รหัสโครงการ SUT1-104-53-36-01

# รายงานการวิจัย

# การผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพจากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะ

# (Production of Bio-plastic Polymers from Cassava Starch by Specific Bacterial Strains)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-53-36-01

# รายงานการวิจัย

# การผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพจากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะ

# (Production of Bio-plastic Polymers from Cassava Starch by Specific Bacterial Strains)

**ผู้วิจัย**

**หัวหน้าโครงการ**

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง**

สาขาวิชาปรีคลินิก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555**

**ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว**

พ.ศ. 2560

# กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “การผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพจากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะ” เป็นโครงการที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณในส่วนของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ผ่านการพิจารณาโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ) ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนงบประมาณที่เป็นค่าใช้จ่าย เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการในการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิมา ดีประเสริฐกุล สาขาวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์ดูแลผู้ช่วยวิจัยที่วิเคราะห์สมบัติของพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพ รวมถึงบุคลากรและนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่มีส่วนช่วยให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทคัดย่อ

การผลิตพอลิเมอร์พลาสติกสลายตัวได้ทางชีวภาพเป็นที่สนใจ เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมี พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) เป็นพอลิเมอร์พลาสติกสลายตัวได้ทางชีวภาพชนิดหนึ่ง ที่ได้จากกระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์ และมีศักยภาพในการใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์และบรรจุภัณฑ์ การผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิดพีเอชเอนี้ยังมีข้อจำกัดด้านวัตถุดิบ กระบวนการผลิต และกรรมวิธีการสกัด ส่งผลให้มีต้นทุนการผลิตสูงและมีความเสี่ยงจากตัวทำละลายอันตรายที่ใช้เป็นสารสกัด การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งพัฒนากระบวนการผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิดพีเอชเอที่มีความเหมาะสมต่อการใช้งานโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะจากวัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังที่มีราคาถูก ผลสำเร็จที่ได้อาจช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มและเสถียรภาพด้านราคาแก่พืชผลทางการเกษตร เน้นการพัฒนากระบวนการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารและกรรมวิธีการสกัดสารพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพที่ลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายเพื่อให้มีต้นทุนการผลิตต่ำและลดความเสี่ยงจากสารที่เป็นพิษ แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่ใช้ศึกษาเป็นสายพันธุ์ปลอดภัย คัดแยกได้ในประเทศไทย ต่างกันจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Chryseobacterium* sp. SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียให้ผลิตพอลิเมอร์พีเอชเอระดับห้องปฏิบัติการแบบกึ่งกะสองขั้นตอน ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อจากผลการศึกษาปริมาตร 5-10 ลิตร ด้วยสภาวะเหมาะสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที การเลี้ยงแบคทีเรียในขั้นตอนแรกใช้อาหารสมบูรณ์เตรียมจากแป้งมันสำปะหลังปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ปริมาตร 3 ใน 5 ส่วนของปริมาตรสุดท้าย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารขั้นต่ำที่มีกลูโคสความเข้มข้นสุดท้าย 10 กรัมต่อลิตร ให้ครบปริมาตรสุดท้าย เลี้ยงแบคทีเรียต่ออีก 48 ชั่วโมง สามารถผลิตเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ได้โดยเฉลี่ย 81.57 และ 79.48 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) ราว 15 และ 14 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ที่มีพีเอชเอสะสมไม่น้อยกว่าร้อยละ 26 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้ทดสอบคุณลักษณะของพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิดพีเอชเอในเบื้องต้น ด้านความเหมาะสมต่อการใช้งาน พบว่าพีเอชเอที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะทั้ง 2 สายพันธุ์ มีพอลิ-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอทชนิดพอลิ-3ไฮดรอกซีบิวทิเรท และพอลิ-4ไฮดรอกซีบิวทิเรท เป็นส่วนประกอบ สามารถทำฟิล์มและขึ้นรูปได้ดี พีเอชเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 มีอุณหภูมิหลอมสูงโดยเฉลี่ย 168.60 และ 167.55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ใกล้เคียงกับพอลิเมอร์ที่ได้จากปิโตรเคมีที่ใช้งานทั่วไปชนิดโพลีเอทิลีนและพอลิโพรไพลีน ชนิดไอโซแท็กติก พอลิโพรไพลีน (มีอุณหภูมิหลอมประมาณ 139 และ 171 องศาเซลเซียส ตามลำดับ) พร้อมทั้งได้พัฒนาวิธีการสกัดพอลิเมอร์พีเอชเอจากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่ศึกษานั้น เป็นกรรมวิธีที่ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายที่มีประสิทธิภาพสูงเป็นสารสกัด และสามารถพัฒนาต่อให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นและต้นทุนต่ำกว่าวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วไป

# Abstract

The biodegradable plastic polymers have been being of interest to replace plastics from petrochemicals. Polyhydroxyalkanoates (PHA) are a group of biodegradable polymers synthesized and stored in some bacterial cells as water-insoluble inclusions, and recognized as plastics. The polymers could be produced by microbial technology and potentially used for medical and packaging materials. The production of PHA is still limited by raw materials, production process, and extraction method, resulting in high production costs and the risk from dangerous extraction solvents. This study; therefore, aimed to produce the desirable PHA from cassava starch, a cheap raw material, by the selected specific bacterial strains, with emphasizing on developing the bacterial cultivation process and the bio-polymer extraction method to obtain the low PHA production cost and low risk with toxic solvents for extracting the bio-polymers. The efficient use of this starchy raw material could result in value added and price stability of the agricultural product. Two different non-pathogenic bacterial strains, *Chryseobacterium* sp. SUT-NZT6 and SUT-NZT9, isolated from their natural habitats in Thailand, were selected for PHA production in laboratory scale using 5-10 L of the optimized media in a bioreactor under optimum cultivation conditions at 30°C, with aeration rate at 2.0 L/min, and agitation speed at 300 rpm. Two steps of fed batch cultivation were performed by firstly growing each bacterial pure culture in three-fifths of volume of the suitable complex medium prepared from cassava starch (30 g/L, dry weight) for 24 h. Secondly, the minimal medium containing glucose at the final concentration of 10 g/L, was added to make up to the final volume, and further cultivated for 48 h. Yields of SUT-NZT6 and SUT-NZT9 cell mass of 81.57 and 79.48 g/L (wet weight) or approximately 15 and 14 g/L (dry weight), respectively, accumulating PHA at least 26% of dry cells were achieved. For preliminary testing the suitability for application, the bio-polymers produced by both specific bacterial strains were found to contain poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] and poly(4-hydroxybutyrate) [P(4HB)], and exhibit high melting temperatures at 168.60 and 167.55°C, respectively, closed to the most common petro-plastics in daily life, polyethylene (~139°C) and polypropylene (isotactic polypropylene, ~171°C). The PHA polymers could be fabricated into film, and be used for moulding. The method for extracting PHA from cells of the selected bacterial strains was also developed to be simple and avoid the expensive and toxic risk solvent, which could be further modified to be the cheap and efficient extraction method.

# สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... ช
สารบัญภาพ..... ฑ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 2
1.5 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย..... 3
1.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย..... 14
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย..... 14
2.1.1 ครุภัณฑ์..... 14
2.1.2 วัสดุ..... 15
2.2 วิธีการวิจัย..... 16
2.2.1 การทดสอบการผลิตสารพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิด PHA โดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะ จากการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังในระดับห้องปฏิบัติการ..... 16
2.2.2 การศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก..... 18
2.2.2.1 การศึกษาปัจจัยด้านสารอาหาร..... 18
ก) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน..... 18
ข) ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน..... 19
ค) Essential element และ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 19
2.2.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHA..... 19
2.2.2.3 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม..... 19

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.2.4 การพัฒนารูปแบบของการเลี้ยงแบคทีเรีย..... 19
2.2.2.5 การทดลองเพิ่มขนาดการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ..... 19
2.2.3 การศึกษาการสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่ศึกษา และตรวจสอบคุณลักษณะสำคัญของ PHA ที่ได้ เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งาน..... 20
2.2.4 การสรุปผลการวิจัย..... 21
บทที่ 3 ผลและอภิปรายผลการวิจัย..... 22
3.1 การทดสอบการผลิตสารพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิด PHA โดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะ จากการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังในระดับห้องปฏิบัติการ..... 22
3.2 การศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก..... 42
3.2.1 การศึกษาปัจจัยด้านสารอาหาร..... 42
3.2.1.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน..... 42
3.2.1.2 ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน..... 46
3.2.1.3 Essential element และ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 55
3.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHA..... 59
3.2.3 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม..... 62
3.2.4 การศึกษาความเร็วรอบของการกวน (Agitation) ที่เหมาะสม เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ..... 62
3.2.5 การศึกษาปริมาณการให้อากาศ (Aeration) ที่เหมาะสม เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ..... 67
3.2.6 การพัฒนารูปแบบของการเลี้ยงแบคทีเรีย..... 73
3.2.7 การทดลองเพิ่มขนาดการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ..... 97
3.3 การสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่ศึกษาและตรวจสอบคุณลักษณะสำคัญของ PHA ที่ได้ เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งาน..... 102
3.3.1 การสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่ศึกษา..... 102
3.3.2 การตรวจสอบคุณลักษณะสำคัญของ PHA ที่ได้ เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งาน..... 111

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 บทสรุป..... 119
4.1 สรุปผลการวิจัย..... 119
4.2 ข้อเสนอแนะ..... 126
บรรณานุกรม..... 128
ภาคผนวก..... 134
ภาคผนวก ก สีย้อมจุลินทรีย์..... 134
ภาคผนวก ข สารละลายและน้ำยาเคมี..... 134
ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์..... 137
ประวัติผู้วิจัย..... 139
เอกสารแนบ..... 140

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรีย 12 ไอโซเลท (สายพันธุ์) ที่เลือกจากงานวิจัยพื้นฐาน เพื่อเริ่มศึกษาความสามารถในการสร้างพอลิเมอร์ PHA..... 23
ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium (สูตรดัดแปลงของโครงการ)..... 27
ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium (สูตรดัดแปลงของโครงการ)..... 27
ตารางที่ 3.4 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท ใน Complex medium (ตารางที่ 3.2) ที่มีแป้งมันสำปะหลังไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ สำหรับกลุ่ม Gram-positive rods และแป้งมันสำปะหลังผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์สำหรับกลุ่ม Gram-positive cocci และ Gram-negative rods ด้วยปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 28
ตารางที่ 3.5 ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium สูตรดัดแปลงของโครงการที่เหมาะสมต่อสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ที่คัดเลือก..... 32
ตารางที่ 3.6 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-CCR2, SUT-CST2-2, SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium (ตารางที่ 3.5) ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7.5 ลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที กวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อใน Minimal medium (ตารางที่ 3.3) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 37
ตารางที่ 3.7 ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium สูตรดัดแปลงของโครงการ ที่เหมาะสมต่อสำหรับการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ที่คัดเลือก..... 43
ตารางที่ 3.8 แหล่งคาร์บอนในส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่ได้ศึกษา..... 44
ตารางที่ 3.9 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium (ตารางที่ 3.7) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร 3 ซ้ำ ปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์เลี้ยงใน Minimal medium ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน (ตารางที่ 3.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 45

# สารบัญตาราง (ต่อ)

**หน้า**

ตารางที่ 3.10 แหล่งไนโตรเจนและสารส่งเสริมการเจริญที่แตกต่างกันใน Complex medium ที่ได้ศึกษา..... 47

ตารางที่ 3.11 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium ที่มีส่วนประกอบของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 4 สูตร (ตารางที่ 3.10) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์เลี้ยงใน Minimal medium no. 1 (ตารางที่ 3.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 49

ตารางที่ 3.12 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium ที่ใช้ Cassava starch hydrolysate 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมยีสต์แห้งที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์และรำข้าวสกัดไขมัน 10 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน Tryptone, Polypeptone และ Yeast extract ปริมาตร 4 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 2% โดยปริมาตร ($10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวน 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม Minimal medium no. 1 (ตารางที่ 3.8) ที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ให้ได้ 5 ลิตร เลี้ยงต่อด้วยสภาวะเดิม แต่กวน 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 53

ตารางที่ 3.13 Minimal medium สำหรับการสะสมสารพอลิเมอร์ของแบคทีเรีย 2 ไอโซเลทที่คัดเลือก ที่ได้ศึกษาส่วนประกอบ..... 56

ตารางที่ 3.14 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium no.1 ตารางที่ 3.8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ให้ได้ปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงใน Minimal medium แต่ละสูตรจำนวน 10 สูตร (ตารางที่ 3.13) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 57

# สารบัญตาราง (ต่อ)

**หน้า**

ตารางที่ 3.15 สรุปส่วนประกอบของ Complex medium และ Minimal medium ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสะสมพอลิเมอร์ชนิด PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 จากผลการศึกษา..... 58

ตารางที่ 3.16 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ใน Complex medium ที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงใน Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 60

ตารางที่ 3.17 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT9 ใน Complex medium ที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงใน Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 61

ตารางที่ 3.18 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ที่คัดเลือกใน Complex medium ที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1-10% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยประมาณ) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงใน Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 63

ตารางที่ 3.19 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT9 ที่คัดเลือกใน Complex medium ที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1-10% โดยปริมาตร ($10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยประมาณ) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงใน Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 64

# สารบัญตาราง (ต่อ)

**หน้า**

ตารางที่ 3.20 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ใน Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร ($10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยประมาณ) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 และให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที เปรียบเทียบการกวนด้วยความเร็ว 100-500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 65

ตารางที่ 3.21 ความสามารถในการเจริญผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ใน Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวน 300 รอบต่อนาที เปรียบเทียบ ให้อากาศ 0.50-5.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อใน Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 68

ตารางที่ 3.22 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวน 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร เลี้ยงเชื้อต่อด้วยสถาวะเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 76

ตารางที่ 3.23 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร ($10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยประมาณ) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) แต่เพิ่มน้ำตาลกลูโคส จาก 10 เป็น 20 กรัมต่อลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้นแต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 79

# สารบัญตาราง (ต่อ)

**หน้า**

ตารางที่ 3.24 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium ที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษา (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 7% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดิม แต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 84

ตารางที่ 3.25 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10% โดยปริมาตร ($10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยประมาณ) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวน 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น แต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 85

ตารางที่ 3.26 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6ใน Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10% โดยปริมาตร (ประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวน 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้นสุดท้าย 30 กรัมต่อลิตร แทนน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น แต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 86

ตารางที่ 3.27 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT9 ใน Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10% โดยปริมาตร (ประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวน 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้นสุดท้าย 30 กรัมต่อลิตร แทนน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น แต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 87

# สารบัญตาราง (ต่อ)

**หน้า**

ตารางที่ 3.28 ผลผลิตเซลล์เพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ที่พัฒนารูปแบบของการเลี้ยงแบคทีเรียใน Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 7% โดยปริมาตร (ที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1.5 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ มีการเติม Complex medium ปริมาตร 0.5 ลิตร ที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวน 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น แต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 90

ตารางที่ 3.29 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1.5 ลิตรในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 3% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวน 300 รอบต่อนาที เติมอาหาร Complex medium ใหม่เพิ่มจำนวน 3 ครั้ง ที่เวลา 10, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง และเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 91

ตารางที่ 3.30 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เติมอาหาร Complex medium ใหม่เพิ่มจำนวน 4 ครั้ง ที่เวลา 10, 12, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง แทนที่ปริมาตร 1 ลิตร ด้วย Minimal medium (ตารางที่ 3.15) เข้มข้น 5 เท่า โดยการปั่นเหวี่ยงแยกของเหลวออก เลี้ยงด้วยสภาวะการเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 93

# สารบัญตาราง (ต่อ)

**หน้า**

ตารางที่ 3.31 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 6 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวน 300 รอบต่อนาที เติมอาหารใหม่จำนวน 4 ครั้ง ที่เวลา 10, 12, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติมอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 100

ตารางที่ 3.32 ผลผลิต PHA จากเซลล์ SUT-NZT6 สกัดด้วยวิธีที่ทางโครงการได้พัฒนา 2 วิธี เปรียบเทียบกับการสกัดตามวิธีที่มีรายงาน (Xu *et al*., 2010)..... 105

ตารางที่ 3.33 ตำแหน่งโปรตอนจากสเปกตรัม 1H NMR ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6..... 114

ตารางที่ 3.34 ตำแหน่งคาร์บอนจากสเปกตรัม 13C NMR ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6..... 114

ตารางที่ 3.35 ลักษณะเฉพาะในเบื้องต้นของ PHA ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9..... 116

ตารางที่ 3.36 การเปลี่ยนแปลงของพอลิเมอร์ PHA เตรียมเป็น Compression-molded film (ใช้อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส) จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 เมื่อทดสอบให้ความร้อนเบื้องต้นด้วยการนำเข้าไมโครเวฟ 700 W เป็นเวลา 1 นาที และแช่น้ำร้อนปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่ทันทีหลังต้มเดือด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-35 นาที..... 117

ตารางที่ 3.37 ผลผลิตเซลล์แบคทีเรีย SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 เลี้ยงด้วยอาหาร Complex medium และ Minimal medium ที่มีส่วนประกอบและสภาวะการเลี้ยงต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ปริมาตรอาหาร 5 ลิตร 123

# สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนี (ลูกศร) ของแบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลท (สายพันธุ์) เจริญบน Trypticase soy agar (TSA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่เลือกมาทดสอบความสามารถในการสร้างพอลิเมอร์ชนิด PHA..... 24

รูปที่ 3.2 รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียที่ไม่มีการสะสม PHA และมีการสะสม PHA จากการย้อมด้วย Nile blue A และตรวจสอบด้วย Fluorescence microscope..... 29

รูปที่ 3.3 รูปร่างของเซลล์และ PHA granules ที่สะสมภายในเซลล์ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ที่คัดเลือก ตรวจสอบด้วย Scanning electron microscope (SEM)..... 30

รูปที่ 3.4 รูปร่างและ PHA granules (ลูกศร) ที่สะสมภายในเซลล์ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ที่คัดเลือก ตรวจสอบด้วย Transmission electron microscope (TEM)..... 31

รูปที่ 3.5 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-CCR2 ใน (ตารางที่ 3.5) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 2% ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ (Aeration) 0.5 ลิตรต่อนาที กวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อใน Minimal medium (ตารางที่ 3.3) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะเช่นเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 33

รูปที่ 3.6 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ CST2-2 เลี้ยงใน Complex medium (ตารางที่ 3.5) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 2% ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที กวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อใน Minimal medium (ตารางที่ 3.3) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะเช่นเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 34

รูปที่ 3.7 ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 เลี้ยงใน Complex medium (ตารางที่ 3.5) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 2% ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที กวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อใน Minimal medium (ตารางที่ 3.3) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะเช่นเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 35

# สารบัญภาพ (ต่อ)

**หน้า**

รูปที่ 3.8 ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT9 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.5) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 2% ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ (Aeration) 0.5 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.3) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะเช่นเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 36

รูปที่ 3.9 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-CCR2, SUT-CST2-2, SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 จากอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.3) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ (Aeration) 0.5 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากเลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.5) ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2% โดยปริมาตร (ที่มีความเข้มข้นเซลล์ ~$10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันกับข้างต้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์มาเลี้ยงใน Minimal medium..... 39

รูปที่ 3.10 ลักษณะของ PHA ที่สกัดได้จากเซลล์ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท (สายพันธุ์) ที่คัดเลือก.. 40

รูปที่ 3.11 Compression-molded film (ใช้อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส) ของ PHA ที่สกัดได้จากเซลล์ของแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ที่คัดเลือก เปรียบเทียบกับ PHA ชนิด PHV จากการค้า (Sigma, Sigma-Aldrich, Inc.)..... 41

รูปที่ 3.12 ตัวอย่างลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ใน Complex medium no. 2 ตารางที่ 3.10 เติมยีสต์แห้งที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์และรำข้าวสกัดไขมัน ปริมาตรอาหาร 4 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 2% โดยปริมาตร ($10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม Minimal medium no. 1 ตารางที่ 3.8 ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร และเลี้ยงแบคทีเรียต่อเนื่องด้วยสภาวะเดิม แต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 51

# สารบัญภาพ (ต่อ)

**หน้า**

รูปที่ 3.13 ตัวอย่างลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ใน Complex medium no. 2 ตารางที่ 3.10 เติมยีสต์แห้งที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์และรำข้าวสกัดไขมัน ปริมาตรอาหาร 4 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 2% โดยปริมาตร ($10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม Minimal medium no. 1 ตารางที่ 3.8 ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร และเลี้ยงแบคทีเรียต่อเนื่องด้วยสภาวะเดิม แต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 52

รูปที่ 3.14 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 จากการเลี้ยงในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 และให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที เปรียบเทียบการกวนด้วยความเร็ว 100-500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากเลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1 ลิตร ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เลี้ยงด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์มาเลี้ยงใน Minimal medium..... 66

รูปที่ 3.15 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เปรียบเทียบการให้อากาศ 0.50-5.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1 ลิตร ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เลี้ยงด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ไปเลี้ยงต่อใน Minimal medium..... 69

รูปที่ 3.16 ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ในอาหาร Complex medium ที่ใช้ Hydrolyzed cassava starch 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 70

# สารบัญภาพ (ต่อ)

**หน้า**

รูปที่ 3.17 ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรีย SUT-NZT6 ใน Complex medium ที่ใช้ Hydrolyzed cassava starch 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตรในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 71

รูปที่ 3.18 ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ใน Complex medium ที่ใช้ Hydrolyzed cassava starch 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 และกวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 5.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 72

รูปที่ 3.19 ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร และเลี้ยงแบคทีเรียต่อเนื่องด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 74

รูปที่ 3.20 ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรีย SUT-NZT6 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 และกวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) แต่เพิ่มน้ำตาลกลูโคส จาก 10 เป็น 20 กรัมต่อลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้นแต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 80

# สารบัญภาพ (ต่อ)

**หน้า**

รูปที่ 3.21 ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรีย SUT-NZT9 เลี้ยงในอาหาร Complex medium ที่เหมาะสมจากการศึกษา (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 7% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร และเลี้ยงแบคทีเรียต่อเนื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 83

รูปที่ 3.22 ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียไอโซเลท SUT-NZT9 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวน 300 รอบต่อนาที เติมอาหารใหม่จำนวน 4 ครั้ง ที่เวลา 10, 12, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แทนที่ปริมาตร 1 ลิตร ด้วย Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ความเข้มข้น 5 เท่า โดยการปั่นเหวี่ยงแยกของเหลวออก ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 95

รูปที่ 3.23 ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียไอโซเลท SUT-NZT6 เลี้ยงใน Complex medium (ตารางที่ 3.15) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 6 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (ประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวน 300 รอบต่อนาที เติมอาหารใหม่จำนวน 4 ครั้ง ที่เวลา 10, 12, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรสุดท้าย 8 ลิตร เลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 98

รูปที่ 3.24 ตัวอย่างลักษณะของตะกอนเซลล์เปียกก่อนนำไปทำแห้งและสกัด PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และสายพันธุ์ SUT-NZT9 .....101

# สารบัญภาพ (ต่อ)

**หน้า**

รูปที่ 3.25 ขั้นตอนการสกัด PHA ด้วย Dodecyl sulfonic acid, sodium salt-Soium hypochlorite (SDS-NaClO) ตาม Xu *et al*. (2010).....103
รูปที่ 3.26 ขั้นตอนการสกัด PHA ด้วย Chloroform-Sodium hypochlorite ตาม Xu *et al*. (2010).....103
รูปที่ 3.27 ขั้นตอนการสกัด PHA ด้วย Chloroform-Sodium hypochlorite (SDS-NaClO) ตาม Wang *et al*. (2013).....104
รูปที่ 3.28 ตัวอย่างลักษณะตะกอนเซลล์เปียกและเซลล์แห้งของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 หลังการเลี้ยงเพื่อผลิตสาร PHA.....106
รูปที่ 3.29 ตัวอย่างลักษณะฟิล์มของพอลิเมอร์ PHA ที่สกัดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่พัฒนาได้ ควบคุมอุณหภูมิเลี้ยงเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส สกัดด้วยวิธีที่ใช้ 1,2-Dichloroethane ดัดแปลงจาก Vanlautem (1982) และ Noda (1988) และสกัด PHA ที่ได้ซ้ำด้วย Methanol และ 1,2-Dichloroethane ตามลำดับ.....107
รูปที่ 3.30 ตัวอย่างลักษณะของพอลิเมอร์ PHA ก่อนการอบแห้ง (A) และหลังการอบแห้ง (B) ที่สกัดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ได้ศึกษาและสกัดด้วยวิธีที่พัฒนาได้ที่ลดการใช้ 1,2-Dichloroethane ที่ใช้เป็นวิธีควบคุมผลบวก.....108
รูปที่ 3.31 ตัวอย่างลักษณะฟิล์มของพอลิเมอร์ PHA ที่สกัดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ศึกษา สกัดด้วยวิธีที่พัฒนาได้จากโครงการนี้ที่ลดการใช้ 1,2-Dichloroethane.....109
รูปที่ 3.32 สเปกตรัม 1H NMR ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6.....112
รูปที่ 3.33 สเปกตรัม 13C NMR ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6.....113
รูปที่ 3.34 ลักษณะของ Compression-molded film (เตรียมจากการใช้อุณหภูมิ 160 องศา-เซลเซียส) ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และลักษณะของพอลิเมอร์ PHA film เมื่อทดสอบให้ความร้อนเบื้องต้นโดยก่อน และหลัง เข้าไมโครเวฟ 700 W เป็นเวลา 1 นาที และก่อน และหลัง แช่น้ำร้อนปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่ทันทีหลังต้มเดือด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 35 นาที.....118

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

พลาสติกเป็นวัสดุที่มีคุณภาพดีด้านความแข็งแรง ความคงทน น้ำหนักเบา และไม่เสื่อมสลายง่าย สามารถนำไปใช้ในประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ช่วยเพิ่มคุณภาพและความสะดวกสบายในชีวิต แต่คุณภาพที่ดีของพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพเหล่านี้ได้ก่อปัญหาขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากการสะสมของพลาสติกที่ผ่านการใช้แล้วมีจำนวนมากทั่วโลก และการแก้ปัญหาขยะพลาสติกก็นำมาซึ่งปัญหาสิ่งแวดล้อมอื่น ประกอบกับแนวโน้มการขาดแคลนวัตถุดิบจากน้ำมันปิโตรเลียมหรือเชื้อเพลิงจากฟอสซิลที่นำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกมีปริมาณจำกัดและมีแนวโน้มจะหมดไป จึงเป็นแรงผลักดันในการค้นหาแหล่งวัตถุดิบทดแทน พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates, PHA) จัดเป็นพอลิเอสเทอร์ชนิดหนึ่ง ได้จากกระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์ (Byrom, 1994) โดย PHA นี้ทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารและพลังงานของเซลล์จุลินทรีย์ จุลินทรีย์ชนิดเด่นที่มีรายงานถึงความสามารถในการสร้าง PHA เป็นแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแกรมลบในสกุล *Alcaligenes*, *Ralstonia* และ *Pseudomonas* (Kunioka *et al*., 1989; Doi *et al*., 1990; Lee, 1996; Ojumu and Solomon, 2004; Khanna and Srivastava, 2005) PHA เป็นพอลิเมอร์กึ่งผลึก (Semi-crystalline polymer) ทำให้ทนความร้อนได้ดี ซึ่งดีกว่าพอลิแล็กติกแอซิด (Poly(lactic acid)) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์อสัณฐาน ที่ได้จาก Polymerization ของ L-Lactic acid) จึงสามารถใช้ทำบรรจุภัณฑ์ชนิดบรรจุร้อน และใช้บรรจุอาหารร้อนได้ เนื่องจาก PHA เป็นพลาสติกที่ย่อยสลายหรือสลายตัวได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastics) และมีสมบัติที่ใกล้เคียงกับ Polypropylene หรือ Polyethylene ซึ่งเป็นปิโตรพลาสติกที่มีการใช้งานกันทั่วไป สามารถนำมาทำเป็นฟิล์ม อัดขึ้นรูป ปั่นเป็นเส้นใย และใช้ผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นเป็นพอลิเมอร์ผสมได้ จึงได้รับความสนใจศึกษากันอย่างกว้างขวางทั้งในด้านกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ การตรวจสอบโครงสร้างและองค์ประกอบ การศึกษาและปรับปรุงสมบัติ การใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์และบรรจุภัณฑ์

อย่างไรก็ตามการผลิต PHA ยังมีข้อจำกัดด้านกระบวนการผลิตและวัตถุดิบ ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูง ดังนั้นจึงเป็นโอกาสในการวิจัยและพัฒนาเพื่อนำไปสู่การผลิต PHA ที่มีต้นทุนต่ำลงได้ ประเทศไทยมีข้อได้เปรียบด้านวัตถุดิบที่เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีมูลค่าต่ำ และทรัพยากรจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทั้งชนิดและปริมาณ นำไปสู่ทางเลือกให้ได้มาซึ่งจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิต PHA จากผลงานของผู้วิจัยที่ได้ดำเนินการก่อนโครงการนี้ มีผลสำเร็จที่สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่แยกได้ในประเทศไทยมากกว่า 20 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพในการผลิตและสะสม PHA ปริมาณสูงภายในเซลล์และย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดี (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2551) จึงเห็นแนวโน้มในการสร้างเทคโนโลยีที่สำคัญสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพ มีความเป็นไปได้ที่จะช่วยตอบสนอง

ความต้องการของประเทศและของโลกในด้านการผลิตพอลิเมอร์สำหรับการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ช่วยเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบซึ่งเป็นผลผลิตจากทางการเกษตร และช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อม หากได้นำแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่คัดเลือกมาใช้ประโยชน์ในการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัยที่ มีดังนี้

1) เพื่อผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates, PHA) ในระดับห้องปฏิบัติการโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะ จากการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลัง

2) เพื่อศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ศึกษา

3) เพื่อศึกษาการสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่ศึกษาและตรวจสอบคุณลักษณะสำคัญของพอลิเมอร์ PHA ที่ได้ เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งาน

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การทดลองผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิด PHA จากการใช้แป้งมันสำปะหลังทั้งที่เตรียมโดยผ่านและไม่ผ่านการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้ศึกษาและคัดเลือกจากโครงการวิจัยที่ผู้วิจัยได้ดำเนินการแล้วจำนวน 10 ไอโซเลท (สายพันธุ์) เพื่อตรวจสอบลักษณะปรากฏของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ในเบื้องต้นเพื่อเลือกให้ได้แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ที่จะนำมาศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังในระดับห้องปฏิบัติการ ศึกษากระบวนการและสภาวะที่เหมาะสมในผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่คัดเลือกนั้น ศึกษาการสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ศึกษาและตรวจสอบคุณลักษณะสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านความเหนียว ยืดหยุ่น แข็ง หรือเปราะ ของพอลิเมอร์ PHA ที่ผลิตได้ เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งานด้านต่างๆ

## 1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่ได้จากผลสำเร็จของการวิจัยที่ได้รับ มีดังนี้

1) สารพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates, PHA) ที่ผลิตโดยใช้แป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่ผลิตได้ในปริมาณมากในประเทศไทย โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย

2) กรรมวิธีการผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะ 1 สายพันธุ์

3) ผลสำเร็จในการใช้แป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัตถุดิบที่เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่ผลิตได้ในปริมาณมากและทรัพยากรจุลินทรีย์ของประเทศไทยให้เป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4) องค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป ซึ่งมีกลุ่มเป้าหมาย คือ นักวิจัยทั้งหน่วยงานภาครัฐและเอกชน นักวิชาการและนักศึกษา ที่ศึกษาวิจัยการผลิตพอลิเมอร์เพื่อการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

5) การบริการความรู้แก่ประชาชนผู้สนใจการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และแก่ภาคธุรกิจที่เป็นผู้ผลิตพอลิเมอร์สำหรับพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

6) ผลงานวิจัยที่ช่วยเพิ่มความเข้มแข็งทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้ส่วนหนึ่ง โดยเผยแพร่ในรูปสิ่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการและนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ

7) ผลผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่และนักศึกษาที่มีประสบการณ์จากการเป็นผู้ช่วยนักวิจัยและช่วยงานวิจัย

## 1.5 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

พอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates, PHA) จัดเป็นพอลิเอสเทอร์ชนิดหนึ่ง ได้จากกระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย PHA เป็นพอลิเมอร์กึ่งผลึกที่ทนความร้อนได้ดีและยังสลายตัวได้ทางชีวภาพ มีสมบัติที่ใกล้เคียงกับ Polypropylene หรือ Polyethylene ซึ่งเป็นปิโตรพลาสติกที่มีการใช้งานกันทั่วไป สามารถนำมาทำเป็นฟิล์ม อัดขึ้นรูป ปั่นเป็นเส้นใย และใช้ผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นเป็นพอลิเมอร์ผสมได้ ดังได้กล่าวแล้วในข้างต้น อย่างไรก็ตามการผลิต PHA ยังมีข้อจำกัดด้านกระบวนการผลิตและวัตถุดิบส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูง การวิจัยเพื่อผลิต PHA จากแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัตถุดิบที่เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีมูลค่าต่ำและผลิตได้ในปริมาณมากในประเทศไทย โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทยด้วยกระบวนการผลิตที่เหมาะสม สามารถลดต้นทุนการผลิต PHA ได้

## 1.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates, PHA) เป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพหนึ่งในสามประเภท (Khanna and Srivastava, 2005) และเป็นพอลิเมอร์ชนิดเดียวที่ย่อยสลายหรือสลายตัวได้ 100% (Steinbuchel, 1991; Sudesh *et al.*, 2000) พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพประเภทที่สอง คือ พอลิเมอร์สังเคราะห์ทางเคมี เช่น Poly(glycollic acid), Poly(lactic acid), Poly(ε-caprolactone), Poly(vinyl alcohol), Poly(ethylene oxide) สารสังเคราะห์ทางเคมีเหล่านี้สามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ แต่ยังขาดสมบัติบางประการที่ต้องการเพื่อการใช้งาน ซึ่งปัจจุบันยังคงมีการพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อให้สามารถนำมาใช้ทดแทนพลาสติกในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างสมบูรณ์ และพลาสติกชีวภาพประเภทที่สามเป็นชนิดที่ผสมแป้ง พลาสติกชนิดนี้ใช้แป้งผสมเป็นสารเติมเต็มหรือสารที่ก่อให้เกิดโครงสร้างร่างแห เช่น Starch-polyethylene จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินสามารถย่อยสลายแป้งได้ ทำให้โครงสร้างพลาสติกบางส่วนสลายตัวไปด้วย ช่วยลดเวลาการสลายตัวของพลาสติก แต่ยังคงมีส่วนของพลาสติกที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานานเช่นพลาสติกทั่วไป

PHA เป็นพอลิเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดไฮดรอกซีแอลคาโนอิก (Hydroxyalkanoic acid, HA) หลายชนิดมารวมตัวกัน สังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์หลายชนิด เพื่อเก็บไว้เป็นแหล่งอาหารสำรองในสภาวะที่สารอาหารไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสมีจำนวนจำกัด แต่มีคาร์บอนเกินความต้องการพอลิเมอร์ชนิดนี้มีสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ทั่วไปหลายชนิด เช่น Polypropylene ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ทดแทนกันได้ เมื่อย่อยสลายจะเปลี่ยนเป็นน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและเปลี่ยนเป็นมีเทนเมื่อย่อยสลายในสภาวะปราศจากออกซิเจนโดยจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในดินและน้ำ

### 1.6.1 การผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates, PHA) โดยแบคทีเรีย

จุลินทรีย์สังเคราะห์พอลิเมอร์ชนิด PHA เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงานของเซลล์ โดยปกติ PHA สะสมอยู่ในลักษณะของ Inclusion หรือ Granule ที่มีการรายงานพบว่า Granule ไม่ละลายน้ำมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-1.0 ไมโครเมตร (Foster *et al*., 2005) จุลินทรีย์ที่สามารถสร้าง PHA ชนิดเด่นเป็นแบคทีเรียในสกุล *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Azotobacter* และ *Pseudomonas* (Kunioka *et al*., 1989; Doi *et al*., 1990; Lee, 1996; Ojumu and Solomon, 2004; Khanna and Srivastava, 2005) และ *Bacillus* (Singh *et al*., 2009) แบคทีเรียมากกว่า 300 ชนิด (species) ที่พบว่าสามารถสะสม PHA โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Cupriavidus necator* (เดิมคือ *Ralstonia eutropha* หรือ *Alcaligenes eutrophus*), *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* และ *Bacillus subtilis* แบคทีเรียสามารถสะสม PHA ได้มากถึงราว 80% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Poirier *et al.,* 2002; Singh *et al*., 2009) ปริมาณ PHA ที่ผลิตได้มากกว่า 80 กรัมต่อลิตร และมีค่า Productivity มากกว่า 2 กรัมต่อกรัม ลิตร ชั่วโมง ในระดับห้องปฏิบัติการ

แบคทีเรียที่สามารถผลิต PHA ได้ที่มีรายงานมีทั้งที่ต้องการสารอาหารจำเป็นในปริมาณที่จำกัด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ สำหรับการสังเคราะห์ PHA และมีแหล่งคาร์บอนมากเกินความจำเป็น แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens* และ *Pseudomonas oleovorans* (Khanna and Srivastava, 2005) และบาง species ในสกุล *Bacillus* (Singh *et al*., 2009) เป็นต้น และแบคทีเรียบางชนิดที่บางสายพันธุ์สะสมพอลิเมอร์ในระหว่างการเจริญได้โดยไม่จำเป็นต้องเจริญในสภาวะที่มีสารอาหารจำเป็นในปริมาณที่จำกัด ได้แก่ *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* สายพันธุ์กลายพันธุ์ (Mutant stain) และ Recombinant *Escherichia coli* (Khanna and Srivastava, 2005) เป็นต้น

PHA ที่สร้างโดยแบคทีเรียที่เป็นที่รู้จักกันดีเป็นพอลิเมอร์ชนิด Poly(3-hydroxybutaric acid) [P(3HB)] ประกอบด้วยหน่วยซ้ำของ (R)-3HB ที่อาจมีน้ำหนักโมเลกุลสูงในช่วง 200,000 ถึง 3,000,000 ดาลตัน (Daltons, Da) ขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียที่สร้างและสภาวะที่แบคทีเรียเจริญ (Sudesh *et al.,* 2000)

แบคทีเรียที่สร้าง P(3HB) เป็น species ในหลายสกุล ได้แก่ *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Chlorogloea*, *Chromatium*, *Chromobacterium*, *Derxia*, *Ferrobacillus*, *Hyphomicrobium*, *Lampropaedia*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Sphaerotilus*, *Spirillum*, *Streptomyces*, *Vibrio* และ *Zoogloea* (Byrom, 1987; Luengo *et al*., 2003; Singh *et al*., 2009)

แบคทีเรียที่สามารถผลิตและสะสม PHA และ PHB ในเซลล์เมื่อเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งที่เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิมและที่ผ่านการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ตามที่มีรายงานมีหลายสายพันธุ์ เช่น *Bacillus megaterium* SRKP-3, *Brevibacillus inocatus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* (Chakravarty *et al*., 2010; Reddy and Mohan, 2012), *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Jantinobacterium lividum*, *Pseudomonas lini*, *Pseudomonas* sp. (Goh and Tan, 2012), *Pseudomonas putida* Bet001 (Gumel *et al*., 2012), *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, *Pseudomonas stutzeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* (Reddy and Mohan, 2012), *Cupriavidus necator* (Campos *et al*., 2014) และแบคทีเรียในสกุล *Azoarcus*, *Thauera*, *Paracoccus* (Albuquerque *et al*., 2013) เป็นต้น รวมถึงแบคทีเรียที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม เช่น *Cupriavidus necator* DSM 545 (Cavalheiro *et al*., 2012; Grousseau *et al*., 2013; Berezina, 2014), Recombinant *Escherichia coli* (Meng *et al*., 2012) และ *Haloferax mediterranei* pWL502-eps เป็นต้น ในจำนวนหลายสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีรายงานการผลิต PHA พบว่า *Cupriavidus necator* (เดิมคือ *Ralstonia eutropha*) เป็นสายพันธุ์ที่ใช้เพื่อผลิต PHA มากที่สุด เนื่องจากให้ PHA ที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่อุตสาหกรรมพลาสติกต้องการ

การศึกษา Pathways และเอนไซม์ รวมทั้ง Gene ที่บงการการสร้าง Key enzymes ที่สังเคราะห์ PHA ทางชีวภาพกันอย่างแพร่หลาย (Steinbüchel, 2001; Taguchi *et al*., 2001; Luengo *et al*., 2003) PHA syntheses ที่พบสามารถจำแนกได้ 3 ชนิด ตามโครงสร้างพื้นฐานและความจำเพาะต่อ Substrate (Sudesh *et al.,* 2000) ชนิดแรกคือ β-Ketothiolase (PhaA) ซึ่งเป็น Homotetrameric ทำให้เกิด Reversible condensation ของโมเลกุลของ Acetyl-CoA 2 โมเลกุล เกิดเป็น Acetoacetyl-CoA และ CoASH ในขั้นแรกของ P(3HB) biosynthesis pathway ในขั้นตอนต่อมาของการสังเคราะห์ P(3HB) มี NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) เป็น Homotetrameric enzyme ที่ทำให้เกิด reduction ของ Acetoacetyl-CoA เป็น (D)-3-Hydroxybutyryl-CoA จากนั้น PhaC ซึ่งเป็น Key enzyme ในกระบวนการสังเคราะห์ PHA ช่วย Polymerize ส่วน Hydroxyacyl-CoA thioesters ซึ่งได้จากหลายแนวทางของกระบวนการย่อยสลายสารอาหารประเภทน้ำตาล สารประกอบคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และ แอลเคน (Alkane) เป็นต้น เพื่อสังเคราะห์ PHA (Luengo *et al*., 2003) นอกจากนั้นยังมี PhaP (PHAin) เป็น Structural protein เด่นที่สร้างในชั้น (layer) ที่หุ้ม PHA granule ทำให้เกิดขนาดและจำนวนของ Granule ในแต่ละเซลล์ PhaR เป็น Regulatory protein ที่จับกับ Upstream region ของ *pha*P gene เพื่อควบคุมการแสดงออกของ PHAin นอกจากนี้ยังมี PhaZ เป็น Depolymerase enzyme ที่ย่อย PHA เป็น Monomer (Kojima *et al.,* 2004)

ด้านการศึกษาการผลิต PHA โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้น ชนิดของแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ แบคทีเรียที่สามารถผลิต PHA จากวัตถุดิบเริ่มต้นหลายชนิด ได้แก่ กลูโคส (Glucose) อะซิเตท(Acetate), Tryptone, Pyruvate, Methanol เป็นต้น และการสะสมมีตั้งแต่ <10% ถึง >80% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Kim and Lenz, 2001; Singh *et al*., 2009) Hollender *et al*. (2002) ได้ศึกษาผลของอะซิเตทชนิดเดียว อะซิเตทและกลูโคส และกลูโคสชนิดเดียว ต่อการผลิต PHA ภายใต้ Anaerobic–aerobic conditions ใน Sequential batch reactor (SBR) โดยใช้จุลินทรีย์ผสม (Mixed cultures) พบว่ามีการใช้กลูโคสอย่างรวดเร็วและให้ผลผลิตที่สูงกว่าอะซิเตท แต่การใช้อะซิเตททำให้เกิด Co-polymer ของ Hydroxybutyrate (HB) และ Hydroxyvalerate (HV) ทำนองเดียวกับที่ Lemos *et al*. (1998) ได้รายงานถึงสัดส่วน 69-100% HB และ 0-31% HV

Satoh *et al*. (1998) ได้เลี้ยง Sludge ด้วยระบบ Sequential batch reactor (SBR) 2 แบบ คือ Anaerobic-Aerobic SBR (A-A) และ Microaerophilic-Aerobic SBR (M-A: มีการเติมอากาศเล็กน้อยในสภาวะ Anaerobic) แล้วนำ Sludge จากทั้ง 2 ระบบ มาทดสอบหาปริมาณ PHA ใน Batch process โดยกำหนดสภาวะไว้ 2 รูปแบบคือ แบบที่ไม่มีการเติมออกซิเจนและแบบที่มีการเติมออกซิเจนในปริมาณจำกัด พบว่า Sludge จากระบบ (A-A) ในสภาวะที่มีออกซิเจนมีการสังเคราะห์ PHA สูงกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยพบ PHA ใน Sludge 33% และ 22% ตามลำดับ ส่วนใน Sludge จากระบบ M-A สามารถสังเคราะห์ PHA ได้ถึง 62%

Warankana and Randall (1999) รายงานถึงการเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะ Microaerophilic-Aerobic activated sludge รวมทั้งสภาวะที่จำกัดธาตุอาหาร โดยวัดปริมาณ PHA ที่สะสมในเซลล์ของระบบ SBR แบบต่อเนื่อง พบว่าในสภาวะที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส จุลินทรีย์มีการสะสม PHA 45% TSS (Total suspended solids) และเมื่อจำกัดปริมาณไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว พบว่ามีการสะสม PHA 36% TSS แต่เมื่อเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวต่อไป พบว่า จุลินทรีย์ในระบบค่อย ๆ ลดจำนวนลงจนถึงไม่พบการสะสม PHA Wang and Lee (1997) ได้ทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ภายใต้สภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจน พบว่าจุลินทรีย์มีการสะสมสาร PHB เพิ่มมากขึ้นถึง 88% จากที่พบในสภาพปกติ

อุณหภูมิมีผลต่อการสะสม PHB ของจุลินทรีย์ มีรายงานการเลี้ยง Activated sludge แบบ SBR ด้วยอะซิเตท ภายใต้สภาวะจำกัดปริมาณอะซิเตท อัตราการสร้าง PHB ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Krishna and Van Loosdrecht, 1999)

PHA granule ที่สะสมในเซลล์มีจำนวนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น *Ralstonia eutropha* สะสม 8-12 Granules ที่มีขนาดแตกต่างกันในขณะที่ *Pseudomonas oleovorans* สะสมโดยเฉลี่ย 1-2 Granules ที่มีขนาดใหญ่ (Zinn *et al.,* 2001) PHA granule ที่อยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียสามารถตรวจหาได้จากการย้อมด้วยสี Sudan black B หรือสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ เช่น Nile blue และ Nile red แสดงให้เห็นถึงสมบัติที่เป็นไขมันโดยธรรมชาติ (Sudesh *et al.,* 2000; Zinn *et al.,* 2001) อย่างไรก็ตามสีย้อม

สามารถติดส่วนประกอบของเซลล์ที่เป็นไขมันส่วนอื่นด้วย (Ciesielski *et al*., 2006) วิธีการตรวจหาแบคทีเรียจึงอาจใช้วิธีที่จำเพาะขึ้นด้วยการตรวจหา Gene ซึ่งมีถึง 4 กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHA คือ Gene กลุ่มแรกเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHA ใน *pha*CAB operon ที่ประกอบด้วย *pha*C, *pha*A และ *pha*B พบใน *Ralstonia eutropha* Gene กลุ่มที่ 2 เป็น Synthase genes (*pha*C1 และ *pha*C2) ของระบบที่สังเคราะห์ PHA ของ *Pseudomonas* sp. Gene กลุ่มที่ 3 บ่งการการสร้าง Synthase enzyme ซึ่งประกอบด้วย 2 Enzyme subunits ที่สร้างโดย *pha*E และ *pha*C genes พบใน *Chromatium vinosum* และ *Synechocystis* sp. และ Gene กลุ่มที่ 4 เกี่ยวข้องกับ *pha*C1ZC2 operon ที่ประกอบด้วย *pha*C1/*phaZ*/*pha*C2 genes ซึ่งพบใน *Pseudomonas* sp. วิธีการตรวจหาที่อาศัย PHA synthase genes นี้มีทั้ง Homologous และ Heterologous gene probes, Short consensus oligonucleotide hybridization หรือ Polymerase chain reaction (PCR) techniques (Ciesielski *et al*., 2006)

กนกพร สังขรักษ์ (2549) ศึกษาการผลิตและคุณลักษณะของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB) โดย *Rhodobacter sphaeroides* ES16 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มที่สามารถผลิตและสะสม PHA ภายในเซลล์ ในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต PHA ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่อเพิ่มผลผลิตของ PHA จากการผลิตพอลิเมอร์ชนิด PHB ด้วยแบคทีเรีย *Rhodobacter sphaeroides* ES16 เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ คือ *Acinetobacter* sp., *Rhodobacter capsulatus* SS3 และ *Rhodobacter sphaeroides* ES16 ที่กลายพันธุ์จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ N20 และ U7 ในอาหาร Glutamate-malate (GM) พบว่าแบคทีเรียกลายพันธุ์ N20 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุดที่ 53.94% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สายพันธุ์ U7 และสายพันธุ์ดั้งเดิม ES16 ผลิตได้ 42 และ 19.49% ตามลำดับ ภายในเวลา 60 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรีย *Rhodobacter sphaeroides* N20 คืออาหาร Glutamate-acetate (GA) ประกอบด้วย Acetate 4 กรัมต่อลิตร Ammonium sulphate 0.02 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 6:1 ที่มี $K_2HPO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร $KH_2PO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร และ NaCl 3% โดยไม่ต้องเติมแร่ธาตุและวิตามิน pH เริ่มต้นที่ 7.0 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ (*Rhodobacter sphaeroides* N20, U7 และ ES16) ในอาหาร GA พบว่ามีการสะสม PHB สูงสุดที่ 72.94, 50.03 และ 22.21% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ เมื่อผลิต PHB จากน้ำเสียที่ได้จากโรงงานน้ำมันปาล์มในบ่อบำบัดไร้อากาศ เจือจาง 25% (มีค่า Chemical oxygen demand (COD) 18,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) และไม่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ ด้วยสายพันธุ์ *Rhodobacter sphaeroides* N20 และ U7 เลี้ยงแบคทีเรียภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน มีแสง (ใช้แสงอาทิตย์) ในน้ำเสียดังกล่าว พบว่าสายพันธุ์ N20 มีการเจริญดี ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.00 กรัมต่อลิตร และผลิต PHB ได้สูงสุด 6.85 กรัมต่อลิตร เทียบผลผลิตเท่ากับ 85.60% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง พอลิเมอร์ PHB จาก *Rhodobacter sphaeroides* N20 ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม มีค่าอุณหภูมิหลอม (Melting temperature, $T_m$) และอุณหภูมิการเกิดผลึก (Crystallization temperature, *Tc*) ในช่วง 164-165 และ 92-96 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีความเป็นผลึก 55.52% น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ได้มีค่า 400,000 ดาลตัน เมื่อเลี้ยงเชื้อ

