	65.33	76.28
60	1.73±0.06	2.03±0.06	1.85±0.21	1.30±0.17	1.43±0.06	1.70±0.10	75.14	70.44	91.89

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ น้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

### 1.3 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

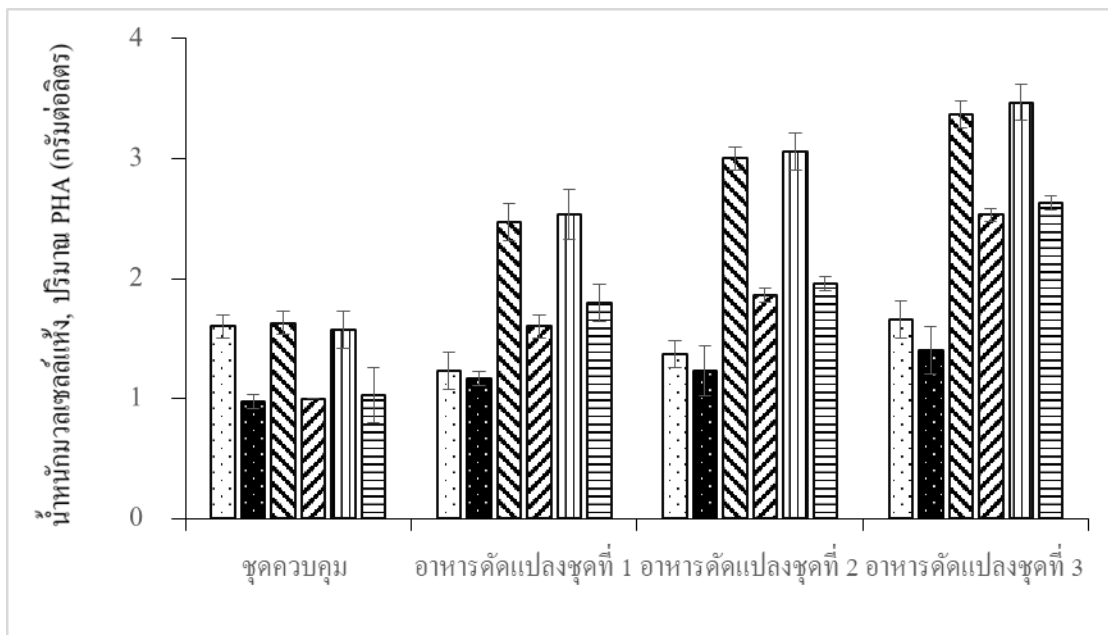
ในการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403, BOT I และ BOT II โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยทำการปรับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นทั้งหมด 3 ชุดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 องค์ประกอบแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue ของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร ที่ใช้ในการศึกษา

องค์ประกอบของ สูตรอาหาร	ชุดควบคุม	อาหารดัดแปลง ชุดที่ 1	อาหารดัดแปลง ชุดที่ 2	อาหารดัดแปลง ชุดที่ 3
Fructose (g/ L)	20	40	40	-
Soybean oil (g/ L)	-	-	-	40
Ammonium Chloride (g/ L)	0.5	0.5	-	-
Monosodium glutamate (g/ L)	-	-	0.5	0.5
Tween 80 (ml)	-	-	-	1

โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่ 3 มาเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ มีการเจริญสูงสุดในอาหารดัดแปลงชุดที่ 3 รองลงมา คือ อาหารดัดแปลงชุดที่ 2 ชุดควบคุม และอาหารดัดแปลงชุดที่ 1 ตามลำดับ และมีการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง ในทุกชุด การทดลอง จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ พบว่า เชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงชุดที่ 3 ซึ่งมีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด  $3.47 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด  $2.63 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 75.79 ของมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48

ชั่วโมง ส่วนในอาหารดัดแปลงชุดที่ 1, 2 และชุดควบคุม สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่แตกต่างกัน ส่วนเชื้อ *A. latus* TISTR 1403 และ BOT I พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารดัดแปลงชุดที่ 3 ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมงเช่นกัน สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ  $1.40 \pm 0.20$  และ  $2.53 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 84.34 และ 75.07 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 21 และตารางที่ 14



ภาพที่ 21 การเปรียบเทียบน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง 3 สูตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสูตรอาหารดัดแปลง 3 สูตร โดย

- น้ำหนักรวมเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403
- ▨ น้ำหนักรวมเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* BOT I
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* BOT I
- ▨ น้ำหนักรวมเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* BOT II
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* BOT II

ตารางที่ 14 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงช่วงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403, BOT I และ BOT II ในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

อาหารดัดแปลงชุดที่	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			PHAs (กรัมต่อลิตร)			PHAs (ร้อยละ)		
	TISTR	สายพันธุ์	สายพันธุ์	TISTR	สายพันธุ์	สายพันธุ์	TISTR	สายพันธุ์	สายพันธุ์
	1403	BOT I	BOT II	1403	BOT I	BOT II	1403	BOT I	BOT II
ชุดควบคุม	1.60±0.10	1.63±0.09	1.57±0.15	0.97±0.06	1.00±0.00	1.03±0.23	60.63	61.35	65.61
อาหารดัดแปลงชุดที่ 1	1.23±0.15	2.47±0.15	2.53±0.21	1.17±0.06	1.60±0.10	1.80±0.15	95.12	64.78	71.15
อาหารดัดแปลงชุดที่ 2	1.37±0.12	3.00±0.10	3.06±0.15	1.23±0.21	1.86±0.06	1.96±0.06	89.78	41.00	64.05
อาหารดัดแปลงชุดที่ 3	1.66±0.15	3.37±0.12	3.47±0.15	1.40±0.20	2.53±0.06	2.63±0.06	84.34	75.07	75.79

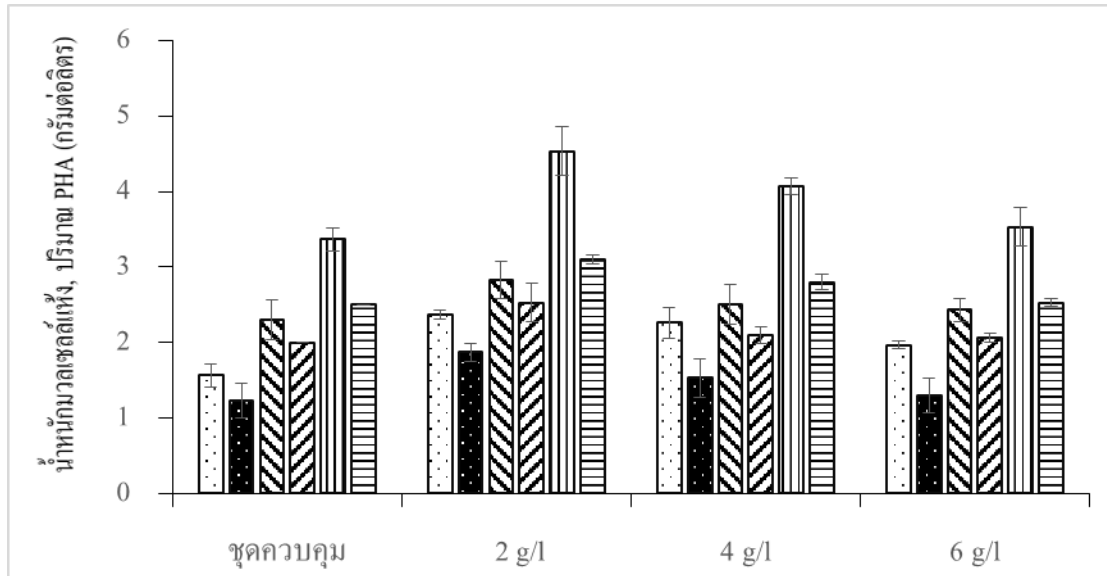
หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ น้ำตาลฟรุคโตส 20 ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร

## 2.4 ผลของความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการศึกษาความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403, BOT I และ BOT II โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยทำการปรับความเข้มข้นของผงชูรส (ตราถ้วยแดง) เริ่มต้นเท่ากับ 0.5, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ความเข้มข้นของผงชูรสเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในทุกชุดการทดลอง ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้ง สามสายพันธุ์ มีการเจริญสูงสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของผงชูรส 2 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ความเข้มข้นของผงชูรส 4, 0.5 และ 6 กรัมต่อลิตร โดยการเจริญสูงสุดชั่วโมงที่ 48 ในทุกชุดการทดลอง

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *A. latus* BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงมีความเข้มข้นของผงชูรสเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ  $4.53 \pm 0.32$  และ  $3.10 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 68.43 ของมวลเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง รองลงมา คือ ความเข้มข้นผงชูรส 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่ามวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงกว่าชุดควบคุม ส่วนในเชื้อ *A. latus* TISTR 1403 และ BOT I พบว่าในสูตรอาหารดัดแปลงมีความเข้มข้นของผงชูรสเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง  $2.37 \pm 0.06$  และ  $2.83 \pm 0.25$  และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ  $1.87 \pm 0.16$  และ  $2.53 \pm 0.25$  คิดเป็นร้อยละ 78.90 และ 89.40 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 22 และตารางที่ 15





ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในความเข้มข้นผงชูรสที่แตกต่างกัน โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403
- ▨ น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- ▨ น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II

ตารางที่ 15 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงช่วงที่ 48 ของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403, BOT I และ BOT II ในสูตรอาหารที่ความเข้มข้นของผงชูรสแตกต่างกัน

ความเข้มข้นของ ผงชูรส (กรัมต่อลิตร)	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร)			PHAs (ร้อยละ)		
	TISTR	สายพันธุ์	สายพันธุ์	TISTR	สายพันธุ์	สายพันธุ์	TISTR	สายพันธุ์	สายพันธุ์
	1403	BOT I	BOT II	1403	BOT I	BOT II	1403	BOT I	BOT II
ชุดควบคุม	1.57±0.15	2.30±0.26	3.37±0.15	1.23±0.23	2.00±0.00	2.50±0.00	78.34	86.96	74.18
2	2.37±0.06	2.83±0.25	4.53±0.32	1.87±0.16	2.53±0.25	3.10±0.06	78.90	89.40	68.43
4	2.26±0.21	2.50±0.26	4.07±0.12	1.53±0.25	2.10±0.16	2.80±0.10	67.70	84.00	68.80
6	1.97±0.06	2.43±0.15	3.53±0.25	1.30±0.23	2.07±0.26	2.53±0.06	65.99	85.19	71.67

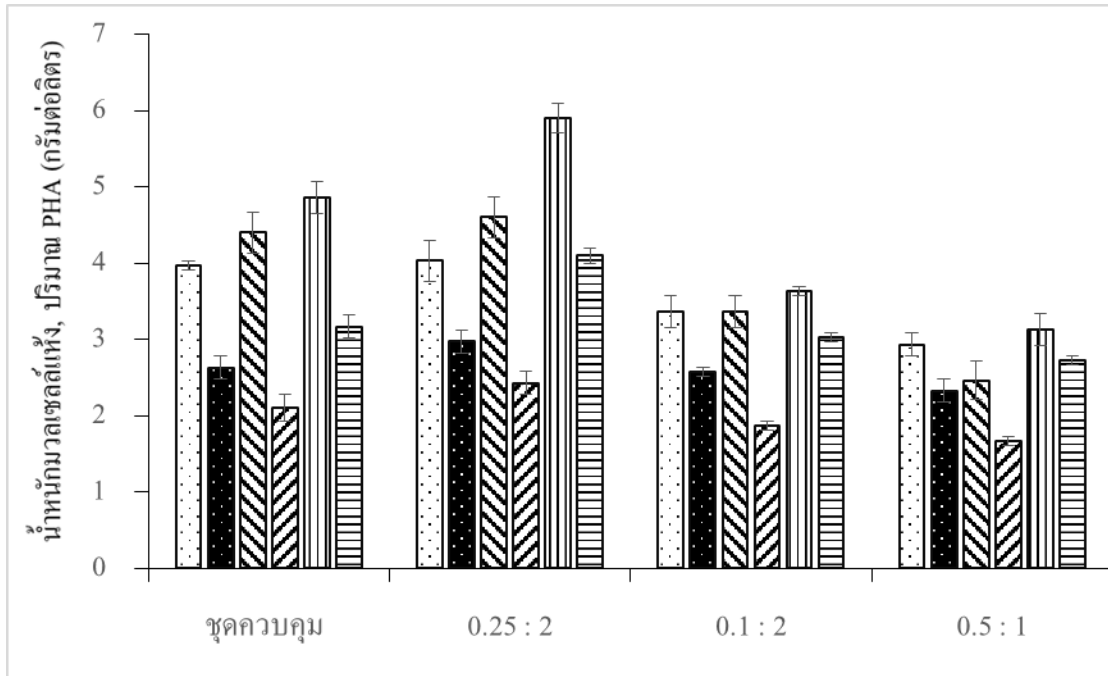
หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ ความเข้มข้นของผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร

## 2.5 ผลของการอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโน

### เอต

ในการศึกษาความเข้มข้นผงชูรสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403, BOT I และ BOT II โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยทำการปรับอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2, 0.25:2, 0.10:2, 0.5:1, 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกชุดการทดลอง ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาที่ 6-12 และเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารชุดที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.25:2 กรัมต่อลิตร มีการเจริญสูงสุด รองลงมา คือ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:0.5, 0.10:2, 0.5:1 และ 0.25:2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ในการเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ ในอาหารที่มีการทดแทนแหล่งไนโตรเจนโดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.25:2 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยงที่ 48 ชั่วโมง สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ  $5.90 \pm 0.20$  และ  $4.10 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 69.49 รองลงมา คือ สูตรอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2, 0.10:2, 0.5:1 และ 0.5:0.5 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *A. latus* TISTR 1403 และสายพันธุ์ BOT I ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสอัตราส่วน 0.25:2 มีมวลเซลล์แห้ง เท่ากับ  $4.03 \pm 0.26$  และ  $4.60 \pm 0.26$  ส่วนปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต มีค่าเท่ากับ  $2.97 \pm 0.15$  และ  $2.43 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 73.70 และ 52.83 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10 และเมื่อนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตให้ชัดเจนมากขึ้น ในระยะเวลาการเลี้ยงที่ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 23 และ ตารางที่ 16



ภาพที่ 23 การเปรียบเทียบน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงซูรสที่แตกต่างกัน โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* TISTR 1403
- ▨ น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT I
- ▨ น้ำหนักมวลเซลล์แห้งของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II

ตารางที่ 16 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs สูงสุด และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงชั่วโมงที่ 48 ของเชื้อ *A. lotus* TISTR 1403 BOT I และ BOT II ในอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสแตกต่างกัน

แอมโมเนียม คลอไรด์ต่อผงชู รส (กรัมต่อ ลิตร)	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร)			PHAs (ร้อยละ)		
	TISTR	สายพันธุ์	สายพันธุ์	TISTR	สายพันธุ์	สายพันธุ์	TISTR	สายพันธุ์	สายพันธุ์
	1403	BOT I	BOT II	1403	BOT I	BOT II	1403	BOT I	BOT II
ชุดควบคุม	3.97±0.06	4.40±0.26	4.86±0.21	2.63±0.15	2.10±0.17	3.17±0.15	66.25	47.73	65.23
0.25:2	4.03±0.26	4.60±0.26	5.90±0.20	2.97±0.15	2.43±0.15	4.10±0.10	73.70	52.83	69.49
0.10:2	3.36±0.21	3.37±0.21	3.36±0.06	2.57±0.06	1.87±0.06	3.03±0.06	76.49	55.49	90.18
0.5:1	2.93±0.15	2.46±0.25	3.13±0.21	2.33±0.15	1.67±0.06	2.73±0.06	79.52	67.89	87.22
0.5:0.5	2.13±0.12	2.13±0.25	2.97±0.15	1.60±0.10	1.67±0.06	2.30±0.26	75.12	78.40	77.44

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส เท่ากับ 0.5

### ส่วนที่ 3 ผลการศึกษาสารกระตุ้นที่ส่งผลต่อเพิ่มการสร้างโคพอลิเมอร์ของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

#### 3.1 ผลของชนิดสารตั้งต้นต่อการเกิดโคพอลิเมอร์

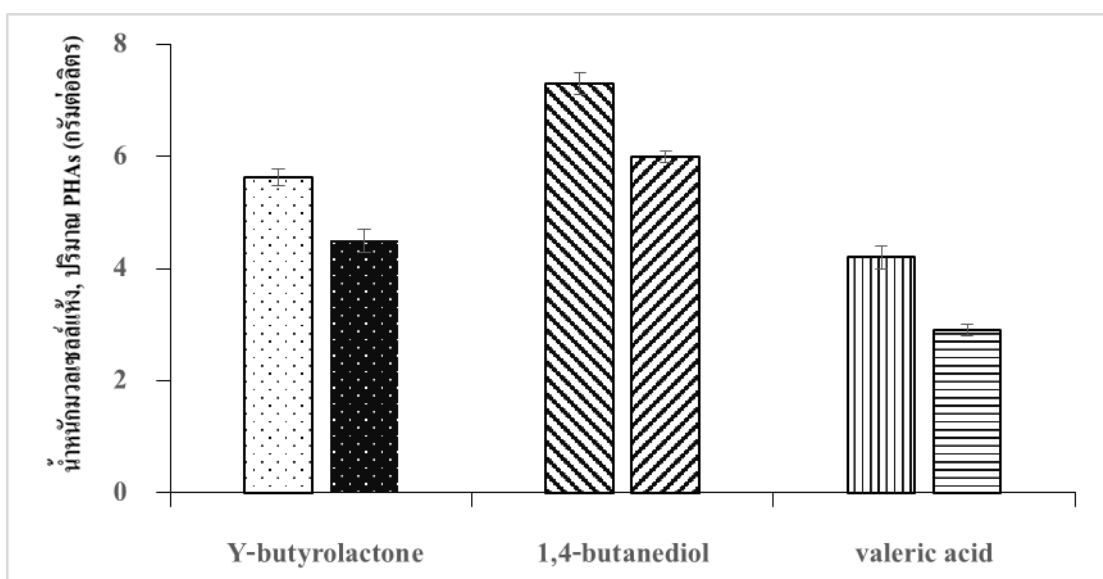
การเลี้ยงเชื้อ *A. latus* BOT II ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจากข้อการศึกษาที่ 1 โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร มีอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงซุรสเท่ากับ 0.25:2 และทำการเติม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