ในแหล่งน้ำเสียเจือจาง 25% ที่มีการเติม Valeric acid เข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อผลิต Polyhydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate (PHBV) ภายใต้สภาวะดังกล่าวข้างต้น พบว่าสายพันธุ์ U7 มีการเจริญสูงสุด (3.10 กรัมต่อลิตร) และผลิต PHBV สูงสุดที่ 0.27 กรัมต่อลิตร เทียบผลผลิตเท่ากับ 85% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง PHBV ที่ผลิตได้ประกอบด้วยโคพอลิเมอร์ของ Hydroxybutyrate 30.05% และ Hydroxyvalerate 69.95% PHBV ที่ผลิตได้มีค่า Melting temperature ($T_m$) และ Crystallization temperature (*Tc*) เท่ากับ 162 และ 96.4 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีความเป็นผลึก 66.43% มีน้ำหนักโมเลกุล 230,000 ดาลตัน

Chakravartry *et al*. (2010) ศึกษาการผลิต PHA ด้วย Activated bio-sludge สำหรับ anaerobic acidogenic reactor (AAR) ที่ได้จาก Up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor รองรับน้ำเสียที่ระบายจากโรงงานน้ำนมดิบด้วยอัตราการไหลช่วง 50.4 ถึง 64.8 ลิตรต่อวัน น้ำเสียที่ใช้เป็นวัตถุดิบหมักมีค่า Biological oxygen demand (BOD) และ COD เท่ากับ 2,000 และ 3,250 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ระบบที่ใช้ทดลองผลิต PHA นี้ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก คือ

1) Continuous anaerobic acidogenic reactor (AAR) สำหรับผลิต Volatile fatty acids

2) Conventional activated sludge production reactor (ASPR) สำหรับผลิต Activated sludge ใหม่

3) PHA synthesis reactor (PHAR) เป็นถังที่ใช้ในขั้นตอนการผสมส่วนประกอบของสารตั้งต้นและ Activated sludge ที่เตรียมได้ในถังส่วนที่ 1 และ 2 ตามลำดับ เพื่อการผลิตและสะสม PHA โดยควบคุมสภาวะให้เหมาะ pH ที่ 7.1 และ Oxidation-reduction potential (ORP) ที่ 33 มิลลิโวลต์ พบการสะสม PHA ใน Sludge สูงสุดถึง 43.11% ที่เวลา 43.56 ชั่วโมงของการเลี้ยงแบคทีเรียในถัง PHAR เทียบผลผลิต PHA สูงสุด เท่ากับ 25% หรือเท่ากับ 0.25 กิโลกรัม PHA ต่อกิโลกรัม COD ที่ใช้ไป

Goh and Tan (2012) ศึกษาแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิต PHA จำนวน 50 ไอโซเลท จากทั้งสิ้น 422 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจาก Casey Station และ Signy Island ใน Antarctica ตะวันออกและตะวันตก ตามลำดับ มีการทดสอบศักยภาพการผลิตและสะสม PHA ของแบคทีเรียด้วย Nitrogen-limiting PHA production medium บรรจุใน Flask แบ่งการเลี้ยงแบคทีเรียเป็น 2 ขั้นตอน คือ (1) การเลี้ยงใน Normal-strength nutrient broth ที่ประกอบด้วย Peptone (จากเนื้อสัตว์) และ Meat extract เข้มข้น 5 และ 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ควบคุมอุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เลี้ยงแบคทีเรียให้เจริญเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ (2) การเลี้ยงใน PHA production medium ที่ประกอบด้วย $Na_2HPO_4$, $KH_2PO_4$, $NH_4Cl$, NaCl เข้มข้น 6.0, 3.0, 0.5, 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ $MgSO_4$ และ $CaCl_2$ เข้มข้น 1.0 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ใช้กลูโคสและ Sodium octanoate เข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยล้างเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงให้เจริญในขั้นที่ (1) จำนวน 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นย้ายตะกอนเซลล์ที่ได้ลงอาหาร PHA production medium และเลี้ยงแบคทีเรียควบคุมอุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้และมีศักยภาพในการผลิต PHA ส่วนใหญ่เป็น *Pseodomonas* spp. และมี *Janthinobacterium* spp. บ้าง โดย *Pseudomonas*

ทุกไอโซเลท สามารถผลิต PHA ชนิด Medium chain-length PHA ได้จากการใช้ Sodium octanoate โดยที่ *Pseudomonas* UMAB-40 สามารถผลิตและสะสม PHA ได้สูงถึง 48% ของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ *Janthinobacterium* สามารถใช้กลูโคสเท่านั้นในการผลิต PHA

Gumel *et al*. (2012) ศึกษาการผลิตและสมบัติของ Medium chain-length PHA ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* Bet001 ที่แยกได้จากน้ำทิ้งจากการผลิตน้ำมันปาล์ม (Palm oil mill effluent) เลี้ยงแบคทีเรียให้เจริญใน Inoculum cultivation medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน Conical flask ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำกล้าเชื้อที่เจริญปริมาตร 3 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงและใช้เป็นกล้าเชื้อเพื่อผลิตและสะสม PHA ใน PHA production medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน Conical flask ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร เลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบการสะสมของ PHA สูงในช่วง 49.7-68.9% ของน้ำหนักแห้งเซลล์ จากการใช้ Octanoic acid และ Oleic acid เป็นแหล่งคาร์บอน พอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 55.7 ถึง 77.7 กิโลดาลตัน ไม่พบ Unsaturated monomer ในโครงสร้าง และ PHA ที่ผลิตได้เป็น Semi-crystalline polymer ที่มีสมบัติทนความร้อนได้ดี

Reddy and Mohan (2012) ศึกษาผลของสภาพแวดล้อมการเลี้ยงเชื้อแบบ Aerobic และ Anoxic ต่อการผลิต PHA ของแบคทีเรียใน Aerobic consortia ที่ได้จาก Activated sludge และเลี้ยงให้เจริญเพื่อผลิต PHA ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากขยะอาหาร 2 ชนิด คือ Un-fermented food wastes (UFW) และ Fermented food wastes (FFW) ที่มี Organic loading rate (OLR) และ pH เท่ากัน คือ 1.11 กิโลกรัม COD ต่อลูกบาศก์เมตรต่อวัน และ 6.52 ตามลำดับ มีส่วนประกอบทางเคมีเหมือนกัน คือ Total solids, Total suspended solids, Total dissolved solids, Total alkalinity, Chlorides, VFA, COD, BOD, Total carbohydrates, Nitrates, Proteins และ Oil รวม Grease เข้มข้น 36,290, 23,068, 13,220, 1,084, 1,420, 5,879, 330,000, 247,500, 95,874, 9.8, 31,250, และ 75,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต PHA ภายใต้สภาวะ Aerobic (UFWA และ FFWA) และ Anoxic (UFWAx และ FFWAx) แบบ Fed-batch fermentation ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 110 มิลลิลิตร ในสภาวะ Aerobic พบการผลิตและสะสม PHA สูงสุดที่เวลาเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 35.2 และ 32.6% สำหรับ FFWA และ UFWA ตามลำดับ โดย PHA ที่ได้ประกอบด้วยโมเลกุล PHB เท่ากับ 61 และ 90% และ PHV เท่ากับ 35 และ 6% ตามลำดับ สำหรับสภาวะ Anoxic พบการผลิตและสะสม PHA สูงสุดที่เวลาเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน ได้ผลผลิตเท่ากับ 39.6 และ 35.6% สำหรับ FFWAx และ UFWAx ตามลำดับ โดย PHA ที่ได้ประกอบด้วยโมเลกุล PHB เท่ากับ 58 และ 65% และ PHV เท่ากับ 36 และ 32% ตามลำดับ ผลผลิตและการสะสม PHA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

Riedel *et al*. (2012) ศึกษาการผลิต Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) โดยแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* Re2058/pCB113 ที่ดัดแปลงพันธุกรรมจาก *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 ให้สามารถผลิต Poly(hydoxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) ได้เมื่อเจริญในอาหารที่มีน้ำมันปาล์ม

เป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยรูปแบบการเลี้ยงแบคทีเรียแบบ Extended batch fermentation และ Fed-batch fermentation ในการผลิต PHA แบบ Extended batch fermentation ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 2 ลิตร เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียให้เจริญในอาหาร Minimal medium ที่มีส่วนประกอบน้ำมันปาล์มและ Urea เข้มข้น 40 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาตรเริ่มต้น 1 ลิตร เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำมันปาล์มเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เพิ่มที่เวลา 32 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และอัตราการให้อากาศ 0.2-1.0 ลิตรต่อนาที พบการผลิต PHA สูงสุดถึง 32.5 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ มีการสะสม PHA สูงถึง 72% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ กระบวนการหมักที่ได้มีผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 0.52 กรัม PHA ต่อกรัมน้ำมันปาล์ม และที่ช่วงระยะเวลา 48-96 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ มีผลผลิตเพิ่มมากขึ้นเป็น 0.77 กรัม PHA ต่อกรัมน้ำมันปาล์ม สำหรับการผลิต PHA แบบ Fed-batch fermentation ในอาหารที่มีส่วนประกอบน้ำมันปาล์มและ Urea เข้มข้นเริ่มต้น 20 และ 2.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาตรเริ่มต้น 1 ลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มทุกๆ 2 ชั่วโมง จำนวน 5 ครั้ง ที่ระยะเวลาช่วง 24-48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ให้มีส่วนประกอบของน้ำมันปาล์มความเข้มข้นสุดท้าย 170 กรัมต่อลิตร และเติม Urea 0.2 กรัมต่อลิตร ทุกๆ 30 นาที ที่ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ จนกระทั่งมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 14.4 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 15 ชั่วโมง *Ralstonia eutropha* Re2058/pCB113 สามารถผลิต PHA ได้ 43% และเพิ่มขึ้นเป็น 61% ที่เวลาเลี้ยงเชื้อ 63 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 96 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ พบการผลิต PHA สูงถึง 102 กรัมต่อลิตร มีการสะสม PHA เท่ากับ 73% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ และเทียบผลผลิตของกระบวนการหมักเฉลี่ยและผลผลิตที่ช่วงเวลา 63-96 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 0.63 และ 0.78 กรัม PHA ต่อกรัมน้ำมันปาล์ม ตามลำดับ

Berezina (2013) ศึกษาการเพิ่มผลผลิต PHA ด้วยแบคทีเรีย *Cupriavidus necator* DSM 545 ที่เป็นสายพันธุ์กลายจาก *Cupriavidus necator* DSM 428 ในอาหารเหลว Mineral medium, Bornnarme's medium, Mandels' medium และ Luria broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติมและไม่เติม Sodium glutamate เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เลี้ยงแบคทีเรียใน Flask ขนาดบรรจุ 300 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 67 ชั่วโมง พบว่ามีการสะสม PHA ในเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร Bornnarme's medium และ Luria broth ที่เติม Sodium glutamate มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ และมี PHA สูงถึง 34% ที่ 67 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อนั้น

Oehmen *et al.* (2013) ศึกษาผลของการควบคุม pH ต่อผลผลิต PHA จากน้ำตาลที่ได้จากการย่อย Molasses ในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต PHA ด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

1) Continuous acidogenic fermentation reactor เพื่อย่อย Molasses ใน Anaerobic continuously stirred-tank reactor ปริมาตร 1.14 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และ pH ที่ 6 เป็นเวลา 10 ชั่วโมง กรองสารละลายที่ได้ผ่านระบบ Microfiltration เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับใช้เป็น Feedstock ในขั้นตอนที่ 2 การคัดเลือกเชื้อ (Culture selection) และขั้นตอนที่ 3 การผลิต PHA และเติมสารละลาย Molasses ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร ต่อเนื่องทุกๆ 10 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

2) Culture selection เป็นขั้นตอนคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อการผลิต PHA ในขั้นตอนที่ 3 ด้วยสภาวะการเลี้ยงที่ควบคุมใน Sequencing batch reactor ปริมาตร 0.8 ลิตร โดยช่วงแรกเลี้ยงแบคทีเรียในสภาวะที่ไม่ควบคุม pH เป็นเวลา 170 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (23-25 องศาเซลเซียส) และช่วงที่ 2 เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญต่อเนื่องในอาหารที่เตรียมจาก Feedstock ที่มีอัตราส่วนของ Carbon:Ammonia:Phosphate เท่ากับ 100:8:1 ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 23-25 องศาเซลเซียส และ pH ที่ 8 เป็นเวลา 50 วัน

3) PHA production เป็นขั้นการผลิต PHA ของเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 2 Culture selection ในอาหาร Feedstock จากขั้นตอนที่ 1 ปริมาตรอาหาร 0.6 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียแบบ Batch ไม่ควบคุมและควบคุม pH ที่ 8 และอุณหภูมิที่ 23-25 องศาเซลเซียส พบว่าการควบคุม pH ที่ 8 ในขั้นการเตรียมกล้าเชื้อมีผลเพิ่มความเข้มข้นของ Biomass เป็น 2 เท่า การผลิตและสะสม PHA เพิ่มเป็น 57.5% เทียบกับการเตรียมกล้าเชื้อที่ไม่ควบคุม pH (pH ประมาณ 9) และแบคทีเรียเด่นที่พบอยู่ในสกุล *Azoarcus*

Campos *et al*. (2014) ศึกษาการผลิต PHA จาก Crude glycerin โดยแบคทีเรีย *Cupriavidus necato*r IPT 026 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) ต่างกัน เลี้ยงแบคทีเรียให้เจริญใน Nutrient broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Flask ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร ใช้เชื้อเริ่มต้น 4% ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใช้แบคทีเรียที่ได้เป็นกล้าเชื้อ (Inoculum size 10% ที่มีจำนวนเซลล์ $10^{11}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรโดยประมาณ) สำหรับผลิตและสะสม PHA ในอาหาร Mineral medium ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ที่สภาวะเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบการผลิตและสะสม PHA สูงสุดเท่ากับ 2.81 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ประกอบด้วย Crude glycerin และ Ammonium sulphate 15 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เทียบผลผลิต PHA ที่ได้เท่ากับ 0.19 กรัม PHA ต่อกรัม Crude glycerin และพบการสะสม PHA ต่ำสุดเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงเชื้อที่ใช้อาหารประกอบด้วย Crude glycerin และ Ammonium sulphate 10 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีสมบัติเชิงความร้อนที่วัดด้วยวิธี Differential scanning colorimetry และ Thermalgravimetric analysis มีค่า Melting temperature ($T_m$) ช่วง 157.2 ถึง 184.3 องศาเซลเซียส และ Thermal degradation temperature ($T_{decomp}$) ช่วง 298.9 ถึง 327.4 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 510 ถึง 780 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยโมเลกุล 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxypentanoate, 3-hydroxynonanoate และโมเลกุลชนิดอื่น เท่ากับ 56.05, 7.56, 27.82 และ 8.29% ตามลำดับ

### 1.6.2 การสกัดและแยกสาร Polyhydroxyalkanoates (PHA) จากเซลล์แบคทีเรีย

การสกัดและแยกสาร PHA ออกจากเซลล์ของแบคทีเรียตามที่มีรายงาน ใช้สารทำละลายอินทรีย์กลุ่ม Halogenated hydrocarbon solvents เช่น Chloroform, Dichloroethane, Dichloromethane และ Dichloropropane เป็นต้น สารทำละลายอินทรีย์กลุ่ม Halogenated hydrocarbon solvents ที่ให้ผลการสกัดดีที่สุด คือ 1,2-Dichloroethane และ 1,1,2-Trichloroethane (Vanlautem and Gilain, 1980) ในการสกัดมี

ขั้นตอนการทำแห้งเซลล์ของจุลินทรีย์ที่สะสม PHA แล้วจึงสกัด PHA โดยใช้ Halogenated solvents จากนั้นแยก PHA ออกด้วย Solvent ที่มี Polarity ต่ำ เช่น Methanol และ Hexane (Vanlautem and Gilain, 1980; Senior *et al*., 1982; Blauhut *et al*., 1993; Noda and Schechtman, 1999; Narasimhan *et al*., 2006) แต่เนื่องจากสารประเภท Halogenated solvents เป็นสารอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมจึงมีข้อจำกัดในการใช้และไม่สามารถใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ต่อมามีการใช้ Non-halogen solvents ได้แก่ Alcohol, Ester, Amide และ Ketone เป็นต้น แทนการใช้ Halogenated solvents แต่มีข้อจำกัดที่ว่า PHA สามารถละลายใน Non-halogen solvents ได้น้อยที่อุณหภูมิห้อง (Kurdikar *et al*., 2000a) จึงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงในการสกัดเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของ PHA (Liddell, 1999; Kurdikar *et al*., 2000b) ทำให้เกิดปัญหาที่ตามมา คืออุณหภูมิสูงมีแนวโน้มทำให้มวลโมเลกุลของ PHA ลดลงตามระยะเวลาที่สกัด ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยลดระยะเวลาในการสกัดลง (Lafferty and Heinzle, 1978; Liddell, 1999; Kurdikar *et al*., 2000a) จากนั้นแยกสารสกัดออกโดยการระเหย การปั่นแยก หรือการกรอง (Jiang *et al*., 2006)

Shawaphun and Manangan (2010) ศึกษาการสกัดพลาสติกชีวภาพชนิด Poly-3-hydroxyalkanoates ที่ผลิตจากกลูโคสด้วยแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ให้ได้ปริมาณมากและพอลิเมอร์มีคุณภาพดี จากที่เลี้ยงแบคทีเรียใน Mineral medium broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาดบรรจุ 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสกัดพอลิเมอร์ที่สะสมในเซลล์ด้วยวิธีที่ประกอบด้วย (1) ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ เป็นการทำให้เซลล์แตกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ร่วมกับการใช้แรงเชิงกล (2) ขั้นตอนการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบต่อเนื่องและการสกัดโดยตรง และ (3) ขั้นตอนการทำพอลิเมอร์ให้บริสุทธิ์ เน้นการตกผลึกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม และตรวจสอบคุณลักษณะของพอลิเมอร์ที่ได้ด้วยเทคนิค Infrared (IR) Spectroscopy และ Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) และวิเคราะห์สมบัติเฉพาะทางความร้อนและน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ได้ด้วย Differential scanning colorimetry และการวัดค่าความหนืดของสารเจือจาง พบว่า การทำให้เซลล์แตกด้วยตัวทำละลาย Ethanol หรือ Methanol ร่วมกับการกวนด้วย Magnetic bar เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ (% Recovery) สูงกว่าการสกัดที่ใช้น้ำเป็นตัวกลาง แต่การใช้ Ethanol หรือ Methanol เป็นสารสกัดมีผลลดผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ และผลึกพอลิเมอร์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำเทียบกับการใช้ Chloroform ($CHCl_3$) และ Dichloromethane ($CH_2Cl_2$) ทั้งในการสกัดแบบต่อเนื่องและการสกัดโดยตรง PHA ที่สกัดได้จากเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ประกอบด้วยโมเลกุลของ Poly(3-hydroxybutyrate) มากกว่า 99% มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 110 กิโลดาลตัน และมีค่า Melting temperature ($T_m$) 169 องศาเซลเซียส

Heinrich *et al*. (2012) ศึกษาการสกัด Poly(3-hydroxybutyrate) จากเซลล์แบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* H16 ด้วย Sodium hypochlorite เลี้ยงแบคทีเรียให้เจริญ แบบ Fed-batch ในอาหาร Mineral salt medium ปริมาตร 400 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 650 ลิตร และปรับสภาพอาหารให้เหมาะต่อการผลิตและสะสม PHA ก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิตเซลล์ 18 ชั่วโมง โดยเลี้ยงแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มี

ไนโตรเจนจำกัดในขณะที่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอ จากนั้นแยกตะกอนเซลล์ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง บดให้ละเอียดด้วย Blender และละลายเซลล์แห้งที่เตรียมได้ 30 กรัมต่อลิตร ในสารละลาย Sodium hypochlorite เข้มข้น 13% ที่มีค่า pH ที่ 12.3 สกัด PHA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรเริ่มต้น และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ปั่นแยกตะกอนพอลิเมอร์และล้างด้วยน้ำสะอาดและ Isopropanol จำนวน 2 และ 1 ครั้ง ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* H16 ผลิตและสะสม PHA สูงถึง 62.20% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ พอลิเมอร์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ 95.66% ประกอบด้วยโมเลกุลของ Poly(3-hydroxybutyrate) 91.32% โมเลกุลของพอลิเมอร์ที่สกัดด้วย Sodium hypochlorite มีขนาดเล็กลงจากเริ่มต้น 50-70% เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย Gel permeation chromatography พบขนาดโมเลกุลในช่วง 460 ถึง 830 กิโลดาลตัน เทียบกับการสกัดด้วย Chloroform ที่ให้พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,700 กิโลดาลตัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 2
# วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการ การผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพจากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะ นี้ใช้สถานที่ปฏิบัติงานคือ ห้องปฏิบัติการ อาคารเครื่องมือ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และห้องปฏิบัติการ อาคารศูนย์วิจัยมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ครุภัณฑ์และวัสดุ-อุปกรณ์หลักที่ใช้ และวิธีดำเนินการของโครงการ มีดังนี้

## 2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

### 2.1.1 ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์หลักที่ใช้มีดังนี้ หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave; Hirayama, Hirayama Manufacturing Corp., Japan) ตู้อบไอร้อน (Hot air oven; 1375FX Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., U.S.A.) ตู้เขี่ยจุลินทรีย์ (Laminar flow hood, Caireb Clen Air, The Netherlands) ตู้บ่มเชื้อช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส (Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., U.S.A.) ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ 4-12 องศาเซลเซียส (FOC225I Velp® Scientific, Progen Scientific Ltd., U.K.) ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (HLLE-370 Heto, Heto-Holten, Denmark) สำหรับเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance, TC-205, Denver Instrument Company, Japan) เครื่องชั่งหยาบ (Pan balance, LB3200D Sartorius, Sartorius AG Göttingen, Germany) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (CCMD 510 pH and conductivity meter, WPA, England) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 6.6 ลิตร (Biostat® Bplus, Type 8843414, Sartorius BBI Systems GmbH, Germany) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร และ 14 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115, New Brunswick, An Eppendorf Company, U.S.A.) เครื่องนับโคโลนี (Colony counter, Colony-Star, Germany) เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze Dry System with Stoppering Tray Dryer, 7759034, Labconco, U.S.A.) เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Büchi Rotavapor R-200, BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland) เครื่องเขย่า (Sheldon Model 1245 PC, Manufacturing, Inc., U.S.A.) กล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ใช้แสง (Light microscope, Olympus BX51, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope; Olympus Model BX51TRF, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM, JEOL JSEM-6460 LV, JEOL, Japan) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM, JEOL JEM-1230, JEOL, Japan) กล้องถ่ายภาพภาคสนาม (Olympus, Camedia, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, 1245PC Shel Lab, Sheldon Manufacturing Inc., U.S.A.) เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer, C-MAG HS 7 IKAMAG®, IKA®-WERKE GMBH & CO. KG, Germany), High speed refrigerated centrifuge (Avanti 26 XPI, Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., U.S.A.),

Microcentrifuge (Strip-Fuge™, Clover Labs, Taiwan), $^{1}$H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer (VARIAN INOVA 300 MHZ NMR SPECTROMETER, Lab Merchant Limited, United Kingdom), $^{13}$C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer (VARIAN INOVA 75 MHZ NMR SPECTROMETER, Lab Merchant Limited), Micropipette sets (Nichipet EX, Nichiryo, Japan), Gel Permeation Chromatography (GPC, Agilent Technologies Inc., U.S.A.), Spectrophotometer UV/VISIBLE GBC 916, Scientific Equipment Ltd., Australia), Thermogravimetric Analyzer (TGA, TA Instruments, U.S.A.), Ultramicrotome (Ultracut RMC Boeckeler® microtome, Beckeler Instruments, Inc., U.S.A.) และ Vortex mixer (Finevortex, FinePCR®, Korea)

**2.1.2 วัสดุ**

วัสดุที่ใช้มีดังต่อไปนี้ เครื่องแก้วพื้นฐานสำหรับปฏิบัติการจุลชีววิทยา หลอดแก้วและพลาสติกชนิดทนต่อการแช่แข็งสำหรับเก็บเซลล์จุลินทรีย์ ขวดฝาเกลียวขนาดบรรจุ 250 และ 500 มิลลิลิตร ที่ทนความร้อนในการนึ่งฆ่าเชื้อ Centrifuge tubes ขนาดบรรจุ 50 และ 250 มิลลิลิตร Microcentrifuge tubes, Micropipette tips สารหลักที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ สารละลาย และส่วนผสมตัวกลางเพื่อเก็บรักษาการมีชีวิตของจุลินทรีย์ ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง (Tapioca starch, Native starch, Sanguan Wongse Industries Co., Ltd., Thailand) โปรตีนจากถั่วเหลือง (Food grade soy protein, Food EQ Co., Ltd, Thailand) ยีสต์แห้งที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (Spent brewer's yeast, บริษัท อาหารเสริม ในเครือ บริษัท เบียร์ไทย (1991)) รำข้าวสกัดน้ำมัน (Defatted rice bran) จากบริษัท นิวทริชั่น แอนด์ คอสเมติกส์ จำกัด ประเทศไทย Beef extract, Proteose peptone, Polypeptone, Tryptone, Yeast extract (Himedia Laboratories, India), Glucose (Carlo Erba Reagents, Italy), Skim milk (Merck, Merck KGaA, Germany) สารเคมีระดับคุณภาพวิเคราะห์ (Analytical grade) ได้แก่ Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$), Acetone, Ethanol และ Isopropyl alcohol (Merck, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Calsium chloride ($CaCl_2.2H_2O$), Magnesium chloride, Manganese sulphate monohydrate, Sodium chloride, Tri-ammonium citrate , Ferrous ammonium citrate, Potassium dihydrogen phosphate ($KH_2PO_4$), Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$) และ Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4$) (Carlo Erba Reagents), Magnesium sulphate monohydrate (Fluka BioChemika, Germany), Tween 80 (ACROS ORGANICS, U.S.A), Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA, Sigma®, Sigma Chemical Co., U.S.A.), 1,2-Dichloroethane, Glutaraldehyde, Lead citrate, Osmiumtetoxide, Nile blue A, Uranyl acetate และ PHV (Sigma, Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A.), Epon resin (Hexion Inc., Sigapore), α-Amylase (α-Amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*), Amyloglucosidase (Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich), Urea (AR grade, Carlo Erba Reagents)

## 2.2 วิธีการวิจัย

วิธีการวิจัยของโครงการ การผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพจากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะ ประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

### 2.2.1 การทดสอบการผลิตสารพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิด PHA โดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะจากการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังในระดับห้องปฏิบัติการ

ทดสอบศักยภาพในการผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิด PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผ่านการศึกษาและคัดเลือกจากโครงการวิจัยที่ผู้วิจัยได้ดำเนินการแล้วจำนวน 10 ไอโซเลท (สายพันธุ์) ที่เก็บรักษาในลักษณะเชื้อแห้งและแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงให้ได้ระยะการเจริญของเซลล์ที่เป็น Vegetative cells ที่ว่องไวโดยใช้อาหาร Trypticase soy broth (TSB, ภาคผนวก ค3) และ Trypticase soy agar (TSA, ภาคผนวก ค4) ในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตามความจำเป็นของแต่ละสายพันธุ์ (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2551) ตรวจสอบสภาพของเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ด้วยวิธี Streak plate และการติดสีย้อมเซลล์แบบแกรม (Cappuccino and Sherman, 2005; ภาคผนวก ก1 และ ก3; ภาคผนวก ข1 และ ข6) จากนั้นใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ในการศึกษาในขั้นการทดสอบศักยภาพในการผลิต PHA ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังทั้งที่เตรียมโดยผ่านและไม่ผ่านการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนการเตรียมอาหาร พร้อมตรวจสอบลักษณะปรากฏของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ในเบื้องต้นเพื่อเลือกให้ได้แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ที่จะนำมาศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังในระดับห้องปฏิบัติการ ในขั้นตอนนี้มีการเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทในอาหารสมบูรณ์ (Complex medium, ภาคผนวก ค1) ที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผลิตเป็นการค้าเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งที่เตรียมโดยผ่านและไม่ผ่านการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการเจริญและ Minimal medium (ภาคผนวก ค2) สำหรับการสะสมสารพอลิเมอร์ ที่มีส่วนประกอบดัดแปลงจาก Kunioka *et al.* (1989), Luengo *et al.* (2003), Atlas (2004) และ Pederson *et al.* (2006) ใช้ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้เซลล์ และสารสะสมภายในเซลล์ที่มีปริมาณเพียงพอต่อการสกัดและตรวจสอบลักษณะปรากฏของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ในเบื้องต้นภายหลังการสกัด ที่มีขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อดังนี้

1) การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียที่คัดเลือกในสภาวะมีออกซิเจนอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใน Complex medium broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ $10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2) การเลี้ยงเชื้อ

2.1) เตรียมอาหาร Complex medium broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อที่เตรียมตามข้างต้นปริมาณ (Inoculum size) 2% โดยปริมาตร เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน บนเครื่อง

เขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2) ปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้ง เติม Minimal medium broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

มีการวิเคราะห์ในช่วงที่มีการเลี้ยงเชื้อดังนี้

ก. การเจริญของแบคทีเรีย

ตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเหลวทั้ง Complex medium และ Minimal medium ตามวิธีมาตรฐาน (Standard plate count) ทางจุลชีววิทยา ด้วยวิธี Spread plate ด้วยอาหาร TSA (ภาคผนวก ค4) จากที่ได้เจือจางตัวอย่างที่ต้องการตรวจนับแบบ Serial dilution ด้วยสารละลายเกลือ (0.85% Sodium chloride) ปลอดเชื้อ (ภาคผนวก ข9) บ่มให้แบคทีเรียเจริญในสภาวะมีออกซิเจน ที่อุณหภูมิเหมาะสมที่ใช้เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี (CFU ต่อมิลลิลิตร) ของแบคทีเรียที่พบ

ข. ปริมาณของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเหลวก่อนและหลังการเลี้ยงแบคทีเรีย

หาปริมาณของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเหลวก่อนและหลังการเลี้ยงแบคทีเรีย โดยตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugars) ด้วย Dinitrosalicylic acid reagent (Miller, 1959) หรือในรูปปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugars) ด้วย Colorimetric (phenol-sulphuric acid) method (Dubois *et al*., 1956)

ค. การตรวจสอบ PHA ที่สะสมในเซลล์แบคทีเรีย

ตรวจสอบ PHA ที่สะสมในเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ตาม Sudesh *et al*. (2000) ที่มีการดัดแปลงในบางขั้นตอน (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2551) โดยเตรียมรอย smear เชื้อที่ได้จากโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Minimal medium บนแผ่นสไลด์ หยดสารละลาย Nile blue A (1%, ภาคผนวก ก2) ลงบนรอย smear ทิ้งไว้ 10 นาที ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ ตรวจดูการติดสีของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร บันทึกผลจากที่มี Granules ติดสีส้มเหลืองภายในเซลล์ (Ostle and Holt, 1982)

ง. การทดลองสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรีย

เพื่อศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHA ที่ผลิตได้เพื่อช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรีย โดยทดลองสกัดสาร PHA โดยใช้สารเคมีตามกรรมวิธีที่ดัดแปลงขึ้นจากงานวิจัยที่มีอยู่ก่อนแล้ว (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2551) ขั้นตอนการสกัดสารที่ทดลองเป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Vanlautem and Gilain (1982) และขั้นตอนการแยกตะกอนผลึก PHA ออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Noda (1998) โดยแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทอาหารส่วนใสทิ้ง อาจมีการบันทึกน้ำหนักเปียกของเซลล์

ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายเกลือเจือจาง (0.85% Sodium chloride) ปลอดเชื้อ (ภาคผนวก ข9) นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธีการ Freeze drying ชั่งน้ำหนักของเซลล์แห้ง ล้างตะกอนเซลล์แห้งด้วย Methanol 200 มิลลิลิตร โดยเท Methanol ผ่านเซลล์แห้งบนกระดาษกรอง เพื่อล้างไขมันออก นำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหย Methanol ออก ผสมตะกอนเซลล์แห้งกับสารสกัด 1,2-Dichloroethane ในอัตราส่วน 1 กรัม ต่อ 20 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ที่มีฝาปิด นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองสารสกัดขณะร้อนผ่านสำลี และนำสารสกัดที่ได้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนสารละลายเกิดเป็นตะกอนลักษณะคล้ายเจล นำสารละลายสกัดไประเหยแยกตัวทำละลายอินทรีย์ 1,2-Dichloroethane ออกจากผลึก PHA โดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 300 mbar หากสามารถสกัดแยก PHA ได้ มีขั้นตอนทดสอบเตรียม Compression-molded film ที่ใช้อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส (ได้รับความอนุเคราะห์ดูแลผู้ช่วยวิจัยในการเตรียมตัวอย่างจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิมา ดีประเสริฐกุล สาขาวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี) เปรียบเทียบกับ PHA ชนิด PHV จากการค้า (Sigma)

**2.2.2 การศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลัง โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก**

ศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังทั้งที่เตรียมโดยผ่านและไม่ผ่านการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก 2 สายพันธุ์ จากข้อ (2.2.1) ทดลองเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100-1,000 มิลลิลิตร บ่มให้เชื้อเจริญที่สภาวะที่ระบุตามข้อมูลพื้นฐานของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ตรวจวัดการเจริญของเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้โดยหาน้ำหนักต่อปริมาตร เปรียบเทียบกับการวัดการเจริญโดยนับจำนวนเซลล์ตามวิธีมาตรฐาน (Standard plate count) ทางจุลชีววิทยา ด้วย Spread plate technique (ข้อ 2.2.1ก) และตรวจสอบปริมาณ PHA ที่สะสมภายในเซลล์ (ข้อ 2.2.1ค) โดยดำเนินการศึกษาตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

**2.2.2.1 การศึกษาปัจจัยด้านสารอาหาร**

ศึกษาปัจจัยด้านสารอาหารเพื่อการเจริญและการผลิต PHA ดังนี้

**ก. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน**

ทดลองเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแป้งมันสำปะหลังซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งที่เตรียมโดยผ่านและไม่ผ่านการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ จากสูตรอาหารเริ่มต้นตามที่ใช้ในข้อ (2.2.1)

**ข. ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน**

ทดลองเพื่อหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนโดยใช้สูตร

อาหารที่ได้จากการศึกษาในข้อ (2.2.2.1ก) แหล่งของไนโตรเจนที่สนใจ ได้แก่ โปรตีนจากถั่วเหลือง แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย เป็นต้น

**ค. Essential element และ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ**

ศึกษาความจำเป็นที่ต้องเติม Essential element และ/หรือ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นผลจากการศึกษาในข้อ (2.2.2.1ข)

**2.2.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHA**

ศึกษาผลอุณหภูมิต่อการผลิต PHA โดยเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (ข้อ 2.2.2.1) ที่ระดับอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต PHA เก็บตัวอย่างจากการเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ ต่อเนื่องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรียและหาปริมาณ PHA ที่สะสมภายในเซลล์

**2.2.2.3 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม**

ศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถเตรียมและใช้ประโยชน์ ทั้งแบคทีเรียกล้าเชื้อและสารในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างคุ้มค่าที่สุด ทดลองผลิต PHA จากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่พัฒนาได้ ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียเฉพาะสายพันธุ์ พิจารณาทดลองใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นโดยเฉลี่ย $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในช่วง 1-5% ตรวจวัดการเจริญ ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแป้งที่เหลือ และปริมาณ PHA ที่ผลิต เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

**2.2.2.4 การพัฒนารูปแบบของการเลี้ยงแบคทีเรีย**

ศึกษาวิธีการเลี้ยงแบคทีเรียแบบ Fed-batch process และพัฒนาให้ได้กระบวนการที่ปฏิบัติได้ง่ายและใช้เวลาสั้นในการผลิต PHA โดยใช้ข้อมูลความต้องการสารอาหารและปัจจัยทางกายภาพตามที่ได้ศึกษาแล้วมาช่วยวางแผนการพัฒนารูปแบบของการเลี้ยงแบคทีเรีย หาน้ำหนักเปียกของเซลล์ที่ผลิตได้จากการชั่งตะกอนเซลล์หลังการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และหาน้ำหนักแห้งตาม AOAC International (2000) โดยคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มมวลของเซลล์ (น้ำหนักเปียก) ได้ราว 80 กรัมต่อลิตร

**2.2.2.5 การทดลองเพิ่มขนาดการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ**

ทดลองเพิ่มขนาดการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ลิตร ที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสม ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม และตามรูปแบบที่ได้จากการศึกษาตามข้อ (2.2.2.1-2.2.2.4) ตรวจวัดการเจริญ ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือ และปริมาณ PHA ที่ผลิต ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ

**2.2.3 การศึกษาการสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่ศึกษาและตรวจสอบคุณลักษณะสำคัญของ PHA ที่ได้ เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งาน**

ทดสอบสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ศึกษา ตามกรรมวิธีที่ใช้ความรู้จากงานวิจัยที่ได้ดำเนินการก่อนโครงการนี้แล้ว และดัดแปลงเพื่อให้มีความเหมาะสมกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ศึกษา ตรวจสอบลักษณะปรากฏของพอลิเมอร์ PHA ที่ผลิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านความเหนียว ยืดหยุ่น แข็ง หรือเปราะ และศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHA ที่เลือกจากผลิตได้เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งานโดยตรวจสอบชนิดของ PHA ตาม Kim *et al.* (1996) และ Khanna and Srivastava (2005) ขั้นตอนนี้ได้รับความอนุเคราะห์ดูแลผู้ช่วยวิจัยในการเตรียมตัวอย่างจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิมา ดีประเสริฐกุล สาขาวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ดังนี้

ก. การตรวจสอบโครงสร้างเคมีเบื้องต้นของพอลิเมอร์

ตรวจสอบโครงสร้างเคมีเบื้องต้นของพอลิเมอร์ด้วย Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy โดยละลายพอลิเมอร์ใน Deuterated chloroform ($CDCl_3$) วัดที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่อง $^{1}H$ NMR Spectrometer (NMR SPECTROMETER INOVA, VARIAN, 300 MHz) และ $^{13}C$ NMR Spectrometer (VARIAN, 75 MHz) โดยใช้ Tetramethylsilane (TMS) เป็นสารมาตรฐานภายใน

ข. การตรวจสอบสมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์

ตรวจสอบสมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) ศึกษาด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (Diamond, PerkinElmer, U.S.A.) โดยบรรจุพอลิเมอร์ปริมาณ 1-5 มิลลิกรัม ลงใน Aluminum pan ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ให้ความร้อนจาก -20 ถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (first run) ทำให้เย็นลงถึง -20 องศาเซลเซียสด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นให้ความร้อนจาก -20 ถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (second run) อ่านค่าอุณหภูมิหลอม (Melting temperature, $T_m$) หรืออุณหภูมิการเกิดผลึก (Crystallization temperature, $T_c$) ที่ตำแหน่งยอดของ Peak

การตรวจสอบสมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์ศึกษายังทดลองใช้ Thermogravimetric Analysis (TGA) ด้วยเครื่อง Thermogravimetric Analyzer (TA Instrument, U.S.A.) โดยบรรจุพอลิเมอร์ ปริมาณ 5-15 มิลลิกรัม ลงใน Aluminum pan ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ให้ความร้อนจากอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (first run) ทำให้เย็นลงด้วยอากาศ จากนั้นให้ความร้อนจาก 30 องศาเซลเซียส ถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (Second run) บันทึกน้ำหนักของสารที่สูญเสีย (Weight loss)

ค. การตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลและการกระจายตัวของพอลิเมอร์ด้วยเทคนิค Gel Permeation Chromatography (GPC)

ละลายพอลิเมอร์ปริมาณ 0.25 กรัม ใน Chloroform ($CHCl_3$) 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นประมาณ 0.5%) ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GPC (Waters Corporation, Milford, MA 01757, U.S.A.) ผ่าน Stila gel column 2 คอลัมน์ โดยใช้ Chloroform เป็นสารตัวชะ วัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บันทึกการอ่านค่าโดยใช้เครื่องตรวจวัดค่าดัชนีหักเห สร้าง Calibration curve ด้วยพอลิสไตรีนมาตรฐาน (ช่วงน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $1.3\times10^3$-$1.96\times10^6$ กรัมต่อโมล)

**2.2.4 การสรุปผลการวิจัย**

สรุปผลการศึกษาและวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บทที่ 3
# ผลและอภิปรายผลการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการวิจัย เพื่อผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates, PHA) ในระดับห้องปฏิบัติการโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่คัดเลือกจากผลการศึกษาที่ใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนหลักเลี้ยงแบคทีเรีย มีการพัฒนากระบวนการผลิตและการสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียที่ศึกษา พร้อมตรวจสอบคุณลักษณะสำคัญของพอลิเมอร์ PHA ที่ได้ เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งาน ได้ผลดังนี้

## 3.1 การทดสอบการผลิตสารพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิด PHA โดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะจากการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังในระดับห้องปฏิบัติการ

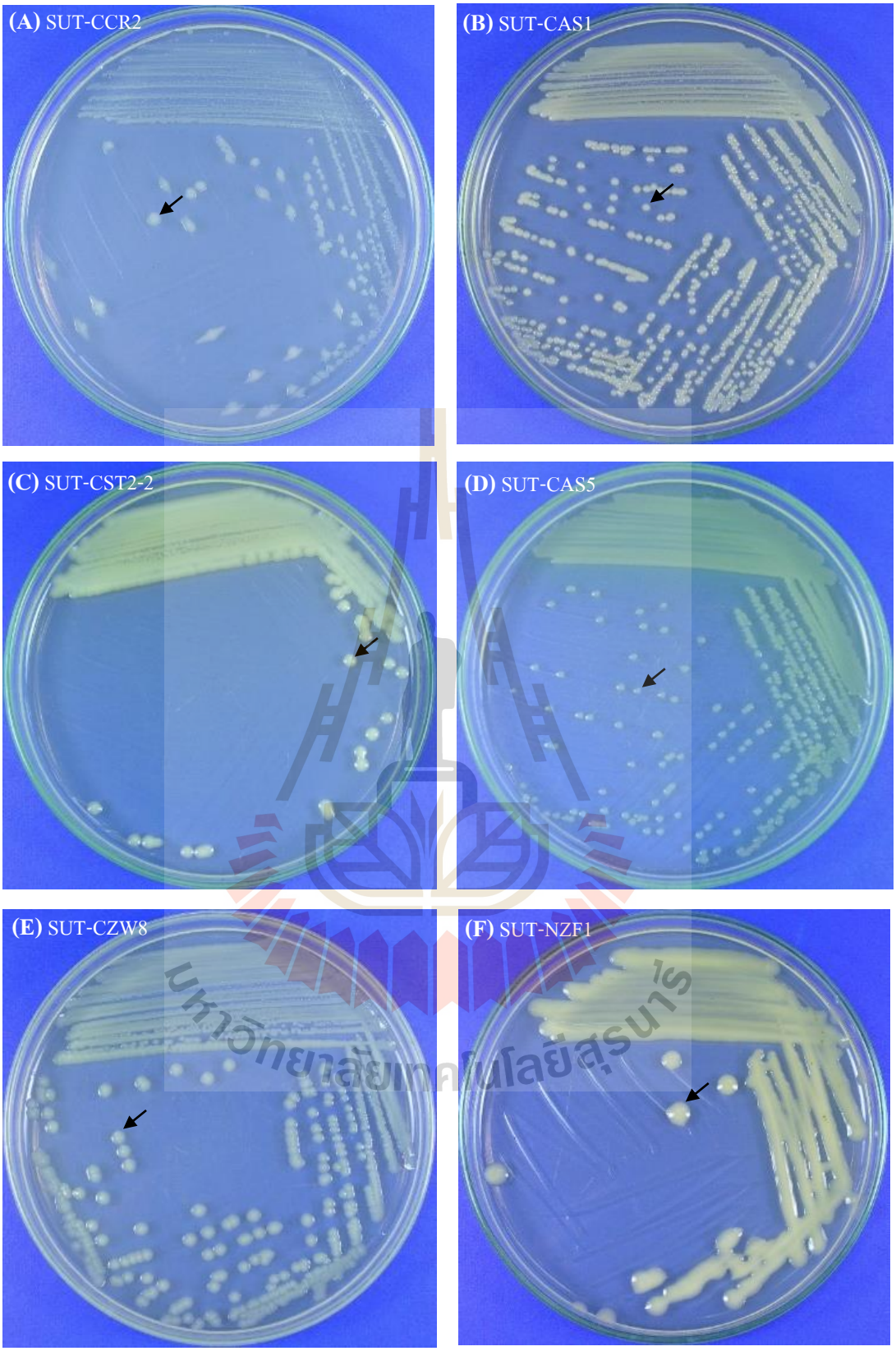
ทดสอบศักยภาพในการผลิตสารพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิด PHA ของแบคทีเรียเพื่อการคัดเลือกเชื้อด้วยการผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังทั้งที่เตรียมโดยผ่านและไม่ผ่านการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ ได้เลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผ่านการศึกษาจากโครงการวิจัยที่ผู้วิจัยได้ดำเนินการแล้ว (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2551) จำนวน 12 ไอโซเลท (สายพันธุ์) (ตารางที่ 3.1 และ รูปที่ 3.1) จากที่วางแผนไว้จำนวน 10 ไอโซเลท (สายพันธุ์) เพื่อตรวจสอบลักษณะปรากฏของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ในเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ที่นำไปศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังในระดับห้องปฏิบัติการ อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตสาร PHA ในขั้นตอนนี้มีทั้งอาหารสมบูรณ์ (Complex medium) สำหรับการเจริญ และ Minimal medium สำหรับการสะสมสารพอลิเมอร์ ซึ่ง Complex medium ที่ใช้มีแป้งมันสำปะหลังที่ผลิตจากหัวมันชนิด Native starch เป็นแหล่งคาร์บอนทั้งที่เตรียมโดยผ่านและไม่ผ่านการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อกรณีการย่อยด้วยเอนไซม์ได้เตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักแห้ง ลดความหนืดและย่อยด้วยเอนไซม์ตามข้อแนะนำของผู้ผลิตเอนไซม์ตามลำดับดังนี้ การย่อยแป้งลำดับแรกด้วย α-Amylase (α-Amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*, Sigma-Aldrich) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และย่อยต่อด้วย Amyloglucosidase (Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (จากช่วงเวลาที่ทางโครงการที่ได้ทดลองย่อยแป้งเป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง) ได้ Reducing sugars ราว 80%

**ตารางที่ 3.1** แบคทีเรีย 12 ไอโซเลท (สายพันธุ์) ที่เลือกจากงานวิจัยพื้นฐาน (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2551) เพื่อเริ่มศึกษาความสามารถในการสร้างพอลิเมอร์ PHA

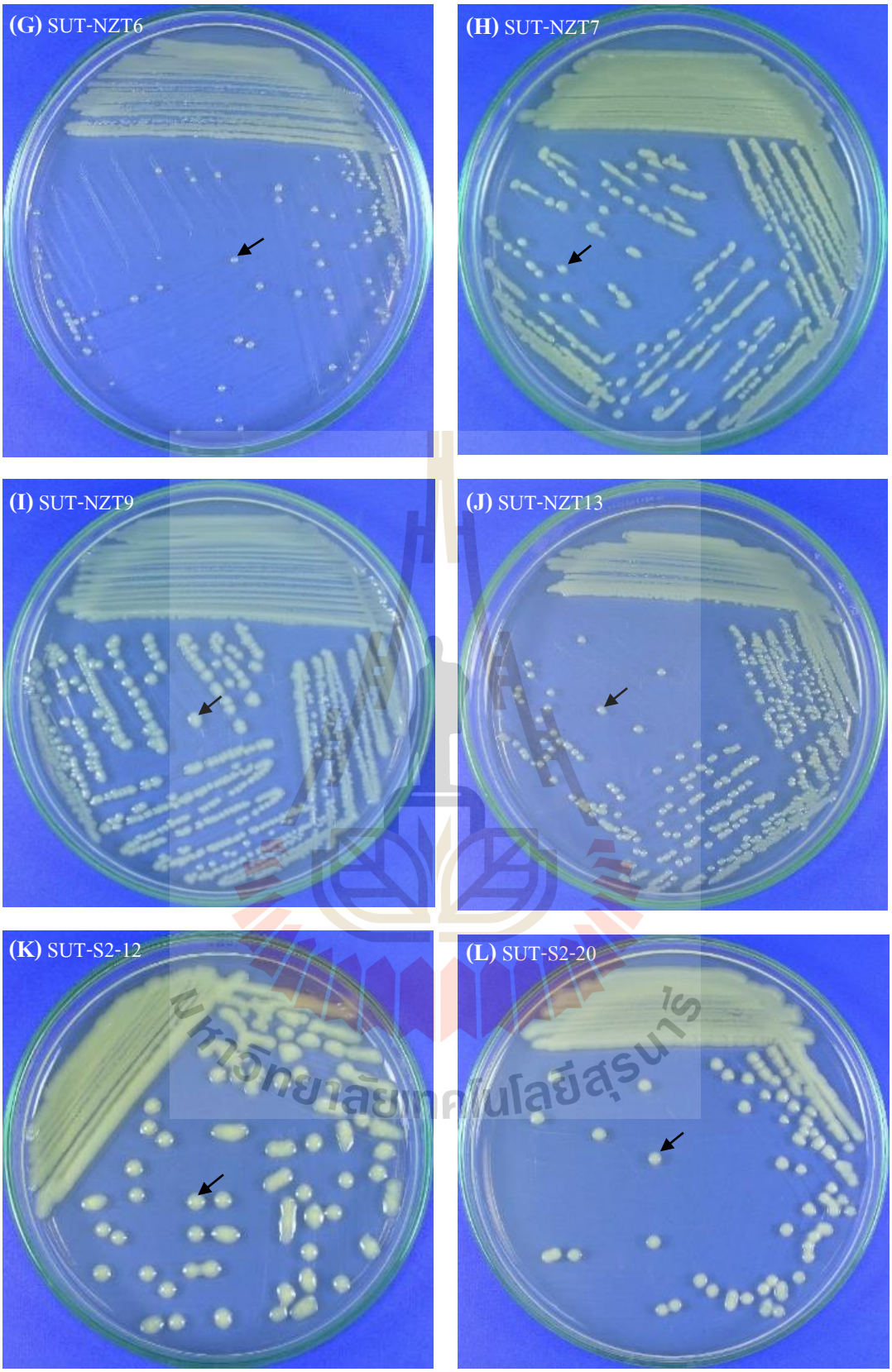
| **Bacterial group/ isolate code** | **Bacterial species**[1] |
|---|---|
| **Gram-positive rods:** | |
| SUT-CCR2 | *Bacillus subtilis* |
| SUT-CST2-2 | *Bacillus megaterium* |
| SUT-S2-20 | *Bacillus megaterium* |
| **Gram-positive cocci:** | |
| SUT-CAS1 | *Micrococcus* sp. |
| SUT-CAS5 | *Staphylococcus lentus* |
| **Gram-negative rods:** | |
| SUT-CZW8 | *Escherichia coli* |
| SUT-NZF1 | *Enterobacter* sp. |
| SUT-NZT6 | *Chryseobacterium* sp. |
| SUT-NZT7 | *Proteus* sp. |
| SUT-NZT9 | *Chryseobacterium* sp. |
| SUT-NZT13 | *Aeromonas* sp. |
| SUT-S2-12 | *Enterobacter* sp. |

หมายเหตุ: [1], แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในประเทศไทย ระบุชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




**รูปที่ 3.1** ลักษณะโคโลนี (ลูกศร) ของแบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลท (สายพันธุ์) (A-L) เจริญบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่เลือกมาทดสอบความสามารถในการสร้างพอลิเมอร์ชนิด PHA




**รูปที่ 3.1** (ต่อ) ลักษณะโคโลนี (ลูกศร) ของแบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลท (สายพันธุ์) (A-L) เจริญบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่เลือกมาทดสอบความสามารถในการสร้างพอลิเมอร์ชนิด PHA

ผลการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1) ให้เจริญในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.2) ที่เติมแป้งมันสำหลังเปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย (Hydrolyzed cassava starch) ด้วยเอนไซม์ α-Amylase และ Glucoamylase ที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 2% โดยปริมาตร (ที่มีความเข้มข้นเซลล์ ~$10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์ออกจาก Complex medium ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารใหม่ชนิด Minimal medium (ตารางที่ 3.3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะเดิมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเลือกได้แบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์เป็นท่อน (Gram-positive rods) สายพันธุ์ *Bacillus subtilis* SUT-CCR2 และ *Bacillus megaterium* SUT-CST2-2 และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเซลล์เป็นท่อน (Gram-negative rods) สายพันธุ์ *Chryseobacterium* sp. SUT-NZT6 และ *Chryseobacterium* sp. SUT-NZT9 เจริญได้ดีในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.2) ที่เตรียมโดยใช้แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch) 2% ทั้งที่ไม่ผ่านและผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (Hydrolyzed cassava starch) ได้น้ำหนักเซลล์เปียกโดยเฉลี่ย 10-13 กรัมต่อลิตร เท่ากับน้ำหนักเซลล์แห้งโดยเฉลี่ย 2.36-2.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีแนวโน้มให้ปริมาณเซลล์สูงกว่าอีก 8 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.4) และสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์ (รูปที่ 3.2) พร้อมทั้งได้ตรวจสอบเซลล์และการสะสมพอลิเมอร์ในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) และแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM) ด้วยวิธีการตาม Bozzola and Russell (1992) โดยนำเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงใน Minimal medium มาตรึงด้วย Fixative solution 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 5% Glutaraldehyde, 1% Osmiumtetoxide และ 0.2M Phosphate buffer อัตราส่วน 1:1:1 (ภาคผนวก ข5, ข7 และ ข8) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffer (0.1M) 1 มิลลิลิตร 3 ครั้ง โดยปั่นแยกเซลล์ออกที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) และเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย SEM และ TEM ด้วยวิธีการตาม Bozzola and Russell (1992) พบรูปร่างเซลล์ที่มีการสะสมพอลิเมอร์แตกต่างกัน (รูปที่ 3.3 และ 3.4)

**ตารางที่ 3.2** ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium (สูตรดัดแปลงของโครงการ)

| **Composition** | **Concetration** (g/L) |
|---|---|
| Tryptone | 5.00 |
| Polypeptone | 5.00 |
| Yeast extract | 5.00 |
| Sodium chloride | 2.50 |
| Cassava starch หรือ Hydrolyzed cassava starch | 20.00 (Dry weight) |

pH 7.00±0.20 ที่ 25 องศาเซลเซียส

**ตารางที่ 3.3** ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium (สูตรดัดแปลงของโครงการ)

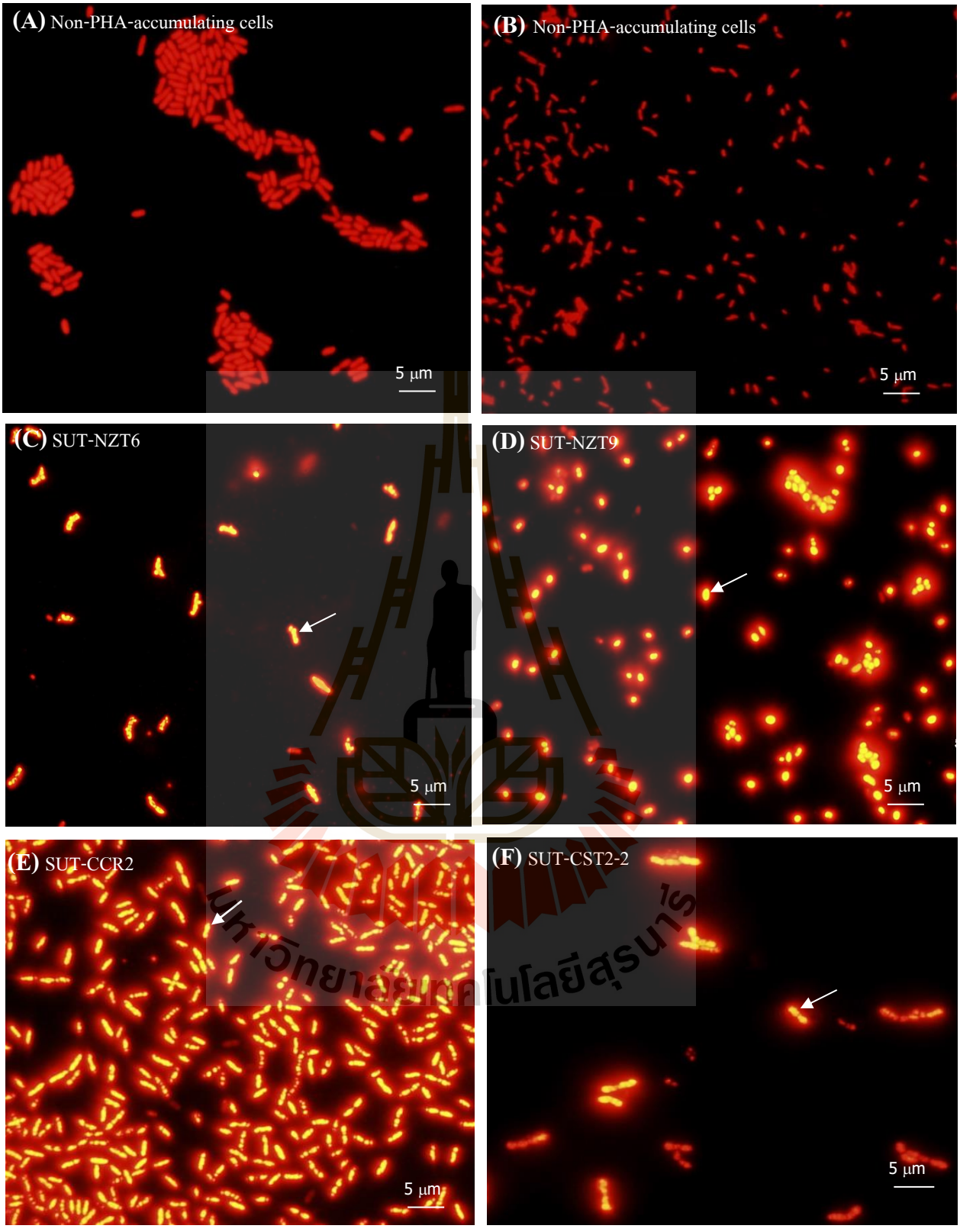
| **Composition** | **Concetration** (g/L) |
|---|---|
| Glucose | 10.00 |
| $(NH_4)_2\ SO_4$ | 1.00 |
| $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ | 0.01 |
| Ferrous ammonium citrate | 0.05 |
| $KH_2PO_4$ | 1.00 |
| $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ | 0.20 |
| $Na_2HPO_4$ | 3.00 |
| Trace element solution<br>ประกอบด้วย $H_3BO_3$, $CoCl_2{\cdot}6H_2O$, $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$, $MnCl_2{\cdot}4H_2O$, $Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$, $NiCl_2{\cdot}6H_2O$ และ $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ เข้มข้น 0.3, 0.2, 0.1, 0.03, 0.03, 0.02 และ 0.01 g/L ตามลำดับ | 1.00 mL |

pH 7.00±0.20 ที่ 25 องศาเซลเซียส

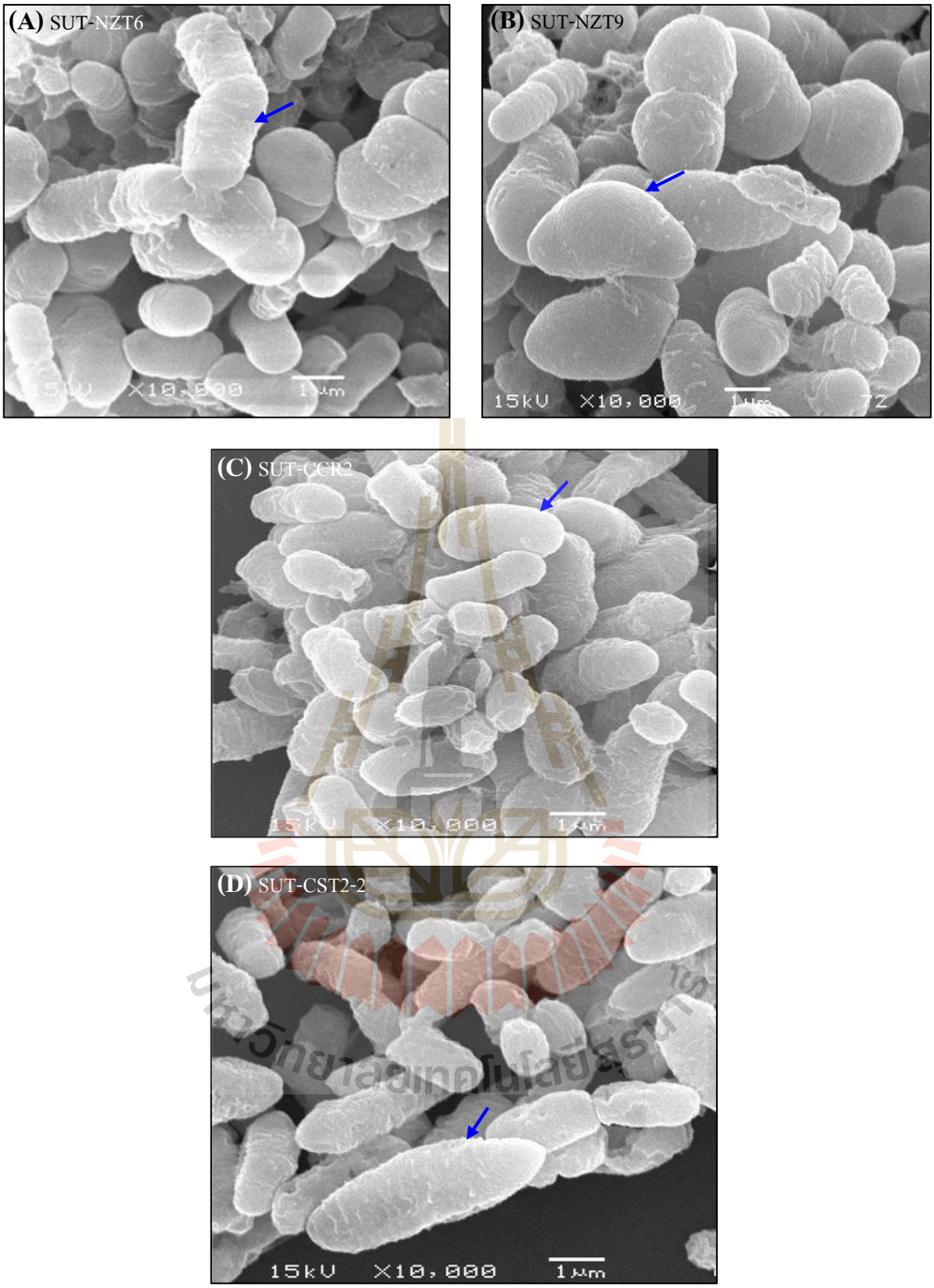
**ตารางที่ 3.4** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท ในอาหารเหลว Complex medium (ตารางที่ 3.2) ที่มีแป้งมันสำปะหลังไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์สำหรับกลุ่ม Gram-positive rods และแป้งมันสำปะหลังผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์สำหรับกลุ่ม Gram-positive cocci และ Gram-negative rods ด้วยปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial group/ isolate code** | **Cells at 0 h** (CFU/mL) | **Complex medium at 24 h** | | | **Minimal medium at 48 h** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) |
| **Gram-positive rods**: | | | | | | | |
| SUT-CCR2 | $1.80\times10^{6}$ | $2.10\times10^{10}$ | 13.00 | 2.09 | $2.40\times10^{10}$ | 13.20 | 2.14 |
| SUT-CST2-2 | $1.90\times10^{6}$ | $2.10\times10^{10}$ | 13.27 | 2.14 | $1.10\times10^{10}$ | 14.87 | 2.37 |
| SUT-S2-20 | $1.90\times10^{6}$ | $9.00\times10^{6}$ | 10.47 | 1.79 | $7.00\times10^{5}$ | 10.60 | 1.82 |
| **Gram-positive cocci**: | | | | | | | |
| SUT-CAS1 | $2.70\times10^{6}$ | $1.06\times10^{10}$ | 12.60 | 2.07 | $1.26\times10^{10}$ | 10.27 | 1.81 |
| SUT-CAS5 | $8.50\times10^{6}$ | $6.30\times10^{9}$ | 11.87 | 2.06 | $6.94\times10^{9}$ | 11.27 | 1.95 |
| **Gram-negative rods**: | | | | | | | |
| SUT-CZW8 | $2.70\times10^{6}$ | $7.80\times10^{10}$ | 9.33 | 1.57 | $5.05\times10^{9}$ | 8.07 | 1.33 |
| SUT-NZF1 | $1.68\times10^{6}$ | $1.37\times10^{11}$ | 12.27 | 2.51 | $2.98\times10^{11}$ | 10.33 | 1.74 |
| SUT-NZT6 | $1.61\times10^{6}$ | $1.55\times10^{11}$ | 10.18 | 2.73 | $2.16\times10^{11}$ | 10.61 | 2.13 |
| SUT-NZT7 | $3.30\times10^{6}$ | $3.50\times10^{9}$ | 9.67 | 1.63 | $8.20\times10^{8}$ | 9.67 | 1.63 |
| SUT-NZT9 | $1.22\times10^{6}$ | $3.15\times10^{11}$ | 13.40 | 2.36 | $1.36\times10^{11}$ | 14.93 | 2.66 |
| SUT-NZT13 | $1.40\times10^{6}$ | $3.50\times10^{8}$ | 7.60 | 1.23 | $1.04\times10^{11}$ | 8.67 | 1.44 |
| SUT-S2-12 | $1.60\times10^{6}$ | $2.50\times10^{6}$ | 8.27 | 1.36 | $9.00\times10^{4}$ | 10.67 | 1.83 |

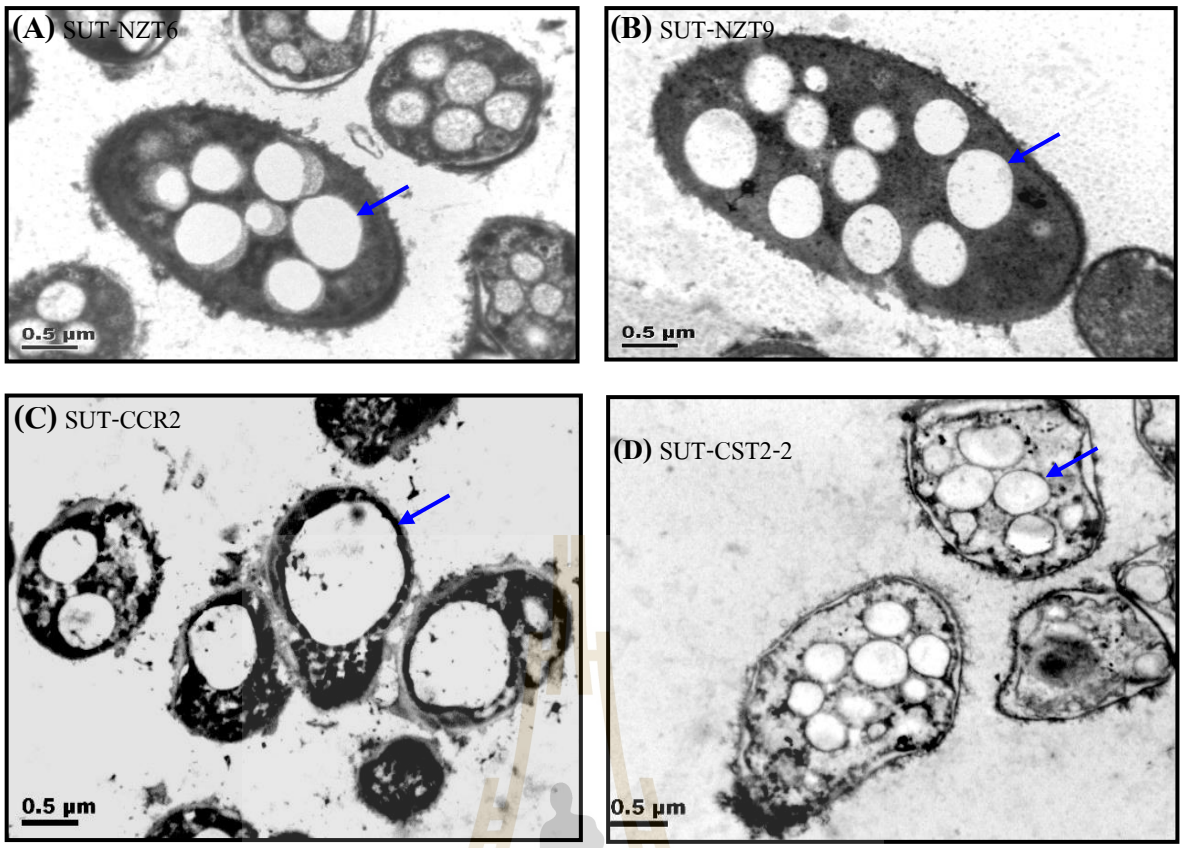
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




**รูปที่ 3.2** รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียที่ไม่มีการสะสม PHA (A และ B) และมีการสะสม PHA (C-F) PHA granules ภายในเซลล์เรืองแสงสีส้มเหลือง (ลูกศร) จากการย้อมด้วย Nile blue A (1%) และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope)




**รูปที่ 3.3** รูปร่างของเซลล์และ PHA granules (ลูกศร) ที่สะสมภายในเซลล์ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ที่คัดเลือก ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)




**รูปที่ 3.4** รูปร่างและ PHA granules (ลูกศร) ที่สะสมภายในเซลล์ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ที่คัดเลือกตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM)

จากนั้นได้ทดลองเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทที่คัดเลือก คือ SUT-CCR2, SUT-CST2-2, SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 เพื่อให้มีการเจริญและผลิต PHA ในอาหารเหลว Complex medium และ Minimal medium ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) แบบ Batch culture โดยมีการปรับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังใน Complex medium จาก 20 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.2) เป็น 30 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.5) ตามขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียที่คัดเลือกอายุประมาณ 18 ชั่วโมง ใน Complex medium (ตารางที่ 3.5) ตามความต้องการของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เตรียมความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียประมาณ $10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็นเชื้อเริ่มต้น (Innoculum) เพื่อเติมลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

2) การเลี้ยงเชื้อในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

2.1) เตรียมอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.5) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

**ตารางที่ 3.5** ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium สูตรดัดแปลงของโครงการ ที่เหมาะสมต่อสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ที่คัดเลือก

| Composition | Concetration (g/L) for bacterial isolates: | |
|---|---|---|
| | SUT-CCR2 & SUT-CST2-2 | SUT-NZT6 & SUT-NZT9 |
| Tryptone | 5.00 | 5.00 |
| Polypeptone | 5.00 | 5.00 |
| Yeast extract | 5.00 | 5.00 |
| Sodium chloride | 2.50 | 2.50 |
| Cassava starch (dry weight) | 30.00 | - |
| Hydrolyzed cassava starch from cassava starch (dry weight) | - | 30.00 |

pH 7.0±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

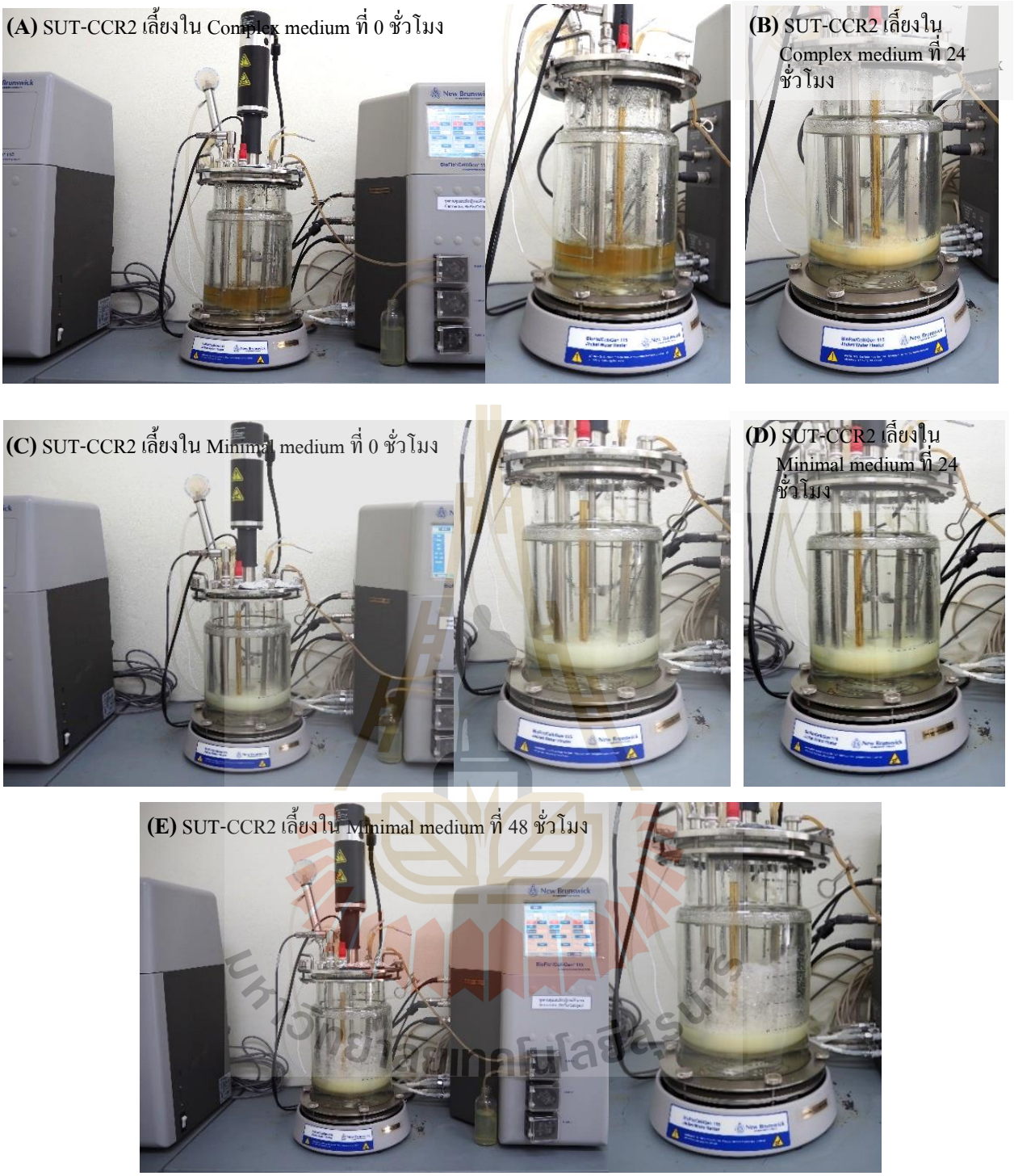
ขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมตามข้างต้นปริมาณ (Inoculum size) 2% โดยปริมาตร เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญในสภาวะมีออกซิเจนโดยให้อากาศ (Aeration) 0.5 ลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่า pH เท่ากับ 7.0 (ปรับ pH ด้วย 3N NaOH และ 3N HCl) กวนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2) ปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Minimal medium (ตารางที่ 3.3) บรรจุในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

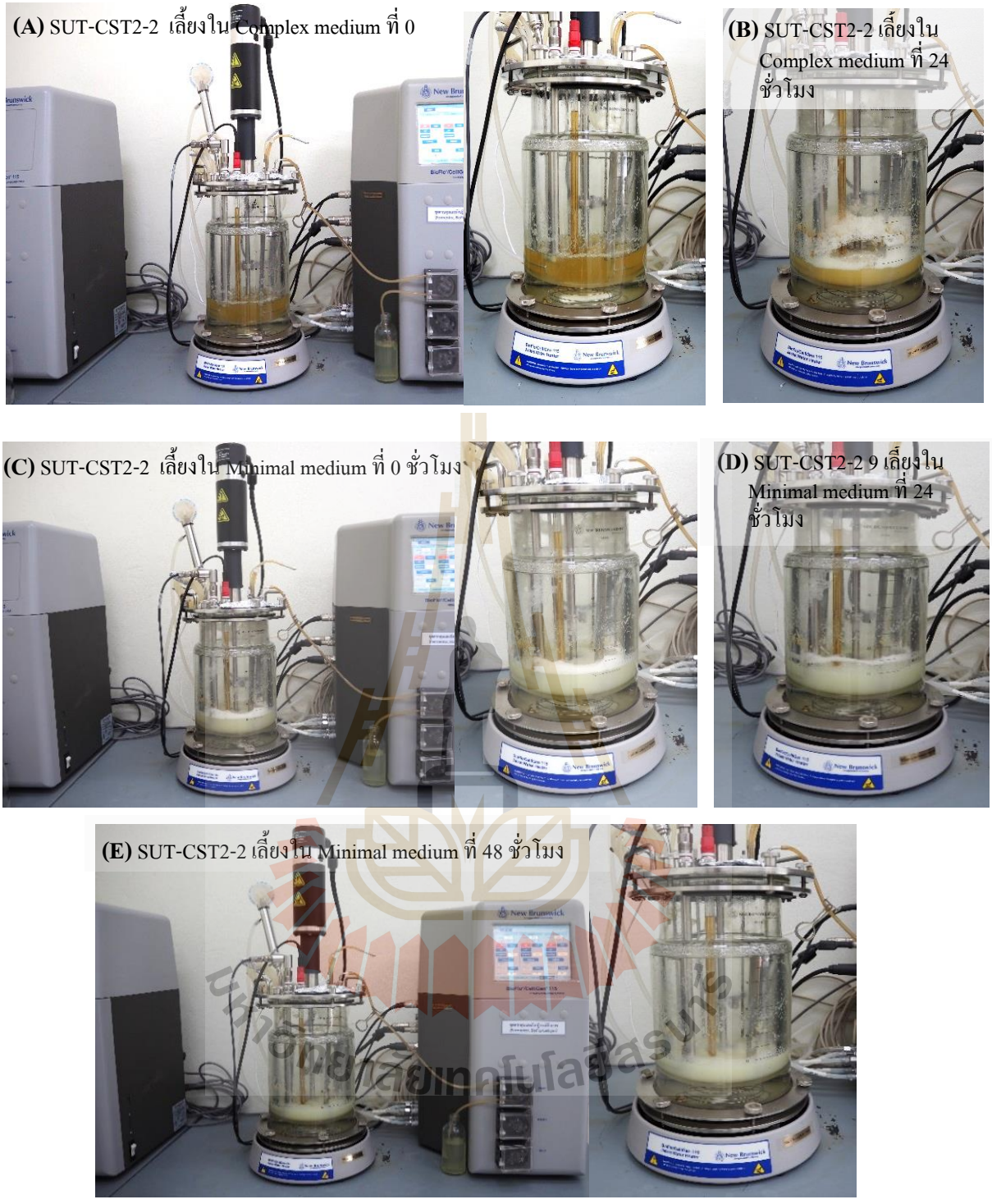
2.3) ปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายเกลือ (0.85% NaCl) ปลอดเชื้อ

2.4) นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัดสาร PHA ในขั้นตอนศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHA ต่อไป

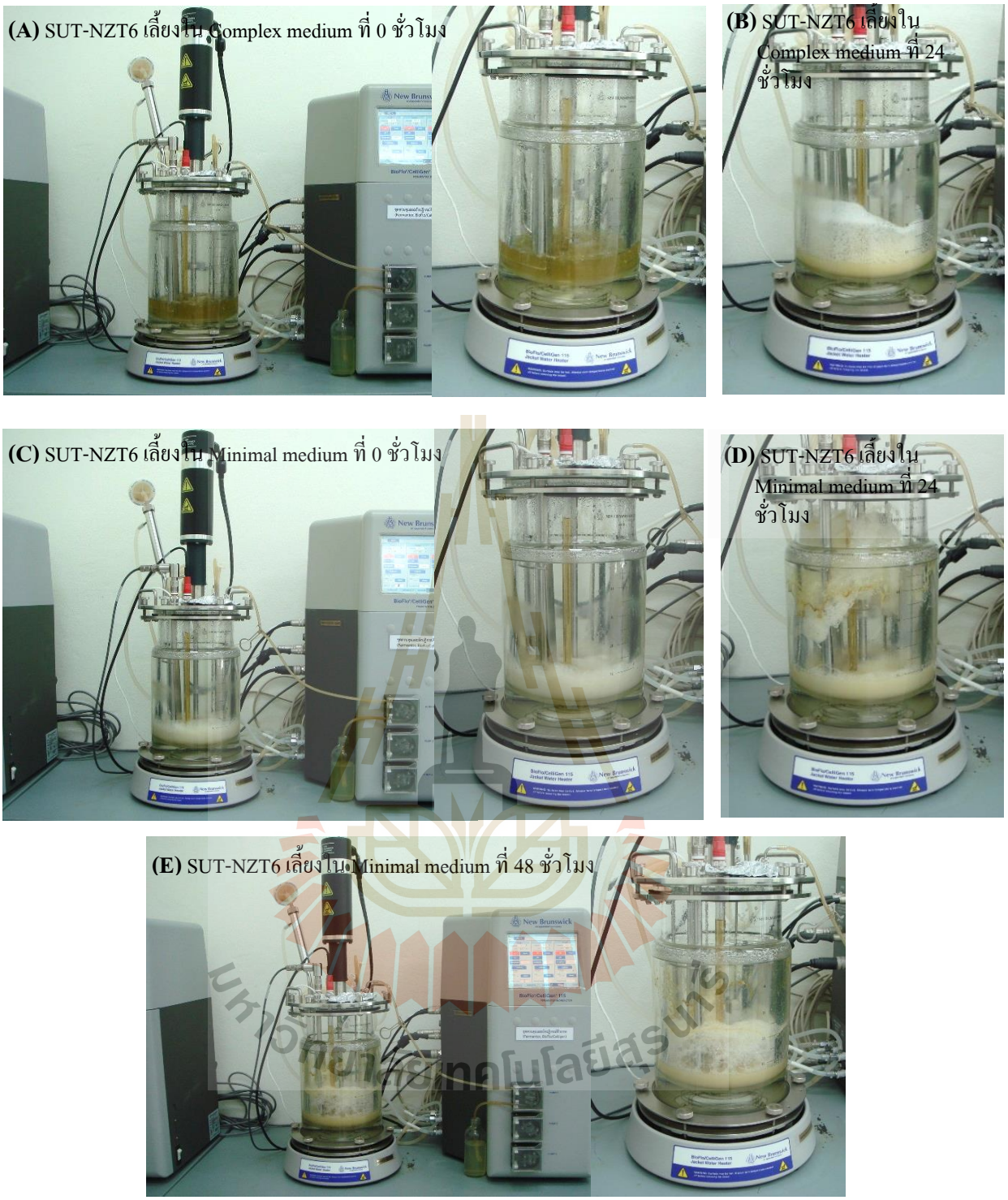
ผลการเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท (SUT-CCR2, SUT-CST2-2, SUT-NZT6 และ SUT-NZT9) ดังกล่าวข้างต้น พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลท เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เลี้ยง (รูปที่ 3.5-3.9 และตารางที่ 3.6) เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 48 ชั่วโมง ให้ปริมาณเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงช่วง $10^{13}$-$10^{14}$ CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ได้น้ำหนักเปียกของเซลล์ 31-39 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้งของเซลล์ 5-7 กรัมต่อลิตร) ในอาหาร Minimal medium (รูปที่ 3.9 และตารางที่ 3.6) นำตะกอนเซลล์ทั้งหมดที่ได้เตรียมเป็นตะกอนแห้งเพื่อสกัดและศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHA ที่ผลิตได้ เพื่อช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรีย



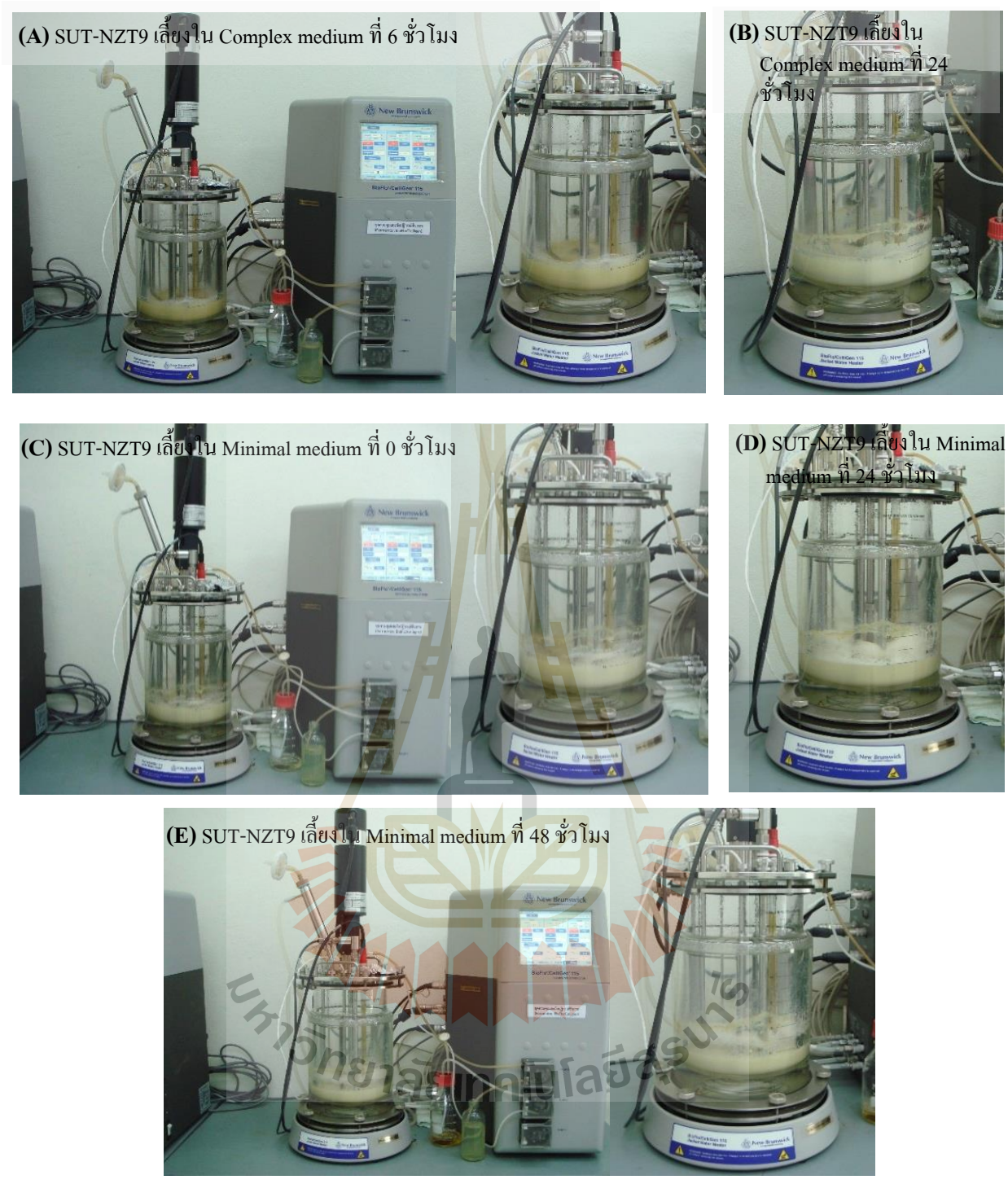

**รูปที่ 3.5** ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-CCR2 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.5) (A และ B) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 2% ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ (Aeration) 0.5 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.3) (C-E) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะเช่นเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง




**รูปที่ 3.6** ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ CST2-2 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.5) (A และ B) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 2% ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ (Aeration) 0.5 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.3) (D-G) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะเช่นเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง




**รูปที่ 3.7** ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.5) (A และ B) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 2% ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ (Aeration) 0.5 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.3) (C-E) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะเช่นเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง




**รูปที่ 3.8** ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT9 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.5) (A และ B) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 2% ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ (Aeration) 0.5 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.3) (C-E) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะเช่นเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.6 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-CCR2, SUT-CST2-2, SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium (ตารางที่ 3.5) ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 2% โดยปริมาตร (~$10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ (Aeration) 0.5 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.3) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

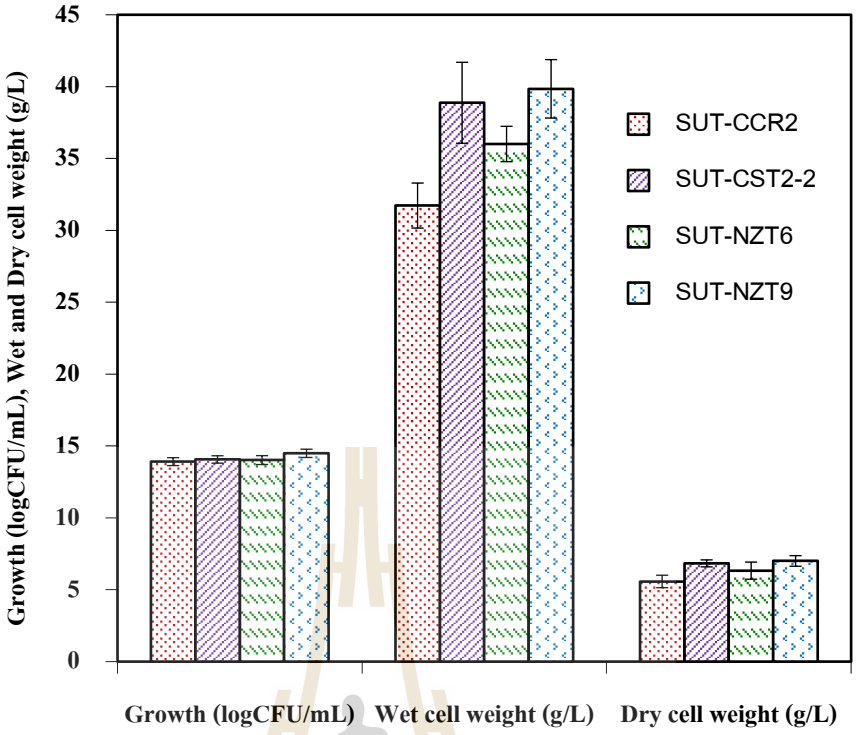
| **Bacterial isolate code/ Medium/ Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in cultured medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-CCR2:** | | | | | |
| **Complex medium:** | | | | | |
| 0 | $6.00\times10^{6}$ | 3.79 | 0.67 | 7.05 | 30.95 |
| 12 | $6.45\times10^{12}$ | 20.36 | 3.58 | 7.00 | 12.45 |
| 24 | $3.50\times10^{13}$ | 27.50 | 4.83 | 6.90 | 1.06 |
| **Minimal medium:** | | | | | |
| 0 | $1.55\times10^{13}$ | 26.95 | 4.74 | 6.89 | 10.64 |
| 24 | $3.55\times10^{13}$ | 29.45 | 5.18 | 7.00 | 3.55 |
| 48 | $8.20\times10^{13}$ | 31.73 | 5.58 | 7.00 | 0.94 |
| **SUT-CST2-2:** | | | | | |
| **Complex medium:** | | | | | |
| 0 | $4.07\times10^{6}$ | 3.10 | 0.54 | 7.05 | 30.70 |
| 12 | $6.60\times10^{12}$ | 19.82 | 3.48 | 7.00 | 11.97 |
| 24 | $3.65\times10^{13}$ | 32.60 | 5.73 | 7.12 | 1.56 |
| **Minimal medium:** | | | | | |
| 0 | $3.50\times10^{13}$ | 31.06 | 5.46 | 6.90 | 10.55 |
| 24 | $2.05\times10^{13}$ | 36.25 | 6.37 | 7.00 | 12.46 |
| 48 | $1.16\times10^{14}$ | 38.88 | 6.83 | 7.00 | 0.85 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.6** (ต่อ) ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-CCR2, SUT-CST2-2, SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium (ตารางที่ 3.5) ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 2% โดยปริมาตร (~$10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ (Aeration) 0.5 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.3) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/ Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in cultured medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6:** | | | | | |
| **Complex medium:** | | | | | |
| 0 | $7.79\times10^{6}$ | 3.45 | 0.61 | 7.10 | 31.05 |
| 12 | $3.65\times10^{12}$ | 21.20 | 3.73 | 7.00 | 12.25 |
| 24 | $4.45\times10^{13}$ | 32.76 | 5.76 | 7.00 | 1.04 |
| **Minimal medium:** | | | | | |
| 0 | $3.95\times10^{13}$ | 31.60 | 5.56 | 6.90 | 10.27 |
| 24 | $7.73\times10^{14}$ | 34.15 | 6.08 | 7.00 | 4.20 |
| 48 | $1.05\times10^{14}$ | 36.01 | 6.33 | 7.00 | 0.91 |
| **SUT-NZT9:** | | | | | |
| **Complex medium:** | | | | | |
| 0 | $1.46\times10^{6}$ | 3.65 | 0.64 | 7.10 | 30.94 |
| 12 | $7.39\times10^{14}$ | 20.27 | 3.81 | 6.95 | 15.56 |
| 24 | $3.02\times10^{15}$ | 35.62 | 6.26 | 7.00 | 1.21 |
| **Minimal medium:** | | | | | |
| 0 | $2.67\times10^{15}$ | 34.10 | 5.99 | 6.90 | 10.25 |
| 24 | $3.20\times10^{15}$ | 37.05 | 6.51 | 7.00 | 3.76 |
| 48 | $3.10\times10^{14}$ | 39.85 | 7.03 | 7.15 | 0.43 |

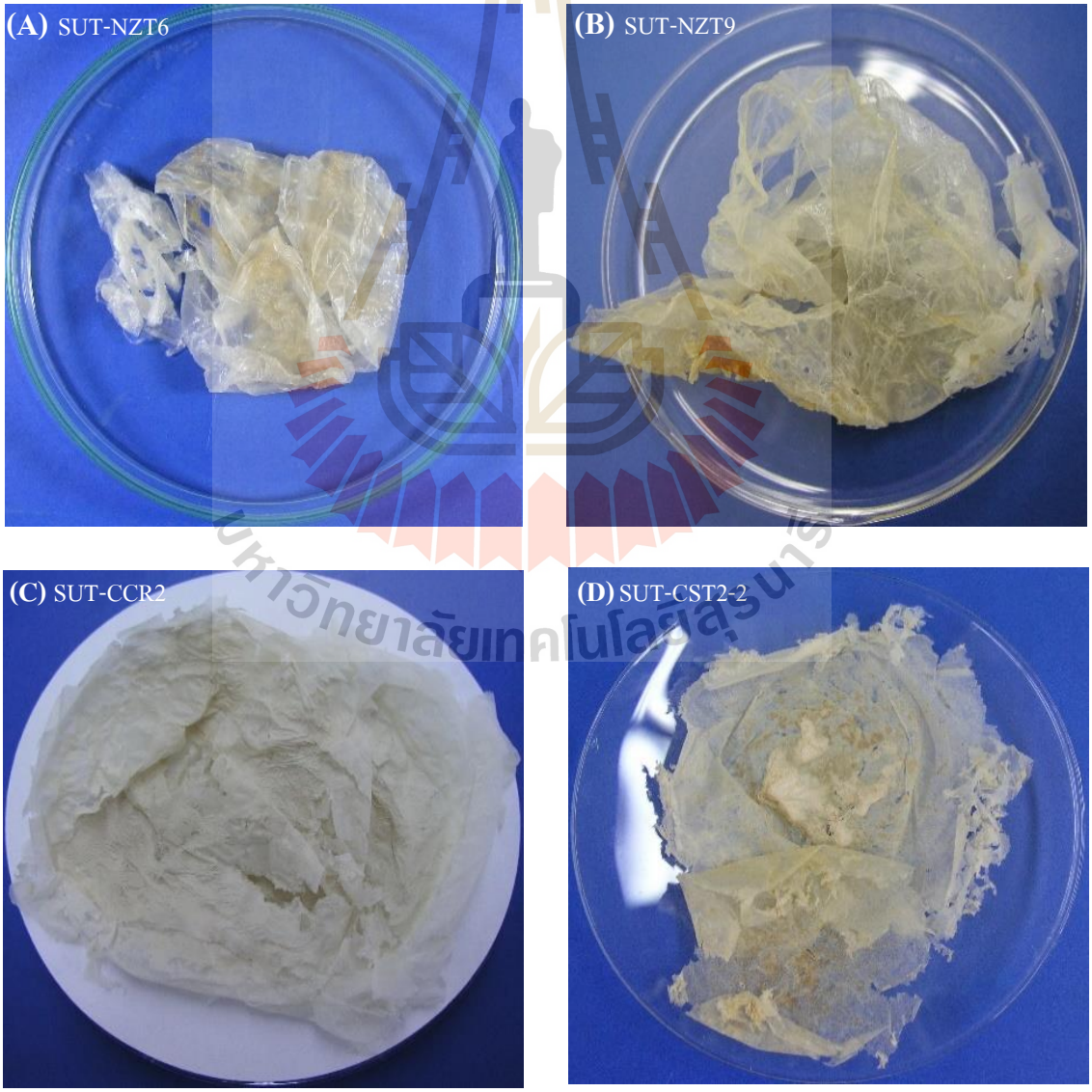
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