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* BOT II ในสูตรอาหารดัดแปลงที่มี 1,4-บิวเทนไดออล ในช่วงเวลาที่ 72 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด  $7.30 \pm 0.20$  กรัมต่อลิตร และพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ  $6.00 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82.19 รองลงมา คือ แกมมา-บิวทาโรแลกโตน และกรดวาเลอริก โดยสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด  $5.63 \pm 0.15$  และ  $4.20 \pm 0.20$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ  $4.50 \pm 0.20$   $2.90 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.93 และ 69.05 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 17 และ ภาพที่ 24

ตารางที่ 17 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยง

ชั่วโมงที่ 72 ของเชื้อ *A. latus* BOT II ในอาหารที่มีสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ

ชนิดของสารกระตุ้น	มวลเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร)	PHAs (ร้อยละ)
$\gamma$ -utyrolactone	$5.63 \pm 0.15$	$4.50 \pm 0.20$	79.93
1,4-butanediol	$7.30 \pm 0.20$	$6.00 \pm 0.10$	82.19
valeric acid	$4.20 \pm 0.20$	$2.90 \pm 0.10$	69.05



ภาพที่ 24 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีสารตั้งต้น เพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์แตกต่างกัน โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีแกมมา-บิวทาโรแลคโตน
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีแกมมา-บิวทาโรแลคโตน
- ▨ น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มี 1,4-บิวเทนไดออล
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มี 1,4-บิวเทนไดออล
- ▨ น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มีกรดวาเลอริก
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มีกรดวาเลอริก

### 3.2 ผลการใช้ไขมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารตั้งต้นเพื่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

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

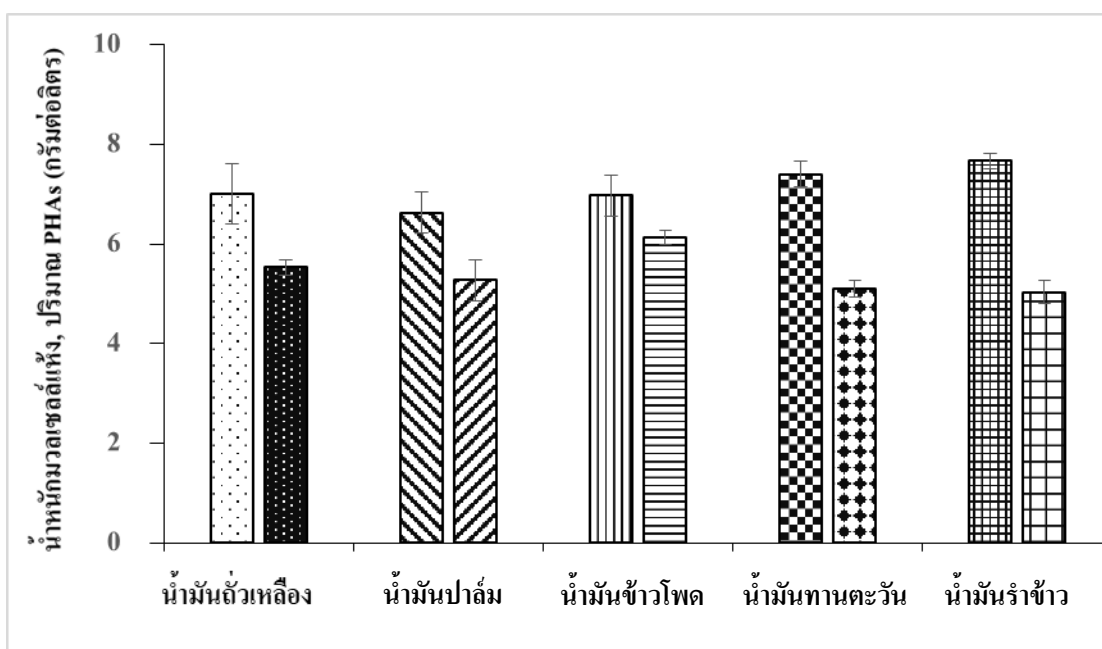
จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* BOT II ในสูตรอาหารตัดแปลงที่มีน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในชั่วโมงที่ 72 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เท่ากับ  $7.67 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ น้ำมันทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันปาล์ม ได้เท่ากับ  $7.40 \pm 0.25$ ,  $7.00 \pm 0.61$ ,  $6.97 \pm 0.40$  และ  $6.63 \pm 0.40$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตพบว่า น้ำมันข้าวโพด สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ  $6.13 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 87.85 รองลงมา คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันข้าวโพด คิดเป็นร้อยละ 79.00, 79.49, 68.92 และ 65.58 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยงในชั่วโมงที่ 72 ของเชื้อ *A. latus* BOT II ในอาหารที่มีน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสาร 1,4-บิวเทนไดออล

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

เมื่อนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตให้ชัดเจนมากขึ้น ในสูตรอาหารตัดแปลงที่มีน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารตั้งต้นที่เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 25





ภาพที่ 25 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดในสูตรอาหารดัดแปลงที่เติมน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารตั้งต้นที่เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย

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

### 3.3 ผลการใช้ไขมันปาล์มร่วมกับสารตั้งต้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

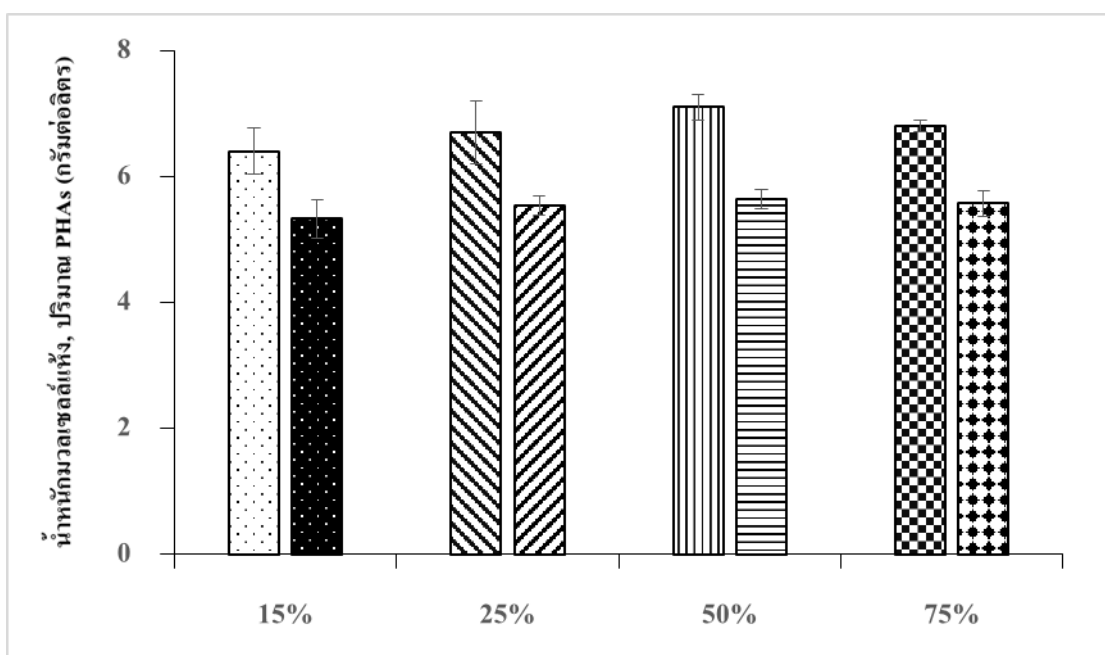
จากจุดประสงค์ของการศึกษาที่ต้องการใช้สารอาหารราคาถูก ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการเลือกน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากน้ำมันปาล์มหาได้ง่ายและมีราคาถูก จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* BOT II ในสูตรอาหารที่ได้จากข้อการศึกษาที่ 3.1 เพื่อเปรียบเทียบน้ำมันปาล์มร่วมกับสาร

1,4-บิวเทนไดออลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ ร้อยละ 15, 25, 50 และ 75 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ของแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. lotus* สายพันธุ์ BOT II มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเจริญลดลงหลังจากเลี้ยงเชื้อไป 24 ชั่วโมง และเริ่มคงที่ในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารที่เติม 1,4-บิวเทนไดออลที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50 มีการเจริญสูงสุด รองลงมา คือ ร้อยละ 75, 25 และ 15 ตามลำดับ

ในการเลี้ยงเชื้อ *A. lotus* BOT II ในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับสาร 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 ในชั่วโมงที่ 72 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เท่ากับ  $7.10 \pm 0.20$  กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ความเข้มข้นร้อยละ 75, 25 และ 15 ได้เท่ากับ  $6.80 \pm 0.10$ ,  $6.70 \pm 0.50$  และ  $6.40 \pm 0.36$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตพบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ  $5.63 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.30 รองลงมา คือ ความเข้มข้นร้อยละ 75, 25 และ 15 คิดเป็นร้อยละ 81.91, 82.54 และ 83.28 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 19 และภาพที่ 26

ตารางที่ 19 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ในการเลี้ยง ชั่วโมงที่ 72 ของเชื้อ *A. lotus* BOT II ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออลความเข้มข้นต่าง ๆ

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



ภาพที่ 26 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดในสูตรอาหารที่มีน้ำมันปาล์มร่วมกับสาร 1,4-บิเวเนไดโอร้อยละที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย

- น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มี 1,4-บิเวเนไดโอร้อยละ 15
- ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มี 1,4-บิเวเนไดโอร้อยละ 15
- ▨ น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มี 1,4-บิเวเนไดโอร้อยละ 25
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มี 1,4-บิเวเนไดโอร้อยละ 25
- ▨ น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มี 1,4-บิเวเนไดโอร้อยละ 50
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มี 1,4-บิเวเนไดโอร้อยละ 50
- ▨ น้ำหนักมวลเซลล์แห้งในอาหารที่มี 1,4-บิเวเนไดโอร้อยละ 75
- ▨ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในอาหารที่มี 1,4-บิเวเนไดโอร้อยละ 75

### 3.4 ผลการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนประเภทน้ำตาลร่วมกับสารโพธิโอนิกและอะซิเตทให้เกิดการสร้างที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์

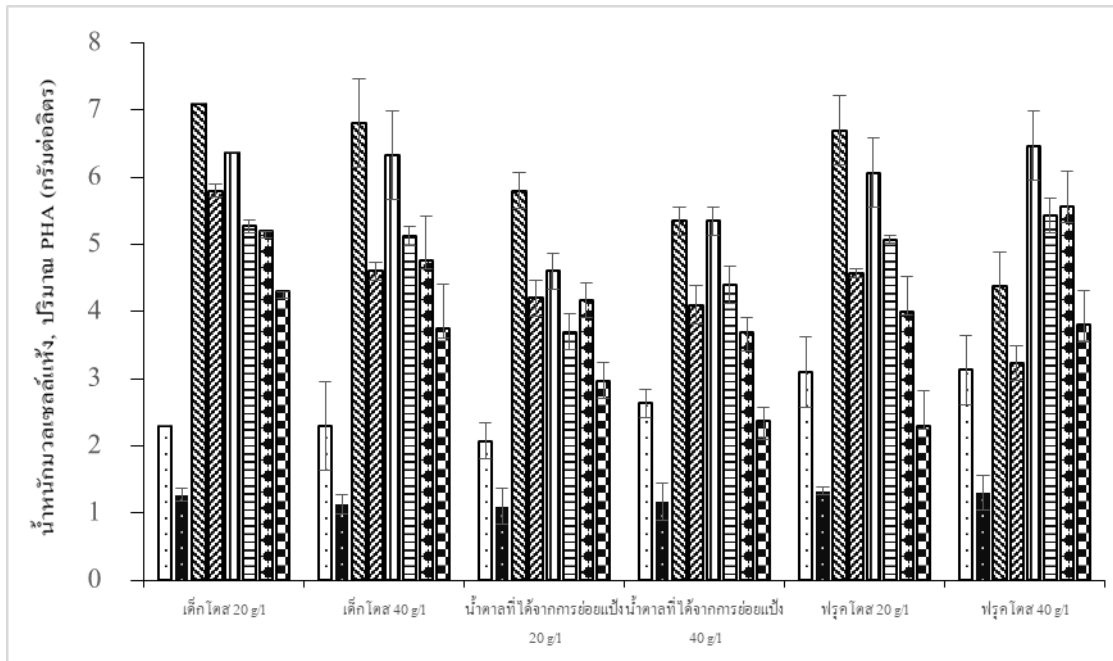
ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. lotus* BOT II ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจากส่วนที่ 1 โดยปรับแหล่งคาร์บอนเป็นเด็กซ์โตรส น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้ง และฟรุคโตสความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารกระตุ้นให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ชนิดโพธิโอนิกและอะซิเตทความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร โดยอะซิเตท

และโพรฟิโอนิคมีปริมาณ 28.75 และ 1.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* BOT II มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 6-36 ชั่วโมง และมีการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร มีการเจริญดีที่สุด รองลงมา คือ เด็กซ์โตรสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ฟรุคโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการเลี้ยงเชื้อในเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด  $7.10 \pm 0.00$  กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ฟรุคโตสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เด็กซ์โตรสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ฟรุคโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ได้เท่ากับ  $6.47 \pm 0.51$ ,  $6.33 \pm 0.65$ ,  $6.07 \pm 0.21$ ,  $5.80 \pm 0.26$  และ  $5.35 \pm 0.21$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่าเด็กซ์โตรสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ  $5.80 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 81.69 รองลงมา คือ ฟรุคโตสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร, เด็กซ์โตรสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ฟรุคโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร น้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 83.93, 81.04, 83.52, 82.24 และ 72.41 ตามลำดับ (ตารางที่ 20 และภาพที่ 27)

ตารางที่ 20 ค่ามวลเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละปริมาณการสะสม PHAs ของเชื้อ *A. latus* BOT II ในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารโพรฟิโอนิคและอะซิเตท

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



ภาพที่ 27 การเปรียบเทียบมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดของเชื้อ *A. latus*

BOT II ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารโพธิ์อินคและอะซิเตทที่  
เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดย

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

## ส่วนที่ 4 การศึกษาการวิธีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

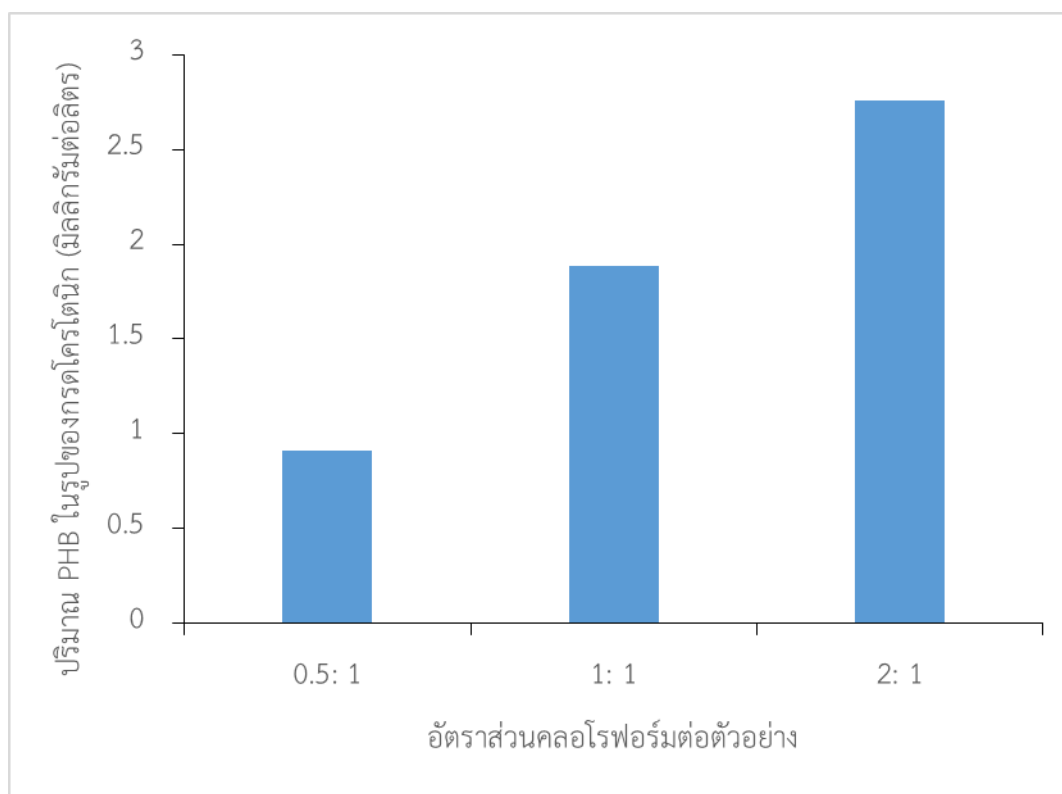
### 4.1 การสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม (ดัดแปลงจาก Rawte และ Mavinkurve, 2002)