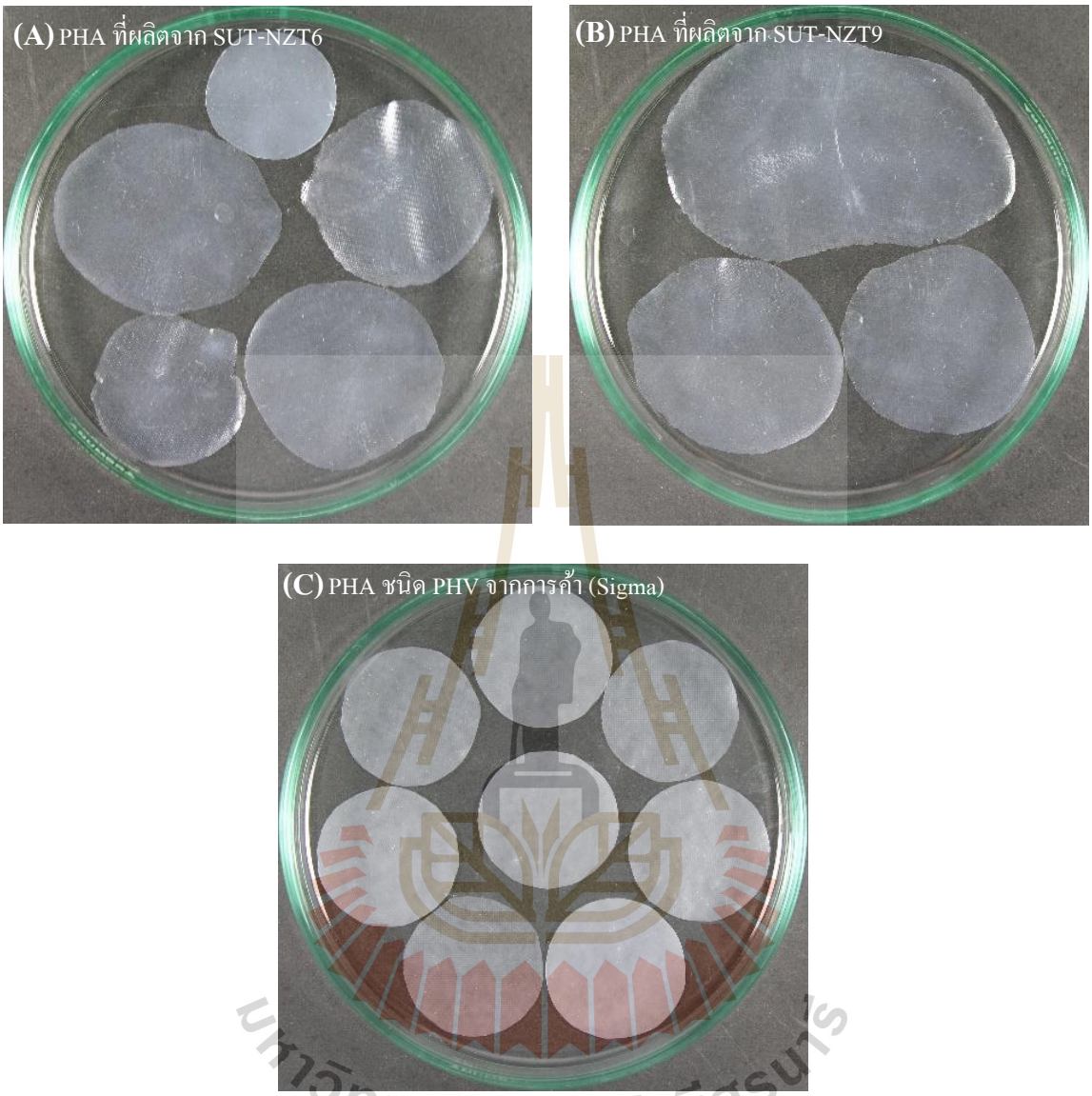

**รูปที่ 3.9** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-CCR2, SUT-CST2-2, SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 จากอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.3) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ (Aeration) 0.5 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากเลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.5) ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2% โดยปริมาตร (ที่มีความเข้มข้นเซลล์ ~$10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันกับข้างต้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์มาเลี้ยงใน Minimal medium

จากที่ได้ทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ที่คัดเลือก เพื่อผลิต PHA มีขั้นตอนการสกัดสารพอลิเมอร์ โดยแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายเกลือ (0.85% NaCl) ปลอดเชื้อ ทำแห้งตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze Dry System) ชั่งน้ำหนักของเซลล์แห้ง ล้างตะกอนเซลล์แห้งด้วย Methanol โดยเท Methanol ผ่านเซลล์แห้งบนกระดาษกรอง เพื่อล้างไขมันออก นำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหย Methanol ออก ผสมตะกอนเซลล์แห้งกับตัวทำละลายอินทรีย์ 1,2-Dichloroethane เพื่อสกัด PHA ในอัตราส่วนตะกอนเซลล์แห้ง 1 กรัม ต่อตัวทำละลายอินทรีย์ 20 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ที่มีฝาปิด นำไปให้

ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณภูมิ เป็นเวลา 30 นาที กรองสารสกัดขณะร้อนผ่านสำลี และนำสารสกัดที่ได้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนสังเกตเห็นผลึก PHA ลักษณะคล้ายเจล จึงนำสารละลายสกัดไประเหยแยกตัวทำละลายอินทรีย์ 1,2-Dichloroethane ออกจากผลึก PHA ด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 300 mbar พบว่าสามารถสกัดแยก PHA ได้ (รูปที่ 3.10) มีเพียง PHA ที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในสกุล *Chryseobacterium* มีความเหนียวและทนอุณหภูมิสูงได้ใกล้เคียงกับพลาสติกจากปิโตรเคมีที่ใช้งานโดยทั่วไป สามารถเตรียม Compression-molded film (รูปที่ 3.11) ที่ใช้อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส ได้และใกล้เคียงกับ PHA ชนิด PHV จากการค้า (Sigma) (ได้รับความอนุเคราะห์การเตรียม Compression-molded film จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิมา ดีประเสริฐกุล สาขาวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี) ส่วน PHA ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกอีก 2 ไอโซเลท ในสกุล *Bacillus* มีความเปราะ แต่ก็ยังน่าสนใจที่อาจใช้เป็นพอลิเมอร์ผสม




**รูปที่ 3.10** ลักษณะของ PHA ที่สกัดได้จากเซลล์ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท (สายพันธุ์) ที่คัดเลือก




**รูปที่ 3.11** Compression-molded film (ใช้อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส) ของ PHA ที่สกัดได้จากเซลล์ของแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ที่คัดเลือก (A และ B) เปรียบเทียบกับ PHA ชนิด PHV จากการค้า (Sigma, Sigma-Aldrich, Inc.) (C)

## 3.2 การศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลัง โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก

ศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก 2 สายพันธุ์ คือ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ตามความสามารถในการเจริญ สะสมพอลิเมอร์ PHA และสมบัติของ PHA ที่สะสม จากข้อ (3.1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100-1,000 มิลลิลิตร บ่มให้เชื้อเจริญที่สภาวะตามการทดลองข้างต้น โดยที่ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 เจริญได้ใน Complex medium (ตารางที่ 3.2) ที่มีแป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch) 2% ทั้งที่ไม่ผ่านและผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (Hydrolyzed cassava starch) แต่เจริญได้ดีมากใน Complex medium ที่มี Hydrolyzed cassava starch (ตารางที่ 3.5 และ 3.6) การเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกในขั้นตอนนี้มีการตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้โดยหาน้ำหนักของเซลล์ที่ได้ในปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ เปรียบเทียบกับการวัดการเจริญตามวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยาด้วย Spread plate technique และตรวจสอบการสะสม PHA ภายในเซลล์แบคทีเรียจาก Minimal medium ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยย้อม PHA granules ด้วย Nile blue A (1%) ตรวจดูการติดสีส้มเหลืองของ PHA granules ภายในเซลล์ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร จากการศึกษาของโครงการพบว่าปริมาณ PHA granules ที่สะสมภายในเซลล์มีความแปรผันโดยตรงกับน้ำหนักของเซลล์แบคทีเรียที่ได้ จึงใช้น้ำหนักของเซลล์ที่ผลิตได้เป็นเกณฑ์ในการศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHA การศึกษาในขั้นตอนนี้มีขั้นตอนและได้ผลการศึกษาดังนี้

### 3.2.1 การศึกษาปัจจัยด้านสารอาหาร

ศึกษาปัจจัยด้านสารอาหารเพื่อการเจริญและการผลิต PHA ได้ผลการศึกษาดังนี้

#### 3.2.1.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

ก. แหล่งคาร์บอนใน Complex medium

ทดลองเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแป้งมันสำปะหลังซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากที่ได้ทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium เติม Hydrolyzed cassava starch เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.2) นั้นพบการเจริญดีมาก จึงเพิ่ม Hydrolyzed cassava starch เป็นเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.5) เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก พบว่ามีความเหมาะสมเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีปริมาตรอาหาร 1,000 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นของเซลล์มากกว่า $10^{13}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร(ตารางที่ 3.6) จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น (0 ชั่วโมง) ประมาณ $10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรณีของ Complex medium เพื่อการเจริญให้ได้ปริมาณเซลล์มาก จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (Hydrolyzed cassava starch) และมีแหล่งไนโตรเจนหลักคือ Tryptone และ Polypeptone และมี Yeast extract (มีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนและคาร์โบไฮเดรทราว 24

และ 20% ตามลำดับ และมีสารเร่งการเจริญ (Growth factors)) ในปริมาณชนิดละ 0.5% (ตารางที่ 3.7) เพื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนทดแทน ในขั้นตอนต่อไป

**ตารางที่ 3.7** ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium สูตรดัดแปลงของโครงการ ที่เหมาะสมต่อสำหรับการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ที่คัดเลือก

| **Composition** | **Concetration** (g/L) |
|---|---|
| Tryptone | 5.00 |
| Polypeptone | 5.00 |
| Yeast extract | 5.00 |
| Sodium chloride | 2.50 |
| Hydrolyzed cassava starch from cassava starch (dry weight) | 30.00 |

pH 7.0±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ข. แหล่งคาร์บอนใน Minimal medium

ทดลองปรับชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนใน Minimal medium ตามตารางที่ 3.8 เพื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือก 2 สายพันธุ์ ให้สะสมพอลิเมอร์ PHA ในเซลล์ เริ่มต้นจากการใช้ Complex medium (ตารางที่ 3.7) เลี้ยงแบคทีเรีย Complex medium ดังกล่าวข้างต้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำให้ได้ปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน คือ Hydrolyzed cassava starch 30 กรัมต่อลิตร เทียบกับกลูโคสเข้มข้น 10 และ 20 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยสภาวะเช่นเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าทั้งกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 และ 20 กรัมและ Hydrolyzed cassava starch ให้ผลผลิตเซลล์โดยเฉลี่ยไม่น้อยกว่า $10^{10}$ CFU ต่อมิลลิลิตร และกลูโคสเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.9) เพียงพอต่อการสนับสนุนเซลล์ให้มีการสะสม PHA เมื่อเปรียบเทียบกับ Minimal medium ที่มี Hydrolyzed cassava starch 30 กรัมต่อลิตร และกลูโคสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน จึงเลือกกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เป็นส่วนประกอบของ Minimal medium เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

**ตารางที่ 3.8** แหล่งคาร์บอนในส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่ได้ศึกษา

| **Composition** | **Concentration** (g/L)/ **Minimal medium no.** | | |
|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** |
| Glucose | 10.00 | 20.00 | - |
| Hydrolyzed cassava starch prepared from cassava starch | - | - | 30.00 |
| $(NH_4)_2.SO_4$ | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Ferrous ammonium citrate | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| $KH_2PO_4$ | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| $Na_2HPO_4$ | 3.00 | 3.00 | 3.00 |
| Trace element solution: | 1.00 mL | 1.00 mL | 1.00 mL |
| ประกอบด้วย $H_3BO_3$, $CoCl_2.6H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$, $MnCl_2.4H_2O$, $Na_2MoO_4.2H_2O$, $NiCl_2.6H_2O$ และ $CuSO_4.5H_2O$ เข้มข้น 0.3, 0.2, 0.1, 0.03, 0.03, 0.02 และ 0.01 g/L ตามลำดับ | | | |
| pH 7.0±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส | | | |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.9** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium (ตารางที่ 3.7) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำให้ได้ปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงในอาหาร Minimal medium ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน (ตารางที่ 3.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/ Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **pH** of the cultivated medium | **Remaining reducing sugars** (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6:** | | | | | |
| **Complex medium** (300 mL from 3 flasks containing $4.65\times10^{6}$ CFU/mL at 0 h): | | | | | |
| 24 h | $4.15\times10^{12}$ | 8.76 | 1.76 | 5.10 | 3.04 |
| **Minimal medium** (100 mL): | | | | | |
| 48 h | | | | | |
| Glucose 10 g/L | $4.10\times10^{12}$ | 16.07 | 3.32 | 4.45 | 0.70 |
| Glucose 20 g/L | $3.40\times10^{11}$ | 16.93 | 3.24 | 4.42 | 3.92 |
| Hydrolyzed cassava starch | $4.50\times10^{11}$ | 16.40 | 2.75 | 4.75 | 10.50 |
| **SUT-NZT9:** | | | | | |
| **Complex medium** (300 mL from 3 flasks containing $2.55\times10^{6}$ CFU/mL at 0 h): | | | | | |
| 24 h | $3.02\times10^{11}$ | 7.62 | 1.26 | 5.30 | 3.21 |
| **Minimal medium** (100 mL): | | | | | |
| 48 h | | | | | |
| Glucose 10 g/L | $5.30\times10^{11}$ | 14.13 | 3.09 | 5.19 | 0.72 |
| Glucose 20 g/L | $9.30\times10^{10}$ | 15.60 | 3.27 | 4.84 | 2.82 |
| Hydrolyzed cassava starch | $8.00\times10^{10}$ | 14.33 | 2.54 | 4.66 | 7.94 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ชนิดของแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ แบคทีเรียสามารถผลิต PHA จากวัตถุดิบเริ่มต้นหลายชนิด ได้แก่ Glucose, Acetate, Tryptone, Pyruvate, Methanol เป็นต้น และการสะสมมีตั้งแต่ <10% ถึง >80% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Kim and Lenz, 2001; Singh *et al*., 2009) Hollender *et al*. (2002) ผลการศึกษาของโครงการนี้ยังคงสอดคล้องกับจากที่มีรายงานน้ำตาลกลูโคสที่ยังคงเป็นแหล่งคาร์บอนสำคัญมากในการผลิต PHA ของแบคทีเรีย ทั้งที่เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิมและที่ผ่านการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ตามที่มีรายงานมีหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus megaterium* SRKP-3, *Brevibacillus inocatus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* (Chakravarty *et al*., 2010; Reddy and Mohan, 2012), *Pseudomonas mandelii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Jantinobacterium lividum*, *Pseudomonas lini*, *Pseudomonas* sp. (Goh and Tan, 2012), *Pseudomonas putida* Bet001 (Gumel *et al*., 2012), *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, *Pseudomonas stutzeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* (Reddy and Mohan, 2012), *Cupriavidus necator* (Campos *et al*., 2014) และแบคทีเรียในสกุล *Azoarcus*, *Thauera*, *Paracoccus* (Albuquerque *et al*., 2013) เป็นต้น

**3.2.1.2 ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน**

ก. แหล่งไนโตรเจนใน Complex medium

ทดลองเพื่อหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนหลายชนิดมีองค์ประกอบที่เป็นสารส่งเสริมการเจริญ (Growth factor) โดยใช้ส่วนประกอบของอาหารที่ได้จากการศึกษาในข้อ (3.2.1.1) โดย Complex medium (ตารางที่ 3.7) เป็นสูตรอาหารเริ่มต้น และศึกษาแหล่งของไนโตรเจนต่างกันคือ โปรตีนจากถั่วเหลือง (Food grade soy protein, Food EQ Co., Ltd, Thailand) ยีสต์แห้งที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (Spent brewer's yeast) จากบริษัท อาหารเสริม ในเครือ บริษัท เบียร์ไทย (1991) และยูเรีย (Urea, AR grade, Carlo Erba Reagents, Italy) รวมทั้งทดลองใช้รำข้าวสกัดน้ำมัน (Defatted rice bran) จากบริษัท นิวทริชั่น แอนด์ คอสเมติกส์ จำกัด ประเทศไทย (จากที่ได้วิเคราะห์ส่วนประกอบของรำข้าวที่ใช้มีปริมาณโปรตีนและไขมันโดยเฉลี่ย 13 และ 14% ตามลำดับ) เพื่อลดปริมาณที่จำเป็นต้องใช้หรือใช้ทดแทนส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำหน่ายเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการคือ Tryptone (Himedia Laboratories, India) และ Yeast extract (Himedia Laboratories) ซึ่งมีราคาแพง

เซลล์จาก Complex medium nos. 2-4 (ตารางที่ 3.10) มีกากจากส่วนประกอบของอาหารปนมาด้วย ถึงแม้จะผ่านการปั่นแยก 2 ครั้ง ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกกากหยาบ และนำส่วนใสไปปั่นแยกอีกครั้ง ที่ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกให้ได้เซลล์แบคทีเรีย ซึ่งเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium 3 สูตรข้างต้น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium no. 1 (ตารางที่ 3.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยสภาวะเช่นเดียวกันกับ Complex medium

เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อการสะสม PHA ภายในเซลล์ ซึ่งได้ผลปริมาณเซลล์ 15.15 และ 14.26, 14.40 และ 15.60, 15.03 และ 14.33 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) ราว 2.56 และ 2.63, 2.41 และ 2.77, 2.44 และ 2.54 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.11) ซึ่งค่อนข้างใกล้เคียงกับการเลี้ยงใน Complex medium เริ่มต้น (Complex medium no. 1 ที่มี Tryptone, Polypeptone และ Yeast extract เป็นส่วนประกอบ) ที่ได้ปริมาณเซลล์ 15.69 และ 15.02 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) ราว 2.98 และ 3.06 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.11)

**ตารางที่ 3.10** แหล่งไนโตรเจนและสารส่งเสริมการเจริญที่แตกต่างกันใน Complex medium ที่ได้ศึกษา

| **Composition** | **Concentration** (g/L)/**Complex medium no.** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** | **4** |
| Tryptone | 5.00 | - | - | - |
| Polypeptone | 5.00 | - | - | - |
| Yeast extract | 5.00 | - | - | - |
| Spent brewer's yeast | - | 10.00 | 5.00 | 5.00 |
| Soybean meal | - | - | 5.00 | 5.00 |
| Urea | - | - | - | 5.00 |
| Defatted rice bran | - | 5.00 | 5.00 | - |
| Sodium chloride | 2.50 | 2.50 | 2.50 | 2.50 |
| Hydrolyzed cassava starch | 30.00 | 30.00 | 30.00 | 30.00 |

กล่าวโดยสรุปได้ว่าแบคทีเรียที่คัดเลือก 2 สายพันธุ์/ไอโซเลท (SUT-NZT6 และ SUT-NZT9) สามารถผลิตพอลิเมอร์ที่มีความเหนียว ที่ได้ศึกษาปัจจัยด้านสารอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนและสารส่งเสริมการเจริญ (Growth factor) พบว่ายีสต์แห้งที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์และรำข้าวสกัดน้ำมันนั้นส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียได้ดี (ตารางที่ 3.11) และมีส่วนประกอบไม่ซับซ้อน เตรียมได้งาน (Complex medium no. 2 ตารางที่ 3.10)

**ตารางที่ 3.11** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium ที่มีส่วนประกอบของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 4 สูตร (ตารางที่ 3.10) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium no. 1 (ตารางที่ 3.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยสภาวะเช่นเดียวกันกับ Complex medium เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/ Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L)[1] | **Dry cell weight** (g/L)[1] | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6:** | | | | | |
| **Complex medium** ($1.65\times10^{6}$ CFU/mL at 0 h)/ | | | | | |
| **24 h:** | | | | | |
| No.1 (Table 3.10) | $8.89\times10^{11}$ | 10.06 | 2.92 | 5.08 | 1.94 |
| No.2 (Table 3.10) | $6.15\times10^{11}$ | 9.76 | 2.35 | 5.10 | 1.89 |
| No.3 (Table 3.10) | $5.50\times10^{11}$ | 9.85 | 2.29 | 5.12 | 1.97 |
| No.4 (Table 3.10) | $4.60\times10^{11}$ | 9.01 | 2.45 | 5.20 | 2.38 |
| **Minimal medium no. 1 (Table 3.8)/** | | | | | |
| **48 h** from complex medium**:** | | | | | |
| No.1 (Table 3.10) | $9.11\times10^{11}$ | 15.69 | 2.98 | 5.01 | 0.72 |
| No.2 (Table 3.10) | $4.00\times10^{11}$ | 15.15 | 2.56 | 4.65 | 0.69 |
| No.3 (Table 3.10) | $2.50\times10^{11}$ | 14.40 | 2.41 | 4.75 | 0.85 |
| No.4 (Table 3.10) | $3.40\times10^{11}$ | 15.03 | 2.44 | 4.82 | 0.92 |

[1], เซลล์จาก Complex medium nos. 2-4 มีกากจากส่วนประกอบของอาหารปนมาด้วย ถึงแม้จะผ่านการปั่นแยก 2 ครั้ง ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกกากหยาบ และนำส่วนใสไปปั่นแยกอีกครั้ง ที่ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกให้ได้เซลล์แบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.11** (ต่อ) ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium ที่มีส่วนประกอบของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 4 สูตร (ตารางที่ 3.10) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium no. 1 (ตารางที่ 3.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยสภาวะเช่นเดียวกันกับ Complex medium เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/ Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L)[1] | **Dry cell weight** (g/L)[1] | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT9:** | | | | | |
| **Complex medium** ($1.145\times10^{6}$ CFU/mL at 0 h)/ **24 h:** | | | | | |
| No.1 (Table 3.10) | $5.12\times10^{11}$ | 10.69 | 2.26 | 5.23 | 3.07 |
| No.2 (Table 3.10) | $2.67\times10^{12}$ | 10.68 | 2.42 | 5.25 | 2.15 |
| No.3 (Table 3.10) | $3.42\times10^{11}$ | 10.62 | 2.26 | 5.10 | 3.01 |
| No.4 (Table 3.10) | $2.02\times10^{11}$ | 9.62 | 2.35 | 5.10 | 2.92 |
| **Minimal medium no. 1 (Table 3.8)/ 48 h** from complex medium**:** | | | | | |
| No.1 (Table 3.10) | $9.02\times10^{11}$ | 15.02 | 3.06 | 5.03 | 0.82 |
| No.2 (Table 3.10) | $4.66\times10^{11}$ | 14.26 | 2.63 | 5.19 | 1.10 |
| No.3 (Table 3.10) | $9.30\times10^{10}$ | 14.60 | 2.77 | 4.84 | 1.08 |
| No.4 (Table 3.10) | $8.00\times10^{10}$ | 14.33 | 2.54 | 4.66 | 0.94 |

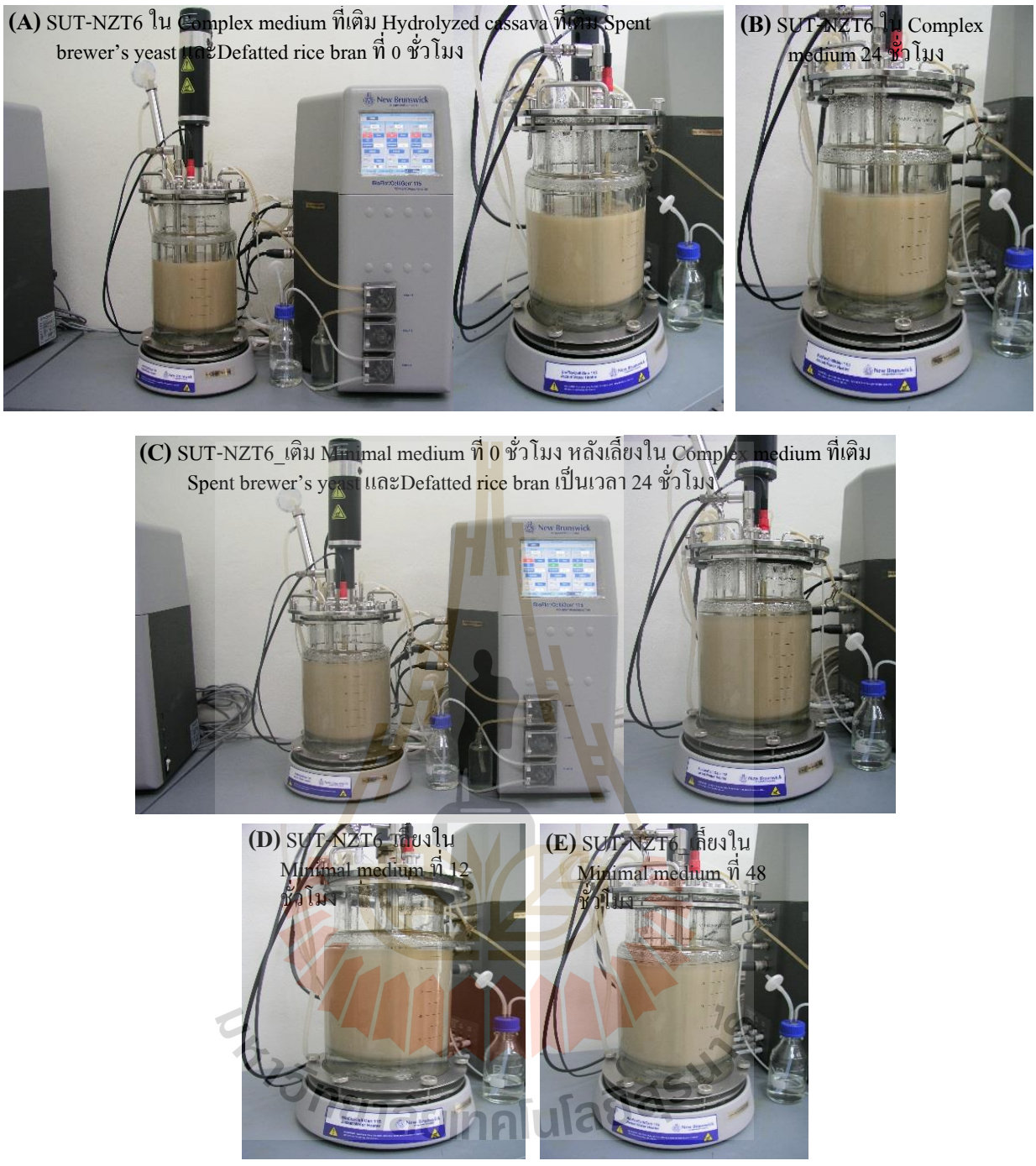
หมายเหตุ: [1], เซลล์จาก Complex medium nos. 2-4 มีกากจากส่วนประกอบของอาหารปนมาด้วย ถึงแม้จะผ่านการปั่นแยก 2 ครั้ง ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกกากหยาบ และนำส่วนใสไปปั่นแยกอีกครั้ง ที่ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ได้เซลล์แบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

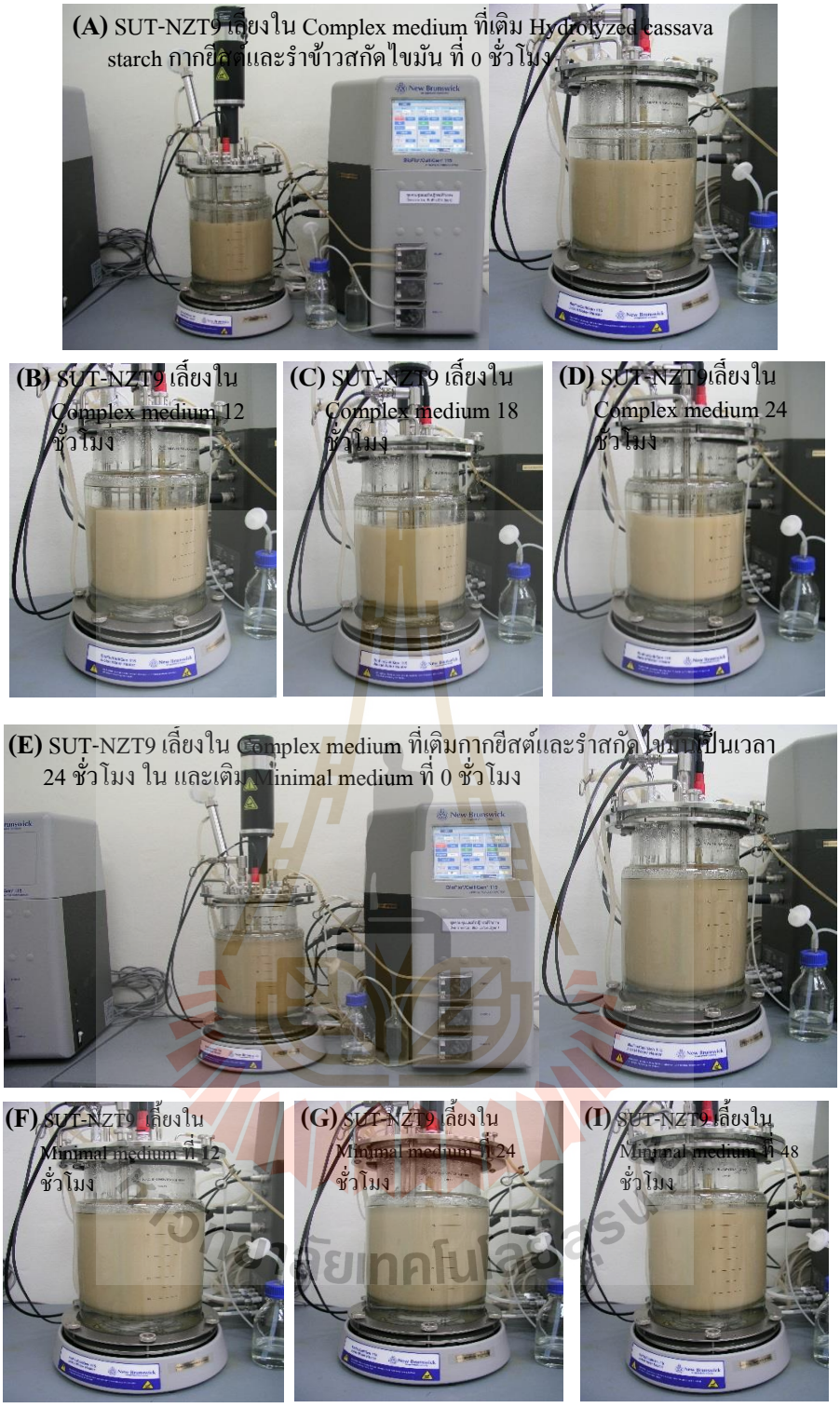
เมื่อทดลองยืนยันผลการเจริญและการสะสม PHA เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือก 2 สายพันธุ์ แบบ Fed-Batch เพื่อลดขั้นตอนการปั่นแยกเซลล์ที่มีตะกอนจากกากอาหารเลี้ยงเชื้อปนอยู่ราว 50% โดยเลี้ยงใน Complex medium no. 2 ตารางที่ 3.10 ที่เติมยีสต์แห้งที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์และรำข้าวสกัดไขมัน ปริมาตรอาหาร 4 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 2% โดยปริมาตร ($10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium no. 1 ตารางที่ 3.8 ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียต่อด้วยสภาวะเดิม แต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบการเจริญดีของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ (SUT-NZT6 และ SUT-NZT9) ได้เซลล์โดยเฉลี่ยไม่น้อยกว่า 24 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) หรือราว 3.5-4.5 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) (รูปที่ 3.12 และ 3.13 และตารางที่ 3.12) น้ำหนักเซลล์ที่เพิ่มขึ้นใน Minimal medium เมื่อเปรียบเทียบกับ Complex medium พบว่าเนื่องจากการสะสมพอลิเมอร์ในเซลล์ที่มีจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกันในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดข้างต้น แต่ในการศึกษาครั้งนี้ยังมีความไม่เหมาะสมในสภาวะการศึกษาปัจจุบัน เนื่องจากมีกากเหลือที่เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ส่งผลความยุ่งยากของกระบวนการแยกเซลล์แบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลถึงปัญหาในขั้นตอนการสกัดสารจากเซลล์แบคทีเรียและการทำบริสุทธิ์สารพอลิเมอร์ อาจพิจารณาปรับใช้ในอนาคตเมื่อได้พัฒนากรรมวิธีเก็บเกี่ยวเซลล์แยกจากตะกอน เนื่องเป็นวิธีการผลิตที่ลดต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อลงได้มากเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอื่นที่ได้ศึกษา

ข. แหล่งไนโตรเจนใน Minimal medium

แหล่งไนโตรเจนที่เป็นส่วนประกอบของ Minimal medium ยังคงพิจารณาการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate) ปริมาณ 0.1% ซึ่งจัดว่าเป็นปริมาณน้อย หาได้ง่าย และเป็นส่วนประกอบของอาหารที่แบคทีเรียสายพันธุ์คัดเลือกเจริญและสะสมพอลิเมอร์ PHA ได้ดี จึงคงไว้เป็นแหล่งไนโตรเจน (ตารางที่ 3.8) ดังนั้นส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่ใช้เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไปประกอบด้วย Glucose, $(NH_4)_2.SO_4$, $CaCl_2.2H_2O$, Ferrous ammonium citrate, $KH_2PO_4$, $MgSO_4.7H_2O$, $Na_2HPO_4$, 10.0, 1.0, 0.01, 0.05, 1.0, 0.20, และ 3.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ Trace element solution (ประกอบด้วย $H_3BO_3$, $CoCl_2.6H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$, $MnCl_2.4H_2O$, $Na_2MoO_4.2H_2O$, $NiCl_2.6H_2O$ และ $CuSO_4.5H_2O$ เข้มข้น 0.3, 0.2, 0.1, 0.03, 0.03, 0.02, 1.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) 1.0 มิลลิลิตร




**รูปที่ 3.12** ตัวอย่างลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ใน Complex medium no. 2 ตารางที่ 3.10 (A-B) เติมยีสต์แห้งที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์และรำข้าวสกัดไขมัน ปริมาตรอาหาร 4 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 2% โดยปริมาตร ($10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม Minimal medium no. 1 ตารางที่ 3.8 (C-E) ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร และเลี้ยงแบคทีเรียต่อเนื่องด้วยสภาวะเดิม แต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง




**รูปที่ 3.13** ตัวอย่างลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ใน Complex medium no. 2 ตารางที่ 3.10 (A-B) เติมยีสต์แห้งที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์และรำข้าวสกัดไขมัน ปริมาตรอาหาร 4 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 2% โดยปริมาตร ($10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย)ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม Minimal medium no. 1 ตารางที่ 3.8 (C-E) ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร และเลี้ยงแบคทีเรียต่อเนื่องด้วยสภาวะเดิม แต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

**ตารางที่ 3.12** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium no. 2 (ตารางที่ 3.10) ที่ใช้ Cassava starch hydrolysate เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมยีสต์แห้งที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์และรำข้าวสกัดไขมัน 10 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน Tryptone, Polypeptone และ Yeast extract ปริมาตร 4 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115 ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 2% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที (จากสมบัติของแบคทีเรียที่เป็น Facultative anaerobes) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม Minimal medium no. 1 (ตารางที่ 3.8) ที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร เลี้ยงต่อด้วยสภาวะเดิม แต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Agitation speed** (rpm) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6:** | | | | | | |
| **Complex medium no. 2 (Table 3.10)**, 4 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $2.02\times10^{6}$ | 300 | 3.19 | 0.39 | 7.10 | 31.57 |
| 6 | $1.42\times10^{8}$ | 300 | 7.72 | 1.67 | 7.10 | 19.79 |
| 12 | $5.70\times10^{10}$ | 300 | 12.22 | 2.55 | 7.15 | 6.55 |
| 24 | $8.10\times10^{12}$ | 300 | 14.76 | 2.85 | 7.21 | 1.89 |
| **Minimal medium no. 1 (Table 3.8)** making up to 5 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $2.12\times10^{12}$ | 500 | 15.75 | 2.84 | 7.12 | 11.25 |
| 12 | $1.12\times10^{12}$ | 500 | 21.46 | 3.98 | 6.98 | 6.05 |
| 24 | $6.70\times10^{12}$ | 500 | 23.81 | 3.25 | 6.98 | 3.98 |
| 48 | $4.00\times10^{12}$ | 500 | 24.15 | 3.51 | 6.90 | 0.62 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.12** (ต่อ) ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium no. 2 (ตารางที่ 3.10) ที่ใช้ Cassava starch hydrolysate เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมยีสต์แห้งที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์และรำข้าวสกัดไขมัน 10 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน Tryptone, Polypeptone และ Yeast extract ปริมาตร 4 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115 ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 2% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม Minimal medium no. 1 (ตารางที่ 3.8) ที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร เลี้ยงต่อด้วยสภาวะเดิม แต่กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Agitation speed** (rpm) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT9:** | | | | | | |
| **Complex medium no. 2 (Table 3.10)**, 4 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $1.28\times10^{6}$ | 300 | 3.08 | 0.40 | 7.09 | 30.94 |
| 6 | $1.31\times10^{9}$ | 300 | 8.12 | 1.34 | 6.85 | 22.17 |
| 12 | $1.01\times10^{11}$ | 300 | 11.38 | 1.97 | 6.86 | 11.59 |
| 24 | $2.17\times10^{12}$ | 300 | 13.68 | 2.42 | 6.85 | 2.15 |
| **Minimal medium no. 1 (Table 3.8)** making up to 5 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $8.20\times10^{11}$ | 500 | 12.96 | 2.28 | 6.85 | 12.04 |
| 12 | $2.80\times10^{12}$ | 500 | 23.88 | 3.46 | 6.85 | 8.15 |
| 24 | $4.68\times10^{12}$ | 500 | 24.17 | 3.13 | 6.80 | 4.12 |
| 36 | $1.38\times10^{12}$ | 500 | 24.35 | 3.55 | 6.90 | 1.85 |
| 48 | $4.66\times10^{11}$ | 500 | 24.27 | 3.53 | 6.90 | 1.10 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**3.2.1.3 Essential element และ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ**

ศึกษาความจำเป็นที่ต้องเติม Essential element และ/หรือ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก 2 สายพันธุ์ (SUT-NZT6 และ SUT-NZT9) ที่เป็นผลจากการศึกษาในข้อ (3.2.1.2) ในส่วนของ Complex medium นั้นได้เลือกสูตรที่ประกอบด้วย Tryptone, Polypeptone, Yeast extract, Sodium chloride และแป้งมันสำปะหลัง (เตรียมเป็น Hydrolyzed cassava starch) ปริมาณ 5.0, 5.0, 5.0, 2.5 และ30.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Complex medium no. 1 ตารางที่ 3.10)

สำหรับ Minimal medium ได้เปรียบเทียบการใช้อาหารที่มีส่วนประกอบต่างกัน 10 สูตร (ตารางที่ 3.13) เพื่อศึกษาความต้องการ Essential element และธาตุอาหาร ที่เหมาะสมต่อการสะสม PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ภายหลังการเลี้ยงใน Complex medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ในฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงในอาหาร Minimal medium แต่ละสูตรจำนวน 10 สูตร (ตารางที่ 3.13) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าอาหารที่มีส่วนประกอบหลักคือ Glucose 1.0%, Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1%, Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$) 0.001%, Ferrous ammonium citrate 0.005%, Potassium dihydrogen phosphate ($KH_2PO_4$) 0.1%, Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$) 0.02% และ di-Sodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4$) 0.3% (Minimal medium no. 2 ตารางที่ 3.13) มีความเหมาะสมต่อการใช้เพื่อกระตุ้นการสะสมสารพอลิเมอร์ของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่คัดเลือก (ตารางที่ 3.14)

จากที่มีรายงานการศึกษาระบุถึงแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHA ได้เป็นแบคทีเรียทั้งที่ต้องการสารอาหารจำเป็นในปริมาณที่จำกัด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ สำหรับการสังเคราะห์ PHA และมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Alcaligenes eutrophus, Protomonas extorquens* และ *Pseudomonas oleovorans* (Khanna and Srivastava, 2005) และบาง species ในสกุล *Bacillus* (Singh *et al*., 2009) เป็นต้น และแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถสะสมพอลิเมอร์ในระหว่างการเจริญได้โดยไม่จำเป็นต้องเจริญในสภาวะที่มีสารอาหารจำเป็นในปริมาณที่จำกัด ได้แก่ *Alcaligenes latus*, Mutant stain *Azotobacter vinelandii* และ Recombinant *Escherichia coli* (Khanna and Srivastava, 2005) เป็นต้น

**ตารางที่ 3.13** Minimal medium สำหรับการสะสมสารพอลิเมอร์ของแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ที่คัดเลือกที่ได้ศึกษาส่วนประกอบ

| **Composition** | **Medium no./Concentration** (g/L) | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** |
| Glucose | 10 | **10** | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1 | **1** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.01 | **0.01** | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Ferrous ammonium citrate | 0.05 | **0.05** | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| $KH_2PO_4$ | 1.4 | **1** | 0.83 | 0.45 | 0.1 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 0.83 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.2 | **0.2** | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| $Na_2HPO_4$ | 3 | **3** | 3 | 3 | 3 | 2.5 | 2 | 1.66 | 1.4 | 1.66 |
| Trace element solution[1] | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL |

หมายเหตุ: [1] เติม Trace element solution 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย $H_3BO_3$ 0.3 กรัม, $CoCl_2.6H_2O$ 0.2 กรัม, $ZnSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม, $MnCl_2.4H_2O$ 0.03 กรัม, $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.03 กรัม, $NiCl_2.6H_2O$ 0.02 กรัม และ $CuSO_4.5H_2O$ 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.14** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium no.1 ตารางที่ 3.8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ในฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ให้ได้ปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงในอาหาร Minimal medium แต่ละสูตรจำนวน 10 สูตร (ตารางที่ 3.13) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial code/Growth** | **Medium no. (Table 3.12)** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** |
| **1. SUT-NZT6** ($6.10\times10^{6}$ CFU/mL at 0 h cultivation): | | | | | | | | | | |
| **1.1 Complex medium** (300 mL combined from 3 flasks) | | | | | | | | | | |
| Growth at 48 h (CFU/mL) | $1.31\times10^{12}$ | $1.31\times10^{12}$ | $1.31\times10^{12}$ | $1.31\times10^{12}$ | $1.31\times10^{12}$ | $1.31\times10^{12}$ | $1.31\times10^{12}$ | $1.31\times10^{12}$ | $1.31\times10^{12}$ | $1.31\times10^{12}$ |
| **1.2 Minimal medium** (100 mL) | | | | | | | | | | |
| Growth at 48 h (CFU/mL) | $5.02\times10^{12}$ | $4.10\times10^{12}$ | $8.30\times10^{11}$ | $6.10\times10^{11}$ | $5.38\times10^{11}$ | $5.01\times10^{11}$ | $4.78\times10^{11}$ | $4.80\times10^{11}$ | $3.98\times10^{11}$ | $4.65\times10^{11}$ |
| Wet cell weight (g/L) | 12.98 | 13.07 | 12.57 | 12.97 | 12.19 | 12.07 | 12.11 | 12.07 | 11.98 | 12.13 |
| Dry cell weight (g/L) | 2.26 | 2.31 | 2.09 | 2.11 | 2.02 | 1.96 | 2.00 | 2.04 | 1.89 | 2.03 |
| **2. NZT9** ($1.83\times10^{6}$ CFU/mL at 0 h cultivation): | | | | | | | | | | |
| **2.1 Complex medium** (300 mL combined from 3 flasks) | | | | | | | | | | |
| Growth at 48 h (CFU/mL) | $2.15\times10^{11}$ | $2.15\times10^{11}$ | $2.15\times10^{11}$ | $2.15\times10^{11}$ | $2.15\times10^{11}$ | $2.15\times10^{11}$ | $2.15\times10^{11}$ | $2.15\times10^{11}$ | $2.15\times10^{11}$ | $2.15\times10^{11}$ |
| **2.2 Minimal medium** (100 mL) | | | | | | | | | | |
| Growth at 48 h (CFU/mL) | $7.10\times10^{11}$ | $5.30\times10^{11}$ | $8.96\times10^{10}$ | $6.86\times10^{10}$ | $4.97\times10^{10}$ | $1.30\times10^{11}$ | $8.13\times10^{10}$ | $5.60\times10^{10}$ | $5.45\times10^{10}$ | $6.36\times10^{10}$ |
| Wet cell weight (g/L) | 12.66 | 12.63 | 12.13 | 12.09 | 12.41 | 11.97 | 12.03 | 11.96 | 11.91 | 11.88 |
| Dry cell weight (g/L) | 2.56 | 2.59 | 2.14 | 2.16 | 2.11 | 2.03 | 1.97 | 1.89 | 1.94 | 1.88 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จากผลการศึกษาปัจจัยด้านสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสะสมพอลิเมอร์ชนิด PHA ของแบคทีเรีย *Chryseobacterium* sp. สายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 (ข้อ 3.2.1) สามารถสรุปส่วนประกอบของ Complex medium ที่เหมาะสมต่อการเจริญและ Minimal medium ที่เหมาะสมต่อการสะสมพอลิเมอร์ชนิด PHA ของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้ตามตารางที่ 3.15 เพื่อใช้ศึกษาให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียในขั้นตอนต่อไป

**ตารางที่ 3.15** สรุปส่วนประกอบของ Complex medium และ Minimal medium ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสะสมพอลิเมอร์ชนิด PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 จากผลการศึกษา

| **Composition** | **Concetration** (g/L) |
|---|---|
| **Complex medium:** | |
| Tryptone | 5.00 |
| Polypeptone | 5.00 |
| Yeast extract | 5.00 |
| Sodium chloride | 2.50 |
| Hydrolyzed cassava starch from cassava starch (dry weight) | 30.00 |
| **Minimal medium:** | |
| Glucose | 10.00 |
| $(NH_4)_2.SO_4$ | 1.00 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.01 |
| Ferrous ammonium citrate | 0.05 |
| $KH_2PO_4$ | 1.00 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.20 |
| $Na_2HPO_4$ | 3.00 |
| Trace element solution:<br>ประกอบด้วย $H_3BO_3$, $CoCl_2.6H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$, $MnCl_2.4H_2O$, $Na_2MoO_4.2H_2O$, $NiCl_2.6H_2O$ และ $CuSO_4.5H_2O$ เข้มข้น 0.3, 0.2, 0.1, 0.03, 0.03, 0.02 และ 0.01 g/L ตามลำดับ | 1.00 mL |
| pH 7.00±0.20 ที่ 25 องศาเซลเซียส | |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

### 3.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHA

ศึกษาผลอุณหภูมิต่อการผลิต PHA โดยเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium และ Minimal medium ตามผลการศึกษาที่ได้ในข้อ 3.2.1 ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร ที่ระดับอุณหภูมิ 25, 28, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต PHA เก็บตัวอย่างจากการเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ ต่อเนื่องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรียและหาปริมาณ PHA ที่สะสมภายในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 เจริญได้ดีทั้งที่อุณหภูมิ 25, 28, 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3.16 และ 3.17) ซึ่งเป็นระดับอุณหภูมิช่วงอุณหภูมิใกล้อุณหภูมิห้องโดยเฉลี่ยของประเทศไทย ลดพลังงานที่ต้องใช้เพื่อให้ความร้อนหรือทำความเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิขณะเลี้ยงแบคทีเรีย ที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส พบการเจริญและการผลิตเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ในระดับที่ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ได้ผลดีกว่าที่ 30 องศาเซลเซียส เล็กน้อย จากผลที่พบการเจริญได้ปริมาณเซลล์ $1.74\times10^{13}$ และ $1.18\times10^{13}$ CFU ต่อมิลลิลิตร (ได้น้ำหนักเซลล์แบคทีเรีย 9.13 และ 15.80 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) หรือ 1.53 และ 2.83 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ) และ$1.35\times10^{11}$ และ $3.15\times10^{12}$ CFU ต่อมิลลิลิตร มิลลิลิตร (ได้น้ำหนักเซลล์แบคทีเรีย 8.13 และ 15.40 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) หรือ 1.33 และ 2.36 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ) ในอาหาร Complex medium และ Minimal medium เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ตารางที่ 3.16) ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ได้ผลน้อยกว่าที่ 30 องศาเซลเซียส เล็กน้อย (ตารางที่ 3.17) จึงเลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีจำนวนเซลล์ลดลงจากเริ่มต้นและคงที่ในระหว่างการเลี้ยง เห็นได้จากเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 มีการเจริญสูงสุดที่มีปริมาณเซลล์ $1.50\times10^{4}$ และ $2.05\times10^{4}$ CFU ต่อมิลลิลิตร (จากปริมาณเริ่มต้นใน Complex medium เท่ากับ $3.50\times10^{6}$ CFU ต่อมิลลิลิตร) เมื่อเลี้ยงในอาหาร Complex medium และ Minimal medium เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ได้น้ำหนักเซลล์แบคทีเรีย 2.13 และ 5.40 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) หรือ 0.13 และ 0.36 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.16) ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT9 มีการเจริญสูงสุดที่ $3.10\times10^{4}$ และ $1.06\times10^{4}$ CFU ต่อมิลลิลิตร (จากปริมาณเริ่มต้นใน Complex medium เท่ากับ $3.17\times10^{6}$ CFU ต่อมิลลิลิตร) เมื่อเลี้ยงในอาหาร Complex medium และ Minimal medium เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ได้น้ำหนักเซลล์แบคทีเรีย 1.92 และ 3.93 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) หรือ 0.12 และ 0.66 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.17)

**ตารางที่ 3.16** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ใน Complex medium ที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/ Cultivation temperature** (ºC) | **Bacterial cells** at 0 h (CFU/mL) | **Growth** at 24 &48 h (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **pH** of the cultivated medium |
|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6 in complex medium:** | | | | | |
| 25 | $3.50\times10^{6}$ | $1.30\times10^{10}$ | 7.31 | 1.09 | 6.94 |
| 28 | $4.74\times10^{6}$ | $1.74\times10^{13}$ | 9.13 | 1.53 | 7.04 |
| 30 | $3.35\times10^{6}$ | $1.35\times10^{11}$ | 8.13 | 1.33 | 7.16 |
| 35 | $3.60\times10^{6}$ | $1.10\times10^{11}$ | 7.92 | 1.29 | 7.05 |
| 40 | $3.15\times10^{6}$ | $1.50\times10^{4}$ | 2.13 | 0.13 | 7.10 |
| **SUT-NZT6 in minimal medium:** | | | | | |
| 25 | $1.30\times10^{10}$ | $1.05\times10^{10}$ | 10.15 | 1.69 | 6.90 |
| 28 | $1.74\times10^{13}$ | $1.85\times10^{13}$ | 15.80 | 2.83 | 4.95 |
| 30 | $1.35\times10^{11}$ | $3.15\times10^{12}$ | 15.40 | 2.36 | 4.54 |
| 35 | $1.10\times10^{11}$ | $1.05\times10^{11}$ | 11.10 | 2.15 | 4.58 |
| 40 | $1.50\times10^{4}$ | $2.05\times10^{4}$ | 5.40 | 0.36 | 6.64 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.17** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT9 ใน Complex medium ที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/ Cultivation temperature** (ºC) | **Bacterial cells** at 0 h (CFU/mL) | **Growth** at 24&48 h (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **pH** of the cultivated medium |
|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT9 in complex medium:** | | | | | |
| 25 | $4.22\times10^{6}$ | $1.05\times10^{11}$ | 7.15 | 0.19 | 5.28 |
| 28 | $4.50\times10^{6}$ | $4.10\times10^{11}$ | 8.07 | 1.32 | 5.26 |
| 30 | $3.97\times10^{6}$ | $6.00\times10^{11}$ | 8.20 | 1.41 | 5.02 |
| 35 | $3.10\times10^{6}$ | $5.20\times10^{10}$ | 7.20 | 1.11 | 5.32 |
| 40 | $3.17\times10^{6}$ | $3.10\times10^{4}$ | 1.92 | 0.12 | 5.97 |
| **SUT-NZT9 in minimal medium:** | | | | | |
| 25 | $1.05\times10^{11}$ | $5.60\times10^{10}$ | 14.25 | 2.50 | 5.05 |
| 28 | $4.10\times10^{11}$ | $5.30\times10^{12}$ | 17.13 | 3.09 | 5.19 |
| 30 | $6.00\times10^{11}$ | $6.36\times10^{12}$ | 17.93 | 2.66 | 4.77 |
| 35 | $5.20\times10^{10}$ | $2.30\times10^{10}$ | 13.80 | 1.89 | 5.76 |
| 40 | $3.10\times10^{4}$ | $1.06\times10^{4}$ | 3.93 | 0.66 | 5.98 |

### 3.2.3 การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

ศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถเตรียมและใช้ประโยชน์ทั้งแบคทีเรียกล้าเชื้อและสารในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างคุ้มค่าที่สุด โดยทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ให้เจริญและผลิต PHA ในอาหาร Complex medium และ Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ตามลำดับ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่พัฒนาได้ ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียเฉพาะสายพันธุ์ โดยพิจารณาทดลองใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (Inoculum size) ที่มีความเข้มข้นโดยเฉลี่ย $10^6$-$10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในช่วง 1-5% ตรวจวัดการเจริญ ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแป้งที่เหลือ และปริมาณ PHA ที่ผลิต เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากที่ได้ทดลองจริงใช้ในช่วง 1-5% ยังคงให้ผลผลิตเซลล์เพิ่ม จึงเพิ่มการศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้น 7 และ 10% ซึ่งสูงสุดของจุดคุ้มทุน ที่ไม่ควรใช้ในปริมาณกล้าเชื้อมากกว่านี้ ผลการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงในอาหาร Minimal medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Inoculum size) เหมาะสมที่ใช้อยู่ในช่วงโดยเฉลี่ยเดียวกันคือ 5 และ 7% (ตารางที่ 3.18 และ 3.19) จึงเลือกปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

### 3.2.4 การศึกษาความเร็วรอบของการกวน (Agitation) ที่เหมาะสม เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ให้เจริญและผลิต PHA คล้ายกัน จึงได้ทดลองผลิต PHA จากการเลี้ยงเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ให้เจริญในอาหาร Complex medium ที่มีแหล่งคาร์บอนหลักเตรียมจากแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1 ลิตร ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 และให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที เปรียบเทียบความเร็วรอบของการกวนที่ 100-500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าความเร็วรอบของการกวนที่เหมาะสมคือ 300 รอบต่อนาที (ตารางที่ 3.20 และรูปที่ 3.14) แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 มีการเจริญสูงสุดที่ $4.18\times10^{14}$ และ $4.50\times10^{14}$ CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหาร Complex medium และ Minimal medium เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ได้เซลล์แบคทีเรีย 39.89 และ 41.12 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) หรือ 7.01 และ 7.23 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.20)

**ตารางที่ 3.18** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ที่คัดเลือกใน Complex medium ที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1-10% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกัน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Inoculum size** (%) | **Bacterial cells** at 0 h (CFU/mL) | **Growth** at 24&48 h (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **pH** of the cultivated medium |
|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6 in complex medium:** | | | | | |
| 1 | $4.30\times10^{6}$ | $9.62\times10^{12}$ | 9.73 | 1.65 | 7.19 |
| 2 | $4.14\times10^{6}$ | $1.74\times10^{13}$ | 9.13 | 1.53 | 7.04 |
| 3 | $4.00\times10^{6}$ | $5.63\times10^{12}$ | 8.73 | 1.45 | 7.11 |
| 4 | $4.10\times10^{6}$ | $1.28\times10^{13}$ | 8.33 | 1.37 | 7.12 |
| 5 | $4.19\times10^{6}$ | $4.62\times10^{12}$ | 9.00 | 1.53 | 7.04 |
| 7 | $4.20\times10^{6}$ | $4.88\times10^{12}$ | 8.40 | 1.39 | 6.88 |
| 10 | $4.15\times10^{6}$ | $1.86\times10^{12}$ | 8.25 | 1.32 | 7.08 |
| **SUT-NZT6 in minimal medium:** | | | | | |
| 1 | $9.62\times10^{12}$ | $1.85\times10^{13}$ | 15.80 | 2.83 | 6.64 |
| 2 | $1.74\times10^{13}$ | $8.73\times10^{12}$ | 13.13 | 2.31 | 6.95 |
| 3 | $5.63\times10^{12}$ | $1.31\times10^{13}$ | 14.60 | 2.59 | 6.68 |
| 4 | $1.28\times10^{13}$ | $1.06\times10^{13}$ | 14.00 | 2.48 | 6.57 |
| 5 | $4.62\times10^{12}$ | $2.09\times10^{13}$ | 15.13 | 2.69 | 6.52 |
| 7 | $4.88\times10^{12}$ | $2.30\times10^{13}$ | 15.15 | 2.70 | 6.56 |
| 10 | $1.86\times10^{12}$ | $7.62\times10^{12}$ | 13.45 | 2.62 | 6.56 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.19** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT9 ที่คัดเลือกใน Complex medium ที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1-10% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกัน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

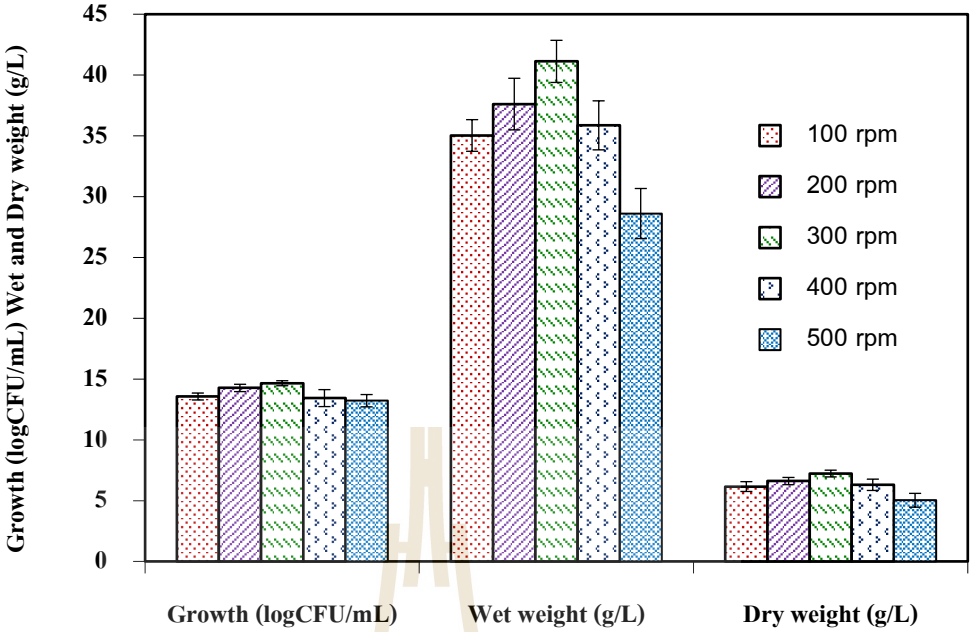
| **Bacterial isolate code/ Medium/ Inoculum size** (%) | **Bacterial cells** at 0 h (CFU/mL) | **Growth** at 24&48 h (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **pH** of the cultivated medium |
|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT9 in complex medium:** | | | | | |
| 1 | $3.02\times10^{6}$ | $4.10\times10^{12}$ | 8.07 | 1.32 | 5.01 |
| 2 | $2.02\times10^{6}$ | $6.50\times10^{12}$ | 9.53 | 1.61 | 5.26 |
| 3 | $2.57\times10^{6}$ | $6.30\times10^{12}$ | 9.32 | 1.57 | 5.00 |
| 4 | $3.19\times10^{6}$ | $1.10\times10^{13}$ | 10.73 | 1.82 | 4.99 |
| 5 | $5.42\times10^{6}$ | $6.20\times10^{13}$ | 10.84 | 1.88 | 4.98 |
| 7 | $3.78\times10^{6}$ | $7.10\times10^{13}$ | 10.40 | 1.79 | 4.98 |
| 10 | $2.19\times10^{6}$ | $6.20\times10^{13}$ | 10.07 | 1.71 | 4.99 |
| **SUT-NZT9 in minimal medium:** | | | | | |
| 1 | $4.10\times10^{12}$ | $5.60\times10^{12}$ | 14.53 | 2.58 | 5.09 |
| 2 | $6.50\times10^{12}$ | $5.30\times10^{12}$ | 15.13 | 2.89 | 5.19 |
| 3 | $6.30\times10^{12}$ | $3.73\times10^{13}$ | 14.07 | 2.49 | 4.91 |
| 4 | $1.10\times10^{13}$ | $7.60\times10^{12}$ | 14.20 | 2.52 | 5.04 |
| 5 | $6.20\times10^{13}$ | $3.51\times10^{13}$ | 13.67 | 2.41 | 4.99 |
| 7 | $7.10\times10^{13}$ | $1.72\times10^{13}$ | 13.53 | 2.39 | 5.06 |
| 10 | $6.20\times10^{13}$ | $1.79\times10^{13}$ | 13.61 | 2.39 | 5.11 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.20** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 และให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที เปรียบเทียบ**การกวนด้วยความเร็ว 100-500 รอบต่อนาที** เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/ Agitation speed** (rpm) | **Bacterial cells** at 0 h (CFU/mL) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6 in complex medium** for 24 h**:** | | | | | | |
| 100 | $3.18\times10^{6}$ | $2.18\times10^{13}$ | 33.98 | 5.97 | 7.00 | 1.16 |
| 200 | $3.36\times10^{6}$ | $4.36\times10^{14}$ | 36.48 | 6.41 | 7.02 | 1.47 |
| 300 | $3.18\times10^{6}$ | $4.18\times10^{14}$ | 39.89 | 7.01 | 7.00 | 1.25 |
| 400 | $3.10\times10^{6}$ | $5.10\times10^{13}$ | 34.78 | 6.11 | 6.95 | 1.18 |
| 500 | $3.50\times10^{6}$ | $1.50\times10^{13}$ | 27.75 | 4.88 | 6.98 | 0.95 |
| **SUT-NZT6 in minimal medium** for 48 h**:** | | | | | | |
| 100 | ~$2.18\times10^{13}$ | $3.65\times10^{13}$ | 35.03 | 6.16 | 7.10 | 0.56 |
| 200 | ~$4.36\times10^{14}$ | $1.85\times10^{14}$ | 37.61 | 6.61 | 7.05 | 0.92 |
| 300 | ~$4.18\times10^{14}$ | $4.50\times10^{15}$ | 41.12 | 7.23 | 7.05 | 0.43 |
| 400 | ~$5.10\times10^{13}$ | $2.70\times10^{13}$ | 35.86 | 6.30 | 6.95 | 0.76 |
| 500 | ~$1.50\times10^{13}$ | $1.65\times10^{13}$ | 28.61 | 5.03 | 6.90 | 0.45 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




**รูปที่ 3.14** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 จากการเลี้ยงในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 และให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที **เปรียบเทียบการกวนด้วยความเร็ว 100-500 รอบต่อนาที** เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากเลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1 ลิตร ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เลี้ยงด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์มาเลี้ยงใน Minimal medium ตามระบุข้างต้น

### 3.2.5 การศึกษาปริมาณการให้อากาศ (Aeration) ที่เหมาะสม เมื่อเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

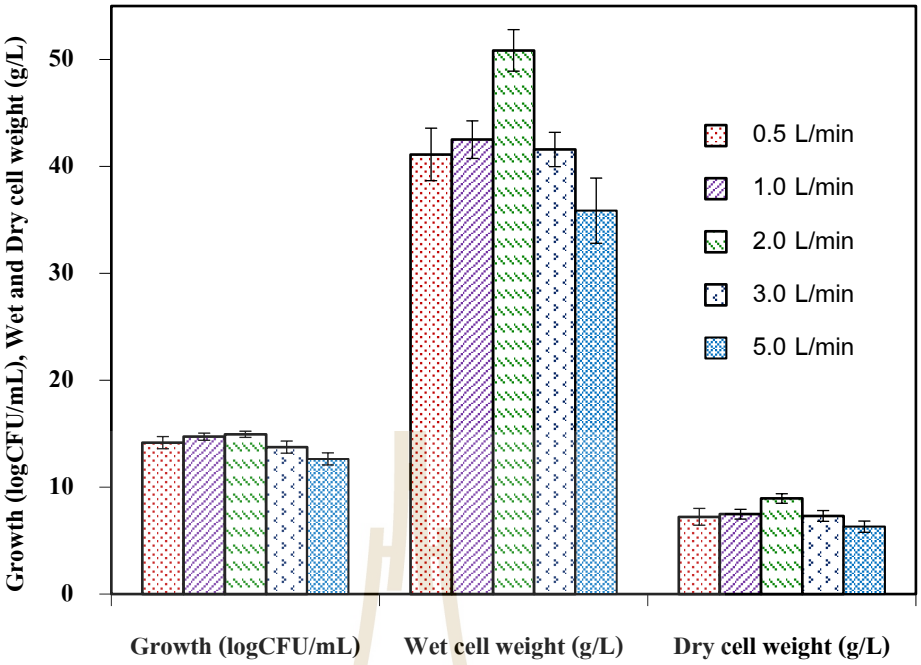
จากที่แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 มีการเจริญและผลิต PHA ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่คล้ายคลึงกัน จึงเลือก SUT-NZT6 เพื่อทดลองผลิต PHA จากการเลี้ยงให้เจริญในอาหาร Complex medium ที่มีแหล่งคาร์บอนหลักเตรียมจากแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เปรียบเทียบ**การให้อากาศ (Aeration) 0.50-5.0 ลิตรต่อนาที** เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 2.0 ลิตรต่อนาที (ตารางที่ 3.21 และรูปที่ 3.15) แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 มีการเจริญสูงสุดที่ $7.58\times10^{14}$ และ $8.75\times10^{14}$ CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหาร Complex medium และ Minimal medium เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ได้เซลล์แบคทีเรีย 44.32 และ 50.85 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) หรือ 7.67 และ 8.94 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.21 และรูปที่ 3.15) ตัวอย่างลักษณะการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ในอาหาร Complex medium ที่เหมาะสมจากการศึกษาปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร ที่เลี้ยงด้วยสภาวะข้างต้นและให้อากาศ 0.5, 2.0 และ 5.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังตัวอย่างลักษณะการเจริญในรูปที่ 3.16-3.18

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

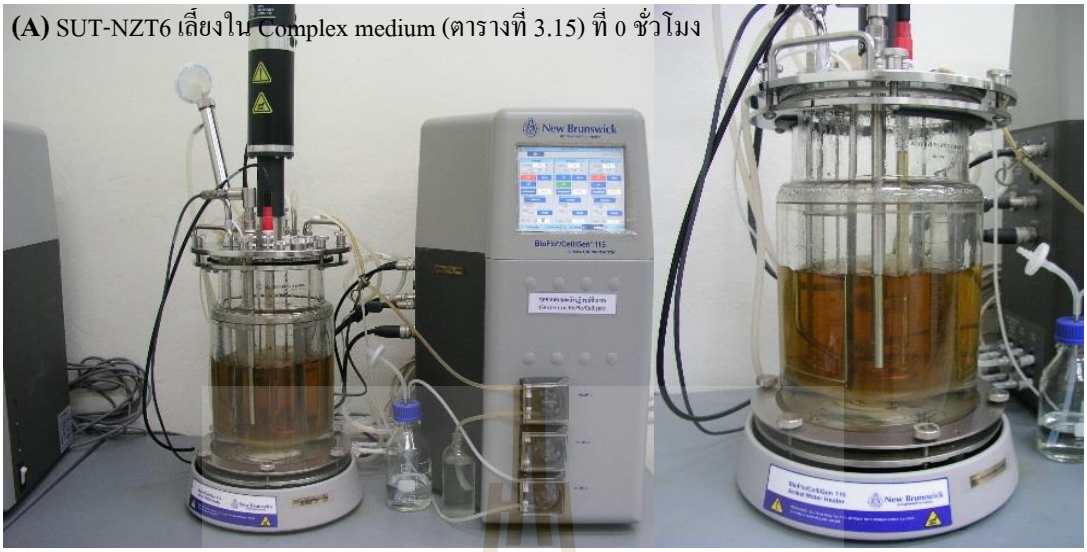
**ตารางที่ 3.21** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เปรียบเทียบ ให้อากาศ **0.50-5.0** ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Medium/Aeration** (L/min) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **Agitation** (rpm) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Complex medium:** | | | | | | |
| **0.5** at: | | | | | | |
| 0 h | $2.55\times10^{6}$ | 1.89 | 0.31 | 300 | 7.05 | 30.04 |
| 24 h | $1.55\times10^{14}$ | 39.89 | 7.01 | 300 | 7.10 | 1.05 |
| **1.0** at: | | | | | | |
| 0 h | $4.31\times10^{6}$ | 2.56 | 0.55 | 300 | 7.00 | 30.12 |
| 24 h | $3.30\times10^{14}$ | 41.23 | 7.25 | 300 | 6.97 | 1.56 |
| **2.0** at: | | | | | | |
| 0 h | $2.67\times10^{6}$ | 2.42 | 0.67 | 300 | 7.00 | 30.29 |
| 24 h | $7.58\times10^{14}$ | 44.32 | 7.67 | 300 | 7.00 | 1.79 |
| **3.0** at: | | | | | | |
| 0 h | $2.87\times10^{6}$ | 2.33 | 0.39 | 300 | 7.00 | 30.81 |
| 24 h | $5.80\times10^{13}$ | 39.33 | 6.95 | 300 | 7.00 | 1.51 |
| **5.0** at: | | | | | | |
| 0 h | $3.16\times10^{6}$ | 2.44 | 1.01 | 300 | 7.00 | 30.50 |
| 24 h | $2.50\times10^{13}$ | 34.78 | 6.11 | 300 | 7.05 | 1.86 |
| **Minimal medium** at 48 h: | | | | | | |
| 0.5 | $1.45\times10^{14}$ | 41.12 | 7.23 | 300 | 7.05 | 0.79 |
| 1.0 | $5.23\times10^{14}$ | 42.50 | 7.47 | 300 | 7.05 | 0.54 |
| 2.0 | $8.75\times10^{14}$ | 50.85 | 8.94 | 300 | 7.00 | 0.80 |
| 3.0 | $5.60\times10^{14}$ | 41.58 | 7.31 | 300 | 6.98 | 0.75 |
| 5.0 | $4.35\times10^{13}$ | 35.86 | 6.30 | 300 | 7.00 | 1.05 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

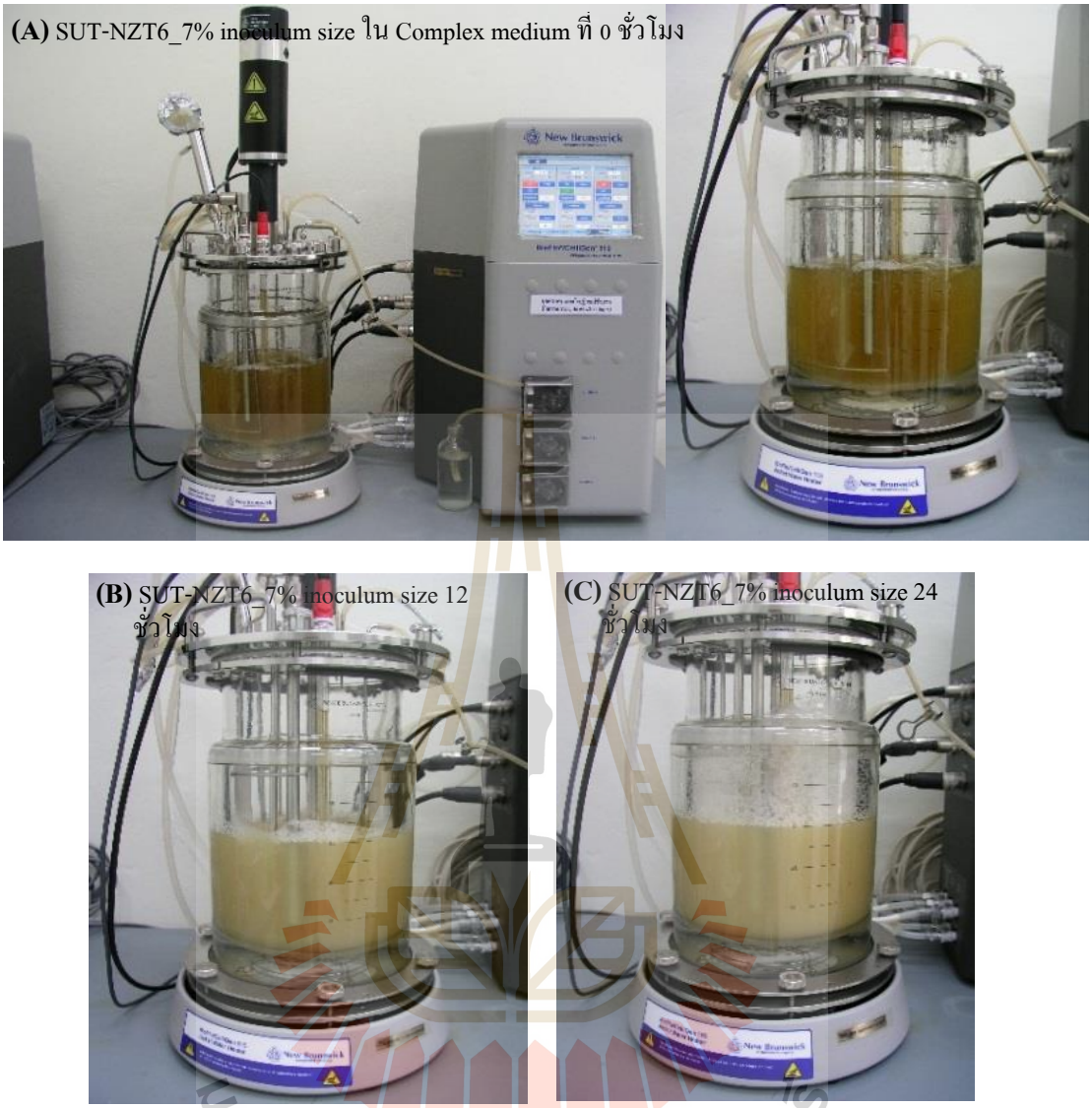



**รูปที่ 3.15** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ในอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เปรียบเทียบการให้อากาศ **0.50-5.0** ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1 ลิตร ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เลี้ยงด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ไปเลี้ยงต่อใน Minimal medium ข้างต้น



**รูปที่ 3.16** ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ในอาหาร Complex medium ที่ใช้ Hydrolyzed cassava starch 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที **ให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที** เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

**รูปที่ 3.17** ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรีย SUT-NZT6 ใน Complex medium ที่ใช้ Hydrolyzed cassava starch 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตรในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที **ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที** เป็นเวลา 24 ชั่วโมง




**รูปที่ 3.18** ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ใน Complex medium ที่ใช้ Hydrolyzed cassava starch 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 และกวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที **ให้อากาศ 5.0 ลิตรต่อนาที** เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.2.6 การพัฒนารูปแบบของการเลี้ยงแบคทีเรีย

ศึกษาวิธีการเลี้ยงแบคทีเรียแบบ Fed-batch process และพัฒนาให้ได้กระบวนการที่ปฏิบัติได้ง่าย ลดขั้นตอนการแยกเซลล์ออกจาก Complex medium หลังการเลี้ยง เพื่อนำตะกอนเซลล์ไปเลี้ยงใหม่ใน Minimal medium และใช้เวลาสั้นในการผลิต PHA โดยใช้ข้อมูลความต้องการสารอาหาร และปัจจัยทางกายภาพตามที่ได้ศึกษาแล้วมาช่วยวางแผนการพัฒนารูปแบบของการเลี้ยงแบคทีเรีย โดยคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มมวลของเซลล์ (น้ำหนักเปียก) ได้ไม่น้อยกว่า 80 กรัมต่อลิตร ในขั้นตอนนี้ได้ทดลองเติมอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการเลี้ยงและปรับเปลี่ยนสภาวะดังนี้

#### 3.2.6.1 วิธีการเลี้ยงแบคทีเรียแบบ Fed-batch ด้วยสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมจากผลการศึกษา

ศึกษาวิธีการเลี้ยงแบคทีเรียแบบ Fed-batch process และพัฒนาให้ได้กระบวนการที่ปฏิบัติได้ง่ายและใช้เวลาสั้นในการผลิต PHA โดยใช้ข้อมูลความต้องการสารอาหาร และปัจจัยทางกายภาพตามที่ได้ศึกษาแล้วมาช่วยวางแผนการพัฒนารูปแบบของการเลี้ยงแบคทีเรีย โดยคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มมวลของเซลล์ (น้ำหนักเปียก) ได้ไม่น้อยกว่า 80 กรัมต่อลิตร การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium ที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษา (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (ที่มีจำนวนเซลล์ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรโดยเฉลี่ย) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ (Aeration) 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium ที่ได้ศึกษา (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร ที่มีความเข้มข้นของส่วนประกอบของอาหารเท่ากับเริ่มต้น เลี้ยงต่อด้วยสภาวะเดิมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบการสะสม PHA ในเซลล์ของแบคทีเรียในช่วงที่เลี้ยงใน Minimal medium ที่ได้ผลผลิตเซลล์ 46.15 และ 44.26 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเปียก เท่ากับ 8.51 และ 7.53 กรัมต่อลิตร น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 3.19 และตารางที่ 3.23) เป็นปริมาณที่น้อยกว่าที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์และเลี้ยงต่อในอาหาร Minimal medium เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังผลการศึกษาข้างต้น (ข้อ 3.2.5) ซึ่งได้ปริมาณเซลล์ใน Minimal medium เท่ากับ 50.85 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเปียก หรือ 8.94 กรัมต่อลิตร น้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติในขั้นตอน Fed-batch process นี้ ดำเนินการได้ง่ายและใช้เวลาสั้นกว่าที่มีการปั่นแยกเซลล์ออกจาก Complex medium แล้วละลายตะกอนเซลล์เพื่อเลี้ยงให้มีการสะสม PHA ใน Minimal medium จึงเลือกการเลี้ยงแบบ Fed-batch process เพื่อพัฒนาต่อไป

**รูปที่ 3.19** ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) (A-D) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) (E-G) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร และเลี้ยงแบคทีเรียต่อเนื่องด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

**(E)** SUT-NZT6 ที่เติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) 0 ชั่วโมง ลงในเชื้อที่เลี้ยงใน Complex medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

**(F)** SUT-NZT6 หลังเติม Minimal medium ที่ 24 ชั่วโมง

**(G)** SUT-NZT6 ที่เลี้ยงใน Minimal medium 48 ชั่วโมง

รูปที่ **3.19** (ต่อ) ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) (A-D) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 อัตราเร็วการกวน 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) (E-G) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร และเลี้ยงแบคทีเรียต่อเนื่องด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

**ตารางที่ 3.22** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร เลี้ยงเชื้อต่อด้วยสถาวะเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/Fermentation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **Agitation** (rpm) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6:** | | | | | | |
| **Complex medium,** 3 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $2.50\times10^{6}$ | 1.61 | 0.41 | 300 | 7.10 | 31.57 |
| 6 | $1.42\times10^{10}$ | 12.72 | 1.67 | 300 | 7.10 | 19.79 |
| 12 | $5.70\times10^{13}$ | 29.22 | 4.55 | 300 | 7.15 | 6.55 |
| 24 | $8.10\times10^{14}$ | 32.76 | 5.85 | 300 | 7.21 | 1.89 |
| **Minimal medium** making up to 5 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $2.12\times10^{14}$ | 33.75 | 5.84 | 300 | 7.12 | 11.25 |
| 12 | $1.12\times10^{15}$ | 41.46 | 7.98 | 300 | 6.98 | 6.05 |
| 24 | $6.70\times10^{15}$ | 42.81 | 7.25 | 300 | 6.98 | 3.98 |
| 48 | $4.00\times10^{15}$ | 46.15 | 8.51 | 300 | 6.90 | 0.62 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.22** (ต่อ) ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร เลี้ยงเชื้อต่อด้วยสถาวะเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/Fermentation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **Agitation** (rpm) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars in the medium** (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT9:** | | | | | | |
| **Complex medium,** 3 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $2.88\times10^{6}$ | 2.51 | 0.43 | 300 | 7.09 | 30.94 |
| 6 | $1.34\times10^{10}$ | 8.12 | 1.45 | 300 | 6.85 | 22.17 |
| 12 | $1.12\times10^{13}$ | 21.34 | 4.86 | 300 | 6.86 | 11.59 |
| 24 | $2.65\times10^{14}$ | 33.75 | 5.46 | 300 | 6.85 | 2.15 |
| **Minimal medium** making up to 5 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $4.03\times10^{13}$ | 38.12 | 6.24 | 300 | 6.85 | 12.04 |
| 12 | $2.56\times10^{14}$ | 43.88 | 7.46 | 300 | 6.85 | 8.15 |
| 24 | $4.76\times10^{14}$ | 44.27 | 7.53 | 300 | 6.80 | 4.12 |
| 36 | $1.53\times10^{14}$ | 44.35 | 7.55 | 300 | 6.90 | 1.85 |
| 48 | $4.57\times10^{14}$ | 44.26 | 7.53 | 300 | 6.90 | 1.10 |

### 3.2.6.2 วิธีการเลี้ยงแบคทีเรียแบบ Fed-batch ด้วยการปรับสภาวะการเลี้ยง

ได้ทดลองพัฒนากรรมวิธีการเลี้ยงแบคทีเรียต่อ โดยผลิตเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ด้วยอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) และ Minimal medium (ตารางที่ 3.15) และปรับสภาวะการเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ดังนี้

**ก. ปริมาณแหล่งคาร์บอน และความเร็วรอบของการกวน (Agitation) ที่ต่างกันเมื่อเลี้ยงใน Complex medium และ Minimal medium**

ทดสอบความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) แต่เพิ่มน้ำตาลกลูโคส จาก 10 เป็น 20 กรัมต่อลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้นแต่กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าได้เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Minimal medium ปริมาณ 40.71 และ 37.99 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) เท่ากับ 7.79 และ 7.26 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.23 และรูปที่ 3.20) ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับการใช้ Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร จึงเลือกใช้กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เป็นส่วนประกอบอาหารเช่นเดิม

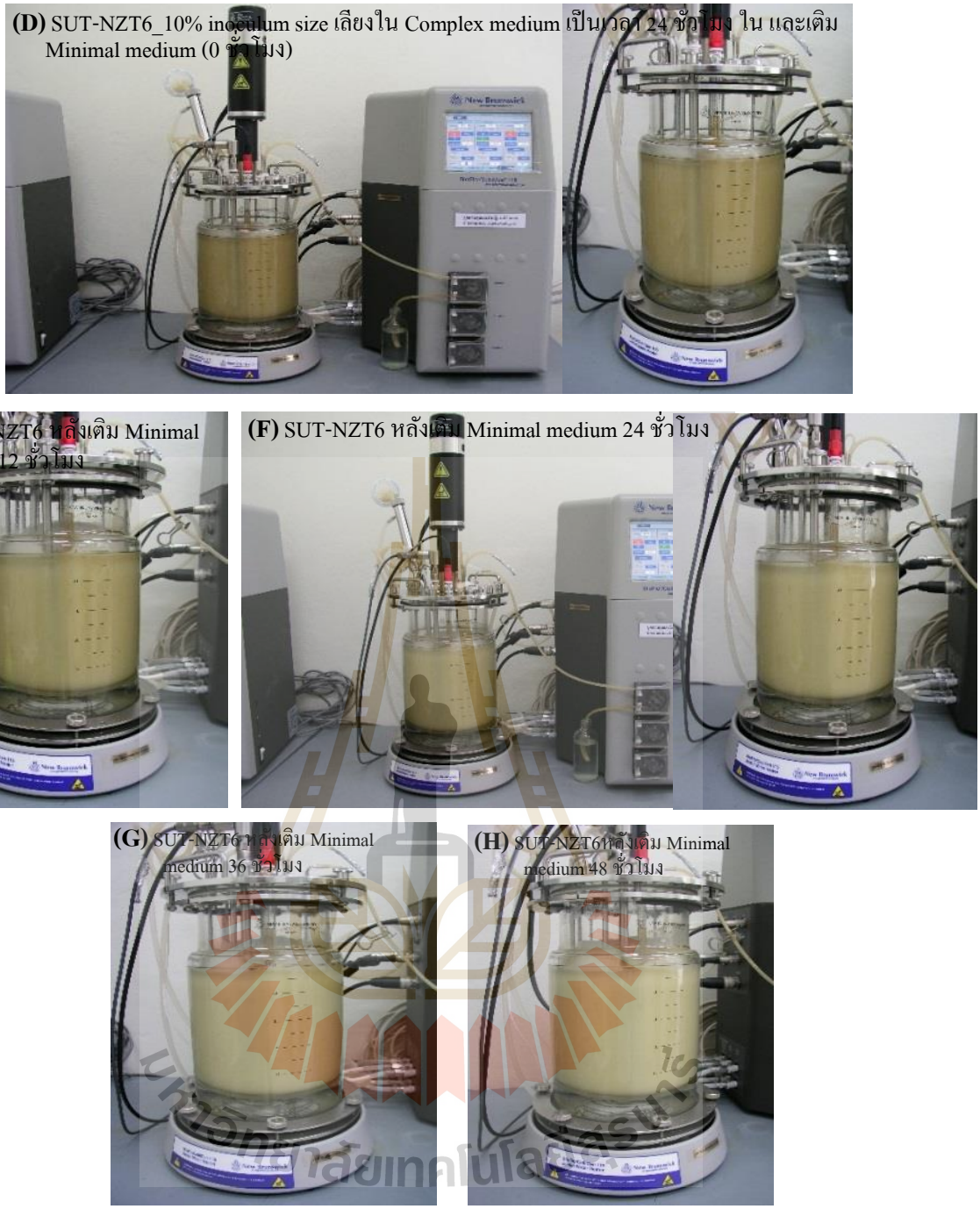
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.23** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) **แต่เพิ่มน้ำตาลกลูโคส จาก 10 เป็น 20 กรัมต่อลิตร** ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/Fermentation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **Agitation** (rpm) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6:** | | | | | | |
| **Complex medium,** 3 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $8.30\times10^{6}$ | 2.31 | 0.59 | 300 | 7.10 | 29.95 |
| 12 | $6.60\times10^{12}$ | 10.99 | 3.26 | 300 | 7.09 | 15.13 |
| 18 | $1.22\times10^{13}$ | 27.95 | 3.25 | 300 | 7.10 | 6.09 |
| 24 | $6.26\times10^{14}$ | 29.68 | 3.59 | 300 | 7.16 | 2.23 |
| **Minimal medium** making up to 5 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $2.11\times10^{13}$ | 29.39 | 6.53 | 300 | 7.11 | 20.91 |
| 12 | $7.75\times10^{14}$ | 30.11 | 7.67 | 300 | 7.05 | 11.97 |
| 24 | $5.21\times10^{14}$ | 39.82 | 7.61 | 300 | 6.97 | 5.52 |
| 36 | $5.10\times10^{14}$ | 39.79 | 7.54 | 300 | 6.88 | 2.39 |
| 48 | $4.56\times10^{14}$ | 40.71 | 7.79 | 300 | 6.88 | 1.45 |
| **SUT-NZT9:** | | | | | | |
| **Complex medium,** 3 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $4.08\times10^{6}$ | 2.58 | 0.64 | 300 | 7.09 | 29.98 |
| 12 | $6.93\times10^{12}$ | 16.29 | 2.93 | 300 | 6.85 | 16.37 |
| 18 | $1.57\times10^{13}$ | 27.18 | 3.09 | 300 | 6.86 | 5.50 |
| 24 | $8.00\times10^{13}$ | 27.94 | 3.25 | 300 | 6.90 | 1.97 |
| **Minimal medium** making up to 5 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $2.05\times10^{13}$ | 37.37 | 7.13 | 300 | 6.90 | 20.45 |
| 12 | $3.46\times10^{13}$ | 37.58 | 7.18 | 300 | 6.85 | 10.15 |
| 24 | $3.90\times10^{13}$ | 37.86 | 7.23 | 300 | 6.85 | 8.23 |
| 36 | $4.35\times10^{13}$ | 37.94 | 7.25 | 300 | 6.85 | 3.19 |
| 48 | $4.10\times10^{13}$ | 37.99 | 7.26 | 300 | 6.87 | 1.05 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**รูปที่ 3.20** ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรีย SUT-NZT6 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) (A-C) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 และกวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) **แต่เพิ่มน้ำตาลกลูโคส จาก 10 เป็น 20 กรัมต่อลิตร** (D-H) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



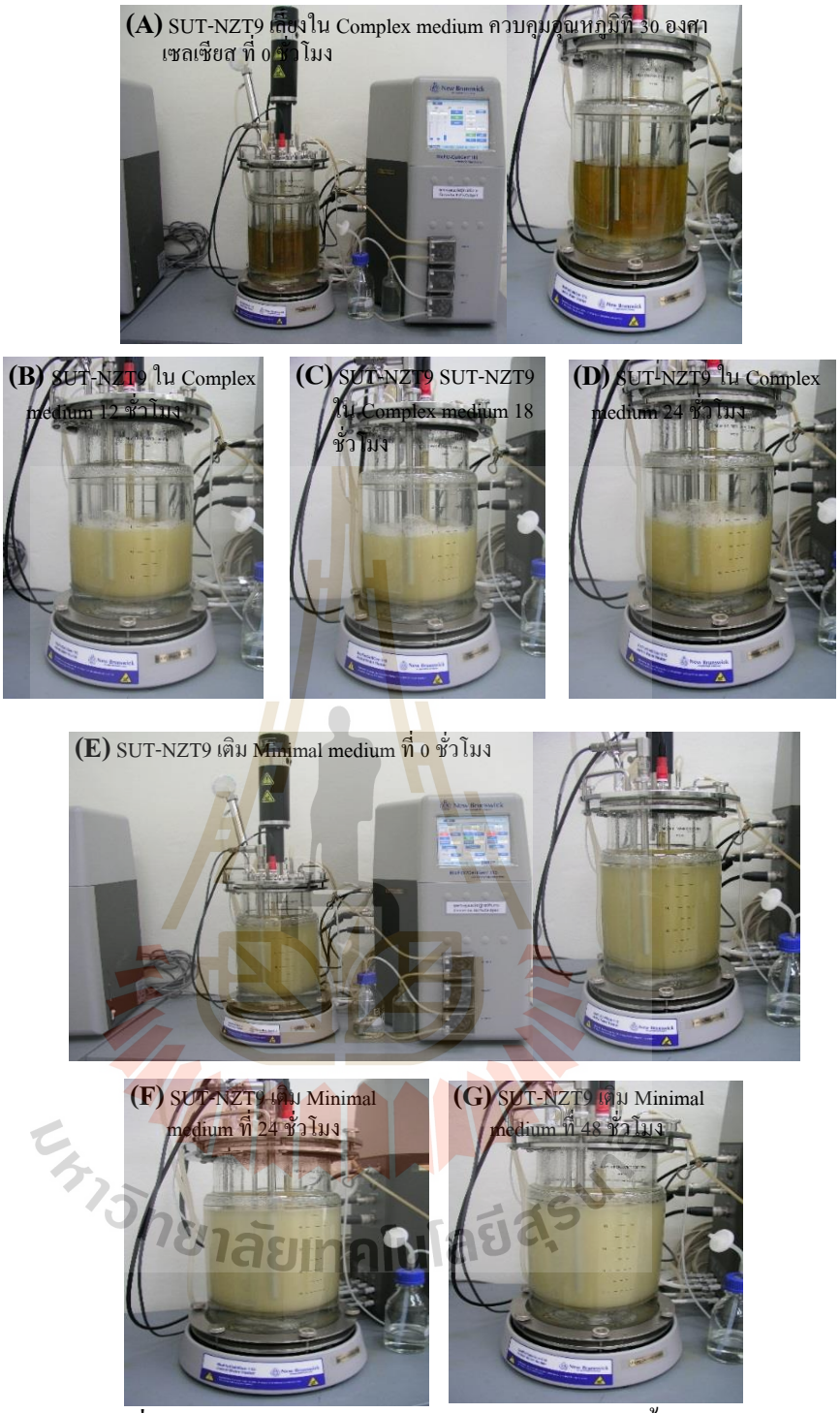

**รูปที่ 3.20** (ต่อ) ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรีย SUT-NZT6 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) (A-C) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 และ**กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที** ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) **แต่เพิ่มน้ำตาลกลูโคส จาก 10 เป็น 20 กรัมต่อลิตร** (D-H) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

**ข. ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Inoculum size) การให้อากาศ (Aeration) และความเร็วรอบของการกวน (Agitation) ที่ต่างกันเมื่อเลี้ยงใน Complex medium และ Minimal medium**

จากที่ได้พัฒนากรรมวิธีการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 โดยเพิ่มปริมาณ**เชื้อเริ่มต้น (Inoculum size) ด้วยคาดหวังจะได้ปริมาณเซลล์มาก เปรียบเทียบปริมาณเชื้อเริ่มต้น 7 และ 10%** จากที่มีผลการศึกษาข้างต้นที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย) มีความเหมาะสม เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ใน Complex medium ที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษา (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ใช้ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 **กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที** และให้อากาศ (Aeration) 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดิม แต่**กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที** เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้**ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 7%** โดยปริมาตร ได้เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Minimal medium ปริมาณ 30.77 และ 30.49 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) เท่ากับ 5.75 และ 5.74 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.24 และรูปที่ 3.21) และจากที่ใช้**ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10%** โดยปริมาตร ได้เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Minimal medium ปริมาณ 50.71 และ 50.49 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) เท่ากับ 8.75 และ 8.74 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.25) ที่ให้ผลการผลิตเซลล์แบคทีเรียที่ดีกว่าการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 7%

ทางโครงการฯ ได้พยายามปรับส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อต่อเพื่อให้มีราคาถูกลง โดยศึกษาความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ใช้**ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10%** โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 **กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที** และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม **Minimal medium** (ตารางที่ 3.15) **ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้นสุดท้าย 30 กรัมต่อลิตร** แทนน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น แต่**กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที** เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้เซลล์แบคทีเรียในอาหาร Minimal medium ปริมาณ 45.69 และ 46.74 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) เท่ากับ 7.76 และ 7.81 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.26 และ 3.27)

จากผลที่ได้ สรุปในภาพรวมปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร และอาหาร Minimal medium กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ยังคงเหมาะสมต่อการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ให้ผลิต PHA จึงเลือกใช้กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เป็นส่วนประกอบอาหารเช่นเดิม




**รูปที่ 3.21** ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรีย SUT-NZT9 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (A-D) ที่เหมาะสมจากการศึกษา (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 7% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (E-G) (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร และเลี้ยงแบคทีเรียต่อเนื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

**ตารางที่ 3.24** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium ที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษา (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ใช้**ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 7%** โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเฉลี่ย) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 **กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที** และให้อากาศ (Aeration) 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดิม แต่**กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที** เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial code/ Medium/Cultivation time** (h) | **Agitation** (rpm) | **pH** of the cultivated medium | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6:** | | | | | |
| Complex medium**,** 3 L working volume: | | | | | |
| 0 | 300 | 7.00 | $9.18\times10^{6}$ | 2.39 | 0.60 |
| 6 | 300 | 7.09 | $6.03\times10^{10}$ | 10.99 | 1.89 |
| 12 | 300 | 7.08 | $8.33\times10^{15}$ | 21.89 | 4.02 |
| 24 | 300 | 7.14 | $9.36\times10^{16}$ | 26.71 | 4.96 |
| Minimal medium[1] making up to 5 L working volume: | | | | | |
| 0 | 500 | 7.11 | $1.65\times10^{15}$ | 26.68 | 4.95 |
| 12 | 500 | 7.18 | $3.00\times10^{15}$ | 28.13 | 5.23 |
| 24 | 500 | 7.18 | $1.43\times10^{17}$ | 29.03 | 5.41 |
| 36 | 500 | 7.06 | $1.62\times10^{17}$ | 30.42 | 5.69 |
| 48 | 500 | 6.95 | $1.50\times10^{17}$ | 30.77 | 5.75 |
| **SUT-NZT9:** | | | | | |
| Complex medium**,** 3 L working volume: | | | | | |
| 0 | 300 | 6.98 | $8.90\times10^{6}$ | 2.10 | 0.55 |
| 6 | 300 | 6.98 | $4.66\times10^{10}$ | 15.99 | 2.87 |
| 12 | 300 | 7.20 | $2.96\times10^{14}$ | 17.39 | 3.14 |
| 24 | 300 | 7.26 | $2.44\times10^{16}$ | 28.02 | 426 |
| Minimal medium[1] making up to 5 L working volume: | | | | | |
| 0 | 500 | 7.14 | $7.50\times10^{15}$ | 27.35 | 4.13 |
| 12 | 500 | 7.15 | $4.18\times10^{15}$ | 29.38 | 4.53 |
| 24 | 500 | 7.15 | $5.18\times10^{15}$ | 29.22 | 4.50 |
| 36 | 500 | 7.10 | $6.76\times10^{16}$ | 29.75 | 4.59 |
| 48 | 500 | 7.10 | $1.81\times10^{16}$ | 30.49 | 5.74 |