จากการนำเซลล์ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* BOT II ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงสูตร DSMZ catalogue และคณะ (1993) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาทำการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม โดยการนำเซลล์ตัวอย่างจากน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเติมคลอโรฟอร์มที่อัตราส่วนต่อตัวอย่าง 1: 1 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการกรอง เพื่อเก็บส่วนคลอโรฟอร์มไปตกตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์เย็น ปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และเก็บส่วนตะกอนไปล้างด้วยอะซิโตน จากนั้นละลายตะกอนในคลอโรฟอร์มอุ่น ทำการระเหยแห้งและนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Nabila และ Veena (2016) โดยนำตัวอย่างที่สกัดได้ไปย่อยด้วยการเติมกรดซัลฟูริก 1 มิลลิลิตร และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดโครโตนิก (Crotonic acid) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์มให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ  $1.77 \pm 0.08$  มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการศึกษาเพื่อหาความเหมาะสมของการใช้คลอโรฟอร์ม และกรดซัลฟูริกที่เหมาะสมต่อพลาสติกชนิดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ได้จากการผลิตของเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ดังนี้ คือ

#### 4.1.1 อัตราส่วนของคลอโรฟอร์มที่เหมาะสมในการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม

จากการนำเซลล์ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* BOT II ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงสูตร DSMZ catalogue และคณะ (1993) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาทำการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์มโดยการนำเซลล์ตัวอย่างจากน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเติมคลอโรฟอร์มที่อัตราส่วนต่อตัวอย่างที่แตกต่างกันดังนี้ คือ 0.5: 1, 1: 1 และ 2: 1 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการกรองเพื่อเก็บส่วนคลอโรฟอร์มไปตกตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์เย็น ปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนตะกอนไปล้างด้วยอะซิโตน จากนั้นละลายตะกอนในคลอโรฟอร์มอุ่น ทำการระเหยแห้ง และนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Nabila และ Veena (2016) โดยนำตัวอย่างที่สกัดได้ไปย่อยด้วยการเติมกรดซัลฟูริก 1 มิลลิลิตร และนำไปต้มที่อุณหภูมิ

95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ เทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดโครโตนิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่า การสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม โดยใช้อัตราส่วนของคลอโรฟอร์มต่อตัวอย่างที่ 2: 1 ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สูงที่สุด รองลงมาคือ 1: 1 และ 0.5: 1 ตามลำดับ โดยให้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเท่ากับ  $2.76 \pm 0.06$ ,  $1.88 \pm 0.04$  และ  $0.91 \pm 0.01$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 26 และ ตารางที่ 21 ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่ำกว่างานวิจัยของ Rawte และ Mavinkurve (2002) ที่ได้คัดแยกจุลินทรีย์จากทะเลออกมา 5 Isolates ดังนี้คือ 61/4, 64/4, 82/4, 12/BL และ 85/6 นำมาทำการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม พบว่ามีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเท่ากับ  $0.8260 \pm 0.0367$ ,  $0.8371 \pm 0.0170$ ,  $0.5436 \pm 0.0141$ ,  $1.4748 \pm 0.14860$  และ  $0.6302 \pm 0.0003$  ตามลำดับ



ภาพที่ 28 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต จากการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม โดยใช้คลอโรฟอร์มในการสกัดที่อัตราส่วนต่อตัวอย่าง 0.5: 1, 1: 1 และ 2: 1

ตารางที่ 21 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต จากการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม โดยใช้คลอโรฟอร์มในอัตราส่วนแตกต่างกัน

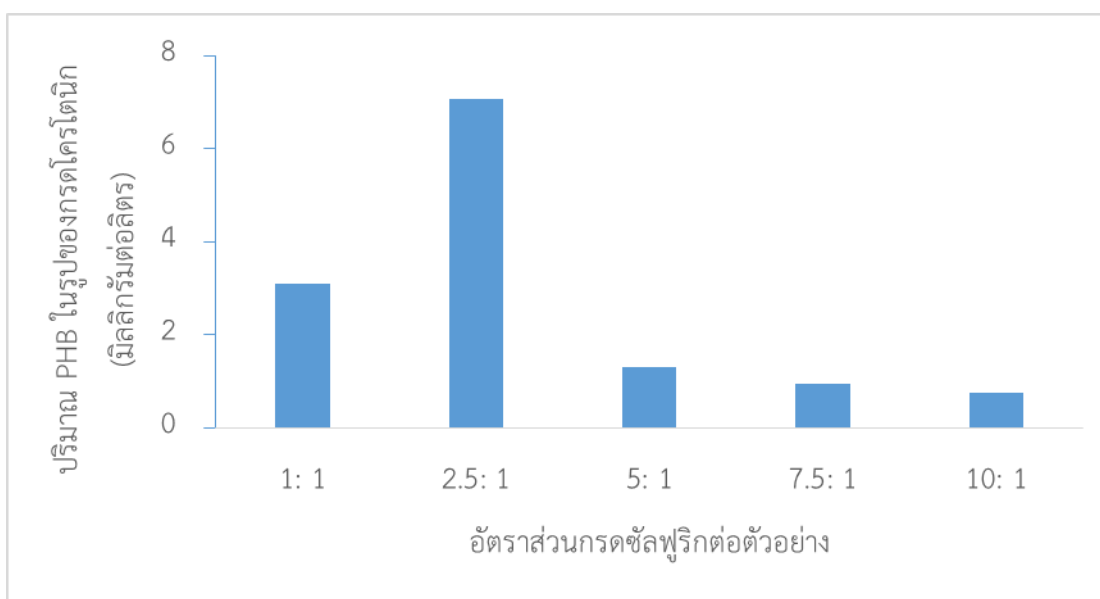
อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อตัวอย่าง	ปริมาณ PHB ในรูปของกรดโครโทนิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0.5: 1	0.91 ± 0.01
1: 1	1.88 ± 0.04
2: 1	2.76 ± 0.06

จากการศึกษาโดยการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม จะเห็นได้ว่าการใช้อัตราส่วนของคลอโรฟอร์มที่มากขึ้นมีผลทำให้ได้ปริมาณของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่มากขึ้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงเลือกใช้อัตราส่วนของคลอโรฟอร์มต่อตัวอย่างที่ 2 : 1 ที่เมื่อทำการสกัดแล้วให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) สูงที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาหัวข้อต่อไป

#### 4.1.2 อัตราส่วนกรดซัลฟูริกที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม

จากการนำเซลล์ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* BOT II ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงสูตร DSMZ catalogue และคณะ (1993) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาทำการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม โดยเลือกใช้อัตราส่วนของคลอโรฟอร์มที่ให้ผลการสกัดดีที่สุดจากการศึกษาข้างต้นมาทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยการเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นที่อัตราส่วนต่อตัวอย่างน้ำหมักที่แตกต่างกันดังนี้ คือ 1:1, 2.5: 1, 5: 1, 7.5: 1 และ 10: 1 ดังแสดงในภาพที่ 29 และตารางที่ 22 พบว่า การเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นที่อัตราส่วน 2.5: 1 ให้ค่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สูงที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $7.07 \pm 0.15$  รองลงมาคือที่อัตราส่วน 1: 1 มีค่าเท่ากับ  $3.09 \pm 0.26$  และอัตราส่วนที่ให้ค่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) น้อยที่สุดคือ 10: 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $0.75 \pm 0.10$  มิลลิกรัมต่อลิตร





ภาพที่ 29 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ที่วัดได้จากการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีคลอโรฟอร์มโดยใช้อัตราส่วนกรดซัลฟูริกต่อตัวอย่างที่แตกต่างกันในการวิเคราะห์หาปริมาณ

ตารางที่ 22 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์มโดยใช้กรดซัลฟูริกที่อัตราส่วนแตกต่างกัน

อัตราส่วนกรดซัลฟูริกต่อตัวอย่าง	ปริมาณ PHB ในรูปของกรดโครโตนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1: 1	3.09 ± 0.26
2.5: 1	7.07 ± 0.15
5: 1	1.31 ± 0.09
7.5: 1	0.95 ± 0.07
10: 1	0.75 ± 0.10

จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าการใช้อัตราส่วนกรดซัลฟูริกต่อตัวอย่างที่ 2.5: 1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม เพื่อหาปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เนื่องจากให้ค่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่วัดได้สูงกว่าการใช้อัตราส่วนอื่นๆ

## 4.2. การสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ (Rawte & Mavinkurve, 2002)

จากการนำเซลล์ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* BOT II ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงสูตร DSMZ catalogue และคณะ (1993) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาทำการสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์โดยการนำเซลล์ตัวอย่างจากน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำการเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในอัตราส่วนต่อตัวอย่าง 0.5: 1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และล้างตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์เย็น ปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อเก็บตะกอนไปทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Nabila และ Veena (2016) โดยนำตัวอย่างที่สกัดได้ไปย่อยด้วยการเติมกรดซัลฟูริก 1 มิลลิลิตร และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดโครโตนิก (Crotonic acid) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าการสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) เท่ากับ  $147.60 \pm 2.74$  มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ และกรดซัลฟูริกที่เหมาะสมในการวิเคราะห์พลาสติกชนิดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ได้จากการผลิตของเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ดังนี้

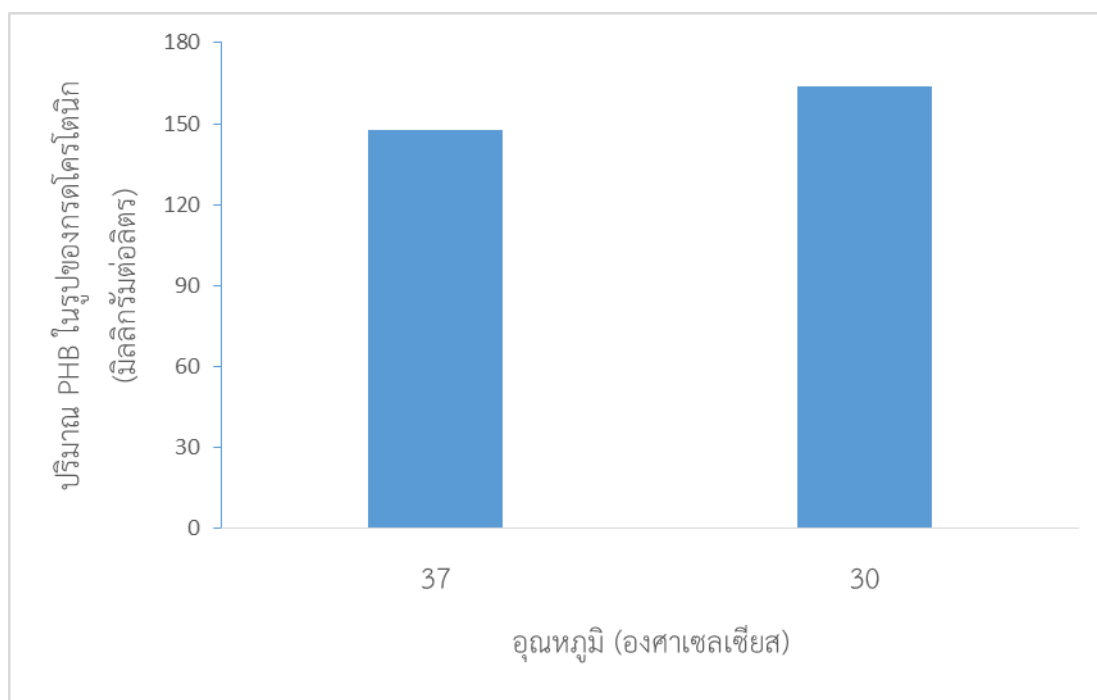
### 4.2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์

จากการนำเซลล์ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* BOT II ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงสูตร DSMZ catalogue และคณะ (1993) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาทำการสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์โดยการนำเซลล์ตัวอย่างจากน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำการเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในอัตราส่วนต่อตัวอย่าง 0.5: 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และล้างตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์เย็น ปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อเก็บตะกอนไปทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Nabila และ Veena (2016) โดยนำตัวอย่างที่สกัดได้ไปย่อยด้วยการเติมกรดซัลฟูริก 1 มิลลิลิตร และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้กรดโครโตนิกเป็นสารมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 23 และภาพที่ 30 พบว่าการสกัดด้วยไฮโปคลอไรท์โดยใช้อุณหภูมิในการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิว

ทิเรต (PHB) สูงกว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีค่าเท่ากับ  $163.79 \pm 3.05$  และ  $147.60 \pm 2.74$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นการศึกษาคครั้งนี้จึงเลือกใช้อุณหภูมิการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสในการสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์เพื่อใช้ในการศึกษาหัวข้อต่อไป

ตารางที่ 23 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) จากการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ที่ อุณหภูมิแตกต่างกัน

อุณหภูมิในการสกัด (องศาเซลเซียส)	ปริมาณ PHB ในรูปของกรดโครโทนิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)
30	$163.79 \pm 3.05$
37	$147.60 \pm 2.74$



ภาพที่ 30 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) จากการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

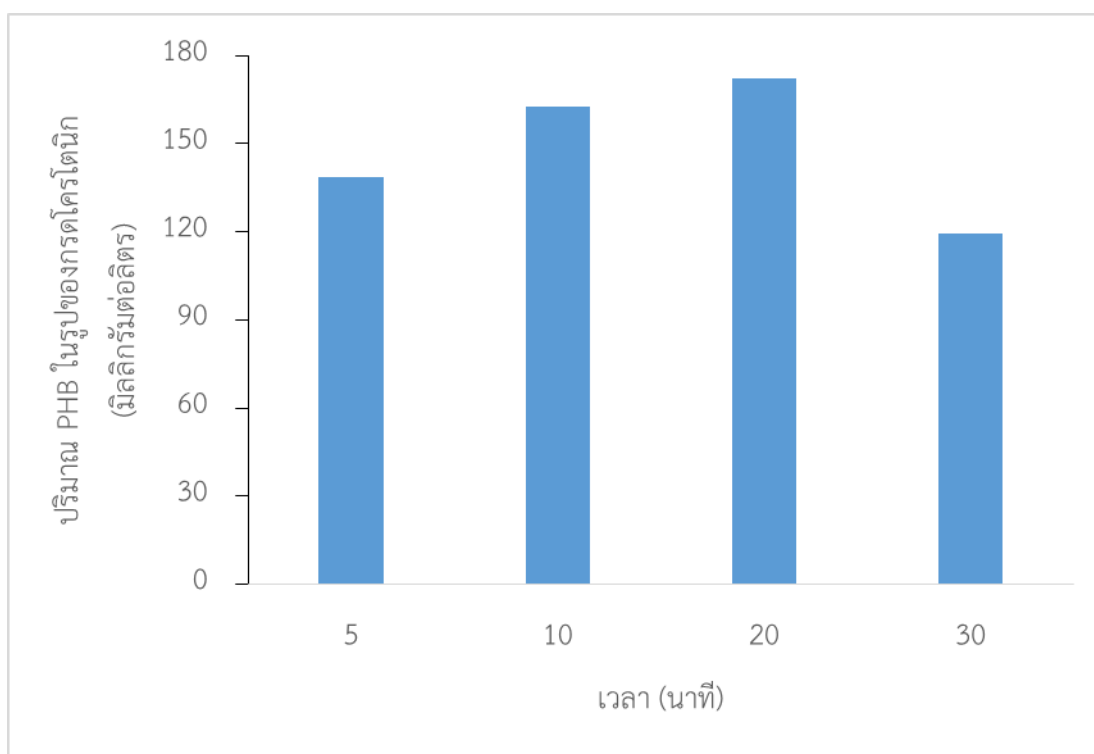
#### 4.2.2 เวลาที่เหมาะสมในการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์

จากการนำเซลล์ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* BOT II ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงสูตร DSMZ catalogue และคณะ (1993) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาทำการ

สกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์โดยการนำเซลล์ตัวอย่างจากน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำการเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในอัตราส่วนต่อตัวอย่าง 0.5: 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลาแตกต่างกัน ดังนี้คือ 5, 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และล้างตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์เย็น ปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อเก็บตะกอนไปทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Nabila และ Veena (2016) โดยนำตัวอย่างที่สกัดได้ไปย่อยด้วยการเติมกรดซัลฟูริก 1 มิลลิลิตร และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดโครโตนิคเป็นสารมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 24 และภาพที่ 31 พบว่า การสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์โดยใช้เวลาในการบ่มที่ 20 นาที ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) สูงที่สุด รองลงมาคือที่เวลา 10, 5 และ 30 นาที โดยมีค่าเท่ากับ  $172.30 \pm 3.03$ ,  $162.56 \pm 3.51$ ,  $138.79 \pm 5.94$  และ  $119.39 \pm 3.12$  มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rawte และ Mavinkurve (2002) ที่มีการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากแบคทีเรีย Isolates 12/BL ที่แยกได้จากน้ำทะเลโดยใช้การสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ ซึ่งบ่มที่เวลาแตกต่างกัน ดังนี้คือ 5, 10, 20, 40 และ 60 นาที พบว่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นที่เวลา 5 ถึง 20 นาที และมีแนวโน้มลดลงที่เวลา 20 นาที ขึ้นไป

ตารางที่ 24 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) จากการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ที่เวลาแตกต่างกัน

เวลาที่ใช้ในการสกัด (นาที)	ปริมาณ PHB ในรูปของกรดโครโตนิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)
5	$138.79 \pm 5.94$
10	$162.56 \pm 3.51$
20	$172.30 \pm 3.03$
30	$119.39 \pm 3.12$