หมายเหตุ: [1], เซลล์ที่เลี้ยงใน Minimal medium มี PHA สะสมจากการตรวจหาด้วยด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ใช้เซลล์ในขั้นตอนการสกัดสาร PHA (ข้อ 3.3)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.25** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ใช้**ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10%** โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 **กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที** และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น แต่**กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที** เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isoalate code/ Medium/ Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **Agitation speed** (rpm) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6:** | | | | | | |
| **Complex medium,** 3 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $9.18\times10^{6}$ | 2.39 | 0.61 | 300 | 7.00 | 32.05 |
| 6 | $6.03\times10^{10}$ | 20.99 | 1.89 | 300 | 7.09 | 24.35 |
| 12 | $8.33\times10^{15}$ | 31.89 | 4.02 | 300 | 7.08 | 17.61 |
| 24 | $9.36\times10^{16}$ | 36.71 | 4.96 | 300 | 7.14 | 1.98 |
| **Minimal medium** making up to 5 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $1.65\times10^{15}$ | 36.68 | 4.67 | 500 | 7.11 | 12.19 |
| 12 | $3.00\times10^{15}$ | 48.13 | 7.23 | 500 | 7.18 | 7.83 |
| 24 | $1.43\times10^{16}$ | 49.03 | 8.41 | 500 | 7.18 | 3.55 |
| 36 | $1.62\times10^{16}$ | 50.43 | 8.68 | 500 | 7.06 | 1.04 |
| 48 | $1.50\times10^{16}$ | 50.77 | 8.75 | 500 | 6.95 | 0.86 |
| **SUT-NZT9:** | | | | | | |
| **Complex medium,** 3 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $8.90\times10^{6}$ | 2.09 | 0.55 | 300 | 6.98 | 31.05 |
| 6 | $4.66\times10^{10}$ | 15.99 | 2.87 | 300 | 6.98 | 25.52 |
| 12 | $2.96\times10^{14}$ | 27.38 | 3.14 | 300 | 7.20 | 13.97 |
| 24 | $2.44\times10^{16}$ | 38.02 | 3.26 | | 7.26 | 1.95 |
| **Minimal medium** making up to 5 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $7.50\times10^{15}$ | 37.35 | 3.13 | 500 | 7.14 | 12.15 |
| 12 | $4.18\times10^{15}$ | 46.38 | 6.87 | 500 | 7.15 | 6.15 |
| 24 | $5.18\times10^{15}$ | 49.22 | 8.49 | 500 | 7.15 | 4.65 |
| 36 | $6.76\times10^{16}$ | 49.75 | 8.59 | 500 | 7.10 | 1.30 |
| 48 | $1.81\times10^{16}$ | 50.49 | 8.74 | 500 | 7.10 | 0.24 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.26** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ใช้**ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10%** โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 **กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที** และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม **Minimal medium** (ตารางที่ 3.15) **ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้นสุดท้าย 30 กรัมต่อลิตร** แทนน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น แต่**กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที** เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Medium/Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **Agitation speed** (rpm) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Complex medium,** 3 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $5.34\times10^{6}$ | 2.44 | 0.81 | 300 | 7.09 | 30.52 |
| 12 | $1.10\times10^{12}$ | 22.72 | 3.64 | 300 | 7.16 | 16.46 |
| 18 | $3.50\times10^{15}$ | 30.97 | 4.84 | 300 | 7.26 | 4.89 |
| 24 | $1.67\times10^{15}$ | 34.42 | 6.51 | 300 | 7.26 | 1.55 |
| **Minimal medium** making up to 5 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $1.45\times10^{14}$ | 30.94 | 6.42 | 500 | 7.15 | 31.81 |
| 12 | $1.26\times10^{15}$ | 44.21 | 7.47 | 500 | 7.15 | 18.34 |
| 24 | $2.50\times10^{15}$ | 44.72 | 7.57 | 500 | 7.08 | 11.50 |
| 36 | $2.30\times10^{15}$ | 44.93 | 7.61 | 500 | 6.96 | 6.09 |
| 48 | $2.39\times10^{15}$ | 45.69 | 7.76 | 500 | 6.88 | 3.07 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.27** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ใช้**ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10%** โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 **กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที** และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม **Minimal medium** (ตารางที่ 3.15) **ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้นสุดท้าย 30 กรัมต่อลิตร** แทนน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้น แต่**กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที** เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Medium/ Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **Agitation** (rpm) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Complex medium,** 3 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $5.33\times10^{6}$ | 2.30 | 0.78 | 300 | 7.20 | 30.60 |
| 10 | $3.09\times10^{15}$ | 35.75 | 5.67 | 300 | 6.97 | 17.85 |
| 18 | $2.14\times10^{15}$ | 38.00 | 6.06 | 300 | 6.81 | 10.20 |
| 24 | $1.71\times10^{15}$ | 35.85 | 6.64 | 300 | 6.96 | 2.70 |
| **Minimal medium** making up to 5 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $2.20\times10^{14}$ | 34.85 | 6.45 | 500 | 6.95 | 10.20 |
| 12 | $1.59\times10^{15}$ | 42.60 | 7.01 | 500 | 6.96 | 4.50 |
| 24 | $8.43\times10^{15}$ | 46.55 | 7.78 | 500 | 7.88 | 1.95 |
| 48 | $3.95\times10^{15}$ | 46.74 | 7.81 | 500 | 7.20 | 0.38 |

**ค. การเติมอาหาร** Complex medium **ในระหว่างการเลี้ยงแบคทีเรีย**

ศึกษาช่วงเวลาการเติมอาหาร Complex medium ระหว่างการเลี้ยงแบคทีเรียใน Complex medium ช่วง Log phase จำนวน 2-4 ครั้ง ได้ผลดังนี้

ผลการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ที่พัฒนารูปแบบของการเลี้ยงแบคทีเรียใน Complex medium (ตารางที่ 3.15) **ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5%** โดยปริมาตร (ที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1.5 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) มีการเติม Complex medium ปริมาตร 0.5 ลิตร **ที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมง**ของการเลี้ยงเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 **กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที** และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 มีการเจริญสูงสุดในอาหาร Minimal medium ที่ $9.10\times10^{16}$ และ $3.95\times10^{15}$ CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้เซลล์ปริมาณ 69.93 และ 56.74 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) เท่ากับ 13.01 และ 10.88 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.28)

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1.5 ลิตรในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.00 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที อัตราเร็วการกวน 300 รอบต่อนาที เติมอาหารใหม่จำนวน 3 ครั้ง **ที่เวลา 10, 14 และ 18 ชั่วโมง** ของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติมอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 มีการเจริญสูงสุดในอาหาร Minimal medium ที่ $5.05\times10^{16}$ และ $3.95\times10^{16}$CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้เซลล์ปริมาณ 72.03 และ 70.65 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) เท่ากับ 12.66 และ 12.42กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.29) สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้เล็กน้อยเมื่อเทียบกับการเติมอาหาร Complex medium ปริมาตร 0.5 ลิตร 2 ครั้ง ที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

จากนั้นได้ทดลองผลิต PHA จากการเลี้ยงแบคทีเรีย SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ที่เลี้ยงให้เจริญในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เติมอาหารใหม่จำนวน 4 ครั้ง **ที่เวลา 10, 12, 14 และ 18 ชั่วโมง**ของการเลี้ยงเชื้อ

ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แทนที่ปริมาตร 1 ลิตร ด้วย Minimal medium (ตารางที่ 3.15) เข้มข้น 5 เท่า โดยการปั่นเหวี่ยงแยกของเหลวออก เลี้ยงด้วยสภาวะการเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 มีการเจริญสูงสุดในอาหาร Minimal medium ที่ $5.43\times10^{17}$ และ $1.27\times10^{16}$ CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้เซลล์ปริมาณ 81.57 และ 79.48 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) เท่ากับ 15.13 และ 14.03 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.30 และรูปที่ 3.22)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.28** ผลผลิตเซลล์เพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ที่พัฒนารูปแบบของการเลี้ยงแบคทีเรียใน Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (ที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1.5 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร มีการเติม Complex medium ปริมาตร 0.5 ลิตร ที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial code/ Medium/Cultivation time** (h) | **Agitation** (rpm) | **pH** of the cultivated medium | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6:** | | | | | |
| Complex medium/ Volume: | | | | | |
| 0/ 1.5 L | 300 | 7.00 | $4.39\times10^{6}$ | 2.17 | 0.65 |
| 10/ 1.5+0.5 L | 300 | 7.01 | $1.91\times10^{15}$ | 40.45 | 7.82 |
| 18/ 2.0+0.5 L | 300 | 7.06 | $8.65\times10^{15}$ | 49.37 | 8.03 |
| 24/ 2.5 L | 300 | 7.10 | $9.87\times10^{15}$ | 50.23 | 8.17 |
| Minimal medium[1] making up to 5 L working volume: | | | | | |
| 0 | 300 | 7.10 | $2.71\times10^{15}$ | 49.61 | 8.11 |
| 12 | 300 | 7.15 | $3.65\times10^{15}$ | 58.13 | 11.32 |
| 24 | 300 | 7.15 | $5.42\times10^{16}$ | 59.11 | 11.51 |
| 36 | 300 | 7.03 | $5.97\times10^{16}$ | 69.58 | 12.88 |
| 48 | 300 | 6.98 | $9.10\times10^{16}$ | 69.93 | 13.01 |
| **SUT-NZT9:** | | | | | |
| Complex medium: | | | | | |
| 0/ 1.5 L | 300 | 7.20 | $5.33\times10^{6}$ | 2.30 | 0.78 |
| 10/ 1.5+0.5 L | 300 | 6.97 | $3.09\times10^{15}$ | 45.75 | 8.67 |
| 18/ 2.0+0.5 L | 300 | 6.81 | $2.14\times10^{15}$ | 58.00 | 11.06 |
| 24/ 2.5 L | 300 | 6.96 | $1.71\times10^{15}$ | 55.85 | 10.64 |
| Minimal medium[1] making up to 5 L working volume: | | | | | |
| 0 | 300 | 6.95 | $2.20\times10^{14}$ | 54.85 | 10.44 |
| 12 | 300 | 6.96 | $1.59\times10^{15}$ | 52.60 | 10.01 |
| 24 | 300 | 7.88 | $8.43\times10^{15}$ | 56.55 | 10.78 |
| 48 | 300 | 7.20 | $3.95\times10^{15}$ | 56.74 | 10.88 |

หมายเหตุ: [1], เซลล์ที่เลี้ยงใน Minimal medium มี PHA สะสมจากการตรวจหาด้วยด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ใช้เซลล์ในขั้นตอนการสกัดสาร PHA (ข้อ 3.3)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.29** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 1.5 ลิตรในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที อัตราเร็วการกวน 300 รอบต่อนาที เติมอาหาร Complex medium ใหม่เพิ่มจำนวน 3 ครั้ง ที่เวลา 10, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง และเติมอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/ Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **Agitation** (rpm) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6:** | | | | | | |
| **Complex medium/ Volume:** | | | | | | |
| 0/ 1.5 L | $5.00\times10^{6}$ | 2.05 | 0.71 | 300 | 7.10 | 31.19 |
| 10/ 1.5+0.5 L | $2.69\times10^{13}$ | 25.10 | 4.41 | 300 | 6.97 | 20.35 |
| 14/ 2.0+0.5 L | $3.90\times10^{16}$ | 32.97 | 5.71 | 300 | 6.95 | 16.56 |
| 18/ 2.5+0.5 L | $1.73\times10^{16}$ | 48.50 | 7.28 | 300 | 7.05 | 7.21 |
| 24/ 3.0 L | $4.40\times10^{16}$ | 53.75 | 8.20 | 300 | 7.00 | 1.52 |
| **Minimal medium** making up to 5 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $6.05\times10^{15}$ | 50.65 | 7.66 | 300 | 6.90 | 13.05 |
| 12 | $3.50\times10^{16}$ | 62.60 | 11.00 | 300 | 6.98 | 6.23 |
| 24 | $7.95\times10^{16}$ | 68.31 | 12.01 | 300 | 7.00 | 2.15 |
| 48 | $5.05\times10^{16}$ | 72.03 | 12.66 | 300 | 7.00 | 0.55 |

**ตารางที่ 3.29** (ต่อ) ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 1.5 ลิตรในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที อัตราเร็วการกวน 300 รอบต่อนาที เติมอาหาร Complex medium ใหม่เพิ่มจำนวน 3 ครั้ง ที่เวลา 10, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง และเติมอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Bacterial isolate code/ Medium/ Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **Agitation** (rpm) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT9:** | | | | | | |
| **Complex medium:** | | | | | | |
| 0/ 1.5 L | $4.33\times10^{6}$ | 2.30 | 0.76 | 300 | 7.15 | 30.64 |
| 10/ 1.5+0.5 L | $3.09\times10^{15}$ | 26.90 | 4.73 | 300 | 6.97 | 18.60 |
| 14/ 2.0+0.5 L | $2.14\times10^{16}$ | 30.85 | 5.42 | 300 | 7.00 | 14.26 |
| 18/ 2.5+0.5 L | $4.26\times10^{16}$ | 54.46 | 9.57 | 300 | 7.00 | 8.79 |
| 24/ 3.0 L | $5.79\times10^{15}$ | 60.59 | 10.65 | 300 | 6.96 | 2.05 |
| **Minimal medium** making up to 5 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | $7.15\times10^{14}$ | 59.10 | 10.39 | 300 | 6.95 | 12.40 |
| 12 | $1.58\times10^{16}$ | 62.55 | 10.99 | 300 | 7.00 | 5.66 |
| 24 | $8.43\times10^{16}$ | 65.40 | 11.49 | 300 | 7.00 | 2.50 |
| 30 | $2.15\times10^{16}$ | 68.21 | 11.99 | 300 | 7.10 | 1.95 |
| 48 | $3.95\times10^{16}$ | 70.65 | 12.42 | 300 | 7.00 | 0.68 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.30** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เติมอาหาร Complex medium ใหม่เพิ่มจำนวน 4 ครั้ง ที่เวลา 10, 12, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง แทนที่ปริมาตร 1 ลิตร ด้วย Minimal medium (ตารางที่ 3.15) เข้มข้น 5 เท่า โดยการปั่นเหวี่ยงแยกของเหลวออก เลี้ยงด้วยสภาวะการเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

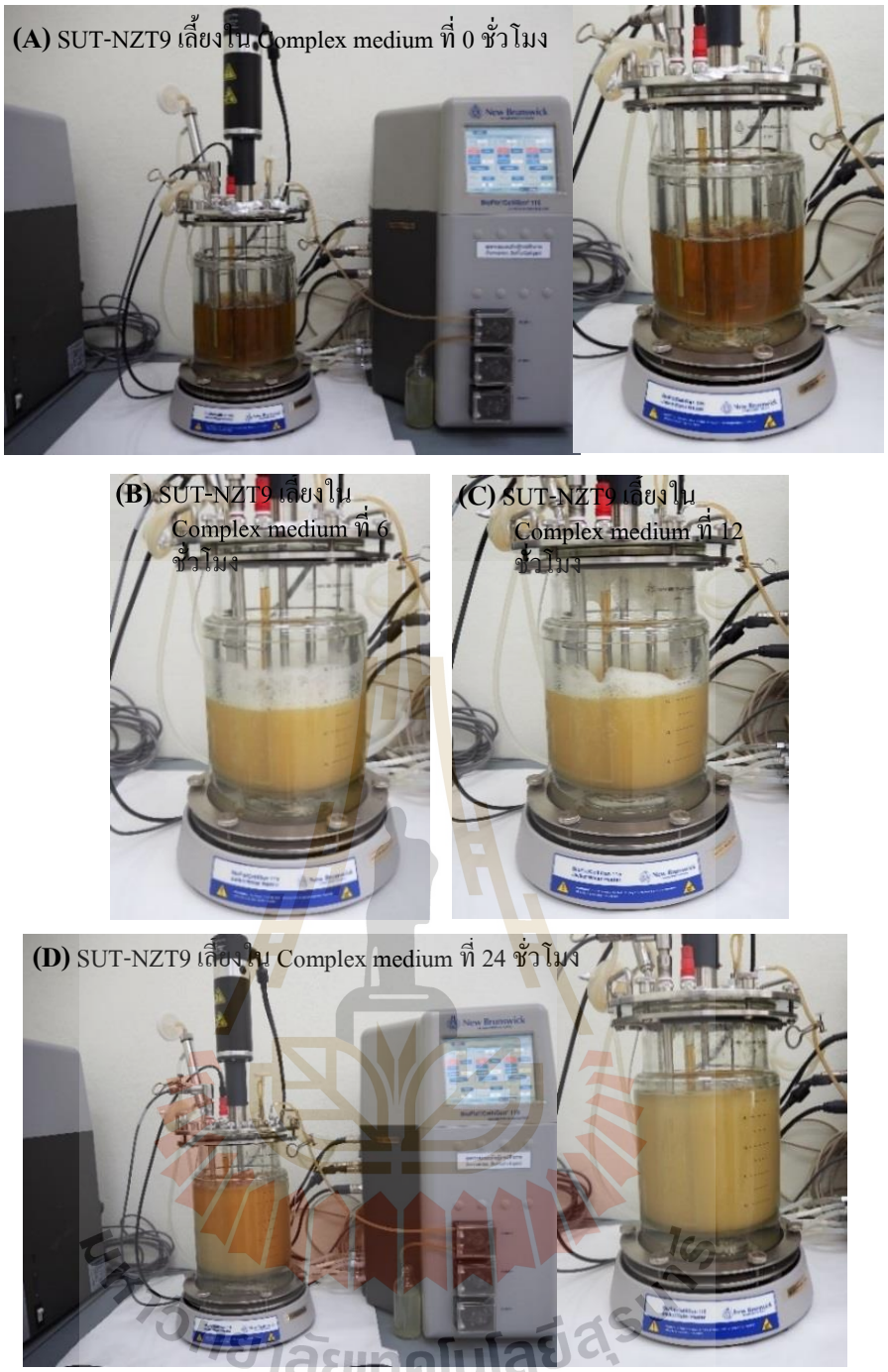
| **Bacterial isolate code/ Medium/ Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT6:** | | | | | |
| **Complex medium/ Volume:** | | | | | |
| 0/ 3 L | $1.65\times10^{6}$ | 2.76 | 0.81 | 7.00 | 31.12 |
| 10/ 3+0.5 L | $1.23\times10^{13}$ | 26.44 | 8.22 | 7.00 | 27.01 |
| 12/ 3.5+0.5 L | $3.98\times10^{16}$ | 30.88 | 9.38 | 7.00 | 15.05 |
| 14/ 4.0+0.5 L | $5.33\times10^{17}$ | 41.76 | 12.23 | 7.00 | 11.03 |
| 18/ 4.5+0.5 L | $1.02\times10^{18}$ | 57.55 | 13.21 | 7.00 | 7.10 |
| 24/ 5 L | $1.55\times10^{18}$ | 74.65 | 13.27 | 7.00 | 2.08 |
| **Minimal medium** (1 L of 5X concentration to replace 1 L of cultured complex medium)**:** | | | | | |
| 0 | $1.70\times10^{17}$ | 73.42 | 13.12 | 6.90 | 12.43 |
| 12 | $1.88\times10^{17}$ | 73.40 | 14.19 | 6.99 | 6.78 |
| 24 | $1.98\times10^{17}$ | 75.04 | 14.89 | 7.00 | 2.80 |
| 48 | $5.43\times10^{17}$ | 81.57 | 15.13 | 7.00 | 2.19 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ตารางที่ 3.30** (ต่อ) ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เติมอาหาร Complex medium ใหม่เพิ่มจำนวน 4 ครั้ง ที่เวลา 10, 12, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง แทนที่ปริมาตร 1 ลิตร ด้วย Minimal medium (ตารางที่ 3.15) เข้มข้น 5 เท่า โดยการปั่นเหวี่ยงแยกของเหลวออก เลี้ยงด้วยสภาวะการเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Medium/ Cultivation time** (h) | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **pH** of the cultivated medium | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| **SUT-NZT9** | | | | | |
| **Complex medium/ Volume:** | | | | | |
| 0/ 3 L | $1.28\times10^{6}$ | 2.50 | 0.79 | 6.90 | 31.08 |
| 10/ 3+0.5 L | $1.36\times10^{13}$ | 18.45 | 3.24 | 7.05 | 26.01 |
| 12/ 3.5+0.5 L | $4.75\times10^{16}$ | 30.60 | 5.38 | 7.00 | 14.75 |
| 14/ 4.0+0.5 L | $5.45\times10^{17}$ | 40.90 | 7.89 | 7.00 | 10.98 |
| 18/ 4.5+0.5 L | $1.06\times10^{18}$ | 58.68 | 10.32 | 7.00 | 6.49 |
| 24/ 5 L | $1.87\times10^{18}$ | 73.79 | 12.97 | 7.00 | 2.15 |
| **Minimal medium** (1 L of 5X concentration to replace 1 L of cultured complex medium)**:** | | | | | |
| 0 | $4.70\times10^{15}$ | 73.42 | 12.90 | 6.95 | 12.56 |
| 6 | $1.38\times10^{16}$ | 73.40 | 12.89 | 6.90 | 6.79 |
| 18 | $1.36\times10^{17}$ | 75.04 | 13.19 | 7.00 | 2.70 |
| 24 | $9.40\times10^{17}$ | 75.37 | 13.25 | 7.05 | 2.28 |
| 30 | $3.30\times10^{17}$ | 77.90 | 13.69 | 7.00 | 1.20 |
| 48 | $1.27\times10^{16}$ | 79.48 | 14.03 | 7.00 | 0.62 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




**รูปที่ 3.22** ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียไอโซเลท SUT-NZT9 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) (A-D) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวน 300 รอบต่อนาที เติมอาหาร Complex medium ใหม่เพิ่มจำนวน 4 ครั้ง ที่เวลา 10, 12, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง แทนที่ปริมาตร 1 ลิตร ด้วย Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ความเข้มข้น 5 เท่า โดยการปั่นเหวี่ยงแยกของเหลวออก (E-H) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

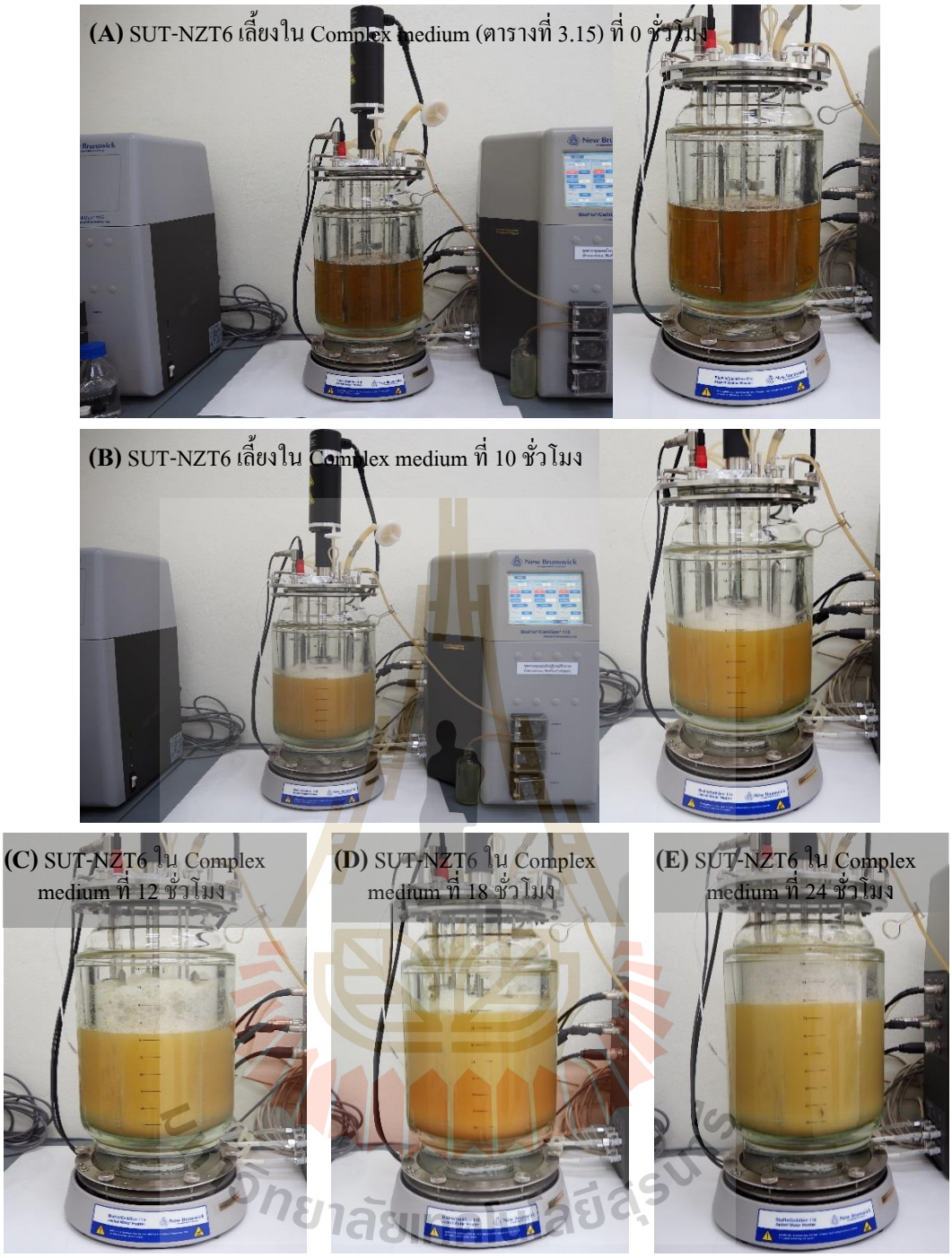
**รูปที่ 3.22** (ต่อ) ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียไอโซเลท SUT-NZT9 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) (A-D) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 3 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวน 300 รอบต่อนาที เติมอาหาร Complex medium ใหม่เพิ่มจำนวน 4 ครั้ง ที่เวลา 10, 12, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง แทนที่ปริมาตร 1 ลิตร ด้วย Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ความเข้มข้น 5 เท่า โดยการปั่นเหวี่ยงแยกของเหลวออก (E-H) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

### 3.2.7 การทดลองเพิ่มขนาดการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

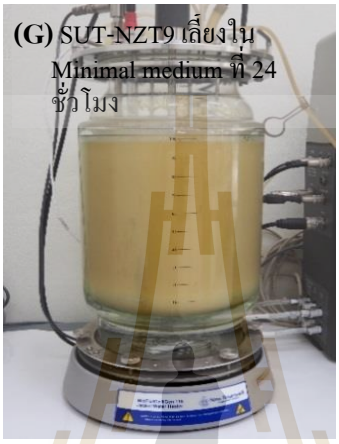
การทดลองเพิ่มขนาดการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ตามแผนใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ลิตร แต่เมื่อปฏิบัติจริง ได้ทดลองเพิ่มปริมาตรการเลี้ยงเซลล์เป็น 10 ลิตร ที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสม ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม และตามรูปแบบที่ได้จากการศึกษา (ข้อ 3.2.4) และได้เลือกแบคทีเรียที่คัดเลือกเพียง 1 สายพันธุ์ คือ SUT-NZT6 ตรวจวัดการเจริญ ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือ และปริมาณ PHA ที่ผลิต ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งยังคงได้ผลผลิตดีเช่นเดียวกับการทดลองผลิตที่ปริมาตรน้อยกว่า 10 ลิตร เซลล์ที่ผลิตได้ ใช้ศึกษาการพัฒนาวิธีการสกัดสาร PHA ที่รายงานผลการศึกษาโดยสังเขปตามข้อ 3.3

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท (สายพันธุ์) SUT-NZT6 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 6 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 14 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (ที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เติมอาหารใหม่จำนวน 4 ครั้ง ที่เวลา 10, 12, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรสุดท้าย 8 ลิตร เลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 3.23) ให้ผลผลิตเซลล์สูงสุด คือ 80.30 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) หรือ 15.59 กรัม กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) (ตารางที่ 3.31)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




**รูปที่ 3.23** ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียไอโซเลท SUT-NZT6 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 6 ลิตร (A) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 14 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (ที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เติมอาหารใหม่จำนวน 4 ครั้ง ที่เวลา 10 (B), 12 (C), 14 และ 18 (D) ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรสุดท้าย 8 ลิตร เลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง (E) จากนั้นเติมอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 ลิตร (F-H) และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

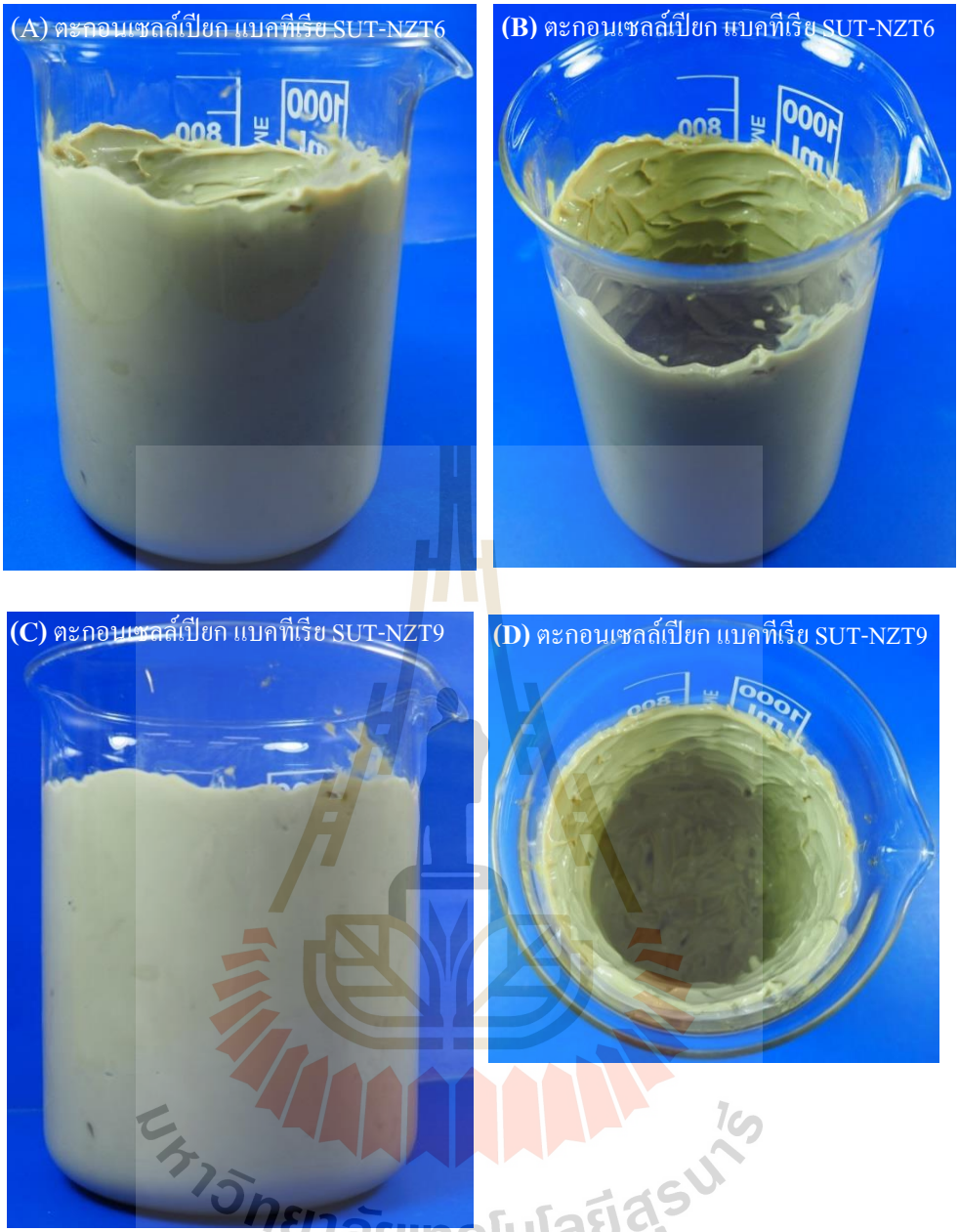


**รูปที่ 3.23** (ต่อ) ลักษณะการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียไอโซเลท SUT-NZT6 เลี้ยงในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 6 ลิตร (A) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 14 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (ที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ $10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เติมอาหารใหม่จำนวน 4 ครั้ง ที่เวลา 10 (B), 12 (C), 14 และ 18 (D) ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรสุดท้าย 8 ลิตร เลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง (E) จากนั้นเติมอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 ลิตร (F-H) และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

**ตารางที่ 3.31** ความสามารถในการเจริญเพื่อผลิต PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ในอาหาร Complex medium (ตารางที่ 3.15) ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 6 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวน 300 รอบต่อนาที เติมอาหารใหม่จำนวน 4 ครั้ง ที่เวลา 10, 12, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติมอาหาร Minimal medium (ตารางที่ 3.15) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| **Medium/ Cultivation time** (h) | **Agitation speed** (rpm) | **pH** of the cultivated medium | **Growth** (CFU/mL) | **Wet cell weight** (g/L) | **Dry cell weight** (g/L) | **Total sugars** in the medium (g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Complex medium:** | | | | | | |
| 0/ 6 L | 300 | 7.05 | $4.02\times10^{6}$ | 5.80 | 1.02 | 31.55 |
| 4/ 6 L | 300 | 7.02 | $3.13\times10^{11}$ | 9.60 | 1.69 | 29.64 |
| 6/ 6 L | 300 | 7.00 | $4.52\times10^{12}$ | 29.25 | 5.14 | 22.35 |
| 10/ 6.0 +0.5 L | 300 | 7.00 | $4.36\times10^{16}$ | 36.80 | 6.47 | 18.25 |
| 12/ 6.5 +0.5 L | 300 | 7.00 | $4.18\times10^{17}$ | 41.90 | 7.36 | 10.79 |
| 14/ 7.0+0.5 L | 300 | 7.00 | $4.99\times10^{17}$ | 45.55 | 8.22 | 8.66 |
| 18/ 7.5+0.5 L | 300 | 6.97 | $6.78\times10^{17}$ | 51.30 | 9.16 | 5.50 |
| 24/ 8.0 L | 300 | 7.06 | $3.52\times10^{18}$ | 67.60 | 11.88 | 1.75 |
| **Minimal medium** making up to 10 L working volume**:** | | | | | | |
| 0 | 300 | 6.98 | $7.85\times10^{15}$ | 65.50 | 11.51 | 12.65 |
| 12 | 300 | 7.00 | $9.35\times10^{16}$ | 68.70 | 12.88 | 6.08 |
| 24 | 300 | 7.00 | $3.24\times10^{17}$ | 75.20 | 13.69 | 4.75 |
| 30 | 300 | 7.00 | $2.44\times10^{17}$ | 79.65 | 15.29 | 1.50 |
| 48 | 300 | 7.05 | $2.23\times10^{17}$ | 80.30 | 15.59 | 0.49 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




**รูปที่ 3.24** ตัวอย่างลักษณะของตะกอนเซลล์เปียกก่อนนำไปทำแห้งและสกัด PHA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 (A และ B) และสายพันธุ์ SUT-NZT9 (C และ D)

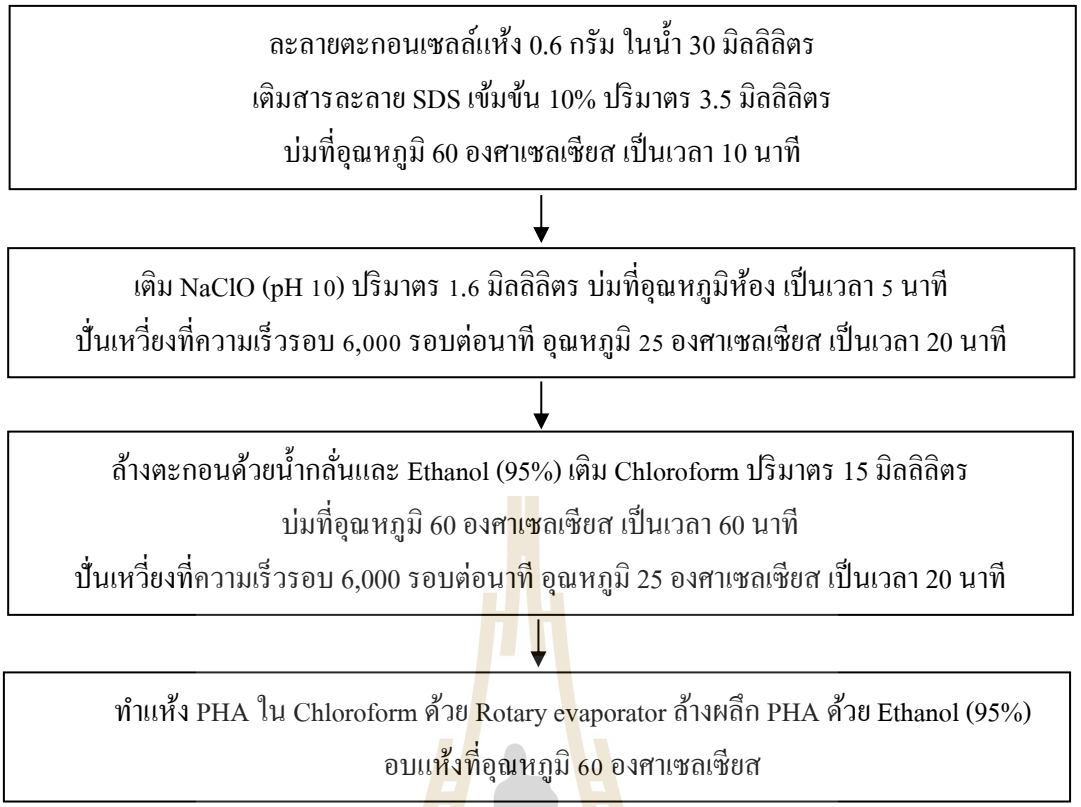
## 3.3 การสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่ศึกษาและตรวจสอบคุณลักษณะสำคัญของ PHA ที่ได้ เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งาน

### 3.3.1 การสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่ศึกษา

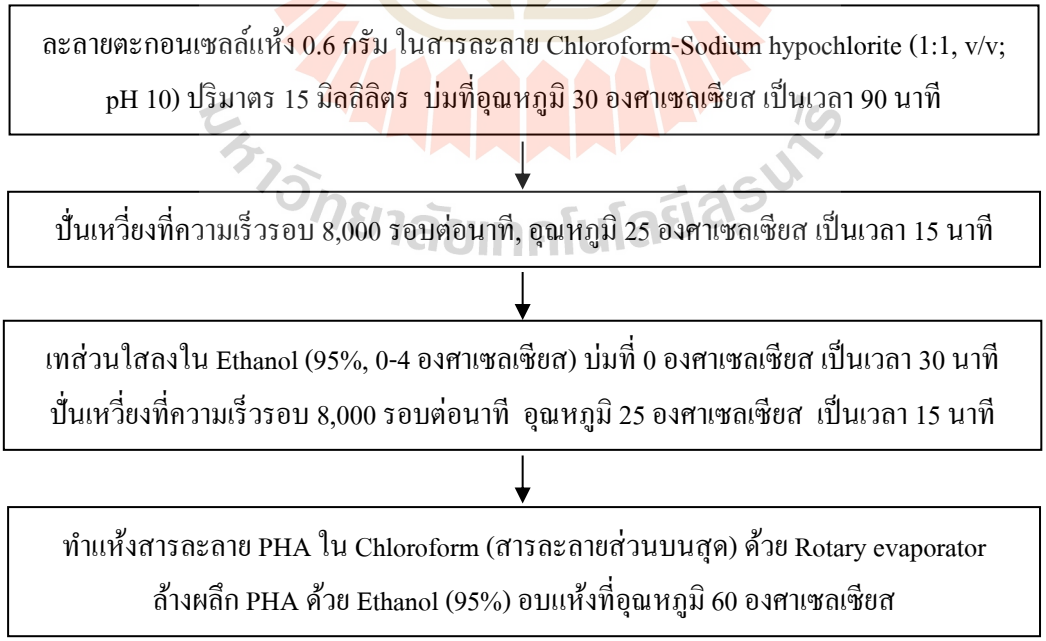
การสกัดและแยกสาร PHA ออกจากเซลล์ของแบคทีเรียตามที่มีรายงาน นิยมใช้สารทำละลายอินทรีย์กลุ่ม Halogenated hydrocarbon solvents เช่น Chloroform, Dichloroethane, Dichloromethane และ Dichloropropane เป็นต้น สารทำละลายอินทรีย์กลุ่ม Halogenated hydrocarbon solvents ที่ให้ผลการสกัดดีที่สุด คือ 1,2-Dichloroethane และ 1,1,2-Trichloroethane (Vanlautem and Gilain, 1980) ในการสกัดมีขั้นตอนการทำแห้งเซลล์ของจุลินทรีย์ที่สะสม PHA แล้วจึงสกัด PHA โดยใช้ Halogenated solvents จากนั้นแยก PHA ออกด้วย Solvent ที่มี Polarity ต่ำ เช่น Methanol และ Hexane (Noda and Schechtman, 1999; Senior *et al*., 1982; Blauhut *et al*., 1993; Narasimhan *et al*., 2006; Vanlautem and Gilain, 1980) แต่เนื่องจากสารประเภท Halogenated solvents เป็นสารอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมจึงมีข้อจำกัดในการใช้ และไม่สามารถใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ต่อมามีการใช้ Non-halogen solvents ได้แก่ Alcohol, Ester, Amide และ Ketone เป็นต้น แทนการใช้ Halogenated solvents แต่มีข้อจำกัดที่ว่า PHA สามารถละลายใน Non-halogen solvents ได้น้อยที่อุณหภูมิห้อง (Kurdikar *et al*., 2000a) จึงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงในการสกัดเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของ PHA (Kurdikar *et al*., 2000b; Liddell, 1999) ทำให้เกิดปัญหาที่ตามมา คืออุณหภูมิสูงมีแนวโน้มทำให้มวลโมเลกุลของ PHA ลดลงตามระยะเวลาที่สกัด ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยลดระยะเวลาในการสกัดลง (Lafferty and Heinzle, 1978; Kurdikar *et al*., 2000a; Liddell, 1999) จากนั้นแยกสารสกัดออกโดยการระเหย การปั่นแยก หรือการกรอง (Jiang *et al*., 2006)

ทางโครงการวิจัยได้พัฒนาวิธีการสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ศึกษา ตามกรรมวิธีที่ใช้ความรู้จากงานวิจัยที่มีอยู่ก่อนแล้วและจากแหล่งอ้างอิงเพิ่ม ดัดแปลงเพื่อให้มีความเหมาะสมกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ศึกษา ตรวจสอบลักษณะปรากฏของพอลิเมอร์ PHA ที่ผลิตได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านความเหนียว ยืดหยุ่น แข็ง หรือเปราะ แหล่งอ้างอิงที่น่าสนใจ ได้แก่ Xu *et al*. (2010) ที่ศึกษาวิธีการสกัด PHA จากแบคทีเรีย *Acidiphilium cryptum* DX1-1 ด้วย Dodecyl sulfonic acid sodium salt-soium hypochlorite (SDS-NaClO) (รูปที่ 3.25) และ Chloroform-Sodium hypochlorite (รูปที่ 3.26) ใช้ตะกอนเซลล์แห้งของแบคทีเรีย 0.6 กรัม ได้ผลผลิต PHA เท่ากับ 24 และ 37% ที่มีความบริสุทธิ์ 74 และ 92% และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 267 และ 326 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

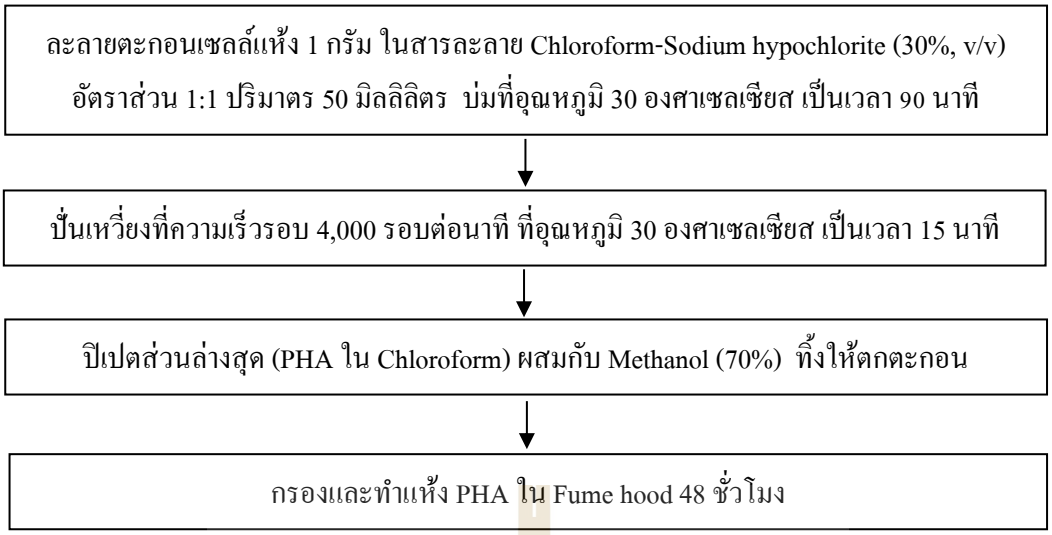
วิธีการสกัด PHA ตาม Wang *et al*. (2013) เป็นอีกแหล่งอ้างอิงที่น่าสนใจ โดยรายงานถึงการศึกษาวิธีสกัด PHA ด้วย Chloroform และ Sodium hypochlorite (รูปที่ 3.27) จากแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติม Sugar beet juice และได้ผลผลิตเซลล์แห้ง 10.30 ±1.01 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิต PHB เข้มข้น 4.01±0.95 กรัมต่อลิตร ที่มี PHB content 38.66±7.28%




**รูปที่ 3.25** ขั้นตอนการสกัด PHA ด้วย Dodecyl sulfonic acid, sodium salt-Soium hypochlorite (SDS-NaClO) ตาม Xu *et al*. (2010)




**รูปที่ 3.26** ขั้นตอนการสกัด PHA ด้วย Chloroform-Sodium hypochlorite ตาม Xu *et al*. (2010)




**รูปที่ 3.27** ขั้นตอนการสกัด PHA ด้วย Chloroform-Sodium hypochlorite (SDS-NaClO) ตาม Wang *et al*. (2013)

ดังได้กล่าวข้างต้น ทางโครงการฯ ได้พัฒนาวิธีการสกัด PHA (ขอสงวนรายละเอียดของกรรมวิธีที่พัฒนาได้) จากพื้นฐานงานวิจัยที่ได้ดำเนินการ และองค์ความรู้จากแหล่งอ้างอิงตาม Lakshman and Shamala (2006), Xu *et al* (2010) และ Wang *et al* (2013) ที่อาศัยสมบัติของเซลล์แบคทีเรียและหลีกเลี่ยงการใช้ตัวทำละลาย 1,2-Dichloroethane ที่มีประสิทธิสูงแต่มีความเป็นพิษทั้งระบบหายใจ การกัดกร่อน ความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง และความคงทนในสิ่งแวดล้อมที่เป็นปัญหาสิ่งแวดล้อม

วิธีสกัดควบคุมผลบวก (Positive control) ของโครงการฯ ยังคงใช้สาร 1,2-Dichloroethane ซึ่งขั้นตอนการสกัดสารนี้ทางโครงการได้ดัดแปลงจาก Vanlautem and Gilain (1982) และขั้นตอนการแยกตะกอนผลึก PHA ออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Noda (1998) โดยแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทอาหารส่วนใสทิ้ง อาจมีการบันทึกน้ำหนักเปียกของเซลล์ ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายเกลือเจือจาง (0.85% Sodium chloride) ปลอดเชื้อ (ภาคผนวก ข9) นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธีการ Freeze drying ชั่งน้ำหนักของเซลล์แห้ง ล้างตะกอนเซลล์แห้งด้วย Methanol 200 มิลลิลิตร โดยเท Methanol ผ่านเซลล์แห้งบนกระดาษกรอง เพื่อล้างไขมันออก นำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหย Methanol ออก ผสมตะกอนเซลล์แห้งกับสารสกัด 1,2-Dichloroethane ในอัตราส่วน 1 กรัม ต่อ 20 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ที่มีฝาปิด นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองสารสกัดขณะร้อนผ่านสำลี และนำสารสกัดที่ได้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนสารละลายเกิดเป็นตะกอนลักษณะคล้ายเจล นำ

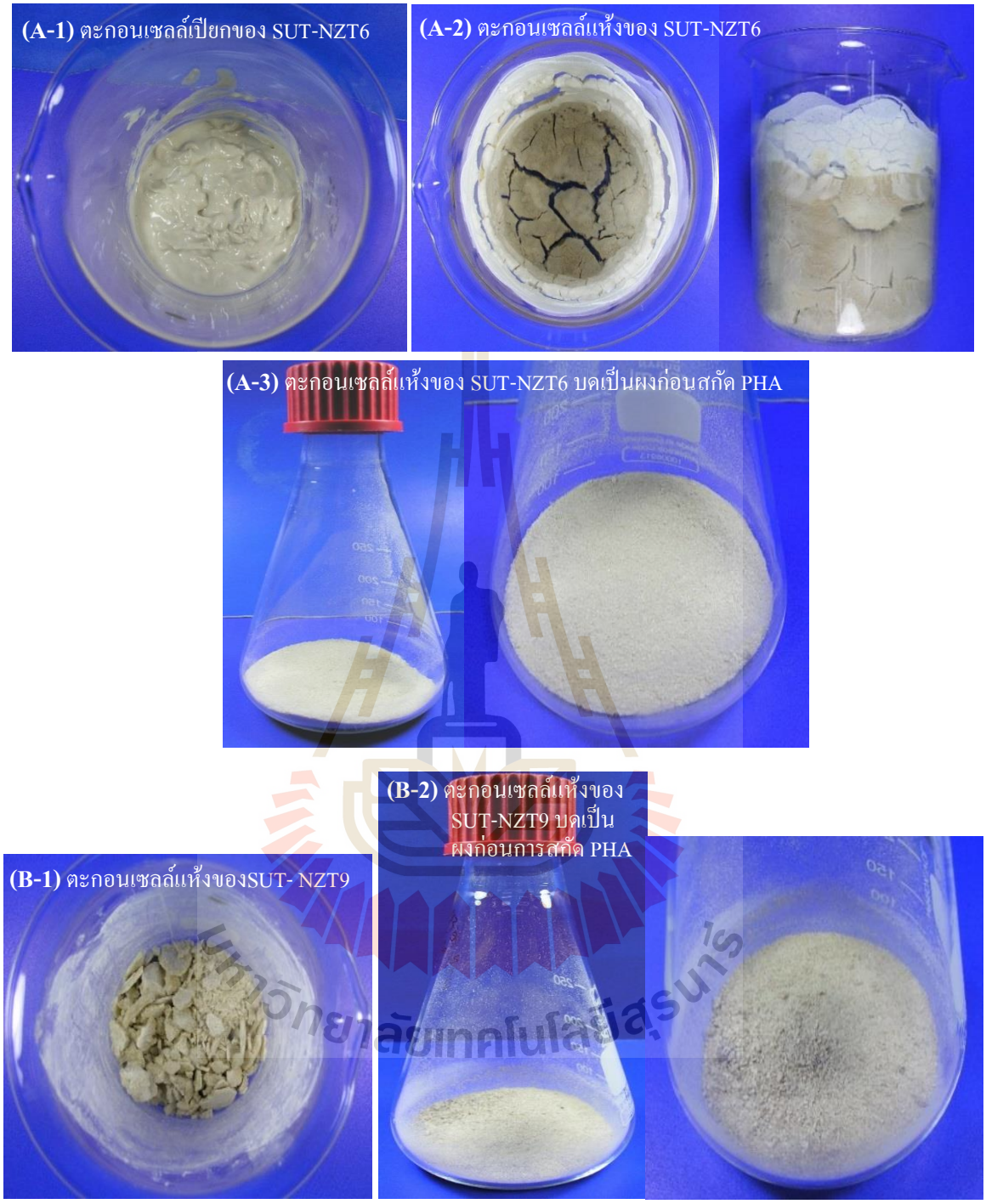
สารละลายสกัดไประเหยแยกตัวทำละลายอินทรีย์ 1,2-Dichloroethane ออกจากผลึก PHA โดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 300 mbar