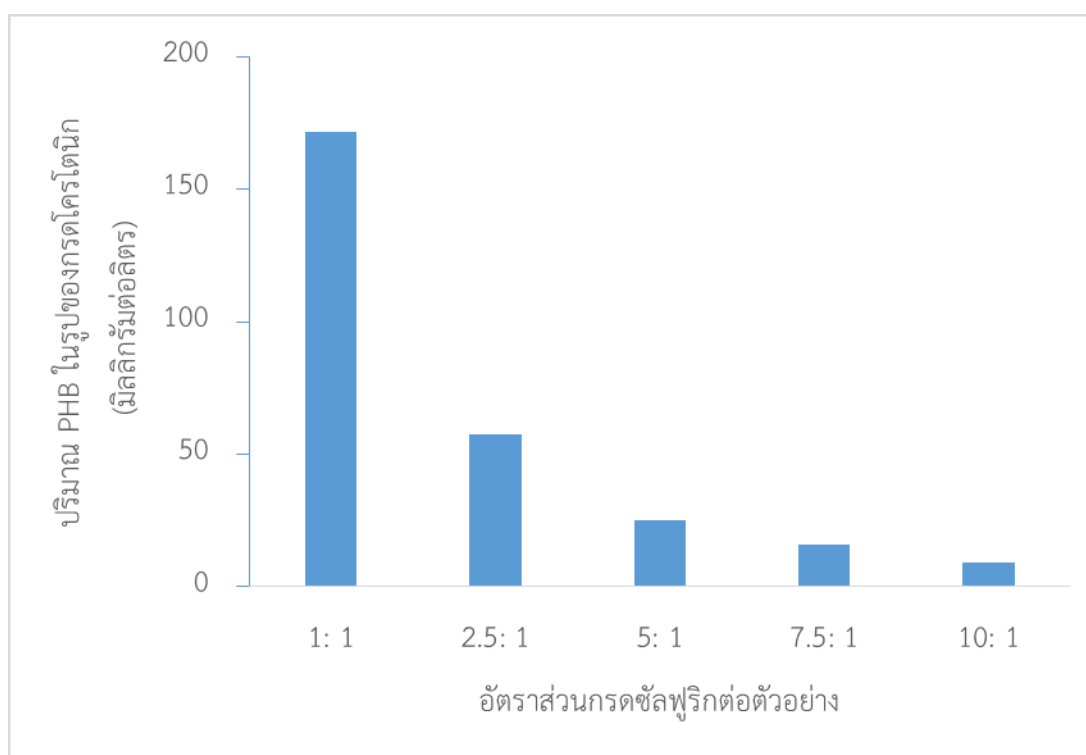
ภาพที่ 31 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) จากการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ที่เวลาแตกต่างกัน

### 3.2.3 อัตราส่วนกรดซัลฟูริกที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์จากตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์

จากการนำเซลล์ตัวอย่างของเชื้อ *Alcaligenes latus* BOT II ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงสูตร DSMZ catalogue และคณะ (1993) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาทำการสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ โดยเลือกใช้ข้อมูลหภูมิและเวลาในการบ่มที่ให้ผลการสกัดดีที่สุดจากการศึกษาข้างต้นมาทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์โดยการเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นที่อัตราส่วนต่อตัวอย่างน้ำหมักที่แตกต่างกันดังนี้ คือ 1:1, 2.5: 1, 5: 1, 7.5: 1 และ 10: 1 ดังแสดงในตารางที่ 25 และภาพที่ 32 พบว่า การเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นที่อัตราส่วน 1: 1 ให้ค่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ที่สูงที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $171.82 \pm 3.34$  รองลงมาคือที่อัตราส่วน 2.5: 1 มีค่าเท่ากับ  $57.37 \pm 3.48$  และอัตราส่วนที่ให้ค่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) น้อยที่สุดคือ 10: 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $8.99 \pm 0.34$  มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 25 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์โดยใช้กรดซัลฟูริกที่อัตราส่วนแตกต่างกัน

อัตราส่วนกรดซัลฟูริกต่อตัวอย่าง	ปริมาณ PHB ในรูปของกรดโครโทนิค (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1: 1	171.82 ± 3.34
2.5: 1	57.37 ± 3.48
5: 1	25.27 ± 1.01
7.5: 1	15.70 ± 0.90
10: 1	8.99 ± 0.34



ภาพที่ 32 ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ที่วัดได้จากการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์โดยใช้อัตราส่วนกรดซัลฟูริกต่อตัวอย่างที่แตกต่างกันในการวิเคราะห์หาปริมาณ

จากการศึกษา เมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์มาทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้กรดซัลฟูริกที่อัตราส่วนต่อตัวอย่างแตกต่างกันจะเห็นได้ว่าการใช้อัตราส่วนที่เพิ่มมากขึ้นมีผลทำให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่วัดได้ลดลง และอัตราส่วนที่

1:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการใช้วิเคราะห์ตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์เพื่อหาปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เนื่องจากให้ค่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ที่วัดได้สูงกว่าการใช้อัตราส่วนอื่นๆ

#### 4.3 การตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของทั้ง 2 วิธี

จากการนำเซลล์ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงสูตร DSMZ catalogue และคณะ (1993) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาทำการตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยทำสกัดและวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยวิธีคลอโรฟอร์มและวิธีไฮโปคลอไรท์โดยใช้สภาวะในการสกัดและวิเคราะห์ที่เหมาะสมของแต่ละวิธีที่ได้จากการศึกษาข้างต้น พบว่าการตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากเซลล์ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ที่สูงกว่าการตรวจสอบด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม ดังแสดงในตารางที่ 26 ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rawte และ Mavinkurve (2002) ที่ทำการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์มและวิธีไฮโปคลอไรท์ในแบคทีเรียชนิดเดียวกัน พบว่า การสกัดด้วยไฮโปคลอไรท์ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สูงกว่าการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม

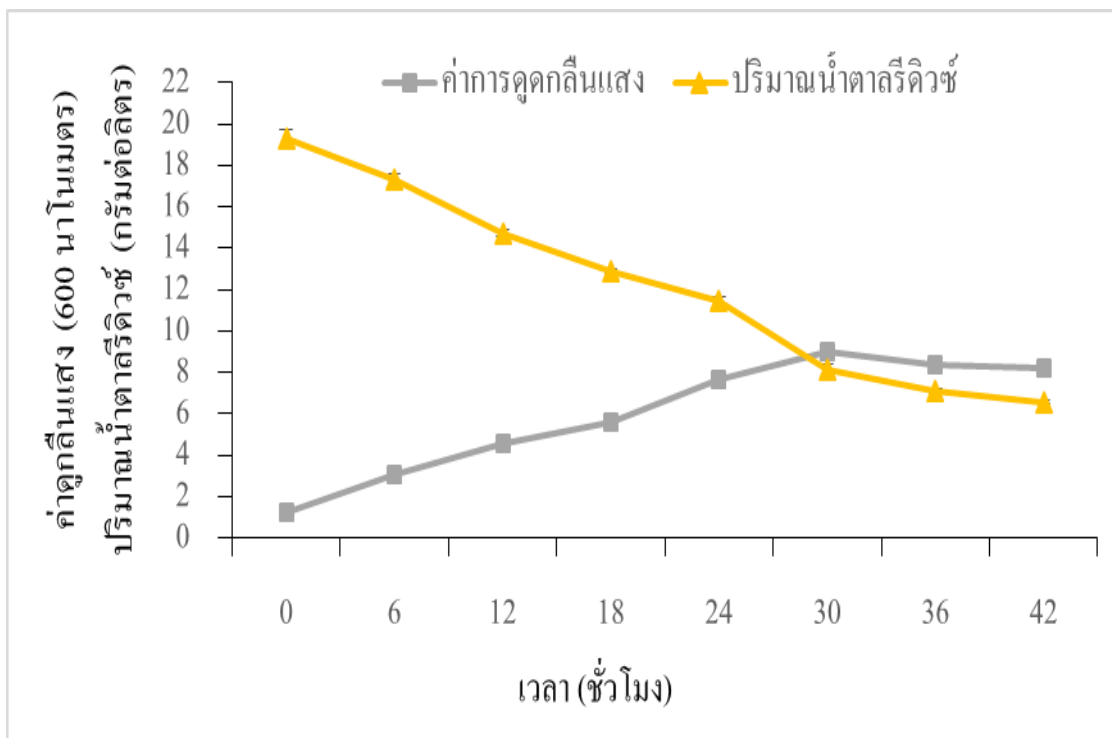
ตารางที่ 26 การตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ของวิธีคลอโรฟอร์มและวิธีไฮโปคลอไรท์

ปริมาณ PHB ในรูปของกรดโครโตนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
วิธีคลอโรฟอร์ม	วิธีไฮโปคลอไรท์
$7.07 \pm 0.15$	$171.82 \pm 3.34$

#### ส่วนที่ 5 ผลของการขยายขนาดการเลี้ยงสู่ระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ (Batch Culture)

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ขนาด 5 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เติมลงในอาหารปริมาตร 3 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 200 รอบต่อนาที กำหนดอัตราการให้อากาศ

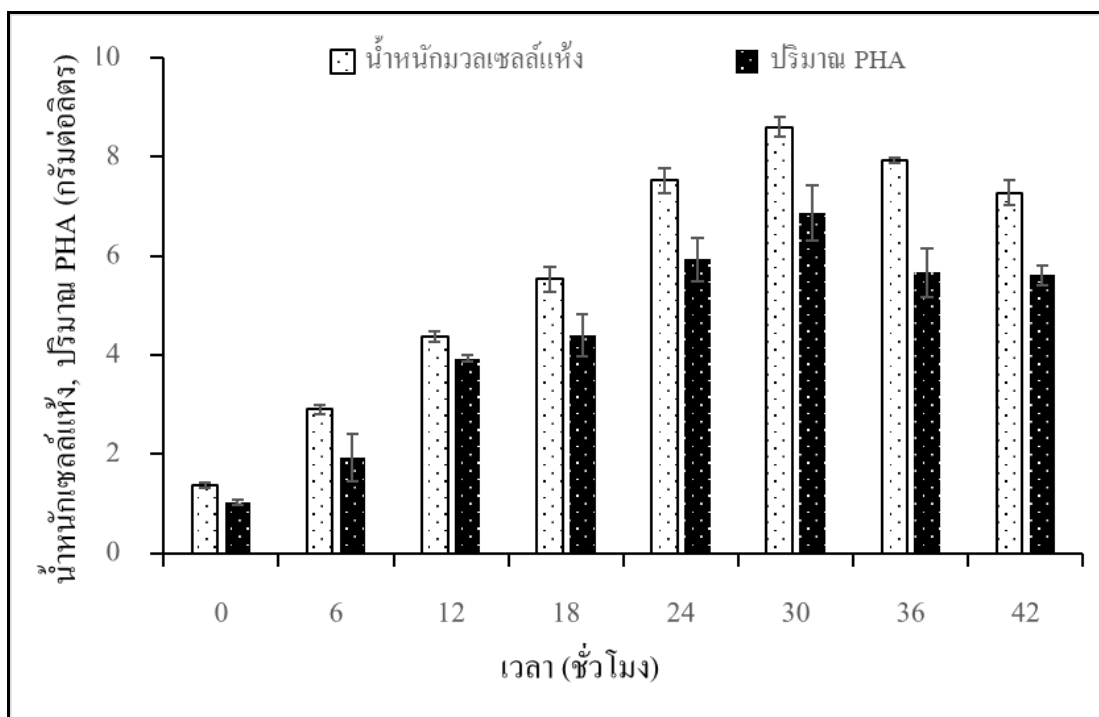
เท่ากับ 2 vvm และค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 นอร์มอล ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *A. latus* BOT II มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง และสูงสุดที่ 30 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญจึงเริ่มคงที่ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการลดลงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่ระยะเวลา 42 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือภายในถังหมัก เท่ากับ  $6.58 \pm 0.08$  กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 33



ภาพที่ 33 การเจริญและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือของเชื้อ *A. latus* BOT II ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 42 ชั่วโมง

จากการศึกษาการผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า เชื้อ *A. latus* BOT II สามารถผลิตได้สูงสุดเท่ากับ  $8.60 \pm 0.20$  และ  $6.87 \pm 0.57$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.88 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 30 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 34





ภาพที่ 34 ปริมาณมวลเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs ของเชื้อ *A. latus* BOT II ที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 42 ชั่วโมง

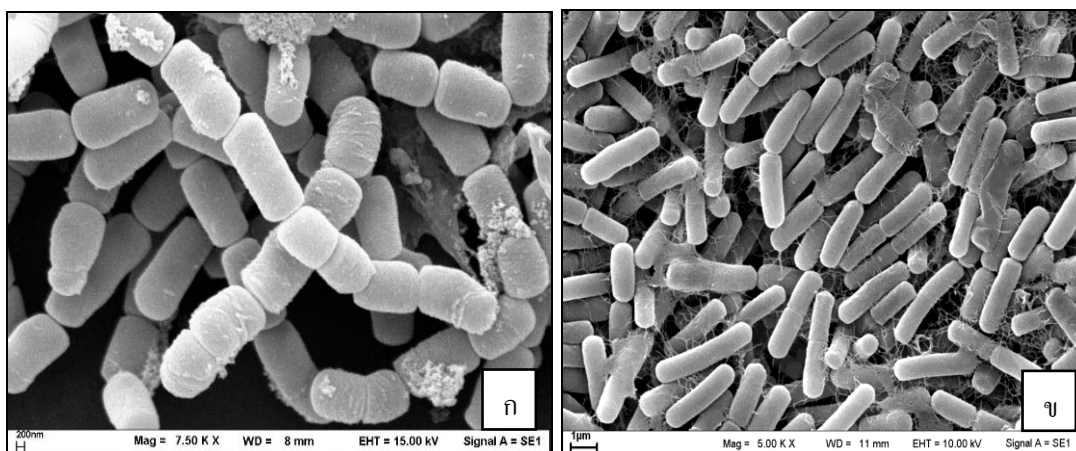
สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB ( $Y_{p/x}$ ) มีค่าเท่ากับ 0.68 กรัมผลผลิตต่อกรัมเซลล์ สัมประสิทธิ์ผลได้ของ PHB จากสารอาหาร ( $Y_{p/s}$ ) เท่ากับ 0.35 กรัมผลผลิตต่อกรัมของสารอาหาร สัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร ( $Y_{x/s}$ ) เท่ากับ 0.23 กรัมเซลล์ต่อกรัมของสารอาหาร และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ ( $Q_p$ ) เท่ากับ 0.28 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 30 ชั่วโมง

## ส่วนที่ 5 การศึกษาลักษณะสัณฐานของแบคทีเรีย

### 5.1 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ในการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* BOT II ในสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาขั้นต้น จากนั้นนำมาทำการตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อ *A. latus* BOT II ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่ารูปร่างของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีลักษณะเป็นท่อนสั้น และมีขนาดใหญ่ เนื่องจากการสะสมของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเกิดขึ้นภายในเซลล์ ดังแสดงในภาพที่

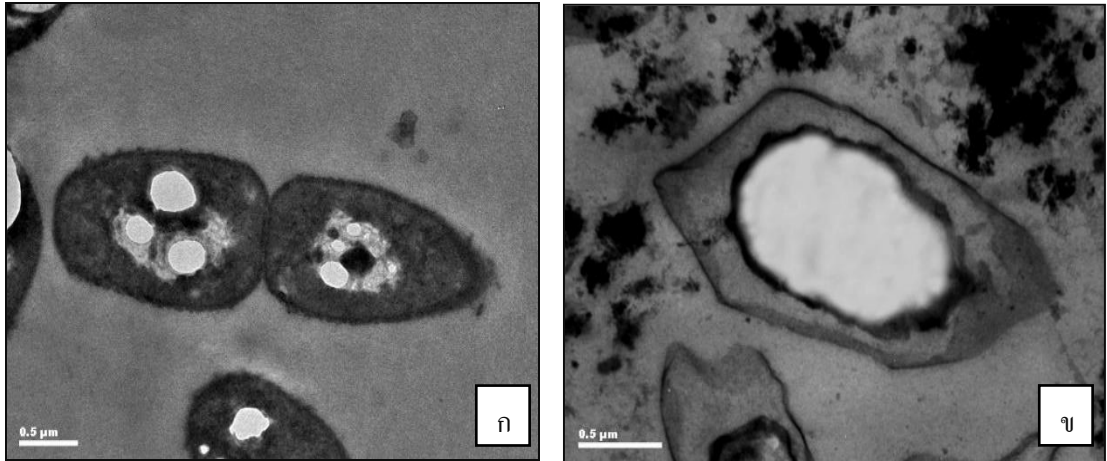
35 (ก) โดยเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับรายงานของจากรุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ, (2557) พบว่าเชื้อ *A. latus* BOT I มีลักษณะเป็นท่อนยาวกว่า ดังแสดงในภาพที่ 35 (ข)



ภาพที่ 35 ลักษณะของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II (ก) และ เชื้อ *A. latus* BOT I (ข) ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (SEM)

## 5.2 การส่องตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

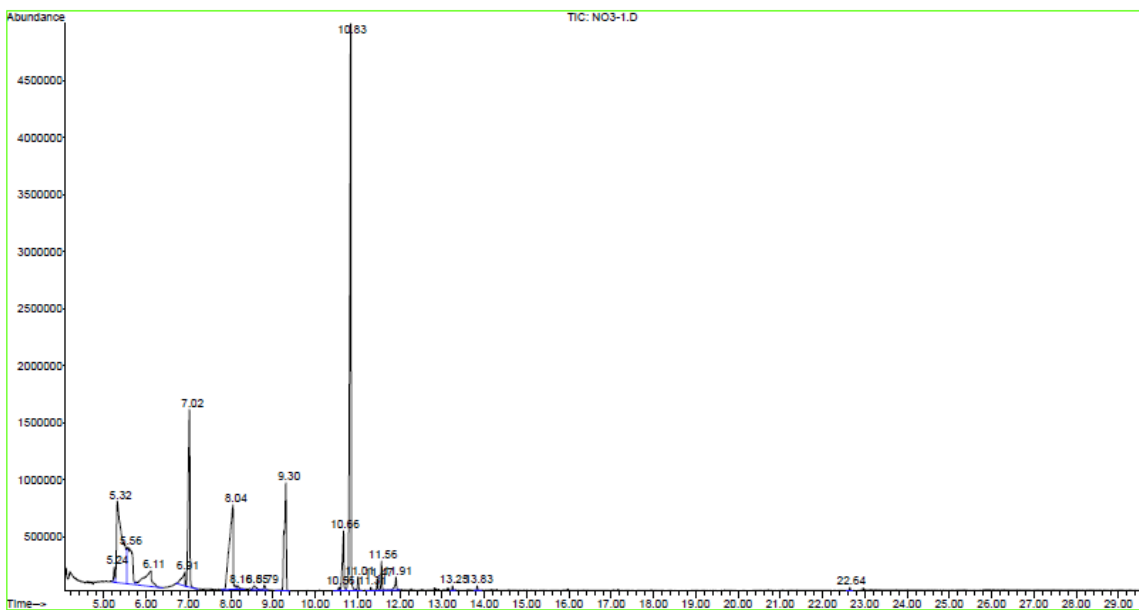
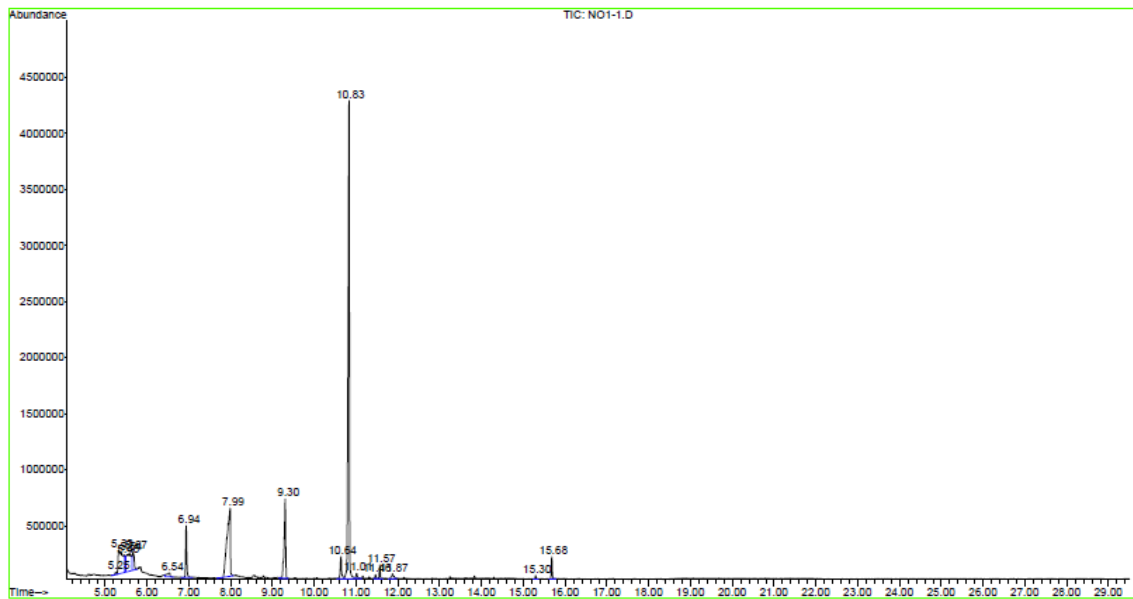
เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* BOT II ในสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาขั้นต้น จากนั้นนำมาทำการตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อ *A. latus* BOT II ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าเชื้อ *A. latus* BOT II มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้าง ขนาดใหญ่ ลักษณะค่อนข้างกลม เนื่องจากการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในแกรนูล และเมื่อเชื้อถูกกระตุ้นทำให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ขึ้นมา จะพบก้อนสีดำลักษณะกลมปะปนอยู่ภายในเซลล์ คาดว่าเป็นชิ้นส่วนของโคพอลิเมอร์ ดังแสดงในภาพที่ 36 (ก) โดยเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับรายงานของจากรุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ, (2557) พบว่าเชื้อ *A. latus* BOT I มีการสะสมพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในแกรนูลปริมาณสูงกว่า และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่กว่า แต่ไม่พบก้อนสีดำลักษณะกลมปะปนอยู่ภายในเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 36 (ข)



ภาพที่ 36 ลักษณะของเชื้อ *A. latus* BOT II (ก) และ เชื้อ *A. latus* BOT I (ข) ที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

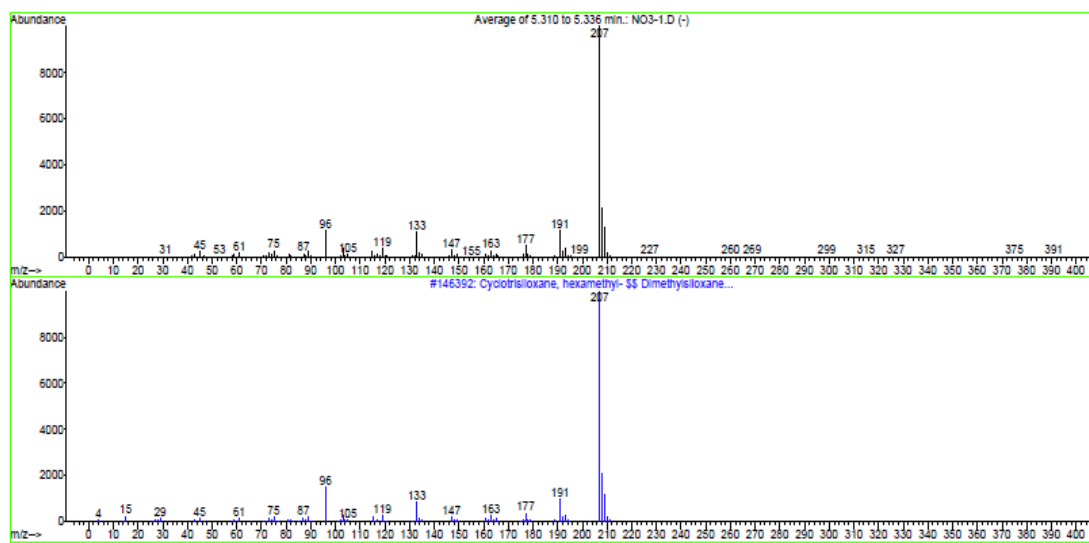
#### ส่วนที่ 6 การตรวจสอบชนิดและปริมาณของพอลิเบต้าไฮดรอกซีอัลคาลาโนเอต

จากการเตรียม methyl ester (เมธิล เอสเทอร์) ของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ เมื่อทดสอบด้วยเครื่อง GC-MS พบ โครมาโตแกรมที่น่าสนใจที่เป็น PHA ชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็น retention time เดียวกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานมาตรฐาน Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) ที่ retention time เท่ากับ 5.32, 6.91, 7.02, 8.05, 9.30, 10.83 และ 11.57 โดยพบว่า ส่วนของโครมาโตแกรมที่มีขนาดใหญ่จะเป็นสารชนิด methyl benzoate (ภาพที่ 37)

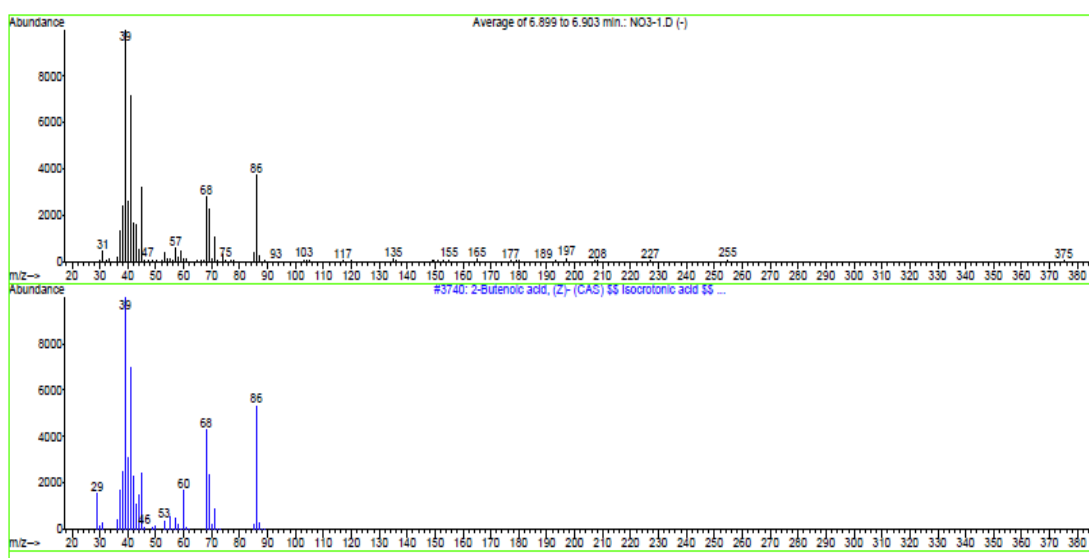


ภาพที่ 37 โครมาโตแกรมของสารที่พบจากการสร้างเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II (ก) เปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

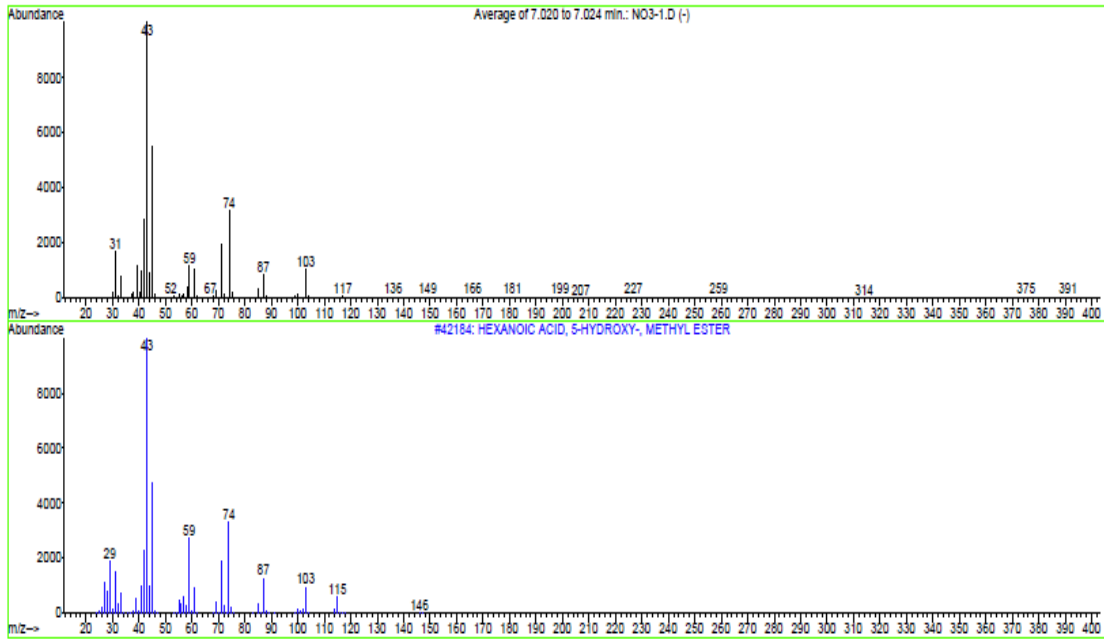
จากการตรวจสอบค่ามวลสเปกตรัม (Mass spectra) ของโครมาโตแกรมที่สกัดได้โดยเทียบกับ Library search wiley7n.l พบว่า เป็นสารชนิด dimethylsiloxane cyclic trimer, 2-Butanoic acid, 5-hydroxyhexanoic acid-methyl ester, methoxy phenyl oxime, octamethylcyclotetrasiloxane, methyl benzoate และ decamethylcyclopentasiloxane ตามลำดับ (ภาพที่ 38 ถึง ภาพที่ 44) โดยเรียงตามลำดับที่ retention time เท่ากับ 5.32, 6.91, 7.02, 8.05, 9.30, 10.83 และ 11.57



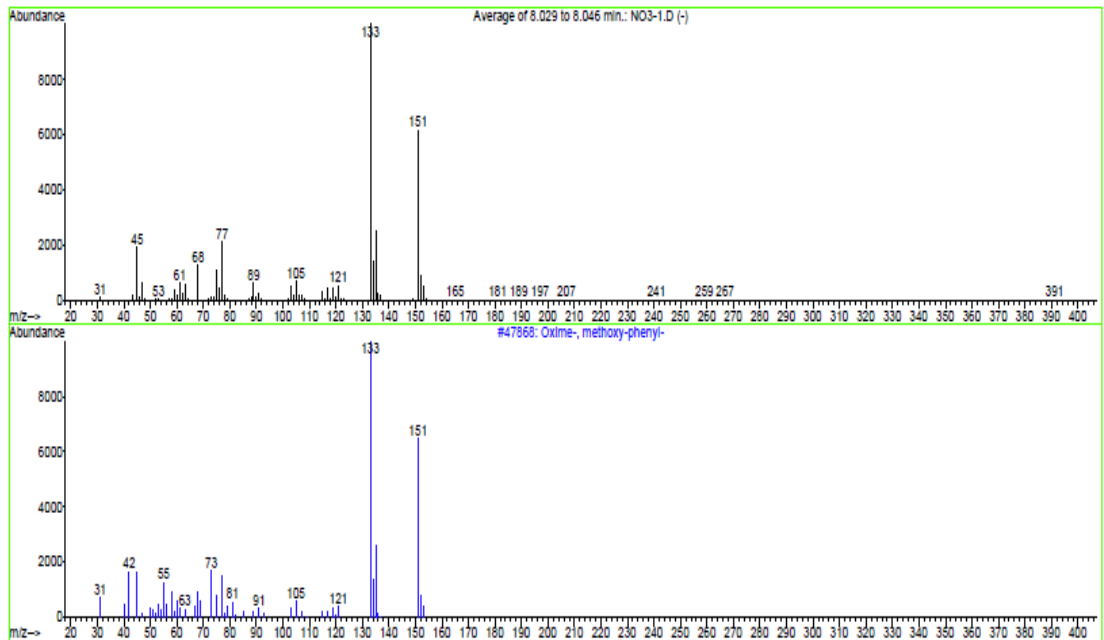
ภาพที่ 38 มวลสเปกตรัมของ dimethylsiloxane cyclic trimer ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัมจาก Library search wiley7n.l



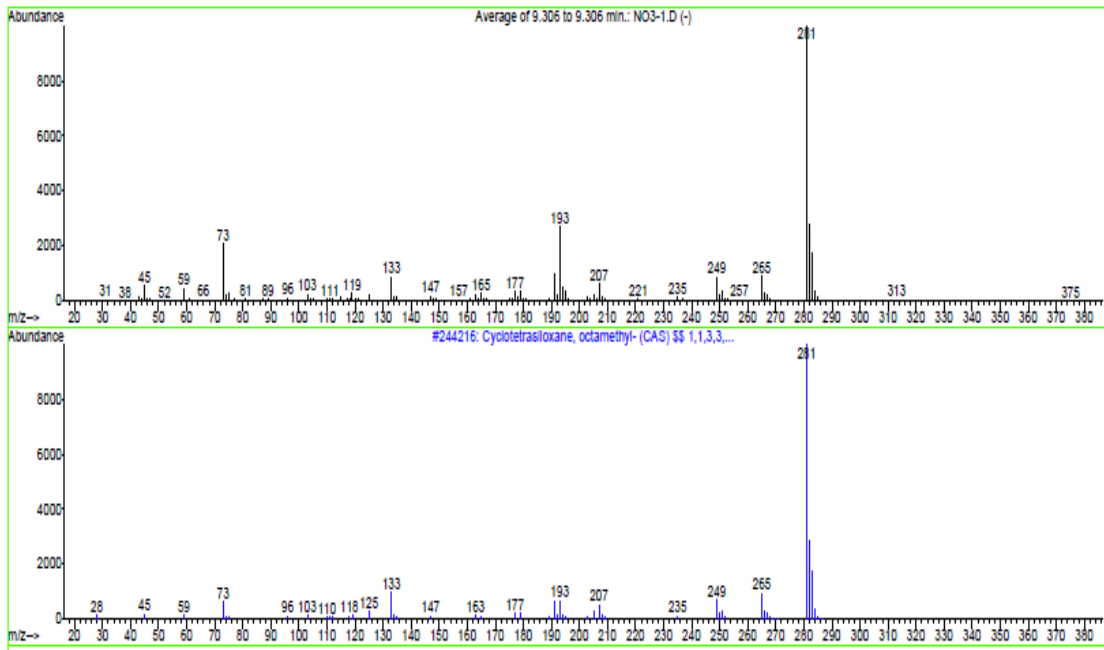
ภาพที่ 39 มวลสเปกตรัมของ 2-Butanoic acid ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัมจาก Library search wiley7n.l



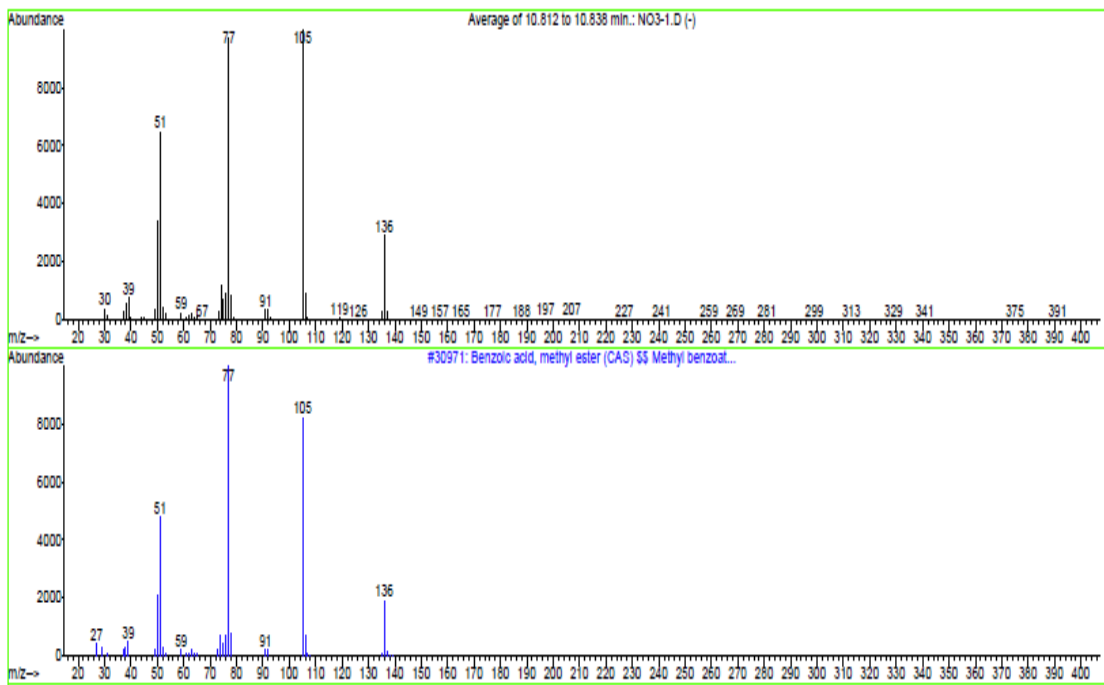
ภาพที่ 40 มวลสเปกตรัมของ hydroxyhexanoic acid-methyl ester ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัมจาก Library search wiley7n.l



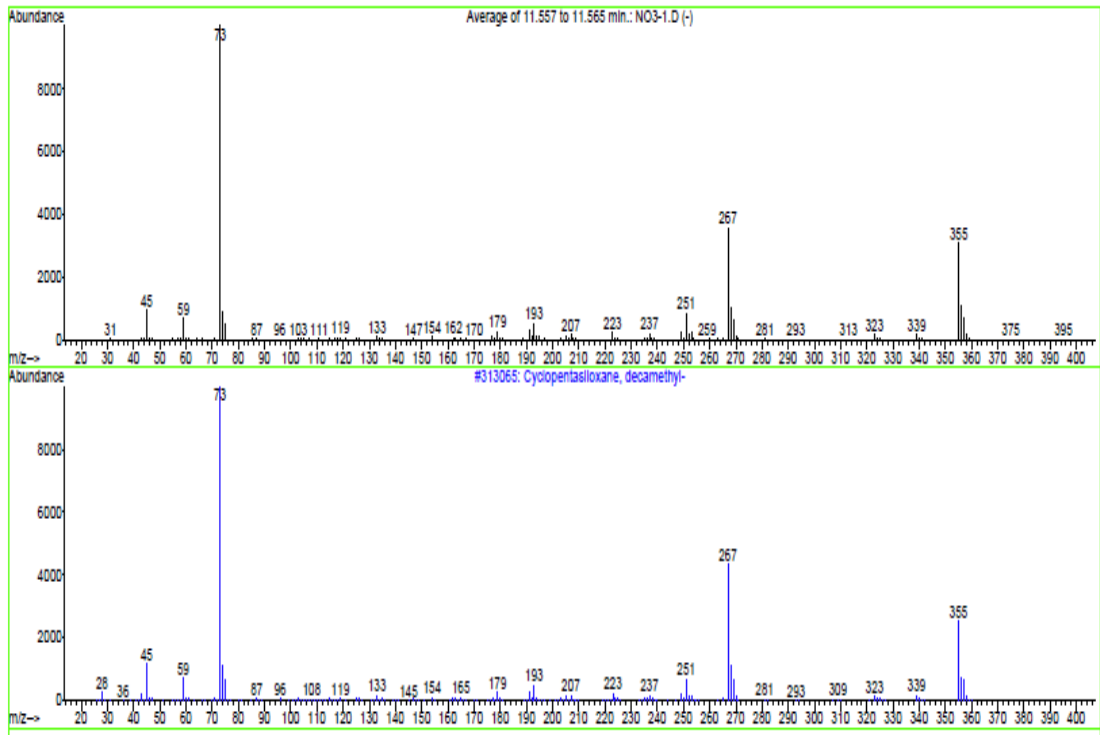
ภาพที่ 41 มวลสเปกตรัมของ methoxy phenyl oxime ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัมจาก Library search wiley7n.l



ภาพที่ 42 มวลสเปกตรัมของ octamethylcyclotetrasiloxane ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัมจาก Library search wiley7n.l



ภาพที่ 43 มวลสเปกตรัมของ methyl benzoate ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัมจาก Library search wiley7n.l



ภาพที่ 44 มวลสเปกตรัมของ methyl benzoate ที่สกัดได้ เทียบกับมวลสเปกตรัม  
จาก Library search wiley7n.l



## บทที่ 3

### สรุปผลการวิจัย

#### 1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

##### 1.1 ผลของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

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

## 1.2 ผลการใช้ไขมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากจุดประสงค์ของการศึกษาเพื่อต้องการใช้สารอาหารราคาถูกมาเป็นสารตั้งต้นให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในกระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ดังนั้นในครั้งนี้ได้เลือกใช้ไขมันถั่วเหลืองมาเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน ทั้งนี้เนื่องจากไขมันถั่วเหลืองมีปริมาณคาร์บอนมากกว่าน้ำตาลฟรุกโตส คาดว่ามีผลทำให้มีพลังงานในการเจริญเติบโตและผลิตผลิตภัณฑ์ได้มากกว่าจากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II ในสูตรอาหารที่ 2 ซึ่งใช้ไขมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยทำการปรับความเข้มข้นของไขมันถั่วเหลืองเป็น 10, 20, 40 และ 60 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมที่มีน้ำตาลฟรุกโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ มีการเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นไขมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตรสูงกว่าชุดควบคุม โดยมีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง และมีการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง ในทุกชุดการทดลอง

จากการศึกษา เชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง พบว่าที่ความเข้มข้นของไขมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ  $2.53 \pm 0.06$  และ  $1.93 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 76.28 ของมวลเซลล์แห้ง และพบว่าที่ความเข้มข้นไขมันถั่วเหลือง 60 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้รองลงมา มีค่าเท่ากับ  $1.85 \pm 0.21$  และ  $1.70 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าความเข้มข้นไขมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร เนื่องจากความเข้มข้นของไขมันถั่วเหลืองที่มากเกินไปอาจส่งผลให้ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยลง ดังนั้นความเข้มข้นไขมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ส่วนในเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ BOT I พบว่าที่ความเข้มข้นของไขมันถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร ผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ  $2.00 \pm 0.06$  และ  $2.27 \pm 0.07$  กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ  $1.40 \pm 0.10$  และ  $1.47 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 70.00 และ 65.33 ของมวลเซลล์แห้งตามลำดับ โดยการศึกษาในครั้งนี้มีค่าต่ำกว่าการศึกษาของ Park and Kim (2011) รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อ *Ralstonia eutropha* ในการผลิตโคพอลิเมอร์ที่ใช้ไขมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เท่ากับ 8.3 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณโคพอลิเมอร์เท่ากับ 7.4 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 88 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

### 1.3 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยทำการปรับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นทั้งหมด 3 ชุดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงชุดที่ 3 มีการเจริญสูงสุด ซึ่งมีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และผงชูรส 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด  $3.47 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด  $2.63 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 75.79 ของมวลเซลล์แห้ง และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่ามีค่าสูงกว่า ส่วนเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม และ BOT I พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารดัดแปลงชุดที่ 3 เช่นเดียวกัน สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ  $1.40 \pm 0.20$  และ  $2.53 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 84.34 และ 75.07 ตามลำดับ จากการใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ ส่งผลให้ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเพิ่มขึ้น เนื่องจากในแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นอนินทรีย์ไนโตรเจน ส่วนในผงชูรสจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนต่าง ๆ ซึ่งโดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Quillaguamán et al. (2008) ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Halomonas Bolivensis* ในการเลี้ยงแบบเดิมกะ โดยใช้ผงชูรสความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 44 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตร้อยละ 81 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และพบว่ามีปริมาณพลาสติกชีวภาพต่ำกว่ารายงานสุพัฒน์ ชมใจ และรสมันต์ จงเจริญ (2555) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตของ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 เมื่อใช้เตี๊ยกซีไตรสและผงชูรสเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยมีอัตรา C:N เท่ากับ 20:2 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต ได้เท่ากับ 4.86 และ 3.92 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 80.60 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

### 1.4 ผลของความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการศึกษาความเข้มข้นของผงชูรสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม, BOT I และ BOT II โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยทำการปรับความเข้มข้นของผงชูรส (ตราถ้วยแดง) เริ่มต้นเท่ากับ 0.5, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่

ความเข้มข้นผงชูรสเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกชุดการทดลอง พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ มีอัตราการเจริญสูงสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของผงชูรส 2 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงมีความเข้มข้นของผงชูรสเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ  $4.53 \pm 0.32$  และ  $3.10 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 68.43 ของมวลเซลล์แห้ง ซึ่งมีความมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงกว่าชุดควบคุม ส่วนในเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม และ BOT I พบว่าในสูตรอาหารดัดแปลงมีความเข้มข้นของผงชูรสเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร ผลิตมวลเซลล์แห้ง  $2.37 \pm 0.06$  และ  $2.83 \pm 0.25$  และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ  $1.87 \pm 0.16$  และ  $2.53 \pm 0.25$  คิดเป็นร้อยละ 78.90 และ 89.40 ตามลำดับ การใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นผงชูรสที่เหมาะสม เนื่องจากผงชูรสยังมีสารอื่น ๆ เช่น กรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่ามีปริมาณพลาสติกชีวภาพต่ำกว่ารายงานของสุพัฒน์ ชมใจ และรสมันต์ จงเจริญ (2555) ได้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 โดยใช้เด็กซ์โตรสเป็นแหล่งคาร์บอนในอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:2, 20:4, 20:6, 20:8 และ 20:10 พบว่าการใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจนที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:2 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เท่ากับ 4.86 และ 3.92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 80.60 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และพบว่ามีค่าพลาสติกชีวภาพสูงกว่ารายงานของขวัญจันทร์ แก้วจันทร์ (2554) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซิเตรท และยูเรียความเข้มข้น 1.4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน พบว่าการใช้ไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลังร้อยละ 50 ร่วมกับแอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้น 1.4 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณพลาสติกชีวภาพ เท่ากับ 2.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 39.61 ของน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง

1.5 ผลของการอัตราส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการศึกษาความเข้มข้นผงชูรสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนของเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ดั้งเดิม BOT I และ BOT II โดยเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง DSMZ catalogue โดยทำการปรับอัตราส่วนความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2,

0.25:2, 0.10:2, 0.5:1, 0.5:0.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:2 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกชุด การทดลอง พบว่าเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงที่ 6-12 และเจริญสูงสุดในช่วงที่ 48 ในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารชุดที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.25:2 กรัมต่อลิตร มีการเจริญสูงสุด รองลงมา คือ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.5:0.5, 0.10:2, 0.5:1 และ 0.25:2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* ทั้งสามสายพันธุ์ ในอาหารที่มีการทดแทนแหล่งไนโตรเจนโดยการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรส พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.25:2 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด เท่ากับ  $5.90 \pm 0.20$  และ  $4.10 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 69.49 ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม ส่วนเชื้อ *A. latus* ดั้งเดิมและสายพันธุ์ BOT I ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสอัตราส่วน 0.25:2 มีมวลเซลล์แห้ง  $4.03 \pm 0.26$  และ  $4.60 \pm 0.26$  กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต มีค่าเท่ากับ  $2.97 \pm 0.15$  และ  $2.43 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 73.70 และ 52.83 ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงทั้งสามสายพันธุ์ในสูตรอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงชูรสเท่ากับ 0.25:2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนมีความเหมาะสมในการนำมาใช้งาน เนื่องจากเชื้อสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูง โดยการศึกษาในครั้งนี้มีค่าพลาสติกชีวภาพต่ำกว่ารายงานของจารุวรรณ ศรีเส็ง และคณะ (2557) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์กลายพันธุ์ โดยใช้กาน้ำตาลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตมวลเซลล์แห้ง เท่ากับ 7.85 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรต เท่ากับ 6.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 78.34 ของมวลเซลล์แห้ง

## 2. ผลการเติมสารตั้งต้นเพื่อก่อให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์

### 2.1 ผลของสารตั้งต้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการสร้างโคพอลิเมอร์

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจากข้อการศึกษาที่ 1 โดยเลี้ยงด้วยสูตรอาหารดัดแปลงจาก DSMZ catalogue ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร มีอัตราส่วนความ

เข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อผงซูรสเท่ากับ 0.25:2 และทำการเติม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกชุดการทดลอง จากนั้นทำการเติมชนิดของสารตั้งต้น 3 ชนิด คือ แคมมา-บิวทาโรแลกโตน ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร (Park and Kim, 2011), 1,4-บิวเทนไดออล ปริมาณร้อยละ 25 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ของแหล่งคาร์บอน (Chanprateep et al., 2010) และกรดวาเลอร์ิก ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร (Chanprateep & Kulpreecha, 2006) พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOI II ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารกระตุ้น 1,4-บิวเทนไดออล มีการเจริญสูงสุด โดยมีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงที่ 6-12 และอัตราการเจริญสูงสุดช่วงที่ 24 และลดลงหลังจากเลี้ยงเชื้อไป 24 ชั่วโมง และการเจริญเพิ่มขึ้นหลังจากช่วงที่ 48 ในทุกชุดการทดลอง โดยพบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่เติม 1,4-บิวเทนไดออล สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด  $7.30 \pm 0.20$  กรัมต่อลิตร และพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ  $6.00 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82.19 รองลงมา คือ แคมมา-บิวทาโรแลกโตน และกรดวาเลอร์ิก โดยสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด  $5.63 \pm 0.15$  และ  $4.20 \pm 0.20$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ  $4.50 \pm 0.20$   $2.90 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.93 และ 69.05 ตามลำดับ จากการศึกษาในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chanprateep et al. (2010) ในการเลี้ยงเชื้อ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ A-04 แบบเติมกะ (Fed-Batch Culture) โดยใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออล ความเข้มข้นร้อยละ 50 พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เท่ากับ 112 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณ P(3HB-co-4HB) เท่ากับ 73 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีค่าพลาสติกชีวภาพรายงานต่ำกว่าของ Norhafini et al. (2017) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Cupriavidus* sp. ในการผลิต Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) โดยการเติม 1,6-เฮกซานไดออลร้อยละ 0.1 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออลร้อยละ 0.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เท่ากับ 9.3 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ 7.6 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 82 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

## 2.2 การศึกษาน้ำมันชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับสารตั้งต้นเพื่อการสร้างโคพอลิเมอร์

จากการศึกษาการน้ำมันชนิดต่าง ๆ ร่วมกับสารตั้งต้น คือ 1,4-บิวเทนไดออล เพื่อเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยใช้ในสูตรอาหารที่ได้จากข้อการศึกษาที่ 1 โดยเปรียบเทียบน้ำมันชนิดต่าง ๆ คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวโพด น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อ *A. latus* สาย

พันธุ์ BOT II มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเจริญลดลงหลังจากเลี้ยงเชื้อไป 24 ชั่วโมง และเริ่มคงที่ในทุกชุดการทดลอง โดยพบว่าเชื้อสายพันธุ์ BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด เท่ากับ  $7.67 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ น้ำมันทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันปาล์ม ได้เท่ากับ  $7.40 \pm 0.25$ ,  $7.00 \pm 0.61$ ,  $6.97 \pm 0.40$  และ  $6.63 \pm 0.40$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่า น้ำมันข้าวโพดสามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด  $6.13 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 87.85 รองลงมา คือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันข้าวโพด คิดเป็นร้อยละ 79.00, 79.49, 68.92 และ 65.58 ตามลำดับ จากการใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ *A. lotus* สายพันธุ์ BOT II สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต มีความใกล้เคียงกับน้ำมันข้าวโพด ได้เท่ากับ  $6.63 \pm 0.40$  และ  $5.27 \pm 0.40$  กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อคิดในด้านเศรษฐศาสตร์การหมัก พบว่าน้ำมันปาล์ม มีราคาต่อหน่วยถูกกว่าน้ำมันข้าวโพด ซึ่งจากรายงานของ Park and Kim (2011) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต poly(3-hydroxy butyrate-co-4-hydroxybutyrate) ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* KCTC2662 ใช้น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้  $\gamma$ -butyrolactone ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture) พบว่าการใช้  $\gamma$ -butyrolactone ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-4HB) ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 10-12 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตร้อยละ 80-83

### 2.3 การใช้น้ำมันปาล์มร่วมกับสารตั้งต้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากจุดประสงค์ของการศึกษาที่ต้องการใช้สารอาหารราคาถูก ในการศึกษานี้จึงได้ทำการเลือกน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากน้ำมันปาล์มหาได้ง่ายและมีราคาถูก จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อ *A. lotus* สายพันธุ์ BOT II ในสูตรอาหารที่ได้จากข้อการศึกษาที่ 1 เพื่อเปรียบเทียบน้ำมันปาล์มร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ ร้อยละ 15, 25, 50 และ 75 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ของแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อ *A. lotus* สายพันธุ์ BOT II มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเจริญลดลงหลังจากเลี้ยงเชื้อไป 24 ชั่วโมง และเริ่มคงที่ในทุกชุดการทดลอง โดยในอาหารที่มีสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50 มีอัตราการเจริญสูงสุด รองลงมา คือ ร้อยละ 75, 25 และ 15 ตามลำดับ โดย พบว่าเชื้อ *A. lotus* BOT II ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับสารกระตุ้นชนิด 1,4-บิวเทนไดออลที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ  $7.10 \pm 0.20$  กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ความเข้มข้นร้อยละ 75, 25 และ 15 ได้เท่ากับ  $6.80 \pm 0.10$ ,  $6.70 \pm 0.50$  และ

6.40±0.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตพบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ 5.63±0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.30 รองลงมา คือ ความเข้มข้นร้อยละ 75, 25 และ 15 คิดเป็นร้อยละ 81.91, 82.54 และ 83.28 ตามลำดับ เช่นเดียวกับรายงานงานวิจัยของ Chanprateep et al. (2010) ในการเลี้ยงเชื้อ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ A-04 แบบเติมกะ (Fed-Batch Culture) โดยใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับ 1,4-บิวเทนไดออล ความเข้มข้นร้อยละ 50 พบว่าสามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 112 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณ P(3HB-co-4HB) เท่ากับ 73 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 65 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และสอดคล้องกับรายงานของ Rao, Sridhar, & Sehgal (2010) ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Cupriavidus necator* โดยใช้ไขมันปาล์มที่ผ่านการใช้ความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้ 1,4-บิวเทนไดออลในการผลิตโคพอลิเมอร์ โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไนโตรเจนจำกัด พบว่าในช่วงเวลาที่ 144 สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดถึงร้อยละ 81 และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของพอลิเมอร์ได้อยู่ระหว่างร้อยละ 70 และ 81 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

#### 2.4 การศึกษาแหล่งคาร์บอนประเภทน้ำตาลที่เหมาะสมร่วมกับสารตั้งต้นในการผลิตโคพอลิเมอร์

ทำการเลี้ยงเชื้อ *A. latus* BOT II ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดจากส่วนที่ 1 โดยปรับแหล่งคาร์บอนเป็นเด็กซ์โตรส น้ำตาลที่ผ่านการย่อย และน้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการใช้สารโพรฟิโอนิกและอะซิเตทความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร โดยอะซิเตทและโพรฟิโอนิกมีปริมาณ 28.75 และ 1.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II มีการเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 6-36 ชั่วโมง และมีอัตราการเจริญสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร มีการเจริญดีที่สุด รองลงมา คือ เด็กซ์โตรสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร น้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร น้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ฟรุคโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยเชื้อ *A. latus* BOT II ที่เลี้ยงในน้ำตาลเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรในช่วงเวลาที่ 24 สามารถผลิตมวลเซลล์แห้งได้สูงสุด 7.10±0.00 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ เลี้ยงด้วยน้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร น้ำตาลเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร น้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร น้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ได้เท่ากับ 6.47±0.51, 6.33±0.65, 6.07±0.21, 5.80±0.26 และ



5.35±0.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่าการเลี้ยงด้วย น้ำตาลเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ สูงสุดเท่ากับ 5.80±0.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 81.69 รองลงมา คือ น้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร น้ำตาลเด็กซ์โตรสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร น้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร น้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลผ่านการย่อยความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 83.93, 81.04, 83.52, 82.24 และ 72.41 ตามลำดับ ซึ่ง สอดคล้องกับรายงานของอรลดา สวาฤทธิ และคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของอะซิเตทและโพปิโอเนตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พบว่าการใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรร่วมกับอะซิเตทและโพปิโอเนตความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 24 ชั่วโมง ของเชื้อ *A. latus* ให้ค่าน้ำหนักมวลเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 10.17 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 9.14 คิดเป็นร้อยละ 89.87 ต่อน้ำหนักมวลเซลล์แห้ง และจากการศึกษาของ Reddy et al. (2016) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพของจุลินทรีย์ *Hydrogenophaga palleronii* ในการผลิต poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) และ poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy valerate) P(3HB-co-3HV) โดยใช้ น้ำเสียสังเคราะห์ร่วมกับความเข้มข้นของอะซิเตทและโพปิโอเนตที่ 20 30 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนอะซิเตทและโพปิโอเนตที่ 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพสูงที่สุดร้อยละ 63

### 3. การศึกษาวิธีการสกัดและการวิเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ *Alcaligenes latus* BOT II

3.1 การสกัดตัวอย่างด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม พบว่า วิธีคลอโรฟอร์มสามารถให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) เท่ากับ 1.77 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าการใช้อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อตัวอย่างที่ 2: 1 ในการสกัดให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ได้สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 2.76 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์มโดยการใช้อัตราส่วนคลอโรฟอร์มต่อตัวอย่างที่ 2: 1 พบว่าการใช้กรดซัลฟูริกที่อัตราส่วนต่อตัวอย่าง 2.5: 1 ในการวิเคราะห์สามารถให้ค่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) สูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 7.07 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2 การสกัดตัวอย่างด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ พบว่า วิธีไฮโปคลอไรท์สามารถให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) เท่ากับ  $147.60 \pm 2.74$  มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากการศึกษาอุณหภูมิในการสกัดที่เหมาะสมพบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) โดยมีค่าเท่ากับ  $163.79 \pm 3.05$  มิลลิกรัมต่อลิตร และจากการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดพบว่า ที่เวลา 20 นาที ให้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ  $172.30 \pm 3.03$  มิลลิกรัมต่อลิตร ในการวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ในตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์โดยใช้อุณหภูมิในการสกัดที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่า การใช้กรดซัลฟูริกที่อัตราส่วนต่อตัวอย่าง 1: 1 ในการวิเคราะห์ สามารถให้ค่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ  $171.82 \pm 3.34$

3.3 จากการตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ด้วยการใช้วิธีคลอโรฟอร์มและวิธีไฮโปคลอไรท์ในการสกัด โดยใช้สภาวะในการสกัดและวิเคราะห์ที่เหมาะสมของแต่ละวิธี พบว่า การตรวจสอบปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์โดยทำการสกัดตัวอย่างและวิเคราะห์ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ด้วยวิธีไฮโปคลอไรท์ สามารถให้ค่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) สูงกว่าการสกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $171.82 \pm 3.34$  และ  $7.07 \pm 0.015$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยวัดในรูปของกรดโครโทนิค

#### 4. การขยายขนาดการผลิตและ การตรวจสอบชนิดของพอลิเมอร์

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *A. latus* สายพันธุ์ BOT II ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยการเลี้ยงแบบกะ ขนาด 5 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เติมลงในอาหารปริมาตร 3 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราเร็วใบพัดอยู่ในช่วง 200 รอบต่อนาที กำหนดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 vvm และค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 พบว่าเชื้อ *A. latus* BOT II มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง และสูงสุดที่ 30 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่ระยะเวลา 42 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือภายในถังหมัก เท่ากับ  $6.58 \pm 0.08$  กรัมต่อลิตร เชื้อ *A. latus* BOT II สามารถผลิตได้สูงสุดเท่ากับ  $8.60 \pm 0.20$  และ  $6.87 \pm 0.57$  กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 79.88 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 30 ชั่วโมง จากการทดสอบด้วยเครื่อง GC-MS พบ โครมาโตแกรมที่น่าสนใจที่เป็น PHA ชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็น retention time เดียวกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานมาตรฐาน Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) ที่ retention time เท่ากับ 5.32, 6.91, 7.02, 8.05, 9.30, 10.83 และ 11.57 โดยพบว่า ส่วนของโครมาโตแกรมที่มีขนาดใหญ่จะเป็นสารชนิด methyl benzoate

## บรรณานุกรม

- กรองจันทร์ รัตน์ประดิษฐ์. (2555) เอกสารประกอบการสอนวิชาเทคโนโลยีกระบวนการหมัก. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- จารุวรรณศรีเส็ง. (2556). การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายและการปรับสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมโดยการเพาะเลี้ยงแบบกะและเติมกะ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- จุฑามาศ ยวงเขตต์และธนพล นิमितกุล. (2553). การผลิต PHB จากจุลินทรีย์ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาพร้อมกับการได้รับ 2-amonoanthracene. ปัญหาพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพ, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เมทินี อมรชัยสินและอารตี อนันตนิกร. (2555). การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) จากจุลินทรีย์ *Alcaligenes latus* TISTR 1403 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยรังสีอัตราไวโอเล็ตร่วมกับสารเคมี. ปัญหาพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพ, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สุพัฒน์ ชมใจและรสมันต์ จงเจริญ. (2555). อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *Alcaligenes latus* ATCC 29714. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.
- Akiyama M., Tsuge T. & Doi Y. 2003. Environmental Life Cycle Comparison of Polyhydroxyalkanoates Produced from Renewable Carbon Resources by Bacterial Fermentation. *Polymer Degradation and Stability*, 80(1), 183–194.
- Aldor, I.S., Keasling, J.D. (2003). Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5), 475-483.
- Alias, Z. & Tan, I.K.P. (2005). Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. *Biores. Technol.* 96, 1229-1234.

- Ashby R.D., Solaiman D.K.Y., & Foglia T.A., (2004). Bacterial Poly(hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream, *J. Polym. Environ.*, 12, 105–112.
- Ashby R.D., Solaiman D.K.Y., & Strahan G.D., (2011) Efficient utilization of crude glycerol as fermentation substrate in the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) biopolymers, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88, 949–959.
- Bernd, H. A. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem. J.*, 376, 5–22.
- Cavalheiro J.M.B.T., de Almeida M.C.M.D., Grandfils C., & da Fonseca M.M.R., (2009) Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol, *Proc. Biochem.*, 44, 509–515.
- Chaijamrus, S. & Udpuay, N. 2008. Production and characterization of polyhydroxybutyrate from molasses and corn steep liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC6748. *Agricultural Engineering International*, Proceeding, Naresuan University, 1–12.
- Chanprateep S, Buasri K, Muangwong A, Utiswannakul P. 2010. Biosynthesis and biocompatibility of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polym Degrad Stab.* 95(10):2003–2012.
- Chen, Y. J. Chen, C.Yu, G. Du, & S. Lun, 1999. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant-chelate aqueous system, *Process Biochem.* 34, 153–157.
- Chen, Y. H. Yang, Q. Zhou, J. Chen, G. Gu, 2001. Cleaner recovery of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus*, *Process Biochem.* 36, 501–506.
- Chen GQ. 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates PHA based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev.* 38: 2434–2446.
- Chien, C. C., Chen, C. C., Choi, M. H., Kung, S. S. & Wei, Y. H. 2007. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment. *Journal of Biotechnology.* 132, 259–263.

- Choi J, & Lee S.Y. 1997. Process Analysis and Economic Evaluation for Poly (3-hydroxybutyrate) Production by Fermentation. *Bioprocess Engineering*, 17(6), 335-342.
- Dionisi, D., Caruccia, G., Petrangeli Papinia, M., Riccardi, C., Majone, M. & Carrasco, F. 2005. Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water Res.* 39, 2076–2084.
- Divyashree M.S. & Shamala T.R. 2009. Effect of gamma irradiation on cell lysis and polyhydroxyalkanoate produced by *Bacillus flexus* Radiation. *Physics and Chemistry*.78, 147–152.
- DeKoning. G.J.M., Kellerhals M., Van Meurs, Witholt, C. B. 1997. Process for the recovery of poly(hydroxy -alkanoates from *pseudomonads* part 2: process development and economic evaluation, *Bioprocess Eng.* 17, 15–21.
- Dong, Z. & X. Sun, 2000. A new method of recovering polyhydroxyalkanoate from *Azotobacter chroococcum*, *Chin. Sci. Bull.* 45, 252–255.
- DSMZ catalogue. (1993). Deutsche Stammsammlung for Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH (German Culture Collection of Microorganisms and Cell Cultures), Fifth Edition.
- Elbahloul Y. & Steinbüchel A. 2009. Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by *Pseudomonasputida* GPo1 and a simplified downstream process. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 643–651.
- El-sayed, Azhar, A., Abdelhady, H. M., Abdel, A. M., & Khodair, T. A. 2009. Batch production of polyhydroxy butyrate (PHB) by *Ralstonia eutropha* and *Alcaligenes latus* using bioreactor different culture strategies, *Journal of Applied Science Research*, 5(5), 556-564.
- Farzaneh, S.M., Ida, I.M., Shahabaldin, R., & Hiro, B. (2014). Importance of Glucose and *Pseudomonas* in Producing Degradable Plastics. *Jurnal Teknologi*, 69(5), 7-10.
- Fatemeh, T., & Ebrahim, V. F. 2002. Biosynthesis of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate as a biodegradable polymer. *Iranian Polymer Journal*, 12, 37-42.

- Fiorese M. L., Freitas F., Pais J., Ramos A. M., de Aragão G. M. F. & Reis M. A. M. 2009. Recovery of polyhydroxy butyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. *Engineering in Life Sciences*, 9, 454–461.
- Gahlawat, G., & Srivastava, A. K. 2013. Development of a mathematical model for the growth associated polyhydroxybutyrate fermentation by *Azohydromonas australica* and its use for the design of fed-batch cultivation strategies. *Bioresource Technology*, 137, 98-105.
- Ghatnekar, M.S. J.S. Pai & M. Ganesh, 2002. Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from methylobacterium sp V49, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77, 444–449.
- Giin *et al.* (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, 6(3), 706-754.
- Gomaa EZ. 2014. Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) By *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* Grown on Cane Molasses Fortified with Ethanol. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.57 n.1: pp. 145-154, Jan/Feb 2014
- Gouda, M. K., Swellam, A. E. & Omar, S. H. 2001. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources, *Microbiol. Res.* 156, 201–207.
- Grothe, E., Young, M. M., & Chisti, Y.1999. Fermentation optimization for the production of Poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 132-141
- Haas, R., Jin, B., & Zepf, F. T. 2008. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 253–256.
- Hahn, S.K. Y.K. Chang, B.S. Kim, K.M. Lee, .1993. The recovery of poly(3-hydroxybutyrate) by using dispersion of sodium hypochlorite solution and chloroform, *Biotechnol. Bioeng.* 44, 256–261.

- Hahn, S.K, Y.K. Chang, B.S. Kim & H.N. Chang, 1994. Communication to the editor optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform, *Biotechnol. Bioeng.* 44, 256–261.
- Hahn S. K., Chang Y. K. & Lee S. Y. 1995. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Applied & Environmental Microbiology*, 61, 34–39
- Hassan, M. A., Shirai, M. A.Y., Kusubayashi, Y.N. N., Karim, M. I. A. , Nakanishi, M. I. A.K. & Hashimoto, K.K. 1996. Effect of organic acid profiles during anaerobic treatment of palm oil mill effluent on the production of polyhydroxyalkanoates by *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 151–156.
- Hazer, B. & Steinbuchel, A. 2007. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74, 1–12.
- Hiremath, L., Kumar, N., Ravishankar H.N., Swathi, A., & Sukanya, P. (2015). Design, Screening and Microbial Synthesis of Bio-polymers of Poly-Hydroxy-Butyrate (PHB) from Low Cost Carbon Sources. *International Journal of Advanced Research*, 3(2), 420-425.
- Holmes, P.A. & Lim, G.B. 1990. Separation process, U.S. Patent 4,910, 145.
- Hwang,K.J. S.F. You & T.M. Don, .2006. Disruption kinetics of bacterial cells during purification of polyhydroxy alkanoates using ultrasonication, *J. Chin. Inst. Chem. Eng.* 37, 209–216.
- Huang T-Y., Duan K-J., Huang S-Y. & Chen C.W. 2006. Production of Polyhydroxyalkanoates from Inexpensive Extruded Rice Bran and Starch by *Haloferax mediterranei*. *J. of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33(8), 701–706.
- Jiang, Y., Song, X., Gong, L., Li, P., Dai, C., & Shao, W. 2008. High poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technol.*, 42, 167-172.

- JINGNAN LU, RYAN C. T., & CHRISTOPHER T. N. 2009. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxylalkanoates). *J. of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 49:226–248,
- Jacquel N., Lo C-W., Wei Y-H., Wu H-S., Wang S. S. 2008. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39, 15–27
- Kapritchkoff, F.M. A.P. Viotti, R.C.P. Alli, M. Zuccolo, J.G.C. Pradella, A.E. Maiorano, E.A. Miranda, & A. Bonomi. 2006. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*, *J. Biotechnol.* 122, 453–462.
- Kawata Y., Aiba S., 2010. Poly(3-hydroxybutyrate) production by isolated *Halomonas* sp. KM-1 using waste glycerol, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 175–177.
- Khanafari, A., Akhavan, S. A., & Mogharab, M. 2006. Production and recovery of poly- $\beta$ -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( $\beta$ -hydroxybutyrate). *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 1145-1151.
- Khardenavis, A. A., Kumar, M. S., Mudlia, S. N. & Chakrabarti, T. 2007. Biotechnological conversion of agro-industrial waste into biodegradable plastic, poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Biores. Technol.* 98, 3579-3584.
- Khosravi-Darani, K. E. Vasheghani-Farahani, S.A. Shojaosadati, & Y. Yamini .2004. Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *ralstonia eutropha* cells for poly(*R*-hydroxybutyrate) recovery, *Biotechnol. Progr.* 20, 1757–1765.
- Kim, M. K.S. Cho, H.W. Ryu, E.G. Lee & Y.K. Chang. 2003. Recovery of poly(3-Hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate, *Biotechnol.Lett.* 25,55–59.



- Kinoshita, S., Kulprecha, K. & Chao, A. 1991. Microbial Production of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid. In Annual Report of IC Biotech (Oshima, Y., ed). Osaka : Osaka University. (pp. 347-349).
- 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*. *J. of Bioscience and Bioengineering*, 107, 240-245.
- Kumar, M.S., Mudliar, S.N., Reddy, K.M., & Chakrabarti, T. 2004. Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant. *Bioresource Technology*, 95, 327-330.
- Kunasundari B. & Sudesh K. 2011. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *eXPRESS Polymer Letters*. 5, (7). 620–634.
- Lafferty R. M. & Heinzle E. 1979. Use of cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-( $\beta$ -hydroxybutyric acid). U.S. Patent 4140741, USA
- Lee, S. Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. 49, 1-14.
- Le Meur S., Zinn M., Egli T., Thöny-Meyer L & Ren Q. 2012. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered *Pseudomonas putida* KT 2440. *BMC Biotechnology*, 12, 53.
- Lenz, R.W. & Marchessault, R.H. 2005. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*. 6, 1–8.
- Ling Y., D.R.G. Williams, C.J. Thomas & A.P.J. Middelberg, 1997. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from recombinant *Escherichia coli* by homogenization and centrifugation, *Biotechnol. Technol.* 11, 409.
- LooC-Y & Sudesh K. 2007. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal (MPJ)*, 2(2), 31-57
- Lu, C.H. 2006. Purification and separation of polyhydroxyalkanoates from bacteria, Ms Thesis, Yuan Ze University, Taiwan,

- Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., & Olivera, E. R. 2003. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion Microbiology*, 6(3), 251-260.
- Madison, L.L. & Huisman, G.W., 1999. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates) from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63 (1), 21-53.
- Mantelatto P. E. & Durao N. A. S. 2008. Process for extracting and recovering polyhydroxyalkanoates (PHAs) from cellular biomass. U.S. Patent 20080193987, USA
- Mona, K. G., Azza E. S. & Sanaa, H. O. 2001. Production of PHB by *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen source. *Microbiological Research*. 156, 201-207
- Mothes G., Schnorpfeil C. & Ackermann JU. 2007. Production of PHB from crude glycerol, *Eng. Life Sci.* 7, 475-479.
- Montaser, N., Ardjmand, M., Heidari, N. A., & Safe, K. A. 2011. Optimization of microbial culture for production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Azotobacter Beijerinckii* DSMZ-1041. *World Applied Sciences J.*, 14, 72-82.
- Nabila, F., & Veena, G.K. (2016). Optimization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production by halotolerant bacterial strains isolated from saline environment. *International Journal of Bioassays*, 5(8), 4775-4781.
- Nikel PI, Pettinari MJ, Mendez BS & Galvagno MA. 2005. Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly3-hydroxybutyrate production by recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial by products. *Int Microbiol.* 8, 243-250.
- Ojumu, T.V., Yu, J. & Solomon, B.O. 2004. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*. 3, 18-24.
- Omar, S., Rayes, A., Eqaab, A., Vob, I., & Steinbuchel, A. (2011). Optimization of cell growth and poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letter*, 162, 996-1007.

- Park, D.H. & Kim, B.S. 2011. Production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxy butyrate) by *Ralstonia eutropha* from soybean oil. *New Biotechnology*, 28, 719-724.
- Posada J.A., Naranjo J.M., López J.A., Higuera J.C. & Cardona C.A. 2011. Design and Analysis of Poly-3-hydroxyl butyrate Production Processes from Crude Glycerol. *Process Biochemistry*, 46(1), 310–317.
- Quillaguaman, J., Hashim, S., Bento, F., Mattiasson, B. & Hatti-Kaul, R. 2005. Poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LCi using starch hydrolysate as substrate. *J. of Applied Microbiology*, 99, 151-157.
- Ramsay J.A., E. Berger, B.A. Ramsay & C. Chavarie, 1990. Recovery of polyhydroxybutyric acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment, *Biotechnol. Technol.* 4, 221–226.
- Ramsay, B. A. , Lonaliza K., Chavarie C., Dube B., Bataille P. & Ramsay J. A. 1990. Production of Poly-( $\beta$ -Hydroxybutyric-Co- $\beta$ -Hydroxyvaleric) Acid, *Appli. & Environ. Microbial.* 56, 2093-2098.
- Ramsay J. A., Berger E., Voyer R., Chavarie C. & Ramsay B. A. 1994. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnology Techniques*, 8, 589–594.
- Rodrigues MFA, Da Silva LF, Gomez JGC, Valentin HE & Steinbuchel A. 1995. Biosynthesis of poly (3-hydroxy butyric acid-co-3-hydroxy-4-pentenoic acid) from unrelated substrates by *Burkholderia* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 43, 880-886.
- Rodrigues MFA, Vicente EJ, Steinbuchel A. 2000. Studies on polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in a PHA synthase negative mutant of *Burkholderia cepacia* generated by homogenization. *FEMS Microbiology Letters*; 193, 179-185.
- Ryu HW, Hahn SK, Chang YK, & Chang HN. 1997. Production of poly-3-hydroxybutyrate by high cell density fed batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnol Bioengin.*; 55: 27-32.

- Ryu H.W., K.S. Cho, E.G. Lee & Y.K. Chang. 2000. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from coagulated *Ralstonia eutropha* using a chemical digestion method, *Biotechnol. Progr.* 16, 676–679.
- Saika A., Watanabe Y., Sudesh K., Abe H. & Tsuge T. 2011. Enhanced Incorporation of 3-Hydroxy-4-Methylvalerate Unit into Biosynthetic Polyhydroxyalkanoate Using Leucine as a Precursor. *AMB Express*, 1:6
- Salehizadeh, H. & Van Loosdrecht, M.C.M. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances.* 22, 261–279.
- Silva, L.F., Taciro, M.K., Ramos, M.E.M., Carter, J.M., Pradella, J.G.C., & Gomez, J.G.C. (2004). Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugar cane bagasse hydrolysate. *J. of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 31, 245–254.
- Singh M., Patel S. KS & Kalia V C. 2009. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories*, 8:38
- Shrivastav A., Mishra S.K., Shethia B., Pancha I., Jain D. & Mishra S., 2010. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (phas) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct, *Int. J. Biol. Macromol.*, 47, 283–287.
- Steinbüchel, A. & Lütke-Eversloh, T. 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem. Eng. J.* 16:81-96.
- Sudesh, K., Abe, H. & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science.* 25, 1503-1555.
- Tamer, M. M. Moo-Young & Y. Chisti, 1998. Disruption of *Alcaligenes latus* for recovery of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid): comparison of high-pressure

- homogenization, bead milling and chemically induced lysis, *Ind. Eng. Chem. Res.* 37,1807–1814.
- Tanamool, V., Danvirutai, P., Thanonkeo, P., Imai, T., & Kaewkannetra, P. 2009. Production of Poly- $\beta$ -hydroxyric acid (PHB) from sweet sorhum juice by *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 and *Alcaligenes latus* ATCC 29714 via batch fermentation, p.95. In *The 3<sup>rd</sup> International conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Product (FerVAAP), 26-28 August 2009.* Khon Kaen, Thailand.
- Timm, A. & Steinbüchel, A. 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol.* 56:3360–3367.
- Tripathi, A.D., Srivastava, S. K., & Singh, R. P. 2013. Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes* sp. *Biomass and Bioenergy.* 3, 1-8.
- Valappil S. P., Misra S. K., Boccaccini A. R., Keshavarz T., Bucke C. & Roy I.2007. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *J. of Biotechnology,* 132, 251–258
- Valentin, H. E. & Steinbüchel, A. 1995. Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid-co-4-hydroxyvaleric acid) by mutants and recombinant strain of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Environ. Polym. Degrad.* 3:169-175.
- Van Wegen, R.J. Y. Ling & A.P.J. Middelberg, 1998. *Trans. IChemE.* 76, 417–426.
- Verlinden AJ R. , Hil J D, Kenward M A, Williams CD 1, Piotrowska-Seget Z. & Radecka I. K. 2011. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express,* 1:11
- Wang, B., Sharma-Shivappa, R.R., Olson, J.W., & Khan, S, A. 2012. Upstream process optimization of polyhydroxy butyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using two-stage

- batch and fed-batch fermentation strategies. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 1-12.
- Wang, B., Sharma-Shivappa, R.R., Olson, J.W., & Khan, S, A. 2013. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice. *Industrial Crop and Products*, 43, 802-811.
- Wiseman, A. 1995. Handbook of enzyme biotechnology. London: Ellis Horwood.
- Xu Y., Wang R.H., Koutinas A.A. & Webb C., 2010, Microbial biodegradable plastic production from a wheat based biorefining strategy, *Proc. Biochem.*, 45, 153–163.
- Yamane, T., Fukunaga, M. & Lee, Y.W. 1996. Increased PHB productivity by high-cell-density fed batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. *Biotechnol. Bioeng.* 50:197-202.
- Yezza, A., Halasz, A., Levadoux, W., & Hawari, J. 2007. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. *Application Microbial Biotechnology*, 77, 269-274.
- Yu, P.H., Chua, H., Huang, A. L, LO, W. & Chen, G.Q. 1998. Conversion of Food Industrial Wastes into Bioplastics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 70-72, 603-614.
- Yu, J., Si, Y. & Wong, W.K.R. 2002. Kinetics modeling of inhibition and utilization of mixed volatile fatty acids in the formation of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochem.* 37:731-738.
- Yu J & Chen LX. 2006. Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass. *Biotechnol Prog.* Mar-Apr; 22(2):547-53.
- Zinn, M. H.U. Weilenmann, R. Hany, M. Schmid & T.H. Egli. 2003. Tailored synthesis of poly([R]-3-hydroxybutyrate -co-3-hydroxyvalerate) (PHB/HV) in *Ralstonia eutropha* DSM 428, *Acta. Biotechnol.* 23, 309–316.

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

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

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. องค์ประกอบอาหารตัดแปลงสูตร DSMZ Catalogue และคณะ (1993)

Glucose	20	กรัมต่อลิตร
NH <sub>4</sub> Cl	0.5	กรัมต่อลิตร
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.3	กรัมต่อลิตร
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.3	กรัมต่อลิตร
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.5	กรัมต่อลิตร
NaHCO <sub>3</sub>	0.5	กรัมต่อลิตร
CaCl <sub>2</sub>	0.01	กรัมต่อลิตร
Ferric citrate	0.5	กรัมต่อลิตร
Trace element	5	มิลลิลิตรต่อลิตร

#### ส่วนประกอบ Trace elements

ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัมต่อลิตร
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	0.003	กรัมต่อลิตร
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.003	กรัมต่อลิตร
CoCl <sub>2</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.02	กรัมต่อลิตร
CuCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.001	กรัมต่อลิตร
NiCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0.002	กรัมต่อลิตร
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.003	กรัมต่อลิตร

#### 2. องค์ประกอบอาหาร Nutrient broth (NB)

Peptone	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
NaCl	5	กรัมต่อลิตร



## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสารและการวิเคราะห์

#### 1. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1995)

##### 1.1 การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก (dinitrosalicylid acid, DNS)

ชั่ง DNS (3,5 dinitrosalicylid acid) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัมละลายใน 200 มิลลิลิตร) ที่ละน้อย คนให้เข้ากันจนสารละลายใสโดยให้ความร้อน จากนั้นเติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรท (Na-K tartrate) 300 กรัม ตามลำดับ รอให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนใช้งาน

##### 1.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายกลูโคส 1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายกลูโคสให้ได้ความเข้มข้น ดังนี้

หลอดที่ 1	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายกลูโคส (ไมโครลิตร)
1	0	500	0
2	0.05	475	25
3	1.0	450	5
4	1.5	425	75
5	2.0	400	100
6	3.0	350	150

จากนั้นนำหลอดทดลองทั้ง 6 หลอด มาเติม DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

### 1.3 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี 3, 5 dinitrosalicylid acid (Miller, 1995)

1.3.1. ปิเปตตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ใส่ลงในหลอดทดลอง

1.3.2. เติม DNS (3, 5 dinitrosalicylid acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.3.3. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

1.3.4. นำไปแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที

1.3.5. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และนำมาเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น จากนั้นคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากสูตร

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส(มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} * \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟกลูโคสมาตรฐาน}}$$

## 2. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight, DCW)

น้ำหนักเซลล์แห้งหรือมวลเซลล์ (biomass) จะแสดงให้เห็นถึงการเจริญของเซลล์ขณะที่ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งการหาปริมาณมวลเซลล์มีหลายวิธีด้วยกัน แต่การทดลองนี้สามารถทำได้โดย

2.1 นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ผ่านการอบแห้ง และทราบน้ำหนักของหลอดเปล่าแล้ว

2.2 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำเซลล์ที่ตกตะกอนที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

2.3 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณ PHB เชิงปริมาณ (Quantitative determination) (Grothe และคณะ , 1999)

ในการวิเคราะห์ปริมาณ PHB ด้วยวิธี Gravimetric method

3.1 นำตัวอย่างสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ผ่านการอบแห้งและรู้ น้ำหนักหลอดเปล่าแล้ว

3.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วนำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง

3.3 เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิล (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 2 และนำไปต้มในอ่างน้ำ ร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.5 นำส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 6 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.6 ล้างตะกอนเซลล์ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วตะกอนที่ได้นำไปอบเน ตู้อบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นและนำมา ชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักที่แท้จริงของ PHB

### 4. การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายโครโตนิก (Hiremanth และคณะ, 2015)

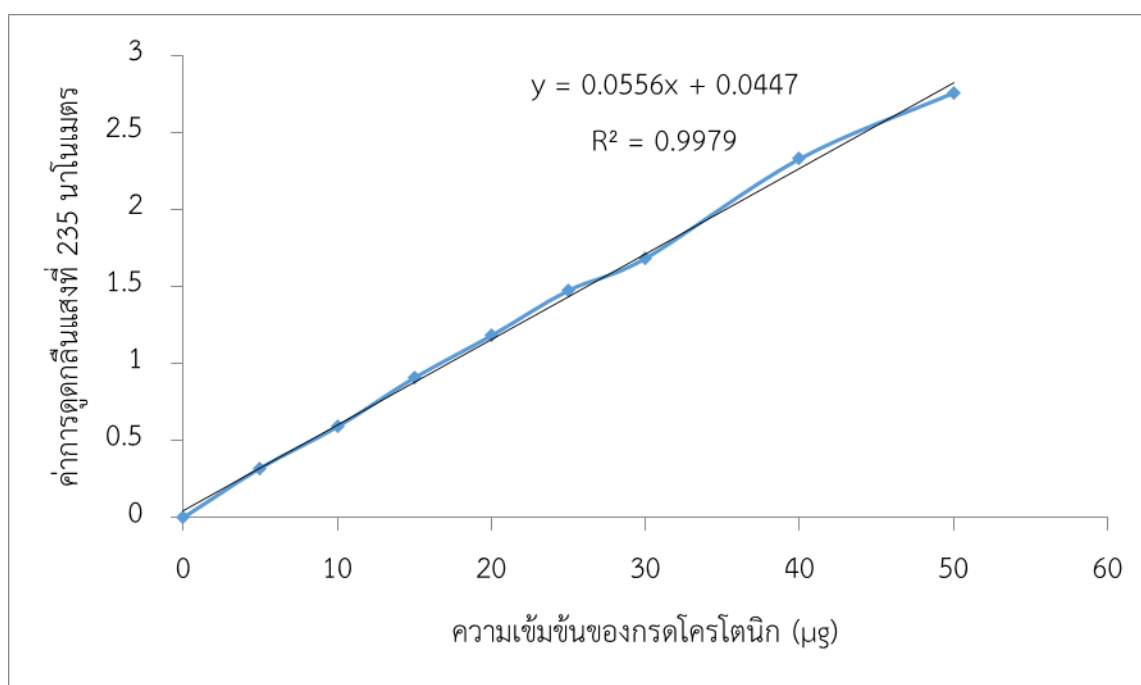
เตรียมสารละลายกรดโครโตนิกมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.1µg/µl โดยชั่งกรดโครโตนิก ละลาย ในกรดซัลฟูริก และเตรียมสารละลายโครโตนิกให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตารางภาคผนวก ข 1-1

หลอดที่	สารละลายกรดโครโตนิกมาตรฐาน (µl)	กรดซัลฟูริก (ml)	ความเข้มข้นของกรดโครโตนิก (µg)
1	-	3	-
2	50	2.950	5
3	100	2.900	10
4	150	2.850	15
5	200	2.800	20

6	250	2.750	25
7	300	2.700	30
8	400	2.600	40
9	500	2.500	50

**ตารางภาคผนวก ข 1-1** การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายโครโตนิก

จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร โดยใช้กรดซัลฟูริกเป็น blank และนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในภาพภาคผนวก ข 1-1



**ภาพภาคผนวก ข 1-1** กราฟมาตรฐานสารละลายโครโตนิก