การสกัด PHA ด้วยวิธีการที่พัฒนาได้ให้ผลสำเร็จเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ระบุในแหล่งอ้างอิงและวิธีสกัดควบคุมผลบวก ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ คือได้ผลผลิต PHA 0.85 กรัม จากเซลล์แห้ง 5 กรัม เทียบเท่ากับ 17% (ตารางที่ 3.32 และรูปที่ 3.28-3.31) เทียบผลผลิต PHA ที่สกัดด้วยวิธีที่พัฒนาใหม่ เท่ากับ 64.89% ของผลผลิต PHA ที่สกัดด้วยวิธีที่ทางโครงการวิจัยได้พัฒนาจาก Vanlautem and Gilain (1982) และ Noda (1998) ใช้ 1,2-Dichloroethane ซึ่งเป็นวิธีสกัดควบคุมผลบวก

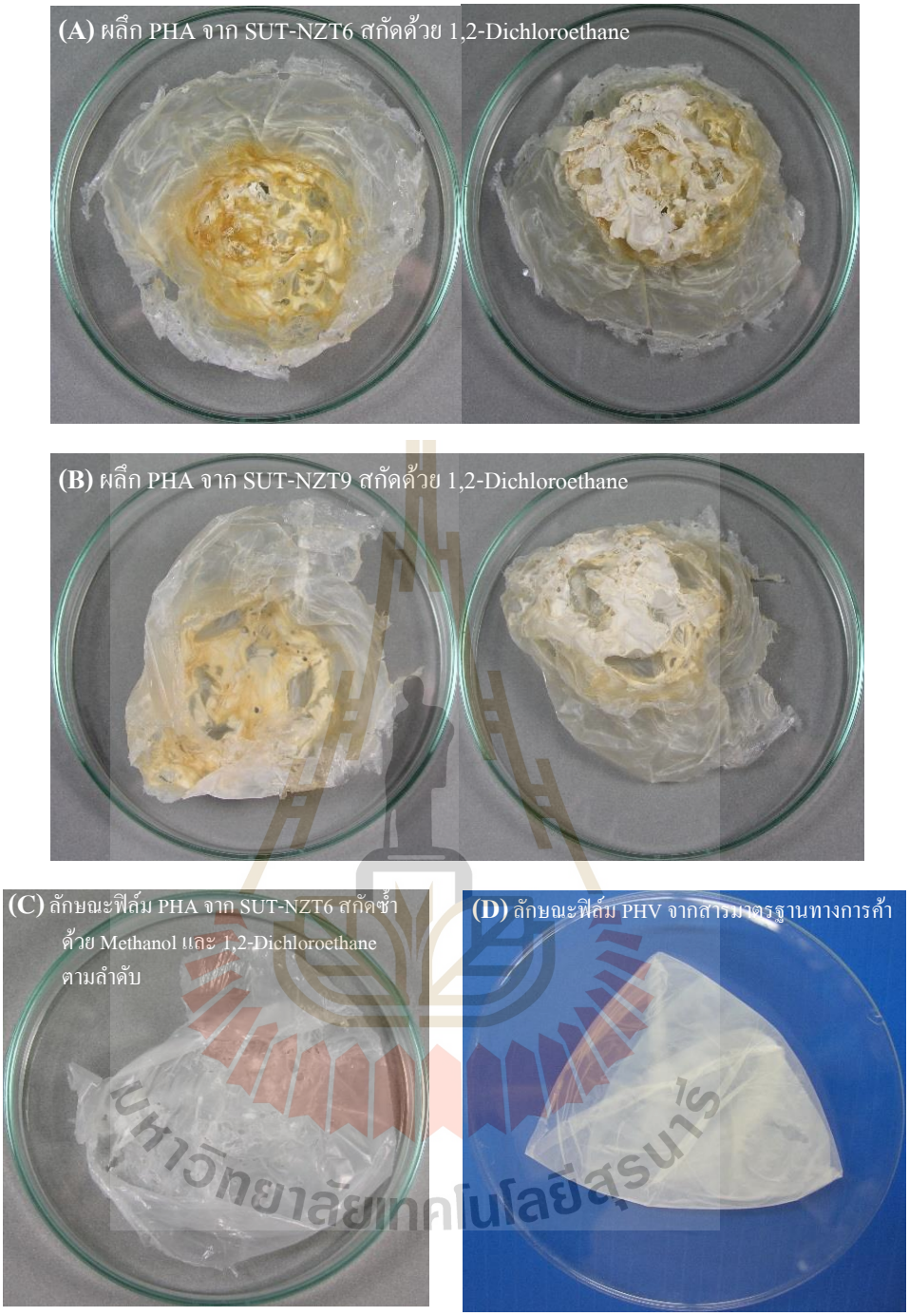
**ตารางที่ 3.32** ผลผลิต PHA จากเซลล์ SUT-NZT6 สกัดด้วยวิธีที่ทางโครงการได้พัฒนา 2 วิธี เปรียบเทียบกับการสกัดตามวิธีที่มีรายงาน (Xu *et al*., 2010)

| **Extraction method** | **Dry bacterial cells** (g) used for extraction | **Extracted PHA** (g) | **PHA yield** (%) compared to cell weight |
|---|---|---|---|
| วิธีสกัดควบคุมผลบวก (Positive control) ตามที่ทางโครงการวิจัยได้พัฒนาจาก Vanlautem and Gilain (1982) และ Noda (1998) ใช้ 1,2-Dichloroethane เพื่อเป็น | 5.00 | 1.31 | 26.20 |
| วิธีสกัดตาม Xu *et al*. (2010) | 5.00 | 0.25 | 5.00 |
| วิธีสกัดที่ทางโครงการวิจัยได้พัฒนาขึ้น ไม่ใช้ 1,2-Dichloroethane | 5.00 | 0.85 | 17.00[a] |

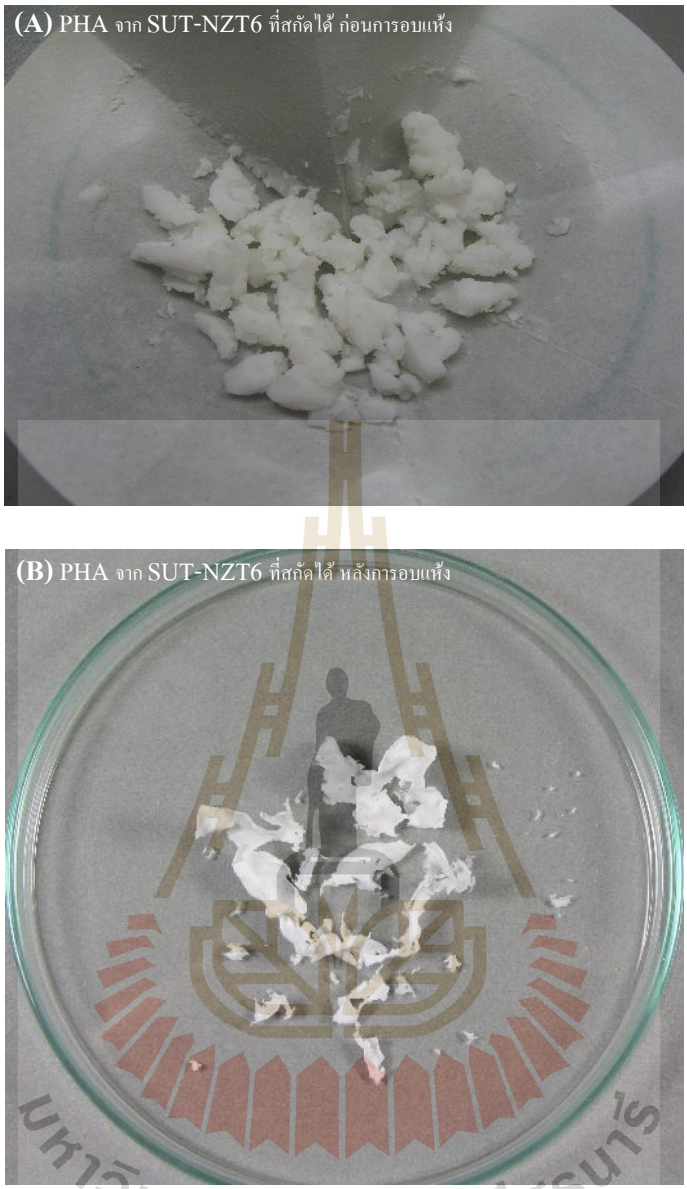
[a] เทียบผลผลิต PHA ที่สกัดด้วยวิธีที่พัฒนาใหม่ เท่ากับ 64.89% ของผลผลิต PHA ที่สกัดด้วยวิธีที่ทางโครงการวิจัยได้พัฒนาจาก Vanlautem and Gilain (1982) และ Noda (1998) ใช้ 1,2-Dichloroethane ซึ่งเป็นวิธีสกัดควบคุมผลบวก




**รูปที่ 3.28** ตัวอย่างลักษณะตะกอนเซลล์เปียกและเซลล์แห้งของแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 (A-1 ถึง A-3) และ SUT-NZT9 (B-1 ถึง B-2) หลังการเลี้ยงเพื่อผลิตสาร PHA

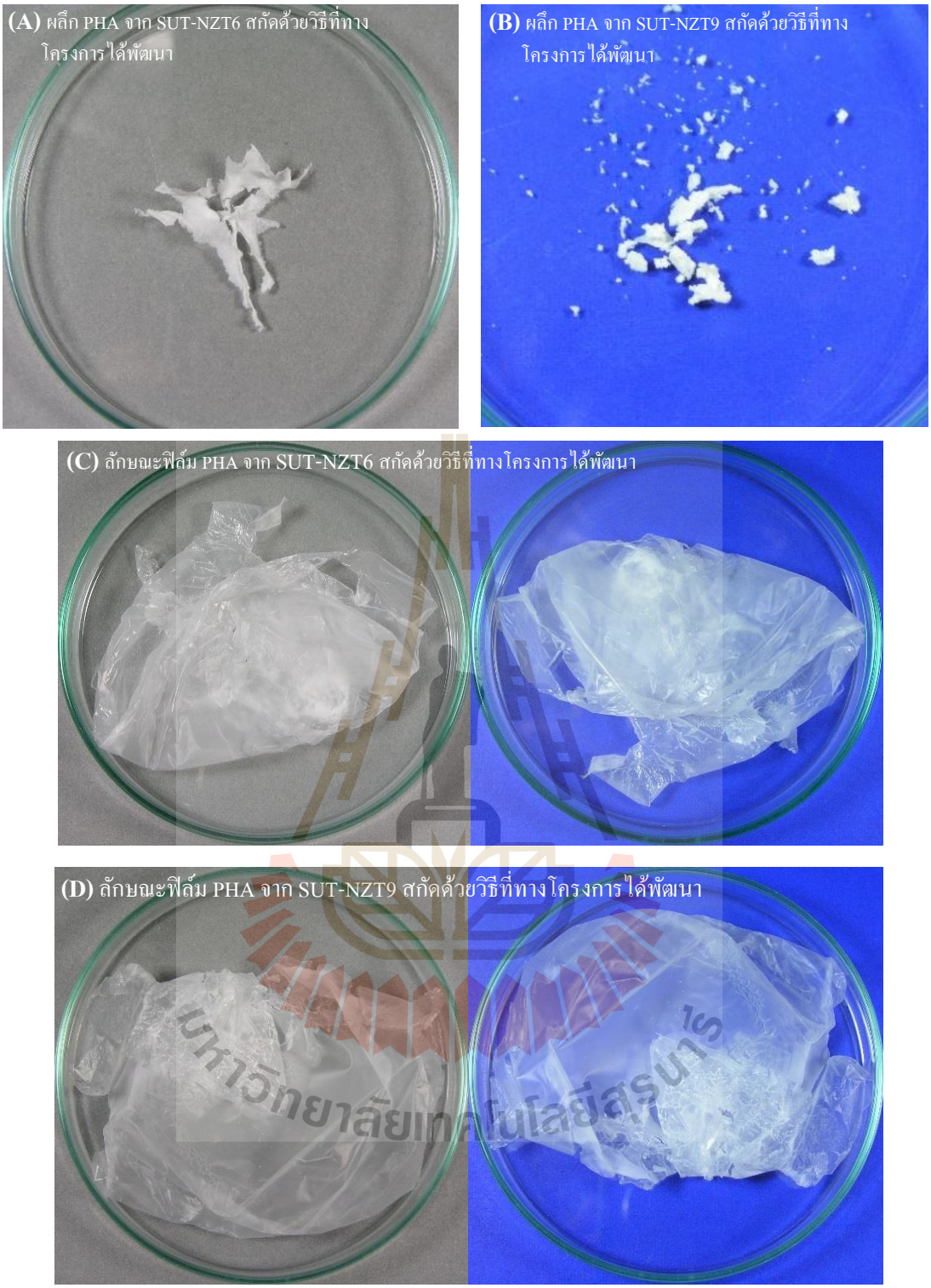



**รูปที่ 3.29** ตัวอย่างลักษณะฟิล์มของพอลิเมอร์ PHA ที่สกัดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 (A และ C) และ SUT-NZT9 (B) ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่พัฒนาได้ ควบคุมอุณหภูมิเลี้ยงเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส สกัดด้วยวิธีที่ใช้ 1,2-Dichloroethane ดัดแปลงจาก Vanlautem (1982) และ Noda (1998) และสกัด PHA ที่ได้ซ้ำด้วย Methanol และ 1,2-Dichloroethane ตามลำดับ




มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**รูปที่ 3.30** ตัวอย่างลักษณะของพอลิเมอร์ PHA ก่อนการอบแห้ง (A) และหลังการอบแห้ง (B) ที่สกัดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ได้ศึกษาและสกัดด้วยวิธีที่พัฒนาได้ที่ลดการใช้ 1,2-Dichloroethane ที่ใช่ปีนวิธีควบคุมผลบวก




**รูปที่ 3.31** ตัวอย่างลักษณะฟิล์มของพอลิเมอร์ PHA ที่สกัดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 (A และ C) และ SUT-NZT9 (B และ D) ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ศึกษา สกัดด้วยวิธีที่พัฒนาได้จากโครงการนี้ที่ลดการใช้ 1,2-Dichloroethane

วิธีสกัดสาร PHA จากเซลลแบคทีเรียแกรมลบ *Chryseobacterium* sp. สายพันธุ์ SUT-NZT 6 และ SUT-NZT 9 ที่พัฒนาได้จากโครงการวิจัยนี้ สอดคล้องกับการศึกษาของนักวิจัยบางกลุ่ม ได้แก่ Shawaphun and Manangan (2010) ศึกษาการสกัดพลาสติกชีวภาพชนิด Poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) ที่ผลิตจากกลูโคสด้วยแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ให้ได้ปริมาณมากและพอลิเมอร์มีคุณภาพดี โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Mineral medium broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาดบรรจุ 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสกัดพอลิเมอร์ที่สะสมในเซลล์ด้วยวิธีที่ประกอบด้วย (1) ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ และ (2) ขั้นตอนการสกัด และ 3) ขั้นตอนการทำพอลิเมอร์ให้บริสุทธิ์ ในขั้นตอนการเตรียมเซลล์เป็นการทำให้เซลล์แตกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ร่วมกับการใช้แรงเชิงกล จากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายแบบต่อเนื่องและการสกัดโดยตรง และขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์เน้นการตกผลึกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม พบว่าการทำให้เซลล์แตกด้วยตัวทำละลาย Ethanol หรือ Methanol ร่วมกับการกวนด้วย Magnetic bar เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ผลผลิต (% Recovery) สูงกว่าการสกัดที่ใช้น้ำเป็นตัวกลาง แต่การใช้ Ethanol หรือ Methanol เป็นสารสกัดมีผลลด % Recovery และผลึกพอลิเมอร์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำเทียบกับการใช้ Chloroform ($CHCl_3$) และ Dichloromethane หรือ Methylene chloride ($CH_2Cl_2$) ทั้งในการสกัดแบบต่อเนื่องและการสกัดโดยตรง PHA ที่สกัดได้จากเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ประกอบด้วยโมเลกุลของ Poly(3-hydroxybutyrate) มากกว่า 99% มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 110 กิโลดาลตัน และมีค่า Melting temperature ($T_m$) 169 องศาเซลเซียส

Heinrich *et al*. (2012) ศึกษาการสกัด Poly(3-hydroxybutyrate) จากเซลล์แบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* H16 ด้วย Sodium hypochlorite เลี้ยงแบคทีเรียให้เจริญ แบบ Fed-batch ในอาหาร Mineral salt medium ปริมาตร 400 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 650 ลิตร และปรับสภาพอาหารให้เหมาะต่อการผลิตและสะสม PHA ก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิตเซลล์ 18 ชั่วโมง โดยเลี้ยงแบคทีเรียภายใต้สภาวะ Nitrogen-limitation with an excess of carbon จากนั้นแยกตะกอนเซลล์ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง บดให้ละเอียดด้วย Blender และละลายเซลล์แห้งที่เตรียมได้ 30 กรัมต่อลิตร ในสารละลาย Sodium hypochlorite เข้มข้น 13% ที่มีค่า pH ที่ 12.3 สกัด PHA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรเริ่มต้น และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ปั่นแยกตะกอนพอลิเมอร์และล้างด้วยน้ำสะอาดและ Isopropanol จำนวน 2 และ 1 ครั้ง ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* H16 ผลิตและสะสม PHA สูงถึง 62.2% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ พอลิเมอร์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ 95.66% ประกอบด้วยโมเลกุลของ Poly(3-hydroxybutyrate) 91.32% โมเลกุลของพอลิเมอร์ที่สกัดด้วย Sodium hypochlorite มีขนาดเล็กลงจากเริ่มต้น 50-70% เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย Gel permeation chromatography พบขนาดโมเลกุลในช่วง 460 ถึง 830 กิโลดาลตัน เทียบกับการสกัดด้วย Chloroform ที่ให้พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,700 กิโลดาลตัน

### 3.3.2 การตรวจสอบคุณลักษณะสำคัญของ PHA ที่ได้ เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งาน

ตรวจสอบคุณลักษณะสำคัญของ PHA ที่ได้จากแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท/สายพันธุ์ คือ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งาน จากที่ได้รับความอนุเคราะห์ดูแลผู้ช่วยวิจัยในการเตรียมตัวอย่างและการวินิจฉัยผลจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิมา ดีประเสริฐกุล สาขาวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้ผลโดยสรุปดังนี้

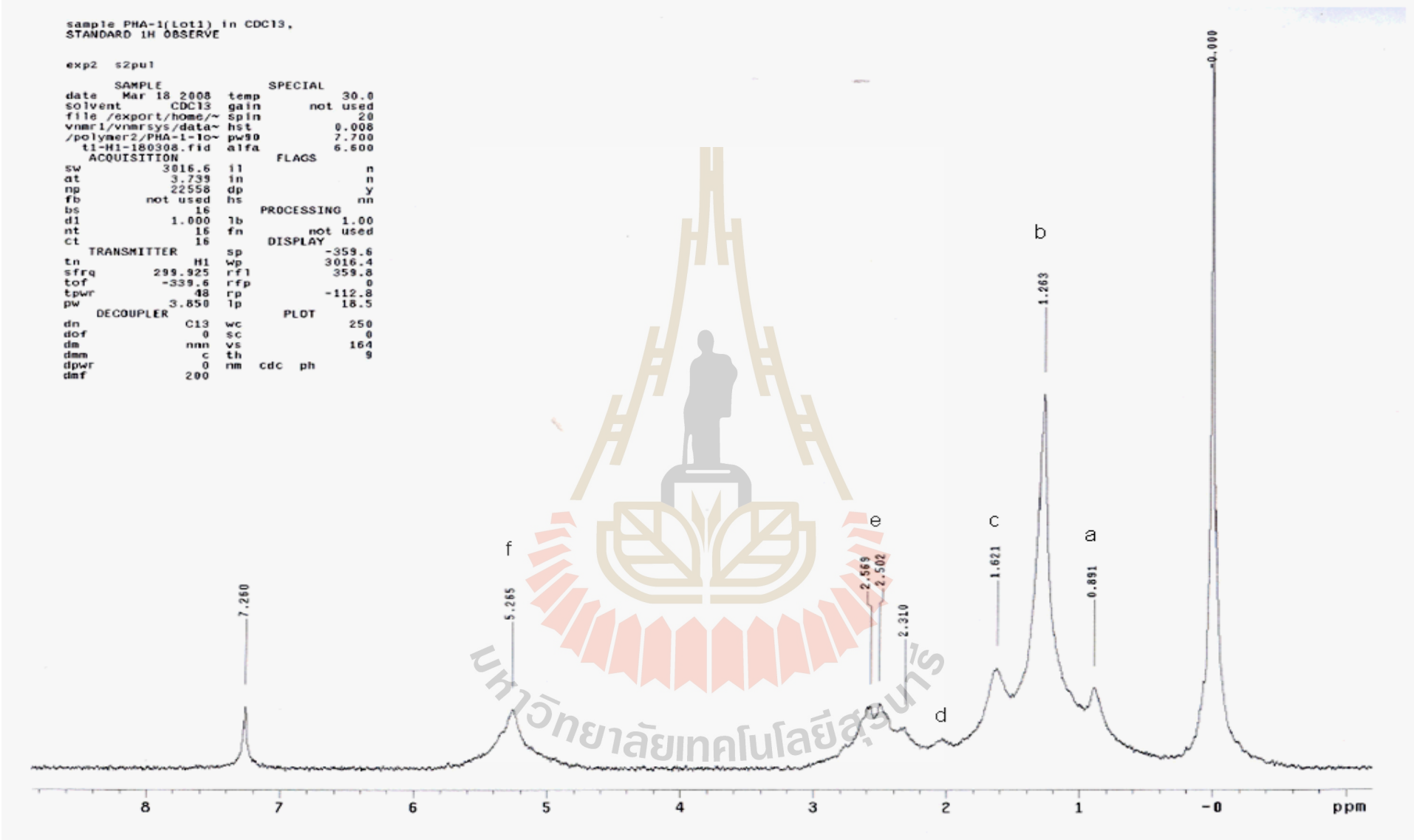
#### 3.3.2.1 โครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของพอลิเมอร์

ตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของพอลิเมอร์ด้วย Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy โดยละลายพอลิเมอร์ใน Deuterated chloroform ($CDCl_3$) วัดที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่อง $^{1}H$ NMR Spectrometer (NMR SPECTROMETER INOVA, VARIAN, 300 MHz) และ $^{13}C$ NMR Spectrometer (VARIAN, 75 MHz) โดยใช้ Tetramethylsilane (TMS) เป็นสารมาตรฐานภายใน

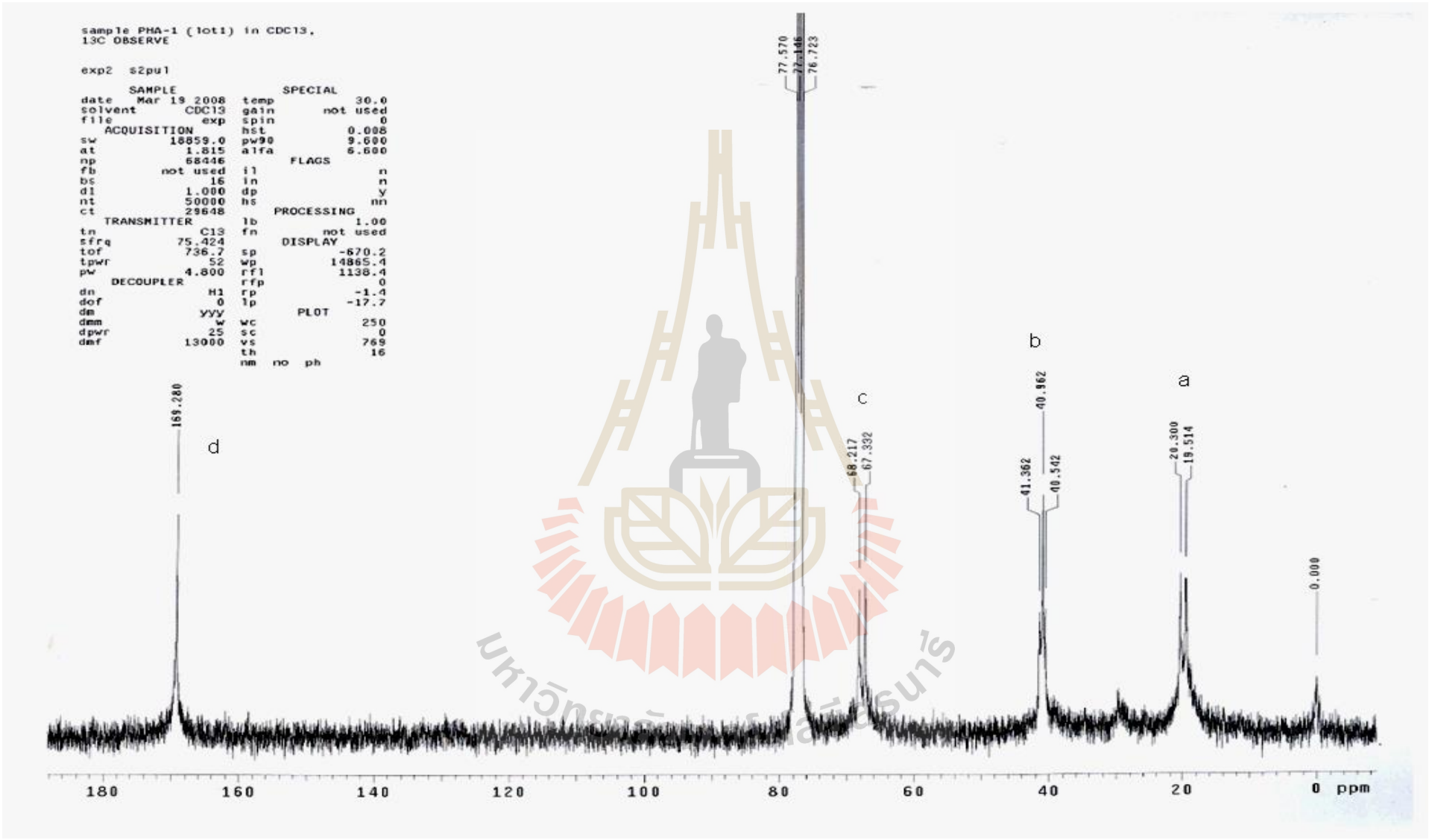
การตรวจสอบโครงสร้างเคมีของตัวอย่าง PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ได้สเปกตรัม $^{1}H$ NMR ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 ดังรูปที่ 3.32 โดยพบ Peak ที่ chemical shift ต่างๆ ดังตารางที่ 3.33

ส่วนตำแหน่งคาร์บอนจากสเปกตรัม $^{13}C$ NMR ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกนั้น สเปกตรัม $^{13}C$ NMR ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 (รูปที่ 3.33) บ่งชี้ว่าตัวอย่าง PHA นี้มีโครงสร้าง Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] และ Poly(4-hydroxybutyrate) [P(4HB)] เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย โดยพบ Peak ที่ Chemical shift ต่างๆ ดังตารางที่ 3.34

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




**รูปที่ 3.32** สเปกตรัม $^{1}$H NMR ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6




**รูปที่ 3.33** สเปกตรัม $^{13}$C NMR ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6

**ตารางที่ 3.33** ตำแหน่งโปรตอนจากสเปกตรัม $^{1}$H NMR ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6

| **Peak** (Figure 3.32) | **Chemical shift (ppm)** | **ตำแหน่งโปรตอนของหมู่** |
|---|---|---|
| a | 0.89 | $-CH_3$ (ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2-$) |
| b | 1.26 | $-CH_3$ (ที่ต่อกับหมู่ –CH-) |
| c | 1.62 | $-CH_2-$ (ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2-$ และ$-CH_3$) |
| d | 2.00 | $-CH_2-$(ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2-$ และ$-CH_2$) |
| e | 2.5 | $-CH_2-$ (ที่ต่อกับหมู่ –CH- และ–C=O) |
| f | 5.27 | –CH- (ที่ต่อกับหมู่ -O) |

**ตารางที่ 3.34** ตำแหน่งคาร์บอนจากสเปกตรัม $^{13}$C NMR ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6

| **Peak** (Figure 3.33) | **Chemical shift (ppm)** | **ตำแหน่งคาร์บอนของหมู่** |
|---|---|---|
| a | 20 | $-CH_3$ |
| b | 40 | $-CH_2-$ |
| c | 67 | CH |
| d | 169 | -COO- |

**3.3.2.2 สมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์**

ตรวจสอบสมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) ศึกษาด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (Diamond, PerkinElmer, U.S.A.) โดยได้รับความอนุเคราะห์ดูแลผู้ช่วยวิจัยในการเตรียมตัวอย่างจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิมา ดีประเสริฐกุล สาขาวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พบว่าค่าอุณหภูมิหลอม (Melting temperature, $T_m$) หรืออุณหภูมิการเกิดผลึก (Crystallization temperature, $T_c$) ที่ตำแหน่งยอดของ Peak การตรวจสอบสมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์ศึกษายังทดลองใช้ Thermogravimetric Analysis (TGA) ด้วยเครื่อง Thermogravimetric Analyzer (TA Instrument, U.S.A.)

ด้านสมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์ เทอร์โมแกรม DSC ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 เมื่อให้ความร้อน first run พบ Endotherm peakที่กว้าง ซึ่งแสดงถึงอุณหภูมิหลอม ($T_m$) ของผลึกพอลิเมอร์ โดยแสดงตำแหน่งยอดของ Peak ที่ 167.7 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ไม่พบ

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่บ่งบอกถึงอุณหภูมิทรานสิชันแก้ว ($T_g$) เมื่อทำให้เย็นลง พบ Exotherm peak ที่กว้างเช่นกัน ซึ่งแสดงถึงอุณหภูมิการเกิดผลึก ($T_c$) ของพอลิเมอร์โดยแสดงตำแหน่งยอดของ Peak ที่ 71.3 องศาเซลเซียส เมื่อให้ความร้อนอีกครั้ง (second run) พบ $T_m$ เป็นช่วงกว้างโดยมียอดของ Peak ที่ 168.6 องศาเซลเซียส โดยเป็นช่วงเดียวกับ first run เป็นการยืนยันอุณหภูมิหลอมของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6

ผลการทดสอบด้วยเทคนิค DSC ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ที่เตรียม ดังตารางที่ 3.34 PHA ที่เตรียมจากแบคทีเรียที่คัดเลือก 2 สายพันธุ์ มีสมบัติทางความร้อนแตกต่างกัน โดย PHA ที่เตรียมได้มีอุณหภูมิหลอมที่สูงใกล้เคียงกับอุณหภูมิหลอมของใกล้เคียงกับอุณหภูมิหลอมของ Polyethylene (~139 องศาเซลเซียส) และ Polypropylene ชนิด Isotactic polypropylene ที่ ~171 องศาเซลเซียส (Sperling, 1992) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากปิโตรเคมีที่มีการใช้งานอยู่ทั่วไป และจากงานวิจัยที่มีมาก่อน จุดหลอมเหลวของ P(3HB) มีค่าเท่ากับ 165 องศาเซลเซียส (Xie and Chen, 2008)

เทอร์โมแกรม DSC ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 แสดงดังรูปที่ 3.33 เมื่อให้ความร้อน first run พบ Endotherm peak ที่กว้าง ซึ่งแสดงถึงอุณหภูมิหลอม ($T_m$) ของผลึกพอลิเมอร์ โดยแสดงตำแหน่งยอดของ Peak ที่ 167.7 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ไม่พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่บ่งบอกถึงอุณหภูมิทรานสิชันแก้ว ($T_g$) เมื่อทำให้เย็นลง พบ Exotherm peak ที่กว้างเช่นกัน ซึ่งแสดงถึงอุณหภูมิการเกิดผลึก ($T_c$) ของพอลิเมอร์โดยแสดงตำแหน่งยอดของ Peak ที่ 71.3 องศาเซลเซียส เมื่อให้ความร้อนอีกครั้ง (second run) พบ $T_m$ เป็นช่วงกว้างโดยมียอดของ Peak ที่ 168.6 องศาเซลเซียส โดยเป็นช่วงเดียวกับ first run เป็นการยืนยันอุณหภูมิหลอมของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6

ผลการทดสอบด้วยเทคนิค DSC ของ PHA ที่เตรียม ดังตารางที่ 3.36 เห็นได้ว่า PHA ที่เตรียมจากจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กัน มีสมบัติทางความร้อนแตกต่างกัน โดย PHA ที่เตรียมได้มีจุดหลอมเหลวที่สูงใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลวของ Polyethylene (~139 องศาเซลเซียส) และ Polypropylene ชนิด Isotactic polypropylene ซึ่ง ~171 องศาเซลเซียส (Sperling, 1992) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากปิโตรเคมีที่มีการใช้งานอยู่ทั่วไป และจากงานวิจัยที่มีมาก่อน อุณหภูมิหลอมของ Poly(3-hydroxybutaric acid) [P(3HB)] มีค่าเท่ากับ 165 องศาเซลเซียส (Xie and Chen, 2008)

#### 3.3.2.3 น้ำหนักโมเลกุลและการกระจายตัวของพอลิเมอร์ด้วยเทคนิค Gel Permeation Chromatography (GPC)

จากการวิเคราะห์หา**น้ำหนักโมเลกุลและการกระจายตัว**ของ PHA ที่เตรียมได้จากแบคทีเรียที่คัดเลือกสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ด้วยเทคนิค Gel Permeation Chromatography (GPC) โดยได้รับความอนุเคราะห์ดูแลผู้ช่วยวิจัยในการเตรียมตัวอย่างจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิมา ดีประเสริฐกุล สาขาวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อีกเช่นกัน สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก ($\overline{M}_W$) จาก GPC โครมาโตแกรมที่ได้ พบช่วง

Peak ที่แสดงว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ $2.98\times10^5$ กรัมต่อโมล และสูงกว่า $19.60\times10^5$ กรัมต่อโมล ในตัวอย่าง PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.35) กรณีตัวอย่าง PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT9 แสดงน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า $19.60\times10^5$ กรัมต่อโมล นั้นคาดว่าอาจสัมพันธ์กับกลไก Polymerization และ Depolymerization ของจุลินทรีย์ที่ผลิต

**ตารางที่ 3.35** ลักษณะเฉพาะในเบื้องต้นของ PHA ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9

| PHA | $\overline{M}_W$ ($\times10^5$g/mol) | 1st run $T_m$ (°C) | 2nd run $T_m$ (°C) | $T_c$ (°C) |
|---|---|---|---|---|
| SUT-NZT6 | 2.98 | 167.70 | 168.60 | 71.30 |
| SUT-NZT9 | >19.60 | 171.07 | 167.55 | 60.59 |

กรณี Poly(3-hydroxybutaric acid) [P(3HB)] ประกอบด้วยหน่วยซ้ำของ (R)-3HB เป็นชนิดของ PHA ที่สร้างโดยแบคทีเรียที่เป็นที่รู้จักกันดี และเป็นพอลิเมอร์ที่อาจมีน้ำหนักโมเลกุลสูงในช่วง 200,000 ถึง 3,000,000 daltons (Da) ขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียที่สร้างและสภาวะที่แบคทีเรียเจริญ (Sudesh *et al.*, 2000) แบคทีเรียที่สร้าง P(3HB) มีหลายสกุล ได้แก่ *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Chlorogloea*, *Chromatium*, *Chromobacterium*, *Derxia*, *Ferrobacillus*, *Hyphomicrobium*, *Lampropaedia*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Sphaerotilus*, *Spirillum*, *Streptomyces*, *Vibrio* และ *Zoogloea* (Byrom, 1987; Luengo *et al*., 2003; Singh *et al*., 2009)

**3.3.2.3 การทดสอบเบื้องต้นในการให้ความร้อน PHA ที่เตรียมเป็น Compression-molded film**

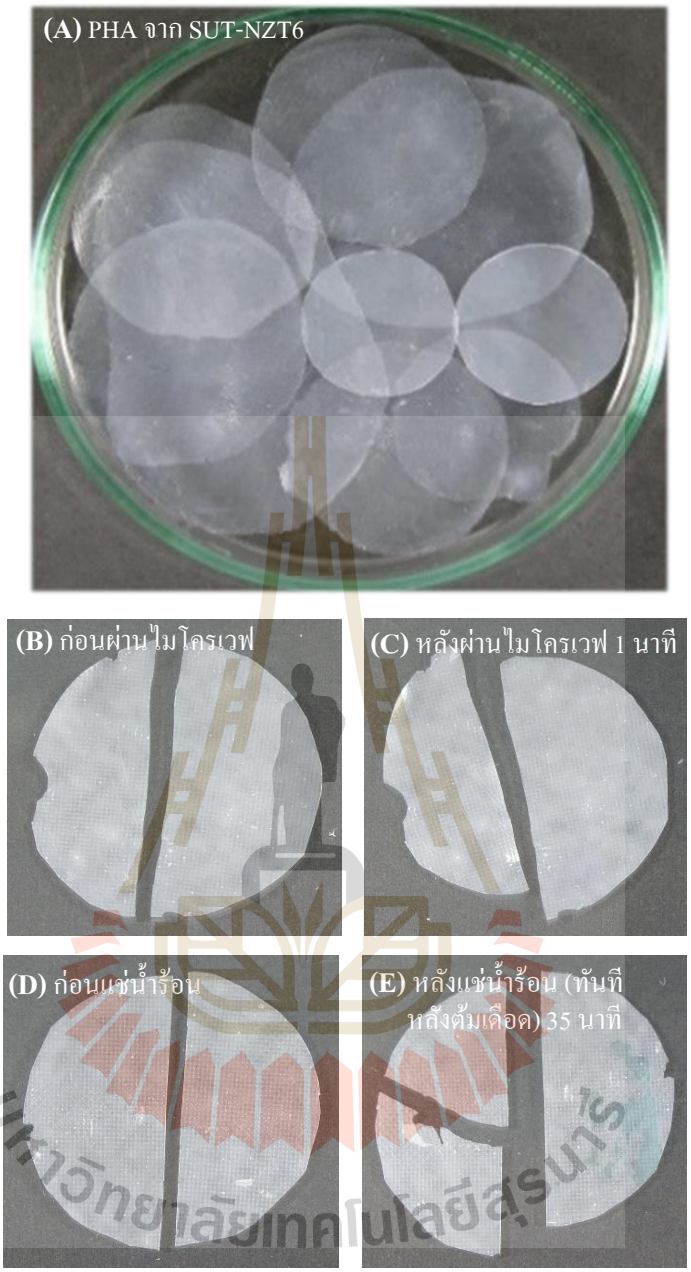
ทดสอบเบื้องต้นในการให้ความร้อน PHA ที่เตรียมเป็น Compression-molded film (ใช้อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส) จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 (รูปที่ 3.34A) ด้วยวิธีให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ และแช่น้ำร้อนต้มเดือด โดยเตรียมตัวอย่างสำหรับทดสอบ ตัดแบ่งครึ่งแผ่น PHA film เป็น 2 ส่วน (รูปที่ 3.34B และ 3.34D) นำตัวอย่างที่เตรียมได้วางในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) นำเข้าเครื่องไมโครเวฟที่ 700 วัตต์ (W) ตั้งเวลา 1 นาที นำตัวอย่างออกจากเครื่องไมโครเวฟและตรวจลักษณะปรากฏ พบว่า PHA film หดตัวเล็กน้อย และเหนียวใกล้เคียงกับก่อนเข้าไมโครเวฟ (ตารางที่ 3.36 และรูปที่ 3.34C) สำหรับการทดสอบแช่น้ำร้อน ต้มเดือดน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร บนผ่านให้ความร้อน (Hot plate) เมื่อเดือดยกบีกเกอร์ลงจากผ่านให้ความร้อน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ปากคีบหนีบแผ่นตัวอย่างที่เตรียมไว้ (รูปที่ 3.34D) แช่ในน้ำร้อนทันที ตรวจดูลักษณะ

ปรากฏที่เวลา 5, 10, 15, 20, 25, 30, และ 35 นาที เริ่มเปลี่ยนจากเหนียวเป็นเปราะที่ 25 นาที (ตารางที่ 3.36 และรูปที่ 3.34E)

**ตารางที่ 3.36** การเปลี่ยนแปลงของพอลิเมอร์ PHA เตรียมเป็น Compression-molded film (ใช้อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส) จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 เมื่อทดสอบให้ความร้อนเบื้องต้นด้วยการนำเข้าไมโครเวฟ 700 W เป็นเวลา 1 นาที และแช่น้ำร้อนปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่ทันทีหลังต้มเดือด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-35 นาที

| วิธีให้ความร้อน | การเปลี่ยนแปลงของ PHA film |
|---|---|
| ไมโครเวฟ 700 W 1 นาที | หดตัวเล็กน้อย และเหนียวใกล้เคียงกับก่อนเข้าไมโครเวฟ |
| น้ำร้อนแช่ทันทีหลังต้มเดือด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-35 นาที | เริ่มเปลี่ยนจากเหนียวเป็นเปราะที่ 25 นาที |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี




**รูปที่ 3.34** ลักษณะของ Compression-molded film (เตรียมจากการใช้อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส) ของ PHA จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 (A) และลักษณะของพอลิเมอร์ PHA film เมื่อทดสอบให้ความร้อนเบื้องต้นโดยก่อน (B) และหลัง (C) เข้าไมโครเวฟ 700 W เป็นเวลา 1 นาที และก่อน (D) และหลัง (E) แช่น้ำร้อนปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่ทันทีหลังต้มเดือด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 35 นาที

# บทที่ 4
# บทสรุป

## 4.1 สรุปผลการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการวิจัย การผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพจากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะ เสร็จสิ้นครบถ้วนตามวัตถุประสงค์ กล่าวคือ (1) ได้พอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates, PHA) เป็นพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ได้จากกระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์ มีศักยภาพในการใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์และบรรจุภัณฑ์ อย่างไรก็ตามการผลิต PHA ยังมีข้อจำกัดด้านวัตถุดิบ กระบวนการผลิต และกรรมวิธีการสกัด ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงและความปลอดภัยต่ำจากตัวทำละลายอันตรายที่ใช้สกัด จึงเป็นโอกาสในการวิจัยและพัฒนาเพื่อนำไปสู่การผลิต PHA ที่ลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายและมีต้นทุนต่ำลง ที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะ จากการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลัง สาร PHA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เป็นสายพันธุ์ปลอดภัย คัดแยกได้ในประเทศไทย ต่างกันจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Chryseobacterium* sp. SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 มีสมบัติที่สามารถทำฟิล์มและขึ้นรูปได้ และมีอุณหภูมิหลอมที่สูง ~168 องศาเซลเซียส ใกล้เคียงกับอุณหภูมิหลอมของ Polyethylene (~139 องศาเซลเซียส) และ Polypropylene ชนิด Isotactic polypropylene (~171 องศาเซลเซียส) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากปิโตรเคมีที่มีการใช้งานอยู่ทั่วไปในปัจจุบัน (2) ได้กระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ศึกษา ระดับห้องปฏิบัติการแบบกึ่งกะสองขั้นตอน ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อจากผลการศึกษาปริมาตร 5-10 ลิตร (3) ได้กรรมวิธีการสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่ศึกษาด้วยกรรมวิธีที่ปลอดภัย ลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและราคาแพง ส่งผลให้มีต้นทุนต่ำกว่าวิธีที่ใช้กันโดยทั่วไปในปัจจุบัน และตรวจสอบคุณลักษณะสำคัญของพอลิเมอร์ PHA ที่ได้ เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งาน สนับสนุนการใช้ทรัพยากรจุลินทรีย์ของประเทศไทยให้เป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจยิ่งขึ้น (4) ผลงานวิจัยที่เผยแพร่ ตามระบุในเอกสารแนบ และ (5) ผลผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีประสบการณ์จากการเป็นผู้ช่วยนักวิจัย

ผลสรุปข้างต้นจากการทดลองผลิตสาร PHA จากการใช้แป้งมันสำปะหลังทั้งที่เตรียมโดยผ่านและไม่ผ่านการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้ศึกษาและคัดเลือกจากโครงการวิจัยที่ผู้วิจัยได้ดำเนินการแล้วจำนวน 12 ไอโซเลท (สายพันธุ์) เพื่อตรวจสอบลักษณะปรากฏของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ในเบื้องต้น เลือกได้แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ที่นำมาศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังในระดับห้องปฏิบัติการ ศึกษากระบวนการและสภาวะที่เหมาะสมในผลิตสาร PHA จากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่คัดเลือกนั้น ศึกษาการสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ศึกษาและตรวจสอบคุณลักษณะสำคัญโดยเฉพาะ

อย่างยิ่งด้านความเหนียว ยืดหยุ่น แข็ง หรือเปราะ ของพอลิเมอร์ PHA ที่ผลิตได้ เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งานด้านต่างๆ

การศึกษาในรายละเอียดนั้นได้พัฒนาสูตรอาหารเพื่อเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลททั้งอาหารสมบูรณ์ (Complex medium) สำหรับการเจริญและ Minimal medium สำหรับการสะสมสารพอลิเมอร์ Complex medium สำหรับการเจริญของแบคทีเรีย ที่เริ่มพัฒนาประกอบด้วย Tryptone 0.5%, Polypeptone 0.5%, Yeast extract 0.5%, Sodium chloride 0.25% และ Glucose หรือแป้งมันสำปะหลัง 1.0% ส่วน Minimal medium สำหรับการสะสมสารพอลิเมอร์มีส่วนประกอบหลักคือ Glucose 1.0%, Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1%, Calsium chloride ($CaCl_2.2H_2O$) 0.001%, Ferrous ammonium citrate 0.005%, Potassium dihydrogen phosphate ($KH_2PO_4$) 0.14%, Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$) 0.02% และ Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4$) 0.3% ซึ่งได้เลี้ยงแบคทีเรียและตรวจสอบ PHA ที่สะสมในเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พร้อมทั้งตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและแบบส่องผ่าน คัดเลือกได้แบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ซึ่งมี 2 ไอโซเลท (SUT-NZT6 และ SUT-NZT9) เจริญได้ดีในอาหารที่เตรียมโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ($\alpha$-Amylase และ Glucoamylase) อีก 2 ไอโซเลท (SUT-CST2-2 และ SUT-CCA2) เจริญได้ดีในอาหารที่เตรียมโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

จากที่ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต PHA มีขั้นตอนการสกัด PHA โดยแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยง และล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ปลอดเชื้อ นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธีการ Freeze drying ล้างตะกอนเซลล์แห้งด้วยเมทานอล และสกัดด้วย 1,2-Dichloroethane ที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่า 30 นาที กรองสารสกัดขณะร้อนผ่านสำลี และนำสารสกัดที่ได้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนสารละลายเกิดเป็นตะกอนลักษณะคล้ายเจล นำสารละลายสกัดไประเหยแยกตัวทำละลาย 1,2-Dichloroethane ออกจากผลึก PHA โดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ พบว่าสามารถสกัดแยก PHA ได้ แต่มีเพียง PHA ที่ผลิตโดยไอโซเลท SUT-NZT6 และ SUT-NZT9) ที่มีความเหนียวและทนอุณหภูมิสูงได้ใกล้เคียงกับพลาสติกจากปิโตเคมีที่ใช้งานโดยทั่วไป คือสามารถเตรียม Compression-molded film ที่ใช้อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส ได้ และใกล้เคียงกับ PHA ชนิด PHV จากการค้า (Sigma, Sigma-Aldrich, Inc.) ส่วน PHA ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกอีก 2 ไอโซเลท (จัดอยู่ในสกุล *Chryseobacterium* ตาม ลักษณะทางสัณฐานและสมบัติทางชีวเคมี) มีความเปราะ แต่ก็ยังสนใจที่จะศึกษาการผลิตต่อไปเนื่องจากอาจใช้ในรูปแบบพอลิเมอร์ผสม

เมื่อศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHA โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก จากแป้งมันสำปะหลังทั้งที่เตรียมโดยผ่านและไม่ผ่านการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ที่เลือกจากข้อ 7.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100-1,000 มิลลิลิตร บ่มให้เชื้อเจริญที่สภาวะที่ระบุตามข้อมูลพื้นฐานของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ตรวจวัดการเจริญของเชื้อที่เพาะเลี้ยงและตรวจสอบปริมาณ PHA ที่สะสมภายในเซลล์ ด้านปัจจัยด้านสารอาหาร

เพื่อการเจริญและการผลิต PHA โดยศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแป้งมันสำปะหลังซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งที่เตรียมโดยผ่านและไม่ผ่านการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ จากสูตรอาหารเริ่มต้น ผลการทดลองเลี้ยง SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ในอาหาร Complex medium ที่เติม Hydrolyzed cassava starch เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก มีความเหมาะสมที่ได้ความเข้มข้นของเซลล์ถึงมากกว่า $10^{11}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากปริมาณเซลล์เริ่มต้น (0 ชั่วโมง) $10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อย้ายแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหาร Minimal medium ที่เติม Hydrolyzed cassava starch 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเทียบกับกลูโคสเข้มข้น 10 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าทั้งกลูโคสที่ความเข้มข้น 10 และ 20 กรัมและ Hydrolyzed cassava starch ให้ผลผลิตเซลล์โดยเฉลี่ย $10^{11}$ CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อ 48 ชั่วโมง

กรณีชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน ได้ทดลองเพื่อหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนหลายชนิดมีองค์ประกอบที่เป็นสารส่งเสริมการเจริญ (Growth factor) โดยใช้ส่วนประกอบของอาหารที่ได้จากการศึกษาในข้อ 7.2.1.1 โดย Complex medium ศึกษาแหล่งของไนโตรเจน คือ โปรตีนจากถั่วเหลือง (Soy protein, Food grade, Solea™) ยีสต์แห้งที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (Spent brewer's yeast) จากบริษัท อาหารเสริม ในเครือ บริษัท เบียร์ไทย (1991) และยูเรีย (Urea, AR grade, Carlo Erba Reagents) รวมทั้งทดลองใช้รำข้าวสกัดน้ำมัน (Defatted rice bran) จากบริษัท นิวทริชั่น แอนด์ คอสเมติกส์ จำกัด ประเทศไทย เพื่อลดปริมาณที่จำเป็นต้องใช้หรือใช้ทดแทน Tryptone (Lab grade, HiMedia) และ Yeast extract (Lab grade, HiMedia) ซึ่งมีราคาแพง ส่วน Minimal medium พิจารณาใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate, AR grade, Carlo Erba Reagents) เป็นแหล่งไนโตรเจน จากแบคทีเรียที่คัดเลือก 2 สายพันธุ์/ไอโซเลท สามารถผลิตพอลิเมอร์ที่มีความเหนียว เมื่อนำมาศึกษาการศึกษาปัจจัยด้านสารอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนและสารส่งเสริมการเจริญ (Growth factor) พบว่าโปรตีนจากถั่วเหลืองและรำข้าวสกัดน้ำมันนั้น ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียได้ดีแต่ไม่เหมาะสมในสภาวะการศึกษาปัจจุบันเนื่องจากมีกากเหลือที่เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ส่งผลความยุ่งยากของกระบวนการแยกเซลล์แบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อและขั้นตอนการสกัดสารจากเซลล์แบคทีเรีย อาจพิจารณาปรับใช้ในอนาคตเมื่อได้พัฒนากรรมวิธีเก็บเกี่ยวเซลล์แยกจากตะกอน

กรณี Minimal medium จากผลการศึกษาใช้ Ammonium sulphate ปริมาณ 0.1% ซึ่งจัดว่าเป็นปริมาณน้อยจึงคงไว้ เมื่อศึกษาความจำเป็นที่ต้องเติม Essential element และ/หรือ Growth factor ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นผลจากการศึกษา พบว่าอาหารที่มีส่วนประกอบหลักคือ Glucose 1.0%, Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1%, Calsium chloride ($CaCl_2.2H_2O$) 0.001%, Ferrous ammonium citrate 0.005%, Potassium dihydrogen phosphate ($KH_2PO_4$) 0.1%, Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$) 0.02% และ Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4$) 0.3% มีความเหมาะสมต่อการใช้เพื่อกระตุ้นการสะสมสารพอลิเมอร์ของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกได้ จากที่ได้เปรียบเทียบการใช้อาหารที่มีส่วนประกอบต่างกัน 10 สูตร

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHA โดยเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ใน Complex medium และ Minimal medium ที่ระดับอุณหภูมิ 25, 28, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างจากการเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 เจริญและสะสม PHA ได้ดีทั้งที่อุณหภูมิ 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นระดับอุณหภูมิช่วงอุณหภูมิใกล้อุณหภูมิห้องโดยเฉลี่ยของประเทศไทย ลดพลังงานที่ต้องใช้เพื่อให้ความร้อนหรือทำความเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิขณะเลี้ยงแบคทีเรีย จึงเลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (Inoculum size) ที่เหมาะสม ศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถเตรียมและใช้ประโยชน์ทั้งแบคทีเรียกล้าเชื้อและสารในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างคุ้มค่าที่สุด ทดลองผลิต PHA จากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่พัฒนาได้ ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียเฉพาะสายพันธุ์ ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นโดยเฉลี่ย $10^6$-$10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในช่วง 1-10% ซึ่งสูงสุดของจุดคุ้มทุน ที่ไม่ควรใช้ในปริมาณกล้าเชื้อมากกว่านี้ ผลการทดลองเลี้ยง SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 พบว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากันคือ 5% โดยปริมาตร

การพัฒนารูปแบบของการเลี้ยงแบคทีเรีย ได้ศึกษาวิธีการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 แบบ Fed-batch process ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) และพัฒนาให้ได้กระบวนการที่ปฏิบัติได้ง่ายและใช้เวลาสั้นในการผลิต PHA โดยใช้ข้อมูลความต้องการสารอาหาร และปัจจัยทางกายภาพตามที่ได้ศึกษาแล้วมาช่วยวางแผนการพัฒนารูปแบบของการเลี้ยงแบคทีเรีย โดยคาดหวังว่าการเพิ่มมวลของเซลล์ (น้ำหนักเปียก) ได้ไม่น้อยกว่า 80 กรัมต่อลิตร จากการผลิตเซลล์แบคทีเรีย SUT-NZT6 และ SUT-NZT6 ที่สะสม PHA ที่เลี้ยงด้วยอาหาร Complex medium และ Minimal medium ที่มีส่วนประกอบและสภาวะการเลี้ยงต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ปริมาตรอาหาร 5 ลิตร ได้ผลสรุปตามตารางที่ 3.37 ซึ่งเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียให้ผลิตพอลิเมอร์พีเอชเอระดับห้องปฏิบัติการแบบกึ่งกะสองขั้นตอน ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อจากผลการศึกษาปริมาตร 5-10 ลิตร ด้วยสภาวะเหมาะสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที การเลี้ยงแบคทีเรียในขั้นตอนแรกใช้อาหารสมบูรณ์เตรียมจากแป้งมันสำปะหลังปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ปริมาตร 3 ใน 5 ส่วนของปริมาตรสุดท้าย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารขั้นต่ำที่มีกลูโคสความเข้มข้นสุดท้าย 10 กรัมต่อลิตร ให้ครบปริมาตรสุดท้าย เลี้ยงแบคทีเรียต่ออีก 48 ชั่วโมง สามารถผลิตเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 ได้โดยเฉลี่ย 81.57 และ 79.48 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) ราว 15 และ 14 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ที่มีพีเอชเอสะสมไม่น้อยกว่าร้อยละ 26 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

**ตารางที่ 3.37** ผลผลิตเซลล์แบคทีเรีย SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 เลี้ยงด้วยอาหาร Complex medium และ Minimal medium ที่มีส่วนประกอบและสภาวะการเลี้ยงต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ปริมาตรอาหาร 5 ลิตร

| **Bacterial isolate code/ Medium and cultivation conditions** | **Cell yields (g) of SUT-NZT6/ SUT-NZT9** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Wet cells** | | **Dry cells** | |
| | **5 L** | **1 L** | **5 L** | **1 L** |
| **1. Complex medium no. 2** (ตารางที่ 3.10) ปริมาตร 5 ลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที กวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกของเหลวออก เติม **Minimal medium no. 1** (ตารางที่ 3.8 เทียบเท่าตารางที่ 3.15) ปริมาตร 5 ลิตร เลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเดิมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง<br>โดยอาหาร Complex medium มี Cassava starch hydrolysate เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมยีสต์แห้งที่ใช้แล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์และรำข้าวสกัดไขมัน เติมรำสกัดไขมันและกากยีสต์เข้มข้น 10 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อเป็นทางเลือกของอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก ทดแทน Tryptone, Polypeptone และ Yeast extract ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และ Minimal medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร แบคทีเรียสายพันธุ์ SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 มีการเจริญสูงสุดที่ $4.00\times10^{10}$ และ $4.66\times10^{11}$ CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้เซลล์แบคทีเรีย 24.15 และ 24.27 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเปียก) หรือ 3.51 และ 3.53 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.12) | 120.75/ 121.35 | 24.15/ 24.27 | 17.55/ 15.65 | 3.51/ 3.53 |
| **2. Complex medium no. 1** (ตารางที่ 3.10 เทียบเท่าตารางที่ 3.15) ปริมาตร 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที กวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกของเหลวออก เติม **Minimal medium no. 2** (ตารางที่ 3.8) ปริมาตร 5 ลิตร เลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเดิมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง | 120.75/ 121.35 | 69.93/ 56.74 | 17.55/ 15.65 | 13.01/ 10.88 |

**ตารางที่ 3.37** (ต่อ) ผลผลิตเซลล์แบคทีเรีย SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 เลี้ยงด้วยอาหาร Complex medium และ Minimal medium ที่มีส่วนประกอบและสภาวะการเลี้ยงต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ปริมาตรอาหาร 5 ลิตร

| **Bacterial isolate code/ Medium and cultivation conditions** | **Cell yields (g) of SUT-NZT6/ SUT-NZT9** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Wet cells** | | **Dry cells** | |
| | **5 L** | **1 L** | **5 L** | **1 L** |
| โดย Complex medium เติม Cassava starch hydrolysate เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10% โดยปริมาตร ($10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยประมาณ) ควบคุมควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติม Minimal medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้นสุดท้าย 30 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นทางเลือกของอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังผ่านการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Minimal medium ปริมาตร 5 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.26 และ 3.27) | | | | |
| **3. Complex medium** (ตารางที่ 3.15) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (ที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1.5 ลิตร มีการเติม Complex medium ปริมาตร 0.5 ลิตร **ที่เวลา 10 และ 18 ชั่วโมง**ของการเลี้ยงเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม **Minimal medium** (ตารางที่ 3.15) ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร เลี้ยงแบคทีเรียด้วยสภาวะเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.28) | 349.65/ 283.70 | 69.93/ 56.74 | 65.05/ 54.40 | 13.01/ 10.88 |
| **4. Complex medium** (ตารางที่ 3.15) ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1.5 ลิตร ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 1.5 ลิตร เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | 360.15/ 353.25 | 72.03/ 70.65 | 63.30/ 62.10 | 12.66/ 12.42 |

**ตารางที่ 3.37** (ต่อ) ผลผลิตเซลล์แบคทีเรีย SUT-NZT6 และ SUT-NZT9 เลี้ยงด้วยอาหาร Complex medium และ Minimal medium ที่มีส่วนประกอบและสภาวะการเลี้ยงต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดบรรจุ 7.5 ลิตร (BioFlo®/CelliGen® 115) ปริมาตรอาหาร 5 ลิตร

| **Bacterial isolate code/ Medium and cultivation conditions** | **Cell yields (g) of SUT-NZT6/ SUT-NZT9** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Wet cells** | | **Dry cells** | |
| | **5 L** | **1 L** | **5 L** | **1 L** |
| ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที อัตราเร็วการกวน 300 รอบต่อนาที เติมอาหาร Complex medium ใหม่เพิ่มจำนวน 3 ครั้ง **ที่เวลา 10, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ** ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง และเติมอาหาร **Minimal medium** (ตารางที่ 3.15) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 ลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องด้วยสภาวะเช่นเดียวกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.29) | | | | |
| **5. Complex medium** (ตารางที่ 3.15) ปริมาตร 3 ลิตร เติมเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร (มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยประมาณ $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส pH ที่ 7.0 ให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เติมอาหาร Complex medium ใหม่เพิ่มจำนวน 4 ครั้ง **ที่เวลา 10, 12, 14 และ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ** ครั้งละ 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงต่อเนื่องจนครบ 24 ชั่วโมง แทนที่ปริมาตร 1 ลิตร ด้วย **Minimal medium** (ตารางที่ 3.15) เข้มข้น 5 เท่า โดยการปั่นเหวี่ยงแยกของเหลวออก เลี้ยงด้วยสภาวะการเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.30) | 407.85/ 397.40 | **81.57/ 79.48** | 75.65/ 71.50 | 15.13/ 14.03 |

จากการศึกษาการสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่ศึกษาและตรวจสอบคุณลักษณะสำคัญของ PHA ที่ได้ เพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งานทดสอบสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ศึกษา ตามกรรมวิธีที่ใช้ความรู้จากงานวิจัยที่มีอยู่ก่อนแล้ว และดัดแปลงเพื่อให้มีความเหมาะสมกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ศึกษา ตรวจสอบลักษณะปรากฏของพอลิเมอร์ PHA ที่ผลิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านความเหนียว ยืดหยุ่น แข็ง หรือเปราะ พร้อมทั้งตรวจสอบข้อมูลที่มีรายงานเพิ่มเพื่อวางแผนการทดลอง

การสกัดและแยกสาร PHA ออกจากเซลล์ของแบคทีเรีย (Vanlautem and Gilain, 1980) ในการสกัดมีขั้นตอนการทำแห้งเซลล์ของจุลินทรีย์ที่สะสม PHA แล้วจึงสกัด PHA โดยใช้ Halogenated

solvents จากนั้นแยก PHA ออกด้วย Solvent ที่มี Polarity ต่ำ เช่น Methanol และ Hexane แต่เนื่องจากสารประเภท Halogenated solvents เป็นสารอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมจึงมีข้อจำกัดในการใช้ และไม่สามารถใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ต่อมามีการใช้ Non-halogen solvents ได้แก่ Alcohol, Ester, Amide และ Ketone เป็นต้น แทนการใช้ Halogenated solvents แต่มีข้อจำกัดที่ว่า PHA สามารถละลายใน Non-halogen solvents ได้น้อยที่อุณหภูมิห้อง จึงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงในการสกัดเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของ PHA ทำให้เกิดปัญหาที่ตามมา คืออุณหภูมิสูงมีแนวโน้มทำให้มวลโมเลกุลของ PHA ลดลงตามระยะเวลาที่สกัด ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยลดระยะเวลาในการสกัดลง จากนั้นแยกสารสกัดออกโดยการระเหย การปั่นแยก หรือการกรอง

จากข้อมูลที่มีรายงานตามข้างต้น ทางโครงการได้พัฒนาวิธีการสกัด PHA ที่อาศัยสมบัติของเซลล์แบคทีเรียและหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีอันตรายตามที่มีรายงาน นิยมใช้สารทำละลายอินทรีย์กลุ่ม Halogenated hydrocarbon solvents เช่น Chloroform, Dichloroethane, Dichloromethane และ Dichloropropane เป็นต้น สารทำละลายอินทรีย์กลุ่ม Halogenated hydrocarbon solvents ที่ให้ผลการสกัดดีที่สุด คือ 1,2-Dichloroethane และ 1,1,2-Trichloroethane วิธีการสกัดพอลิเมอร์พีเอชเอจากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่พัฒนานี้ เป็นกรรมวิธีที่ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายที่มีประสิทธิภาพสูงเป็นสารสกัด และสามารถพัฒนาต่อให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นและต้นทุนต่ำกว่าวิธีที่ใช้อย่างแพร่หลายทั่วไป

สาร PHA มีลักษณะผลึกภายหลังการสกัดจากเซลล์แบคทีเรียที่มีแนวโน้มการนำไปใช้ประโยชน์ได้ดี 2 ตัวอย่าง ที่มีโครงสร้าง Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] และ Poly(4-hydroxybutyrate) [P(4HB)] เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย มีอุณหภูมิหลอมสูงโดยเฉลี่ย 168.60 และ 167.55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

จุดเด่นของงานวิจัยที่ได้โดยสรุป ได้แก่

1) สารพอลิเมอร์ PHA ชนิดที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ มีสมบัติที่สามารถทำฟิล์มและขึ้นรูปได้ดี มีอุณหภูมิหลอมที่สูง ~168 องศาเซลเซียส ใกล้เคียงกับอุณหภูมิหลอมของ Polyethylene (~139 องศาเซลเซียส) และ Polypropylene ชนิด Isotactic polypropylene (~171 องศาเซลเซียส) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากปิโตรเคมีที่มีการใช้งานอยู่ทั่วไป จึงอาจประยุกต์ใช้ประโยชน์ PHA ที่ได้ทั้งด้านการแพทย์และบรรจุภัณฑ์

2) แบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เป็นทรัพยากรจุลินทรีย์ของประเทศไทย ที่มีศักยภาพในการผลิตพอลิเมอร์พลาสติกชนิด PHA จากแป้งมันสำปะหลัง เป็นการใช้ทรัพยากรจุลินทรีย์ของประเทศไทยให้เป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจ และช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มแก่มันสำปะหลัง เพื่อเสถียรภาพด้านราคาแก่พืชผลทางการเกษตรของประเทศไทย

3) กรรมวิธีการสกัดสาร PHA จากเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่ศึกษา ด้วยกรรมวิธีที่ปลอดภัย ลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายที่มีประสิทธิภาพสูงเป็นสารสกัด และต้นทุนต่ำกว่าวิธีที่ใช้กันโดยทั่วไป

## 4.2 ข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้มีผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ ที่เป็นพื้นฐานสำคัญของการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อในเชิงลึกในส่วนที่เกี่ยวข้องในประเด็นดังต่อไปนี้

1) การทดลองเพิ่มกำลังการผลิตเซลล์ด้วยระบบถังปฏิกรณ์ควบคุมสภาวะ เพื่อพัฒนาเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิต

2) การพัฒนาวิธีการสกัดพอลิเมอร์จากเซลล์แบคทีเรียต่อเนื่องให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

3) การระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ให้ได้ชนิดหรือสายพันธุ์ที่แน่นอน ด้วยการศึกษาสารพันธุกรรม เพื่อแก้ปัญหาการระบุชนิดและจำแนกสายพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก แบคทีเรียสายพันธุ์ธรรมชาติที่ศึกษาอาจเป็นชนิดหรือสายพันธุ์ใหม่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# บรรณานุกรม


กนกพร สังขรักษ์. 2549. *การผลิตและคุณลักษณะของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดย Rhodobacter sphaeroides ES16*. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุรีลักษณ์ รอดทอง จันทิมา ดีประเสริฐกุล นิธินาถ ศุภกาญจน์ มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์ และ วีระศักดิ์ เลิศสิริโยธิน. 2551. *การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 98 หน้า.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International. 2000. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 17th Edition. Gaithersburg: Official Methods of Analysis of the AOAC International.

Atlas, R.M. 2004. *Handbook of Microbiological Media*. Boca Raton: CRC Press.

Berezina, N. 2013. Novel approach for productivity enhancement of polyhydroxyalkanoates(PHA) production by *Cupriavidus necator* DSM 545. *New Biotechnology*. 30(2): 192-195.

Blauhut, W., Gierlinger, W., and Strempfl, F. 1993. Process for obtaining a polyhydroxyalkanoate from the cell material of a microorganism. *United States Patent no. 5213976.*

Bozzola, J.J. and Russell, L.D. 1992. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Boston: Jones and Bartlett Publishers.

Byrom, D. 1994. Polyhydroxyalkanoates. *In* Mobley D.P. (ed.). *Plastics from Microbes: Microbial Synthesis of Polymers and Polymer Precursors*. Munich: Hanser, pp. 5-33.

Campos, M.I., Figueiredo, T.V.B., Sousa, L.S., and Druzian, J.I. 2014. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necato*r using a response surface methodology and its characterization. *Industrial Crops and Products*. 52: 338-346.

Cappuccino, J.G. and Sherman, N. 2005. *Microbiology: A Laboratory Manual*. 7th Edition. New York: Pearson Education, Inc.

Cavalheiro, J.M.B.T., Raposo, R.S., de Almeida, M.C.M.D., Cesàrio, M.T., Sevrin, C., Grandfils, C., and da Fonseca, M.M.R. 2012. Effect of cultivation parameters on the production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Bioresource Technology*. 111: 391-397.

Chakravartry, P., Mhaisalkar, V., and Chakrabarti, T. 2010. Study on poly-hydroxyalkanoate (PHA) production in pilot scale continuous mode wastewater treatment system. *Bioresouece Technology*. 101: 2896-2899.

Ciesielski, S., Cydzik-Kwiatkowska, A., Pokoj, T., and Klimiuk, E. 2006. Molecular detection and diversity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates-producing bacteria enriched from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology*. 101: 190-199.

Doi, Y., Segawa, A., and Kunioka, M. 1990. Biosynthesis and characterization of poly-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 12: 101-111.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(3): 350-356.

Foster, L.J.R., Sanguanchaipaiwong, V., Gabelisha, C.L., Hookc, J., and Stenzel, M. 2005. A natural-synthetic hybrid copolymer of polyhydroxyoctanoate-diethylene glycol: biosynthesis and properties. *Polymer*. 46: 6587-6594.

Fradinho, J.C., Oehmen, A., and Reis, M.A.M. 2013. Effect of dark/light periods on the polyhydroxyalkanoate production of a photosynthetic mixed culture. *Bioresource Technology*. 148: 474-479.

Goh, Y.S. and Tan, I.K.P. 2012. Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacterial isolate from Casey Station and Signy Island. *Microbiological Research*. 167: 211-219.

Grousseau, E., Blanchet, E., Déléris, S., Albuquerque, M.G.E., Pual, E., and Uribelarrea, J.-L. 2013. Impact of sustaining a controlled residual growth on polyhydroxybutyrate yield and production kinetics in *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*. 148: 30-38.

Gumel, A.M., Annuar, M.S.M., and Heidelberg, T. 2012. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates copolymers produced by *Pseudomonas putida* Bet001 isolated from palm oil mill effluent. *PLOS ONE*. 7(9): 1-8.

Heinrich, D., Madkour, M.H., Al-Ghamdi, M.A., Shabbaj, I.I., and Steinbüchel, A. 2012. Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *AMB Express*. 2(59): 1-6

Hollender, J., Van der Krol, D., Gierden, E., Kornberger, L., and Dott, W. 2002. Effect of different carbon sources on the enhanced biological phosphorus-removal process in sequencing batch reactors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18: 355-360.

Jiang, X., Ramsay, J.A., and Ramsay, B.A. 2006. Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Microbiological Methods.* 67: 212-219.

Khanna, S. and Srivastava, A.K. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 40: 607-619.

Kim, Y.B. and Lenz, R.W. 2001. Polyesters from microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 71: 51-79.

Kim, Y.B., Rhee, Y.H., Han, S.-H., Heo, G.H., and Kim, J.S. 1996. Poly-3-hydroxyalkanoates produced from *Pseudomonas oleovorans* grown with ω-phenoxyalkanoates. *Macromolecules*. 29: 3432-3435.

Kojima, T., Nishiyama, T., Maehara, A., Ueda, S., Nakano, H., and Yamane, T. 2004. Expression profiles of polyhydroxyalkanoate synthesis-related genes in *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 97: 45-53.

Krishna, C. and Van Loosdrecht, M.C.M. 1999. Effect of temperature on storage polymers and settle ability of activated sludge. *Water Research.* 33: 2374-2382.

Krishna, C. and Van Loosdrecht, M.C.M. 1999. Effect of temperature on storage polymers and settle ability of activated sludge. *Water Research.* 33: 2374-2382.

Kunioka, M., Kawaguchi, Y., and Doi, Y. 1989. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 30: 569-573.

Kurdikar, D.L., Strauser, F.E., Solodar, A.J., and Paster, M.D. 2000a. High temperature PHA extraction using PHA-poor solvents. *United States Patent no. 6087471.*

Kurdikar, D.L., Strauser, F.E., Solodar A.J., Paster, M.D., and Asrar, J. 2000b. Methods of PHA extraction and recovery using non-halogenated solvents. *United States Patent no. 6043063.*

Lakshman, K. and Shamala, T.R. 2006. A process for the extraction of polyhydroxyalkanoates from bacteria. *Patent WO 2006103699 A1*.

Lafferty, R.M. and Heinzle, E. 1978. Cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-β-hydroxybutyric acid. *United States Patent no. 4101533.*

Lee, S.Y. 1996. Plastic bacterial progress and prospects for polyhydroxyalkanoates production in bacteria. *Trends in Biotechnology*. 14: 431-438.

Lemos, C., Viana, C., Sagueiro, E.N., Rmas, A.M., Crespo, S.G., and Reis, M.A.M. 1998. Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates by a phosphate accumulating mixed culture. *Enzyme Microbiology and Technology*. 22: 662-71.

Liddell, M.J. 1999. Process for the recovery of polyhydroxyalkanoic acid. *United States Patent no. 5894062.*

Luengo, J.M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., and Olivera, E.R. 2003. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*. 6: 251-260.

Martínez-Sanz, M., Villano, M., Oliveira, C., Albuquerque, M.G., Majone, M., Reis, M., Lopez-Rubio, A., Lagaron, J.M. 2014. Characterization of polyhydroxyalkanoates synthesized from microbial mixed cultures and of their nanobiocomposites with bacterial cellulose nanowhiskers. *New Biotechnology*. 31(4):364-76.

Meng, D.-C., Shi, Z.-Y., Wu, L.-P., Zhou, Q., Wu, Q., Chen, J.-C., and Chen, G.-Q. 2012. Production and characterization of poly(3-hydroxypropionate-co-4hydroxybutyrate) with fully controllable structures by recombinant *Escherichia coli* containing an engineered pathway. *Metabolic Engineering*. 14: 317-324.

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

Moralejo-Gàrate, H., Palmeiro-Sànchez, T., Kleerebezem, R., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., and van Loosdrecht, M.C.M. 2013. Influence of the cycle length on the production of PHA and polyglucose from glycerol by bacterial enrichments in sequencing batch reactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 110(12): 3148-3155.

Narasimhan, K., Noda, I., Satkowski, M.M., Cearley, A.C., Gibson, M.S., and Welling, S.J. 2006. Process for the extraction of polyhydroxyalkanoates from biomass. *United States Patent no. 7118897.*

Noda, I. and Schechtman, L.A. 1999. Solvent extraction of polyhydroxyalkanoates from biomass. *United States Patent no. 5942597.*

Oehmen, A., Pinto, F.V., Silva, V., Albuquerque, M.G.E., and Reis, M.A.M. 2013. The impact of pH control on the volumetric productivity of mixed culture PHA production from fermented molasses. *Engineering in Life Science*. 14: 143-152.

Ojumu, T.V. and Solomon, B.O. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*. 3: 18-24.

Ostle, A.G. and Holt, J.G. 1982. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-β-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*. 44: 238-241.

Pederson, E.N., McChalicher, C.W.J., and Srienc, F. 2006. Bacterial synthesis of PHA block copolymers. *Biomacromolecules*. 7: 1904-1911.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Poirier, Y., Erard, N., and Petetot, M.D.-C.J. 2002. Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Letters*. 207: 97-102.

Reddy, M.V. and Mohan, S.V. 2012. Influence of aerobic and anoxic microenvironments on polyhydroxyalkanoates (PHA) production from food waste and acidogenic effluents using aerobic consortia. *Bioresource Technology*. 103: 313-321.

Riedel, S.L., Barder, J., Brigham, C.J., Budde, C.F., Yusof, Z.A.M., Rha, C., and Sinskey, A.J. 2012. Production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*. 109(1): 74-83.

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

Senior, P.J., Wright, L.F., and Alderson, B. 1982. Extraction process. *United States Patent no. 4324907.*

Shawaphun, S. and Manangan, T. 2010. Study of extraction process and characterization of poly-3-hydroxyalkanoate produced from *Alcaligenes latus*. *KKU Res J*. 15(9): 809-817.

Singh, M., Patel, S.K.S., Kalia, V.C. 2009. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories*. 8: 38 doi:10.1186/1475-2859-8-38.

Steinbüchel, A. 1991. Polyhydroxyalkanoic acids. *In* Byrom D. (ed.). *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources*. New York: Stockton, pp. 124-213.

Steinbüchel, A. 2001. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromolecular Bioscience*. 1: 1-24.

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

Taguchi, K., Taguchi, S., Sudesh, K., Maehara, A., Tsuge, T., and Doi, Y. 2001. Metabolic pathways and engineering of PHA biosynthesis. *In* Doi, Y. and Steinbüchel, A. (eds.). *Biopolymers-Biology*, *Chemistry*, *Biotechnology*, *Applications*, Vol 3A (Polyesters I), Edition 1. Weinheim: Wiley-VCH, pp. 217-247.

Vanlautem, N. and Gilain, J. 1982. Process for separating poly-β-hydroxybutyrates from a biomass. *United States Patent no. 4310684.*

Wang, F. and Lee, S.Y. 1997. Poly(3-hydroxybutyrates) production with high polymer content by fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3703-3706.

Wang, B.Q., Sharma-Shivappa, R.R., Olson, J.W., and Khan, S.A. 2013. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus*using sugarbeet juice. *Industrial Crops and Products*: 4:802–811. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.08.011.

Warankana, P. and Randall, C.W. 1999. Factors affecting the production and storage of polyhydroxyalkanoates in activated sludge biomass. Department of Civil and Environmental Engineering, Virginia Polytechnic Institute and State University Blackburg, VA 24061, USA.

Zhao, D., Cai, L., Wu, J., Li, M., Liu, H., Han, J., and Xiang, H. 2013. Improving polyhydroxyalkanoate production by knocking out the genes involved in exopolysaccharide biosynthesis in *Haloferax mediterranei*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 97: 3027-3036.

Zinn, M., Witholt, B., and Eglia, T. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 53: 5-21.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก สีย้อมจุลินทรีย์

1. Crystal violet (Gram stain)

| | | |
|---|---|---|
| Crystal violet | 2.0 | กรัม |
| Ethanol (95%) | 20.0 | มิลลิลิตร |
| ละลายให้เข้ากัน แล้วจึงเติม | | |
| Ammonium oxalate (1% Aqueous solution) | 80.0 | มิลลิลิตร |

2. Nile blue A (1.0%)

| | | |
|---|---|---|
| Nile blue A | 1.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100.0 | มิลลิลิตร |
| ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง | | |

3. Safranin (Gram stain)

| | | |
|---|---|---|
| Safranin O (2.5% Solution ใน 95% Ethanol) | 10.0 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 90.0 | มิลลิลิตร |
| ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง | | |

## ภาคผนวก ข สารละลายและน้ำยาเคมี

1. Acetone alcohol

| | | |
|---|---|---|
| Alcohol (95%) | 700.0 | มิลลิลิตร |
| Acetone | 300.0 | มิลลิลิตร |
| ผสมให้เข้ากัน | | |

2. Acetone series สำหรับ Electron microscopy specimen dehydration

เตรียม Acetone series ความเข้มข้นในช่วง 20-80% ดังนี้

| Acetone concentration (%) | Acetone (100%, mL) | Distilled water (mL) |
|---|---|---|
| 20 | 20.0 | 80.0 |
| 40 | 40.0 | 60.0 |
| 60 | 60.0 | 40.0 |
| 80 | 80.0 | 20.0 |

3. Epon resin

| | | |
|---|---|---|
| Epon-812 substitute | 20.0 | กรัม |
| Dodecenyl succinic anhydride | 20.0 | กรัม |

| | | |
|---|---|---|
| Methyl-5-norbornene-2-3-dicarboxilic anhydride | 6.0 | กรัม |
| 2,4,6 (Tri(Dimethylaminoethyl)phenol) | 0.7 | กรัม |

ชั่งสารตามลำดับ Polymerize ที่ 60-70 องศาเซลเซียส

4. Formvar (0.3%)

| | | |
|---|---|---|
| Formvar | 0.3 | กรัม |
| Ethylene dichloride | 100.0 | มิลลิลิตร |

ชั่ง Formvar 0.3 กรัม ละลายใน Ethylene dichloride ปรับปริมาตรให้ได้ 100.0 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น

5. Glutaraldehyde (2%) ใน 0.1M Cacodylate buffer

| | | |
|---|---|---|
| Glutaraldehyde (25%) | 8.0 | มิลลิลิตร |
| 0.1M Cacodylate buffer | 92.0 | มิลลิลิตร |

สารละลาย 0.1M Cacodylate buffer (pH 7.2) เตรียมได้ดังนี้

Solution A: Sodium cacodylate (0.2M)

| | | |
|---|---|---|
| Sodium cacodylate | 42.8 | กรัม |
| เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ | 1,000.0 | มิลลิลิตร |

Solution B: Hydrochloric acid (0.2M)

| | | |
|---|---|---|
| Hydrochloric acid | 16.5 | มิลลิลิตร |
| เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ | 1,000.0 | มิลลิลิตร |

เตรียมสารละลาย 0.1M Cacodylate buffer ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Solution A | 50.0 | มิลลิลิตร |
| Solution B | 4.2 | มิลลิลิตร |

6. Iodine solution (Gram's iodine)

| | | |
|---|---|---|
| Iodine | 1.0 | กรัม |
| Potassium iodide | 2.0 | กรัม |

ละลายสารทั้งสองชนิดในน้ำ โดยค่อยๆ เติมน้ำทีละน้อย จนกระทั่ง Iodine ละลายหมด

| | | |
|---|---|---|
| เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ | 300.0 | มิลลิลิตร |

เก็บไว้ในขวดสีชา

7. Osmium tetroxide (2%)

| | | |
|---|---|---|
| Osmium tetroxide | 0.5 | กรัม |
| Phosphate buffer (0.1M) | 25.0 | มิลลิลิตร |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผสมให้เข้ากันบรรจุสารละลายไว้ในขวดแก้ว ปิดฝาให้แน่นและหุ้มฝาด้วยพาราฟิล์ม เก็บสารละลายในตู้เย็น

8. Phosphate buffer (0.2M)

เตรียม Stock solution A และ B สำหรับ Phosphate buffer (0.2M) ดังนี้

Solution A:

| | | |
|---|---|---|
| $NaH_2PO_4.H_2O$ | 27.60 | กรัม |

ชั่ง $NaH_2PO_4.H_2O$ 27.60 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

Solution B:

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2HPO_4$ | 28.40 | กรัม |

ชั่ง $Na_2HPO_4$ 28.40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

Phosphate buffer solution (0.2M):

| Solution A (mL) | Solution B (mL) | pH |
|---|---|---|
| 73.5 | 26.5 | 6.4 |
| 68.5 | 31.5 | 6.5 |
| 62.5 | 37.5 | 6.6 |
| 56.5 | 43.5 | 6.7 |
| 51.0 | 49.0 | 6.8 |
| 45.0 | 55.0 | 6.9 |
| 39.0 | 61.0 | 7.0 |
| 33.0 | 67.0 | 7.1 |
| 28.0 | 72.0 | 7.2 |
| 23.0 | 77.0 | 7.3 |
| 19.0 | 81.0 | 7.4 |
| 16.0 | 84.0 | 7.5 |

9. Sodium chloride (NaCl) solution (0.85%)

| | | |
|---|---|---|
| Sodium chloride | 85.0 | กรัม |
| เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ | 1,000.0 | มิลลิลิตร |

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

10. Sodium dodecylsulfate (SDS) (10% w/v)

| | | |
|---|---|---|
| Sodium dodecylsulfate (SDS) | 100.0 | กรัม |
| เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ | 1,000.0 | มิลลิลิตร |

11. Uranyl acetate (4% w/v)

| | | |
|---|---|---|
| Uranyl acetate | 4.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น หรือ Ethanol (70%) | 100.0 | มิลลิลิตร |

ชั่ง Uranyl acetate 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น หรือ Ethanol (70%) เก็บค้างคืน กรอง แล้วเก็บในขวดสีชาในตู้เย็น

## ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Complex medium ดัดแปลงจาก Kunioka *et al*. (1989), Khanna and Srivastava (2005), Luengo *et al*. (2003), Atlas (2004) และ Pederson *et al*. (2006)

| | | |
|---|---|---|
| Tryptone | 5.0 | กรัม |
| Polypeptone | 5.0 | กรัม |
| Yeast extract | 5.0 | กรัม |
| Sodium chloride | 2.5 | |
| Cassava starch | 30.0 | กรัม |
| เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

2. Minimal medium ดัดแปลงจาก Kunioka *et al*. (1989), Khanna and Srivastava (2005), Luengo *et al*. (2003), Atlas (2004) และ Pederson *et al*. (2006)

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 10.00 | กรัม |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1.00 | กรัม |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.01 | กรัม |
| Ferrous ammonium citrate | 0.05 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 1.00 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.20 | กรัม |
| $Na_2HPO_4$ | 3.00 | กรัม |
| Trace element solution | 1.00 | มิลลิลิตร |
| เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ | 1,000 | มิลลิลิตร |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ละลายส่วนผสม จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

Trace element solution ประกอบด้วย $H_3BO_3$ 0.3 กรัม, $CoCl_2.6H_2O$ 0.2 กรัม, $ZnSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม, $MnCl_2.4H_2O$ 0.03 กรัม, $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.03 กรัม, $NiCl_2.6H_2O$ 0.02 กรัม และ $CuSO_4.5H_2O$ 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3. Trypticase (tryptic) soy broth (TSB)

| | | |
|---|---|---|
| Trypticase หรือ Tryptose (Pancreatic digest of casein) | 17.0 | กรัม |
| Phytone (Papaic digest of soya meal) | 3.0 | กรัม |
| Sodium chloride | 5.0 | กรัม |
| di-Potassium hydrogen phosphate | 2.5 | กรัม |
| Glucose | 2.5 | กรัม |
| เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH เท่ากับ 7.3±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

4. Trypticase soy agar (TSA)

เตรียมตามส่วนประกอบ TSB เติม Agar 1.5% ละลายส่วนผสมและหลอม Agar ให้ความร้อน ปรับ pH เท่ากับ 7.3±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# ประวัติผู้วิจัย

**ชื่อ-สกุล** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง

**หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่**

สาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-22 4297, 044-22 463 โทรสาร 044-22 4185 e-mail: sureelak@sut.ac.th

**ประวัติการศึกษาและฝึกอบรม**

| | | |
|---|---|---|
| วท.บ. (ชีววิทยา เลือกจุลชีววิทยา) | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ | ประเทศไทย |
| วท.ม. (จุลชีววิทยา) | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ | ประเทศไทย |
| PGDip.Sci. (Biotechnology) with Credit | University of Otago | นิวซีแลนด์ |
| Ph.D. (Microbiology) | University of Otago | นิวซีแลนด์ |
| Post-Doc (Molecular Biology) | University of Guelph | แคนาดา |
| Certificate (International Training Programme in Biotechnology, ITP 12) | Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) | เยอรมนี |
| Certificate (Proficiency in English) | Victoria University of Wellington | นิวซีแลนด์ |
| Certificate (Laboratory Safety Course) | The Laboratory Safety Institute (LSI) | สหรัฐอเมริกา |
| Certificate (Quality Management of Culture Collection for Curators) | National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) | ประเทศไทย |
| Certificate (Culture Collection Techniques) | Bangkok MIRCEN | ประเทศไทย |
| วุฒิบัตร (หลักสูตรการออกแบบและพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ก๊าซชีวภาพ) | สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (ปัจจุบันคือมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี | ประเทศไทย |

**สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ**

พันธุศาสตร์และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ การหมักของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา) และความหลากหลายของชนิดและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกและเชื้อรา

**ผลงานทางวิชาการ**

1. ตำรา หนังสือ/เอกสารประกอบการสอน จำนวน 13 เรื่อง (เล่ม)
2. ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
   วารสารระดับชาติ จำนวน 22 เรื่อง และวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 49 เรื่อง
3. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ใน Proceedings จำนวน 26 เรื่อง
4. ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับชาติ จำนวน 104 เรื่อง
5. ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 100 เรื่อง
6. สิทธิบัตรที่ยื่นคำขอจดทะเบียน จำนวน 6 คำขอ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# เอกสารแนบ

**ผลงานวิจัยของโครงการที่ได้เผยแพร่**

มีการเผยแพร่ผลงานวิจัยในรูปแบบต่างๆ ดังนี้

**1. บทความในหนังสือ**

ผลงานวิจัยในการเตรียมบทความของหนังสือในฐานะผู้เขียนรับเชิญ จำนวน 2 เรื่อง ดังนี้

1) สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2557. สารตั้งต้นจากงานวิจัย. *ใน* สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ (องค์การมหาชน) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. นวัตกรรมพลาสติกชีวภาพไทย. กรุงเทพฯ: สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ (องค์การมหาชน). หน้า 164-171.

2) สุรีลักษณ์ รอดทอง ปราณี ชุมสำโรง นิธินาถ ศุภกาญจน์ และ จันทิมา ดีประเสริฐกุล. 2558. พอลิ- ไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย. *ใน* สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.). พลาสติกชีวภาพ: งานวิจัยสู่อุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: กองบริหารแผนและงบประมาณการวิจัย (กบง.) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.). หน้า 4-6.

**2. วารสารวิชาการ**

ผลงานวิจัยเผยแพร่ในวารสารวิชาการ จำนวน 1 เรื่อง คือ

Chansatein, O., Urairong, H., and Rodtong, S. 2012. Developement of cultivation media for polyhydroxyalkanoates accumulation in bacterial cells isolated from cassava pulp. *Research Journal of Biological Sciences*. 7: 31-37.

**3. การประชุมวิชาการ**

**3.1 การประชุมวิชาการระดับชาติ**

ผลงานวิจัยเผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับชาติ จำนวน 3 เรื่อง ดังนี้

1) สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2554. งานวิจัยจากการประยุกต์ใช้ทรัพยากรจุลินทรีย์ในประเทศไทย (Research from the application of microbial resources in Thailand). *การประชุมวิชาการผลงานวิจัยของนิสิตและบุคลากรภาควิชาชีววิทยา ครั้งที่ 4, 26 มกราคม 2554, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม*. วิทยากรรับเชิญ.

2) Chansatein, O., Urairong, H., and Rodtong, S. 2011. Dominant species of polyhydroxyalkanoates-producing *Bacillus* found in Thailand. *Abstracts of the 1st Conference on Taxonomy and Systematics in Thailand, 2-4 May 2011, Faculty of Science, Naresuan University, Thailand*: 138-139.

3) Chansatein, O. and Rodtong, S. 2011. Polyhydroxyalkanoates-producing Gram-negative bacteria isolated from cassava pulp in Thailand. *Abstracts of the 1st Conference on Taxonomy and Systematics in Thailand*, *2-4 May 2011*, *Faculty of Science, Naresuan University*, *Thailand*: 140-141.

**3.2 การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ**

ผลงานวิจัยเผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 4 เรื่อง ดังนี้

1) Rodtong, S., Songsrirote, S., Sornnok, K., and Nanthisa, M. 2010. Accumulation of intracellular polyhydroxyalkanoates in various genera of heterotrophic bacteria found in Thailand. *Abstracts of the TSB 2010 International Conference on Biotechnology for Healthy Living, 20-22 October 2010, Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand*: 197.

2) Rodtong, S., Songsrirote, S., Pananu, A., and Deeprasertkul, C. 2010. Production of polyhydroxyalkanoates from sugar cane by specific bacterial strains. *Abstracts of the TSB 2010 International Conference on Biotechnology for Healthy Living, 20-22 October 2010, Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand*: 198.

3) Chansatein, O. and Rodtong, S. 2010. Modification of specimen preparation procedure for detecting PHA granule in bacterial cells using electron microscopy. *Abstracts of the TSB 2010 International Conference on Biotechnology for Healthy Living, 20-22 October 2010, Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand*: 295.

4) Chansatein, O. and Rodtong, S. 2010. Diversity study of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp samples. *Abstracts of the TSB 2010 International Conference on Biotechnology for Healthy Living, 20-22 October 2010, Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand*: 296.

**4. การฝึกอบรม**

ผลงานวิจัยเป็นข้อมูลในการบรรยายเพื่อฝึกอบรมให้หน่วยงานของรัฐ ในฐานะวิทยากรรับเชิญ จำนวน 1 เรื่อง ดังนี้

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2553. การผลิตสารมอนอเมอร์และพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพจากแป้งมันสำปะหลังโดยแบคทีเรีย. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง การผลิตและตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทางการเกษตร, 22-25 มิถุนายน 2553, สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จังหวัดปทุมธานี. 27 หน้า. วิทยากรรับเชิญ.

**5. งานจัดแสดงนิทรรศการและประชุมวิชาการ และสิ่งพิมพ์เผยแพร่อื่น**

ผลงานวิจัยเผยแพร่ในงานแสดงนิทรรศการและประชุมวิชาการ และสิ่งพิมพ์เผยแพร่อื่น ดังนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1) สุรีลักษณ์ รอดทอง จันทิมา ดีประเสริฐกุล และ นิธินาถ ศุภกาญจน์. 2555. พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอทจากแป้งมันสำปะหลัง. ร่วมจัดแสดงนิทรรศการภายในงาน “การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2555 (Thailand Research Expo 2012)” ระหว่างวันที่ 24-28 สิงหาคม พ.ศ. 2555 ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ ราชประสงค์ กรุงเทพมหานคร จัดโดย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
2) สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ. 2555. พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอทจากแป้งมันสำปะหลัง. ในเอกสารเผยแพร่เรื่องที่ 10 ของ Science Park, Suranaree University of Technology ในงาน “การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2555 (Thailand Research Expo 2012)”. เทคโนธานี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
3) สุรีลักษณ์ รอดทอง ปราณี ชุมสำโรง นิธินาถ ศุภกาญจน์ และ จันทิมา ดีประเสริฐกุล. 2558. พอลิ-ไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย. ร่วมจัดแสดงนิทรรศการภายในงานเสวนาเรื่อง “เปิดบ้านวิจัยพบผู้ประกอบการพลาสติกชีวภาพ” วันที่ 18 กันยายน พ.ศ. 2558 ณ ห้องประชุมจอมพลสฤษดิ์ ธนะรัชต์ ชั้น 2 อาคาร วช. 1 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) กรุงเทพมหานคร
4) Rodtong, S., Deeprasertkul, C., Suppakarn, N., and Chumsamrong, P. 2013. Bioplastics from cassava. World Tapioca Conference and Thailand Tapioca Exhibition 2013, 20-23 June 2013. Suranaree University of technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.
5) Rodtong, S. and Deeprasertkul, C. 2013. Polyhydroxyalkanoates (PHA) from tapioca starch. World Tapioca Conference and Thailand Tapioca Exhibition 2013, 20-23 June 2013. Suranaree University of technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

**6. ฐานข้อมูล GenBank/ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ประเทศสหรัฐอเมริกา**

ผลงานวิจัยเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank/ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ประเทศสหรัฐอเมริกา จำนวน 13 items ดังนี้

1) Chansatein, O., Rodtong, S., and Urairong, H. 2011. Diversity of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp: *Bacillus* sp. SC4 16S rRNA gene, partial sequence *(*1,410 bp*). GenBank (USA) Nucleotide Sequence*: Accession HQ179137.1. BCT 18-MAY-2011.
2) Chansatein, O., Rodtong, S., and Urairong, H. 2011. Diversity of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp: *Bacillus* sp. CST2-2 16S rRNA gene, partial sequence *(*1,410 bp*). GenBank (USA) Nucleotide Sequence*: Accession HQ179138.1. BCT 18-MAY-2011.

3) Chansatein, O., Rodtong, S., and Urairong, H. 2011. Diversity of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp: *Bacillus megaterium* CCA2-11 16S rRNA gene, partial sequence *(*1,410 bp*). GenBank Nucleotide Sequence*: Accession HQ179139.1. BCT 18-MAY-2011.

4) Chansatein, O., Rodtong, S., and Urairong, H. 2011. Diversity of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp: *Bacillus* sp. CSP2-25-1 16S rRNA gene, partial sequence *(*1,410 bp*). GenBank Nucleotide Sequence*: Accession HQ179140.1. BCT 18-MAY-2011.

5) Chansatein, O., Rodtong, S., and Urairong, H. 2011. Diversity of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp: *Bacillus subtilis* CCA1-24 16S rRNA gene, partial sequence *(*1,410 bp*). GenBank Nucleotide Sequence*: Accession HQ179141.1. BCT 18-MAY-2011.

6) Chansatein, O., Rodtong, S., and Urairong, H. 2011. Diversity of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp: *Bacillus* sp. CSP2-25-1-1 16S rRNA gene, partial sequence *(*1410 bp*).GenBank Nucleotide Sequence*: Accession HQ179142.1. BCT 18-MAY-2011.

7) Chansatein, O., Rodtong, S., and Urairong, H. 2011. Diversity of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp: *Enterobacter hormaechei* sp. CAS5-1 16S rRNA gene, partial sequence *(*1,439 bp*). GenBank Nucleotide Sequence*: Accession HQ179143.1. BCT 18-MAY-2011.

8) Chansatein, O., Rodtong, S., and Urairong, H. 2011. Diversity of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp: *Klebsiella oxytoca* CSP2-21 16S rRNA gene, partial sequence *(*1,407 bp*). GenBank Nucleotide Sequence*: Accession HQ179144.1. BCT 18-MAY-2011.

9) Chansatein, O., Rodtong, S., and Urairong, H. 2011. Diversity of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp: *Staphylococcus cohnii* CWP2-16 16S rRNA gene, partial sequence *(*1,381 bp*). GenBank Nucleotide Sequence*: Accession HQ179145.1. BCT 18-MAY-2011.

10) Chansatein, O., Rodtong, S., and Urairong, H. 2011. Diversity of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp: Bacterium PCA1-1 16S rRNA gene, partial sequence *(*1,435 bp*). GenBank Nucleotide Sequence*: Accession HQ179146.1. BCT 18-MAY-2011.

11) Chansatein, O., Rodtong, S., and Urairong, H. 2011. Diversity of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp: *Bacillus* sp. CWP1-6-1 16S rRNA gene, partial sequence *(*1,443 bp*). GenBank Nucleotide Sequence*: Accession HQ179147.1. BCT 18-MAY-2011.

12) Chansatein, O., Rodtong, S., and Urairong, H. 2011. Diversity of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp: *Bacillus cereus* CASA51-1 16S rRNA gene, partial sequence *(*1,453 bp*). GenBank Nucleotide Sequence*: Accession HQ179148.1. BCT 18-MAY-2011.

13) Chansatein, O., Rodtong, S., and Urairong, H. 2011. Diversity of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from cassava pulp: *Pseudomonas* sp. CSP2-3 16S rRNA gene, partial sequence *(*1406 bp*). GenBank Nucleotide Sequence*: Accession HQ179149.1. BCT 18-MAY-2011.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี