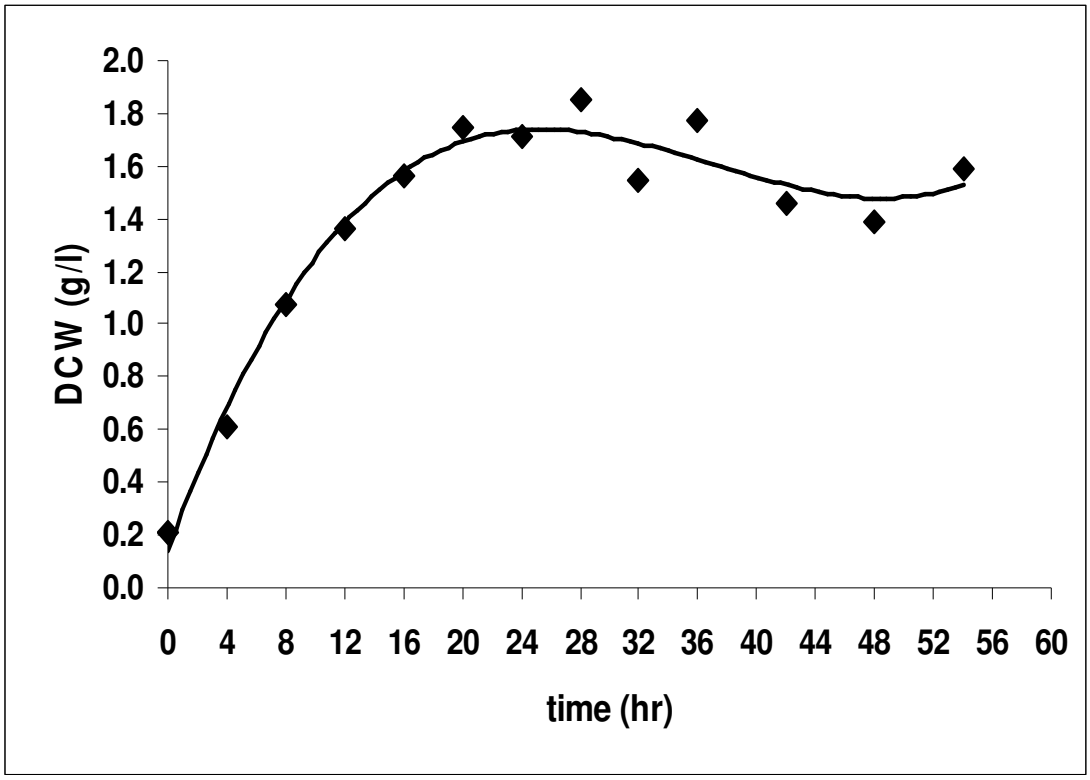
บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

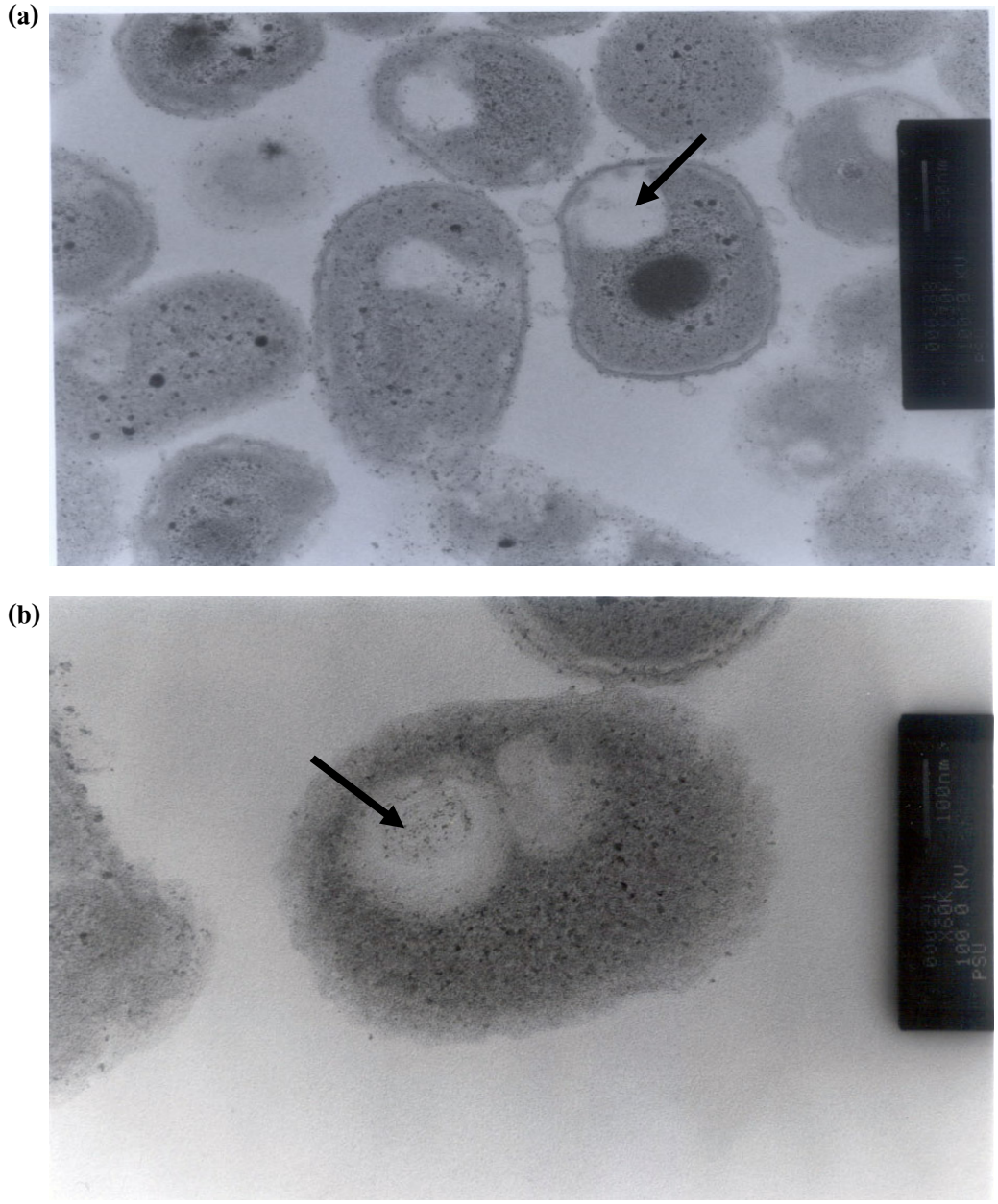
1. ผลของการศึกษาลักษณะการเจริญและสะสม PHA ภายในเซลล์ของเชื้อ *R. eutropha* TISTR 1095

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในหัวข้อนี้เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญและการสะสม PHA ภายในเซลล์ของเชื้อ *R. eutropha* TISTR 1095 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเหลวสูตร NB ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากการทดลองพบว่าเชื้อ *R. eutropha* TISTR 1095 ไม่มีระยะพักตัว (lag phase) และมีการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (log phase) จนกระทั่งถึง 20 ชั่วโมง เซลล์จะเริ่มคงที่ (stationary phase) โดยช่วง mid-log phase อยู่ในช่วง 8-16 ช่วงโมง และหลังจาก 28 ชั่วโมงไปแล้วเซลล์จะค่อยๆลดลง (death phase) ดังแสดงในภาพที่ 8 และเมื่อทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ไปศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพื่อดูปริมาณการสะสม PHA ภายในเซลล์พบว่าเชื้อ *R. eutropha* TISTR 1095 มีการเก็บสะสมสาร PHA ในปริมาณที่น้อย ดังแสดงในภาพที่ 9 ทั้งนี้อาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงเหมาะกับการเจริญจึงทำให้มีการสะสมแหล่งพลังงานสำรองไว้น้อย จากการรายงานของ Heinzle และ Lafferty (1980) อ้างโดย Kim และคณะ (1993) พบว่า เชื้อ *Alcaligenes eutrophus* เป็นเชื้อที่ใช้ในการศึกษาการผลิต PHA เนื่องจากเชื้อสามารถเจริญได้ง่ายในสูตรอาหารทั่วไป และมีการเก็บสะสมสาร PHA ไว้เป็นจำนวนมาก คิดเป็นร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และจากการศึกษาการผลิต PHB โดยใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* แบบกึ่งกะที่มีการควบคุมความเข้มข้นของปริมาณกลูโคส พบว่า เชื้อมีความสามารถในการเก็บสะสม PHB ไว้ภายในเซลล์สูงถึงร้อยละ 73 (Kim *et al.*,1993) จากการทดลองนี้ จึงเลือกชั่วโมงที่ 12 เป็นช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น ตลอดการวิจัยนี้



ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 ในอาหารเหลว (NB)

Figure 8. Growth curve of *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 in nutrient broth.



ภาพที่ 9 การสะสม PHA ภายในเซลล์ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 ในอาหารเหลว (NB)

(a) : ภาพกำลังขยาย x 1000 (b) : ภาพกำลังขยาย x 6000

Figure 9. PHA accumulation intracellular *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 in nutrient broth.

(a) : x 1000 (b) : x 6000

2. การเตรียมกรดคาร์บอกซิลิกโดยการหมักเส้นใยปาล์มเพื่อใช้ในการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตกรดคาร์บอกซิลิกโดยใช้เส้นใยปาล์ม (palm oil fiber) ที่ผ่านการแปรสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 0.1 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเส้นใยปาล์มผสมกับตะกอนสลัดจ์จากบ่อบำบัดน้ำเสียที่ผ่านการทำให้แห้งในอัตราส่วน 80:20 เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ผสมจากตะกอนดินก้นบ่อบำบัดน้ำเสียบ่อแรกของโรงงานน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จังหวัดสงขลา ทำการหมักในถังปฏิกรณ์แบบไร้อากาศขนาด 20 ลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน พบว่า ในช่วงระหว่างการหมักนั้นค่าความเป็นกรด – ด่าง เริ่มต้นลดลงจาก 7.0 จนกระทั่งความเป็นกรด – ด่าง ต่ำกว่า 6.0 เนื่องจากมีการผลิตกรดอินทรีย์ของกลุ่มแบคทีเรีย (acid forming bacteria) ปริมาณกรดคาร์บอกซิลิกที่ผลิตได้จากการหมักเท่ากับ 840 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 31.6 ของสารอินทรีย์ทั้งหมด (Total organic carbon, TOC) และมีสารประกอบอินทรีย์ละลายในน้ำหมัก ดังแสดงในตารางที่ 5จากรายงานวิจัยของ Yu (2001) ทำการผลิต PHA จากน้ำเสียประเภทแป้งที่ผ่านการหมักแบบไร้อากาศ พบว่า น้ำเสียที่ผ่านการหมักแบบไร้อากาศจะมีกรดอินทรีย์ประมาณร้อยละ 80 ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในน้ำหมักที่ได้ จะเห็นว่าน้ำหมักที่ได้จากการทดลองนี้มีสัดส่วนของกรดต่อสารอินทรีย์ทั้งหมดต่ำกว่ารายงานของ Yu (2001) ทั้งนี้เนื่องจากมีการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มสร้างมีเทน (methane forming bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้กรดอินทรีย์ในการเจริญเติบโตจากการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซทั้งหมดโดยใช้การแทนที่น้ำ พบว่า มีการผลิตก๊าซสูงถึง 200 มิลลิลิตรต่อวัน และจากการวิเคราะห์ชนิดของกรด พบว่า มีกรดอะซิติกมากที่สุดถึงร้อยละ 28.5 และมีกรดโพรพิโอนิคและกรดบิวทีริกเพียงร้อยละ 8.8 และ 4.4 ตามลำดับ ซึ่งกรดทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นกรดคาร์บอกซิลิกที่สำคัญในการสร้างและสะสม PHA ของเชื้อ *R. eutropha* ดังนั้นหากต้องการน้ำหมักนี้ไปใช้ในการผลิต PHA ควรมีการเติมกรดทั้ง 2 ชนิดเพิ่มเติมและควรปรับสภาวะในการหมักแบบไร้อากาศโดยควบคุมการเกิดมีเทนเพื่อส่งเสริมให้มีการสร้างกรดมากขึ้น

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของน้ำหมักเส้นใยปาล์ม

Table 5. Composition of palm oil fiber fermermented broth.

Composition	Concentration (mg/l)
Acetic acid	239
Propionic acid	74
Butyric acid	37
Long chain acid (C>4)	490
Total acid	840
Reducing sugar	14
Phosphate	270
Nitrogen	34
pH	5.94
Total organic carbon (TOC)	2655

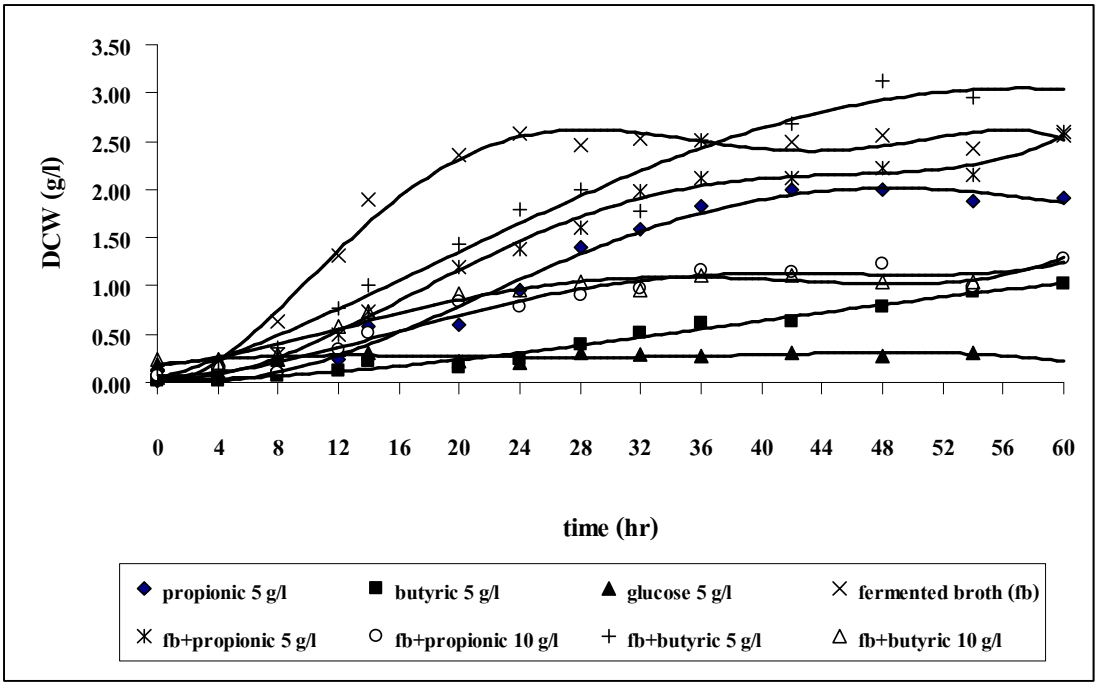
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA แบบกะ

3.1. การวางแผนการทดลองแบบการศึกษาทีละปัจจัย

3.1.1 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ทำการทดลองหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสาร PHA ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 โดยการเลี้ยงเชื้อในน้ำหมักที่เตรียมได้จากข้อ 2 ที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิค, กรดบิวทิริคในจำนวน 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในน้ำหมักที่ไม่มีการเติมกรดเป็นชุดควบคุม (control) พบว่า เชื้อ *R. eutropha* TISTR 1095 ในน้ำหมักที่ไม่มีการเติมกรด จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงต้น และเข้าสู่ช่วงการเจริญคงที่ (staionary phase) ในชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.57 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อใช้น้ำหมักที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิคและกรดบิวทิริค 5 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้การเจริญของเชื้อในช่วงต้นช้าลง (ดังแสดงในภาพที่ 10) และเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ในชั่วโมงที่ 36 และ48 ซึ่งจะให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.23 และ 3.12 กรัมต่อลิตรตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดเป็น 10 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญของเชื้อมีแนวโน้มที่ลดลงเนื่องจากความเข้มข้นของกรดสูงจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Yu (2001) ที่รายงานว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของกรดมีผลต่อการเจริญและการสะสม PHA ดังนั้นการเติมกรดผสมสองครั้งในการเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* จึงให้ปริมาณเซลล์และปริมาณ PHA สูงกว่าการเติมกรดเพียงครั้งเดียว เนื่องจากการแบ่งกรดและเติมสองครั้งเป็นการลดความเข้มข้นของกรดที่สูงเกินไป ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการยับยั้งการเจริญของเชื้อและเป็นการส่งเสริมการผลิต PHA

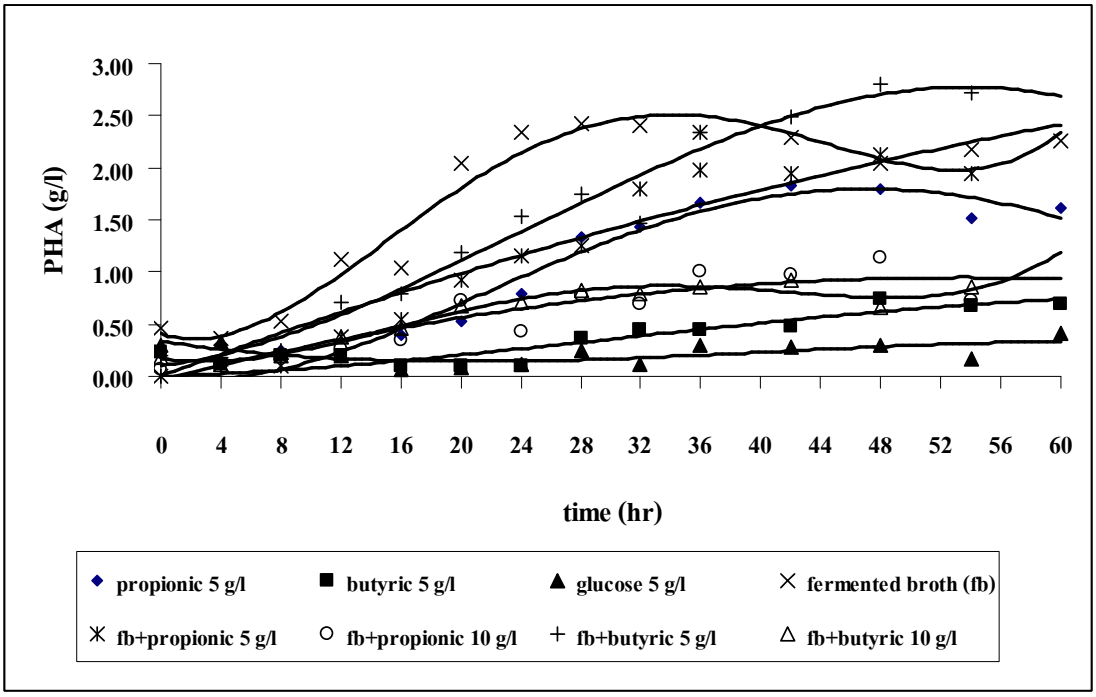
เมื่อเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้น้ำหมักที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 กับการทดลองที่ใช้กลูโคส กรดโพรพิโอนิค และกรดบิวทิริคเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวโดยไม่ใช้น้ำหมัก พบว่า การใช้กลูโคส, กรดโพรพิโอนิค และกรดบิวทิริคเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว จะให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.34, 2.00 และ1.02 ตามลำดับ (ภาพที่ 10) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการใช้น้ำหมัก (ชุดควบคุม) และชุดการทดลองที่มีการเติมกรด 5 กรัมต่อลิตรในน้ำหมักอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำหมักนอกจากจะมีแหล่งคาร์บอนแล้วยังมีธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญด้วย (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 10 ผลของความเข้มข้นของกรดต่อการเจริญของเชื้อ

Figure 10. Effect of acid concentration on cell growth.

นอกจากนี้ยังได้เปรียบเทียบปริมาณ PHA ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 11 พบว่า การสะสมสาร PHA ภายในเซลล์จุลินทรีย์ มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยชุดการทดลองที่ใช้น้ำหมักและมีการเติมกรดบิวทิริก 5 กรัมต่อลิตร ให้การผลิต PHA สูงสุดเท่ากับ 2.81 กรัมต่อลิตร และเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของกรดที่เติมลงไปเป็น 10 กรัมต่อลิตร พบว่า ปริมาณการสะสม PHA ไว้ภายในเซลล์ไม่มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นต่อไป ซึ่งจะให้ผลสอดคล้องกับผลการวิจัยของ ศิริพงษ์ วิงวอน (2539) ที่ทำการเพิ่มปริมาณกลูโคสจากความเข้มข้นเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร จนความเข้มข้นมากกว่า 18 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697 พบว่า ปริมาณ PHB มีแนวโน้มที่ไม่เพิ่มขึ้นต่อไป ปริมาณ PHB สูงสุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคสมีค่าเท่ากับ 7.6 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสมากกว่า 18 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการใช้น้ำหมักที่มีการเติมกรดบิวทีริก 5 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณเซลล์และ PHA สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกชุดการทดลองที่มีการเติมกรดบิวทิริก 5 กรัมต่อลิตร ไปใช้ในการทดลองต่อไป

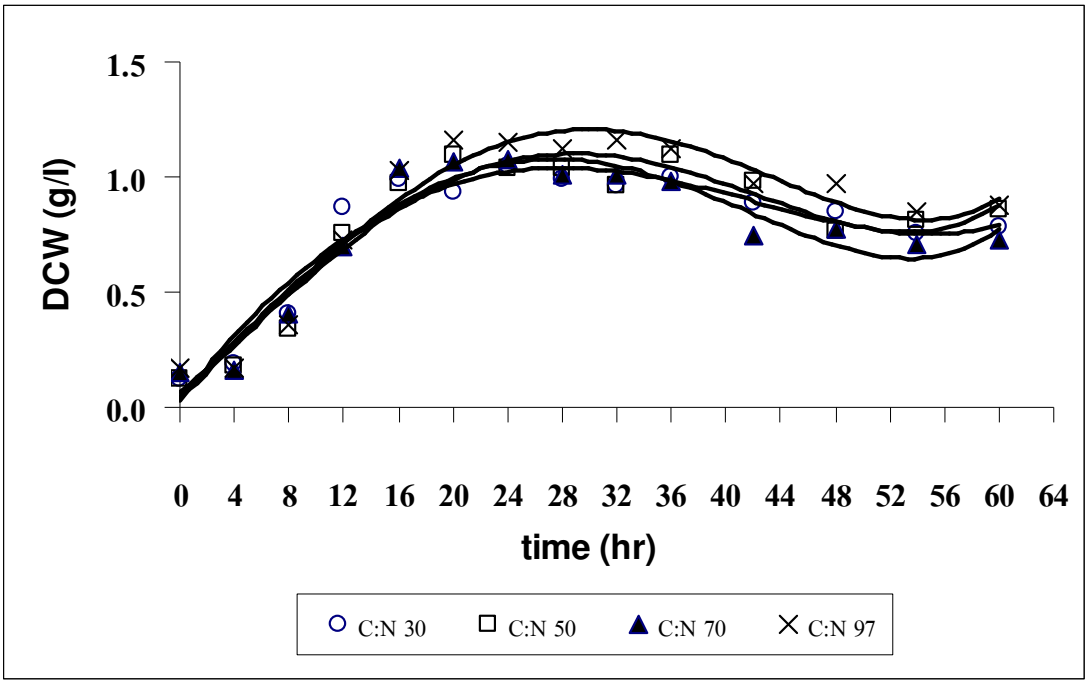


ภาพที่ 11 ผลของความเข้มข้นของกรดต่อการผลิต PHA

Figure 11. Effect of acid concentration on PHA production.

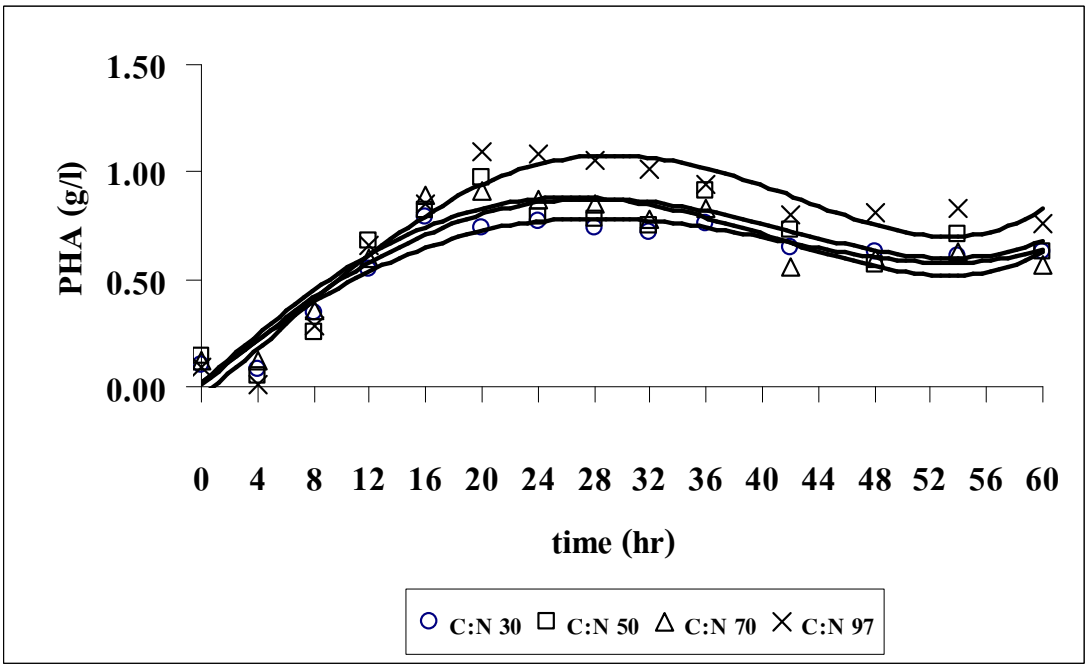
3.1.2 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N)

การศึกษาในหัวข้อนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHA จากภาพที่ 12 และ 13 แสดงผลการเจริญและการผลิต PHA ที่ C:N เท่ากับ 30, 50, 70 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม (C:N=97) โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยน้ำหมักเส้นใยปาล์ม ผลการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนไม่มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ และการสร้างสาร PHA ให้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งให้ผลต่างจากการศึกษาของ ศิริพงษ์ วิงวอน (2539) ที่ศึกษาการผลิต PHA โดยใช้การควบคุมอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน พบว่า ค่าอัตราส่วนที่ดีที่สุดอยู่ที่ 30 โมลคาร์บอนต่อโมลไนโตรเจน และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนขึ้นไปอีกจะทำให้ได้ปริมาณเซลล์ลดลง และจากการศึกษาการผลิต PHA โดยใช้เชื้อ *Rhizobium meliloti* TISTR 078 พบว่า อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 จะส่งเสริมให้มีการสะสม PHA สูงสุดร้อยละ 38 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Arunpan, 1998) ดังนั้นชุดการทดลองต่อไปจึงไม่มีความจำเป็นต้องปรับค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N) เริ่มต้น



ภาพที่ 12 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อ

Figure 12. Effect of C:N ratio on cell growth.

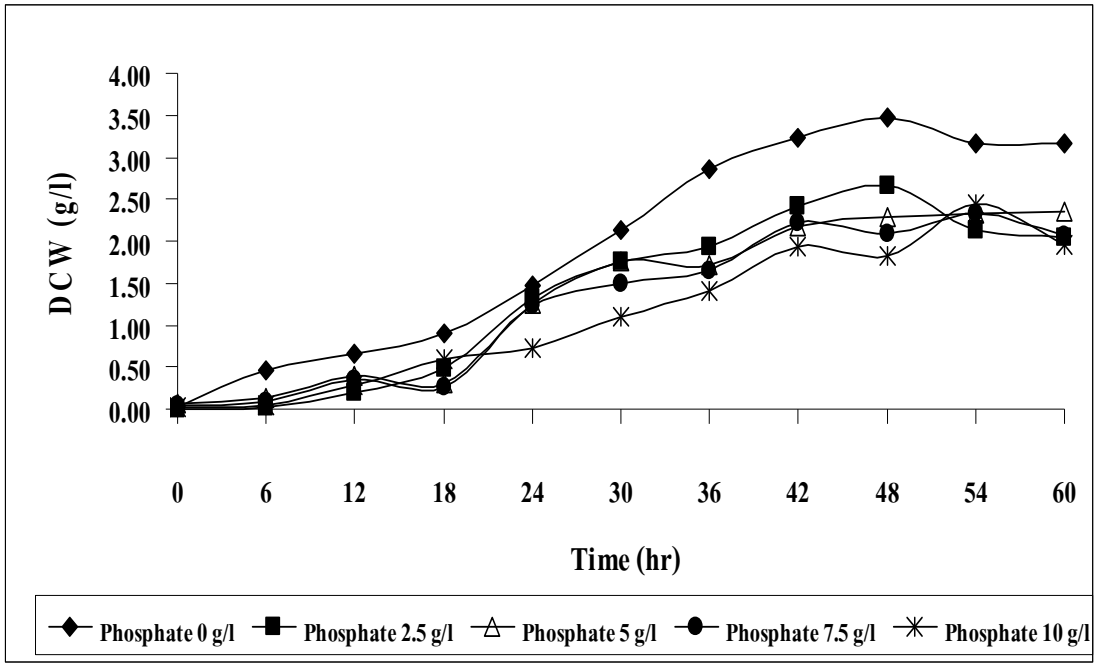


ภาพที่ 13 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิต PHA ของเชื้อ

Figure 13. Effect of C:N ratio on PHA production.

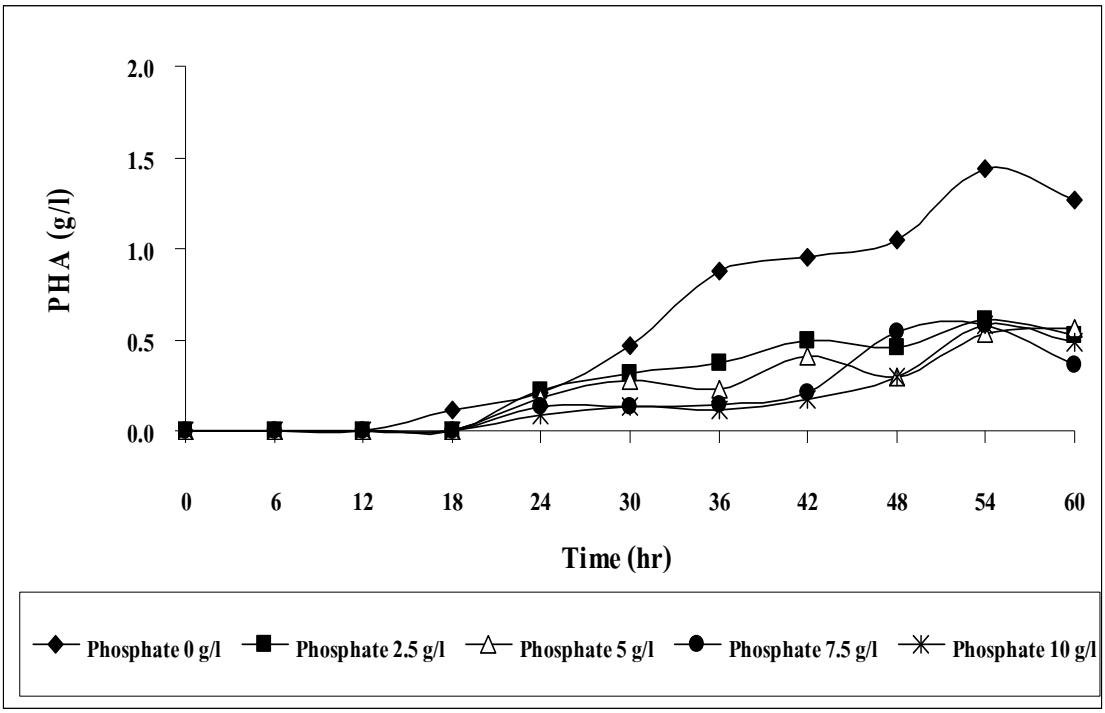
3.1.3 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งฟอสเฟต

จากการศึกษาความเข้มข้นของปริมาณฟอสเฟตเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทำการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นในช่วง 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัมต่อลิตร พบว่า การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตไม่มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญและการเพิ่มปริมาณ PHA ให้สูงขึ้น แสดงดังในภาพที่ 14 และ 15 ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นเพราะฟอสเฟตเป็นปัจจัยจำกัดที่มีความจำเป็นต้องควบคุมแต่กรดที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์มมีองค์ประกอบที่มีฟอสเฟตสูงถึง 0.27 กรัมต่อลิตร จึงอาจมีผลทำให้ฟอสเฟตที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีมากเกินไปทำให้ยับยั้งการเจริญและลดการสะสม PHA ในเซลล์ แต่จากการศึกษาของ Ryu และคณะ (1997) ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับผลของการควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นของฟอสเฟตเริ่มต้นต่อการผลิต PHA จากเชื้อ *A. eutrophus* ในถังหมักขนาด 60 ลิตร โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ปริมาณฟอสเฟตเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHA เท่ากับ 5.5 กรัมต่อลิตร มีการเก็บสะสมสาร PHA ไว้ภายในเซลล์สูงถึงร้อยละ 80 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งต่างจากผลการทดลองในครั้งนี้ จากการศึกษา พบว่า ชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมฟอสเฟตจะให้ผลการเจริญและการผลิต PHA ดีกว่าชุดการทดลองที่มีการเติมฟอสเฟตมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต PHA จากกรดที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์ม



ภาพที่ 14 ผลของความเข้มข้นฟอสเฟตที่เติมต่อการเจริญของเชื้อ

Figure 14. Effect of added phosphate concentration on cells growth.



ภาพที่ 15 ผลของความเข้มข้นฟอสเฟตที่เติมต่อการผลิต PHA

Figure 15. Effect of added phosphate concentration on PHA production.

3.2. การวางแผนการทดลองแบบการศึกษาผลร่วมของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญ และผลิต PHA ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095

ผลขององค์ประกอบของสารอาหารต่อการผลิต PHA

ตารางที่ 6 แสดงการออกแบบการทดลองและผลที่ได้จากแต่ละชุดการทดลองซึ่งแสดงผลตอบสนองของปริมาณเซลล์ ปริมาณ PHA และการเก็บสะสม PHA จากการศึกษาการเติมสารอาหารลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ชุดการทดลอง 18, 20, 22 และ 24) พบว่า การเติมสารอาหารมีผลทำให้มีการเก็บสะสมของ PHA เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ชุดการทดลอง 17, 19, 21 และ 23) จากการเติมโซเดียมโพรพิโอเนตและกรดบิวทิริก 10 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร สามารถส่งเสริมให้มีการเก็บสะสมสาร PHA เพิ่มขึ้นร้อยละ 49, 30, 55 และ 46 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการเติมสารอาหารเพิ่มขึ้นจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยกเว้นฟอสเฟต และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้การควบคุมการเปลี่ยนแปลงทีละปัจจัยนั้นจะเห็นได้ว่าผลการทดลองให้ผลที่สอดคล้องกันคือ การเติมกรดบิวทิริก และโซเดียมโพรพิโอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการส่งเสริมให้จุลินทรีย์มีการเก็บสะสม PHA เพิ่มสูงขึ้น

ตารางที่ 6 ชุดการทดลองสำหรับ 4 ปัจจัยและผลการตอบสนองต่อการผลิต PHA ของเชื้อ *R. eutropha* TISTR 1095.

Table 6. Treatment schedule for four-factor CCD and the response for PHA production by *R. eutropha* TISTR 1095.

Std number	A	B	C	D	Dry cell (g/l)	PHA (g/l)	PHA content (%)
1	-1	-1	-1	-1	2.07	0.70	33.60
2	1	-1	-1	-1	2.12	0.69	32.39
3	-1	1	-1	-1	2.36	0.86	36.44
4	1	1	-1	-1	0.81	0.31	38.51
5	-1	-1	1	-1	1.96	0.84	42.76
6	1	-1	1	-1	1.53	0.66	43.14
7	-1	1	1	-1	1.10	0.67	60.61
8	1	1	1	-1	0.87	0.44	50.38
9	-1	-1	-1	1	2.39	0.78	32.73
10	1	-1	-1	1	1.99	0.75	37.46
11	-1	1	-1	1	1.85	0.61	33.09
12	1	1	-1	1	1.00	0.38	37.79
13	-1	-1	1	1	2.12	0.77	36.56
14	1	-1	1	1	1.90	0.82	43.41
15	-1	1	1	1	0.87	0.46	52.49

A: Propionate (g l^{-1}) (X_1); B: Butyric acid (X_2); C: $(NH_4)_2SO_4$ (g l^{-1}) (X_3) and D: KH_2PO_4 (g/l) (X_4)

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Table 6. (Continue)

Std number	A	B	C	D	Dry cell (g/l)	PHA (g/l)	PHA content (%)
16	1	1	1	1	0.96	0.43	44.44
17	-2	0	0	0	2.49	0.72	28.92
18	2	0	0	0	1.56	0.65	41.58
19	0	-2	0	0	1.37	0.70	51.46
20	0	2	0	0	0.84	0.56	66.93
21	0	0	-2	0	2.91	0.81	27.95
22	0	0	2	0	1.53	0.66	43.45
23	0	0	0	-2	1.86	0.48	25.81
24	0	0	0	2	1.87	0.71	37.72
25	0	0	0	0	1.37	0.60	43.55
26	0	0	0	0	2.07	0.74	35.97
27	0	0	0	0	1.69	0.54	31.76
28	0	0	0	0	1.77	0.57	32.48
29	0	0	0	0	1.71	0.55	32.10
30	0	0	0	0	2.02	0.63	31.19

A: Propionate (g l^{-1}) (X_1); B: Butyric acid (X_2); C: $(NH_4)_2SO_4$ (g l^{-1}) (X_3) and D: KH_2PO_4 (g/l) (X_4)

จากการศึกษาผลร่วมของแต่ละปัจจัยในชุดการทดลองนี้จะสามารถชี้ให้เห็นผลของโพรพิโอเนต กรดบิวทิริก แอมโมเนียมซัลเฟต และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ต่อผลการตอบสนองของการเจริญของเชื้อและปริมาณการเก็บสะสมสาร PHA ได้ดียิ่งขึ้นซึ่งผลจะแสดงในตารางที่ 7 สัมประสิทธิ์ของสมการกำลังสองจะแสดงถึงความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA โดยเครื่องหมายลบหน้าค่าสัมประสิทธิ์จะหมายถึงปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อการยับยั้งทำให้มีผลได้ลดน้อยลงขณะที่เครื่องหมายบวกหน้าค่าสัมประสิทธิ์จะหมายถึงปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อการส่งเสริมทำให้มีผลได้เพิ่มขึ้น เทอมของปัจจัยที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติจะถูกละเว้นโดยใช้ t – test ในการพิจารณาและผลการตอบสนองของปัจจัยร่วมต่างๆ จะวิเคราะห์โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ต่อการออกแบบชุดการทดลอง ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ของเทอมสมการกำลังสองและเทอมของผลร่วมระหว่างสองปัจจัย ซึ่งสามารถนำมาเขียนแสดงเป็นสมการได้ดังนี้

$$DCW = 2.98 - 0.11x_1 + 0.28x_2 - 1.62x_3 - 0.03x_2^2 + 0.31x_3^2 - 0.02x_1 x_2 + 0.10x_1 x_3 \quad (8)$$

$$PHA = 0.93 - 0.04x_1 + 0.04x_2 - 0.36x_3 + 0.20x_4 + 0.11x_3^2 - 0.01x_1 x_2 + 0.02x_1 x_3 + 0.71x_1x_4 - 0.70x_2x_4 \quad (9)$$

$$PHA\ content = 37.60 + 2.59x_1 - 9.13x_2 + 7.47x_3 + 1.0x_2^2 - 0.22x_1 x_2 - 1.07x_1 x_3 + 1.6x_2 x_3 \quad (10)$$

แต่ในส่วนของค่าการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit)ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยการประเมินค่าสัมประสิทธ์ความแปรปรวนเฉลี่ย เท่ากับ 0.8 กราฟของการตอบสนองสำหรับแต่ละรูปแบบแสดงดังภาพที่ 16, 17 และ 18 โดยจะกำหนดค่าคงที่ของสองตัวแปรที่ระดับความเหมาะสมและทำการเปลี่ยนแปลงค่าของอีกสองตัวแปรที่อยู่ในช่วงของชุดการทดลอง

ผลของความเข้มข้นของโซเดียมโพรพิเนตและกรดบิวทิริกต่อการเจริญของเชื้อ การผลิตและการเก็บสะสม PHA

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของโพรพิโอเนตและกรดบิวทิริกที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟต และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่า ระดับความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHA เท่ากับ 2.5 และ 6.53 กรัมต่อลิตร จากสภาวะดังกล่าวมีผลทำให้ได้เซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.52 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHA 0.64 กรัมต่อลิตร และปริมาณการสะสม PHA เท่ากับร้อยละ 46.5 ซึ่งจากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณกรดจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสาร PHA (ดังแสดงในตารางที่ 7 ภาพที่ 16a และ 17a) แต่จะมีผลในการเพิ่มปริมาณการสะสมสาร PHA ไว้ภายในเซลล์ให้สูงขึ้น (ดังแสดงในตารางที่ 7 ภาพที่ 18a) จากการศึกษาของ Yan และคณะ (2003) พบว่ากรดอินทรีย์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเนื่องจากกรดมีผลต่อการส่งผ่านของผนังเซลล์ของเซลล์แบคทีเรียโดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นกรดสูงๆ อย่างไรก็ตามการให้สารอาหารที่ไม่สมดุลโดยเฉพาะอัตราส่วนของ C:N ที่สูงจะสามารถกระตุ้นให้มีการเก็บสะสม PHA (Wang *et al.*, 2006)

ผลความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและความเข้มข้นกรดต่อการเจริญของเชื้อ การผลิต และการเก็บสะสม PHA

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสมทั้งสองชนิด พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้มีการเก็บสะสม PHA สูงที่สุด (ดังแสดงในภาพที่ 18b และ 18c) จากการศึกษาของ Grothe และคณะ (1999) พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้มีการสะสม PHA เพิ่มมากขึ้นและจะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น ถึงแม้ว่าไนโตรเจนจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แต่ก็ส่งเสริมให้มีการผลิต PHA เช่นกัน (Beyatli, 2002)

ผลความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและความเข้มข้นของกรดต่อการเจริญของเชื้อ การผลิตและการสะสม PHA

จากการศึกษาความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสม พบว่าที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตเท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตร จะให้ค่าการเจริญ การผลิต และการสะสม PHA สูงสุด และ เมื่อพิจารณาจากกราฟการตอบสนองแสดงดังภาพที่ 16e, 16f, 17e, 17f, 18e และ 18f จะเห็นได้ว่าฟอสเฟตมีผลน้อยมากกับการเจริญ การผลิต และการสะสม PHA ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในน้ำหมักที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณฟอสเฟตอยู่เป็นจำนวนมาก (0.27 กรัมต่อลิตร) อย่างไรก็ตาม Laskshman และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษา พบว่า การลดปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตเริ่มต้นในสารอาหารจะสามารถเพิ่มปริมาณการสะสม PHA ไว้ภายในเซลล์สูงขึ้น

ตารางที่ 7 การประเมินค่าสัมประสิทธิ์เพื่อความเหมาะสมของสมการกำลังสองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลการตอบสนองและตัวแปรสำหรับการผลิต PHA โดย *R. eutropha* TISTR 1095

Table 7. Estimated coefficient for the fitted second-order polynomial representing the relationship between the response and process variables for PHA production by *R. eutropha* TISTR 1095.

	DCW (g/l)	PHA (g/l)	PHA Content (%)
β_0	1.77	0.61	34.51
β_1	-0.23[b]	-0.06[b]	1.02[ns]
β_2	-0.31[a]	-0.09[a]	3.44[b]
β_3	-0.25[a]	-0.01[ns]	5.12[a]
β_4	0.01[ns]	0.01[ns]	0.17[ns]
β_{11}	0.03[ns]	0.02[ns]	0.27[ns]
β_{22}	-0.20[b]	0.00[ns]	6.26[a]
β_{33}	0.08[ns]	0.03[ns]	0.38[ns]
β_{44}	-0.01[ns]	-0.01[ns]	-0.60[ns]
β_{12}	-0.10[ns]	-0.05[c]	-1.39[ns]
β_{13}	0.12[ns]	0.03[ns]	-1.33[ns]
β_{14}	0.05[ns]	0.04[ns]	1.08[ns]
β_{23}	-0.07[ns]	-0.02[ns]	2.02[ns]
β_{24}	-0.07[ns]	-0.04[ns]	-1.02[ns]
β_{34}	0.03[ns]	-0.01[ns]	-1.26[ns]

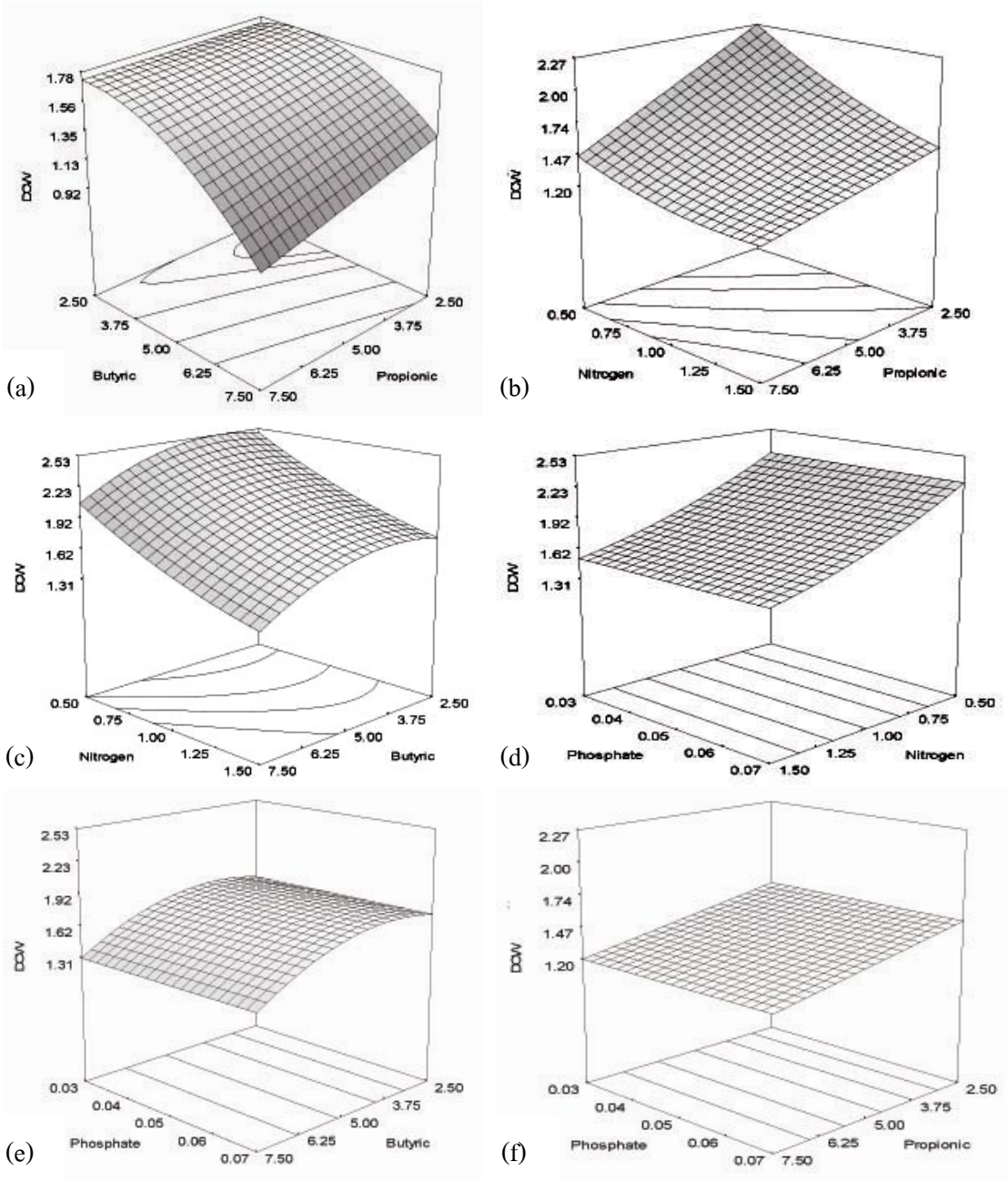
ns : not significant even at 5% level.

a Significant at 0.1%.

b Significant at 1.0%.

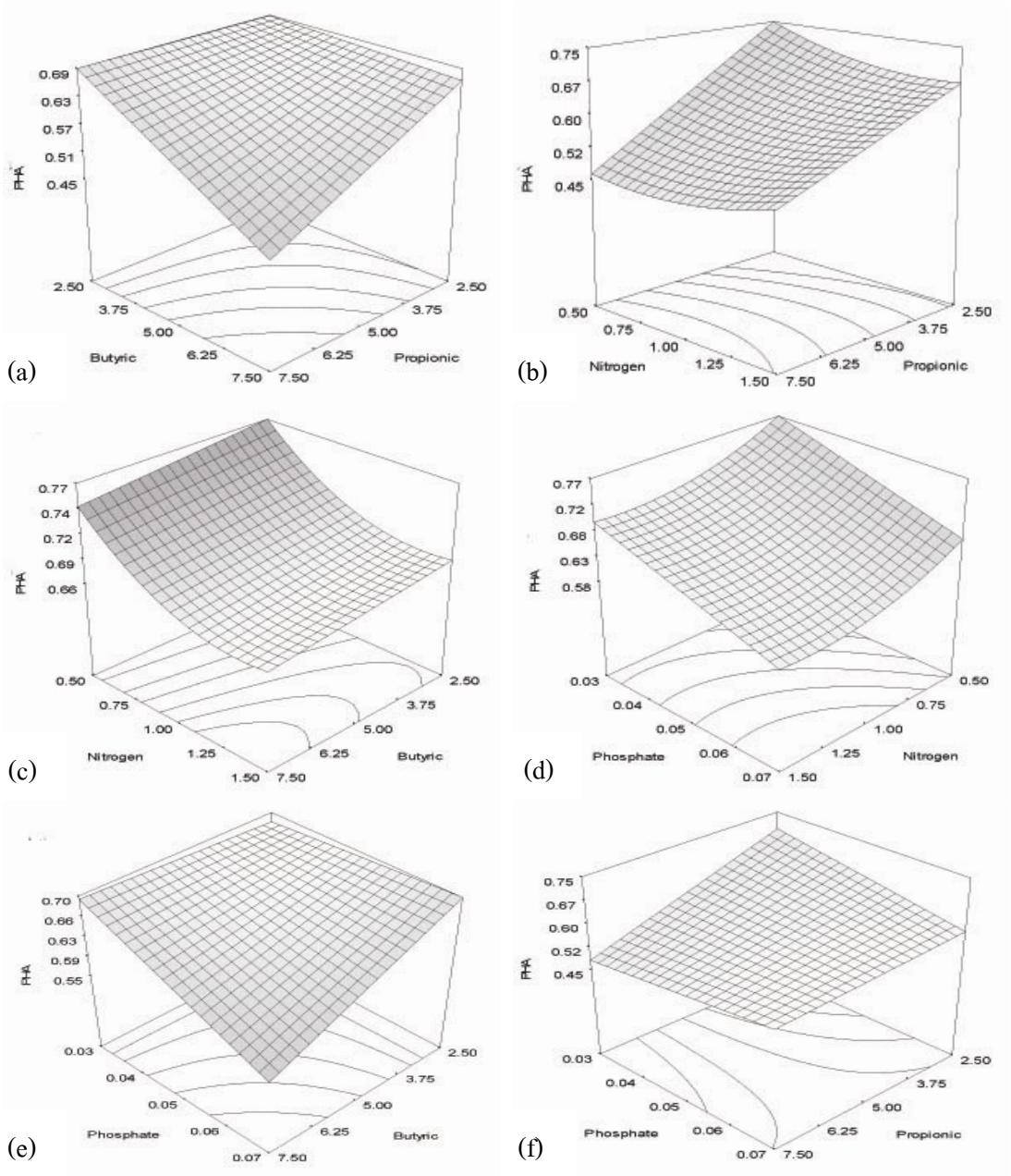
c Significant at 5.0%.

จากการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการวางแผนการทดลองแบบศึกษาทีละปัจจัยในข้อ 3.1 กับการวางแผนการทดลองแบบการศึกษาผลร่วมของปัจจัยต่างๆ ในการทดลองนี้ พบว่าผลการทดลองที่ได้จากทั้งสองแบบการทดลองให้ผลสอดคล้องกัน คือ ในชุดการทดลองที่ทดลองทีละปัจจัยนั้นการเติมกรดบิวทีริก 5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การทดลองที่ใช้การศึกษาถึงผลร่วมของปัจจัยนั้นใช้ความเข้มข้นกรด 6.53 กรัมต่อลิตร แต่ก็มีผลต่อการส่งเสริมให้มีการเก็บสะสมสารเพิ่มขึ้นเช่นกัน และจะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตมีผลน้อยมากต่อการส่งเสริมการเก็บสะสมสาร PHA เหมือนกันทั้งสองชุดการทดลองซึ่งเมื่อนำแบบการทดลองทั้งสองมาเปรียบเทียบกันจะทำให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างข้อดีกับข้อเสียในแต่ละวิธี โดยข้อดีของการทดลองทีละปัจจัย คือ การเตรียมการของแต่ละชุดการทดลองทดลองจะสะดวก รวดเร็ว ผลการทดลองที่ได้รับเป็นค่าตรงจุดที่เราทดลองจริงของปัจจัยนั้นๆ ง่ายต่อการอธิบายผลการทดลองเนื่องจากไม่มีผลร่วมของปัจจัยอื่นๆ ในขณะที่ข้อเสียของการดำเนินการทดลองทีละปัจจัยนั้นคือ มีจำนวนชุดการทดลองมาก และต้องทำการเตรียมอุปกรณ์และทำทดลองหลายครั้งทำให้ต้องใช้ระยะเวลายาวนานกว่า และไม่สามารถอธิบายถึงผลร่วมของปัจจัยอื่นๆ เมื่อนำมาใช้ร่วมกันในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนข้อดีของการทดลองแบบการศึกษาปัจจัยร่วมนั้นจะช่วยลดระยะเวลาที่ใช้ในการดำเนินการทดลองเนื่องจากการออกแบบการทดลองจะทำพร้อมกันทุกปัจจัยทำให้มีชุดการทดลองที่น้อยกว่า สามารถออกแบบการทดลองได้หลายรูปแบบซึ่งสามารถอธิบายผลการทดลองได้ครอบคลุมถึงผลร่วมระหว่างปัจจัยทุกปัจจัย และสามารถใช้แบบหุ่นจำลองที่ได้จากการประมวลผลของโปรแกรมในการทำนายผลได้ของเซลล์และผลิตภัณฑ์เมื่อทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้ในสูตรอาหาร แต่ข้อเสียของการทดลองแบบการศึกษาผลร่วมของปัจจัยนั้นก็มีเช่นกัน เนื่องจากการทดแบบนี้ต้องมีการออกแบบการทดลองและประมวลผลโดยใช้โปรแกรมหากผู้ทดลองขาดความรู้ ความเข้าใจก็อาจแปลผลผิดได้ ผลสรุปที่ได้เกิดจากการนำค่าที่ได้จากการทดลองมาประมวลผลด้วยหลักทางสถิติดังนั้นผลที่ได้จึงอาจจะมีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงบ้าง



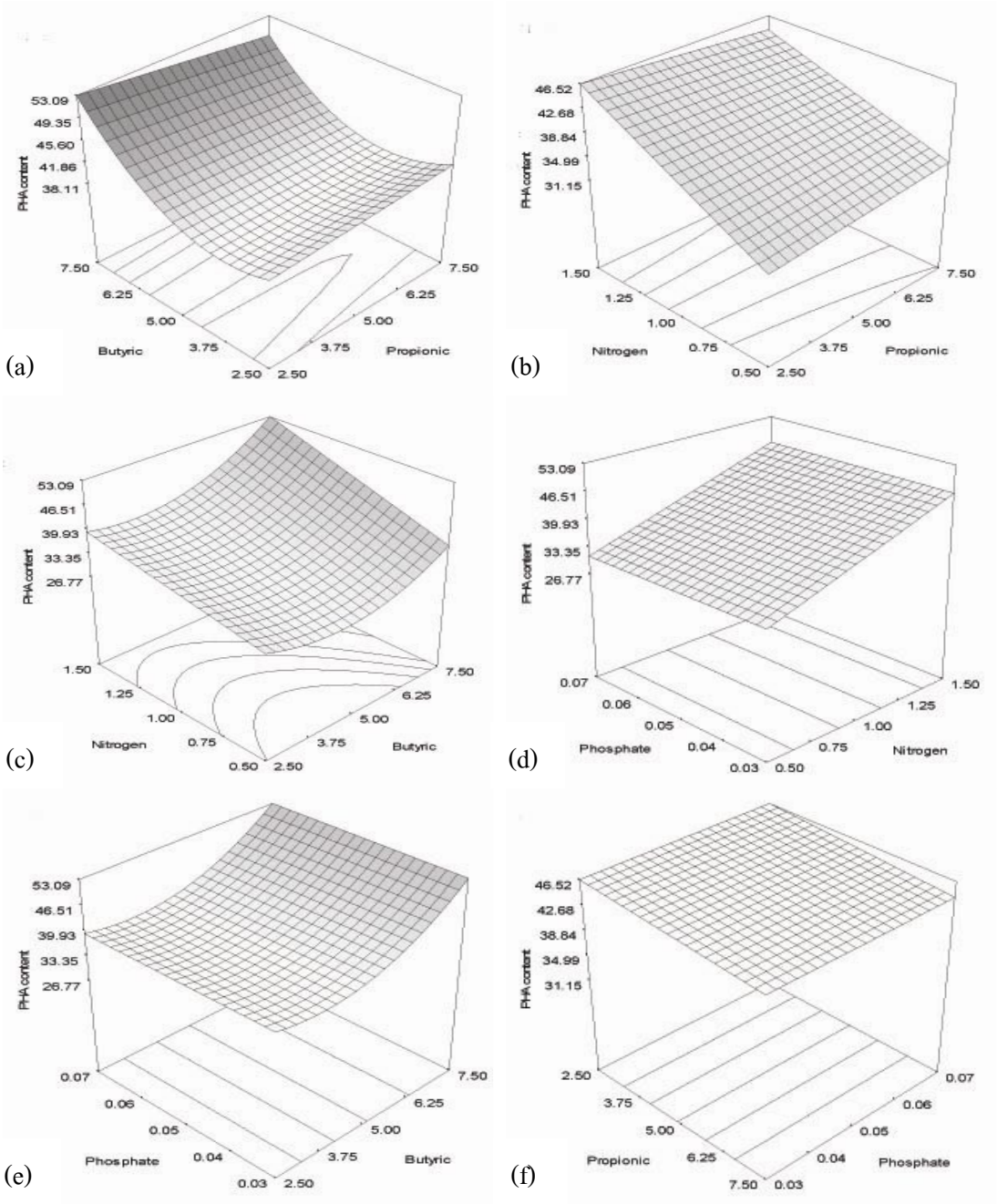
ภาพที่ 16 ผลการตอบสนองระหว่างกรดโพรพิโอนิคและกรดบิวทีริก (a), ระหว่างความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ และความเข้มข้นกรด (b และ c), ระหว่างความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ และความเข้มข้นของ K_2HPO_4 (d), ระหว่างความเข้มข้นของกรดและความเข้มข้นของ K_2HPO_4 (e และ f) ต่อการเจริญของจุลินทรีย์

Figure 16. Response surfaces showing the effect of propionic acid and butyric acid (a); $(NH_4)_2SO_4$ concentration and acid concentration (b and c); $(NH_4)_2SO_4$ concentration and K_2HPO_4 concentration (d) ; K_2HPO_4 concentration and acid concentration (e and f) on biomass.



ภาพที่ 17 ผลการตอบสนองระหว่างกรดโพรพิโอนิคและกรดบิวทีริก (a), ระหว่างความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ และความเข้มข้นกรด (b และ c), ระหว่างความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ และความเข้มข้นของ K_2HPO_4 (d), ระหว่างความเข้มข้นของกรดและความเข้มข้นของ K_2HPO_4 (e และ f) ต่อการผลิต PHA

Figure 17. Response surfaces showing the effect of propionic acid and butyric acid (a); $(NH_4)_2SO_4$ concentration and acid concentration (b and c); $(NH_4)_2SO_4$ concentration and K_2HPO_4 concentration (d); K_2HPO_4 concentration and acid concentration (e and f) on PHA concentration.



ภาพที่ 18 ผลการตอบสนองระหว่างกรดโพรพิโอนิคและกรดบิวทีริก (a), ระหว่างความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ และความเข้มข้นกรด (b และ c), ระหว่างความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ และความเข้มข้นของ K_2HPO_4 (d), ระหว่างความเข้มข้นของกรดและความเข้มข้นของ K_2HPO_4 (e และ f) ต่อการสะสม PHA

Figure 18. Response surfaces showing the effect of propionic acid and butyric acid (a); $(NH_4)_2SO_4$ concentration and acid concentration (b and c); $(NH_4)_2SO_4$ concentration and K_2HPO_4 concentration (d); K_2HPO_4 concentration and acid concentration (e and f) on PHA yield.

4. การศึกษาการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์แบบกะ

ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาผลร่วมของปัจจัยต่างๆ ต่อการเจริญและผลิต PHA ของเชื้อในข้อ 3.2 มีองค์ประกอบคือ โพรพิโอเนต 2.5, กรดบิวทิริก 6.5, แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 และฟอสเฟต 0.03 (กรัมต่อลิตรน้ำหมัก) ตามลำดับ

4.1 ศึกษาอัตราการให้อากาศ

การศึกษาการเจริญและการผลิต PHA ของ *R. eutropha* TISTR 1095 โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เติมในอาหารปริมาตร 3 ลิตร ทำการควบคุมพีเอชเริ่มต้นที่ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที และทำการเปลี่ยนแปลงอัตราการให้อากาศที่ 0.5, 1.0 และ 2.0 vvm ตามลำดับ จากภาพที่ 19 และ 20 แสดงการเจริญและการผลิต PHA ของแต่ละอัตราการให้อากาศที่เวลาต่างๆ พบว่า เมื่อให้ปริมาตรอากาศที่ 0.5 vvm จะมีการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต PHA น้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณของออกซิเจนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยเกินไปจึงทำให้เชื้อเจริญได้น้อย และเมื่อพิจารณาที่มีการให้อากาศ 1 vvm จะมีอัตราการเจริญอย่างต่อเนื่องเมื่อผ่านช่วงระยะพักตัว (12 ชั่วโมง) ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับการเก็บสะสมสาร PHA เพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการให้อากาศที่ 2 vvm จะพบว่า ที่มีการให้อากาศ 2 vvm จะมีระยะพักตัวที่สั้นกว่าและมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่า แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเซลล์ของทั้งสองชุดการทดลอง (1 และ 2 vvm) ให้ผลที่ใกล้เคียงกันที่ชั่วโมงที่ 60 หากพิจารณาดูปริมาณ PHA จะเห็นได้ว่าที่ชั่วโมงที่ 54 เมื่อให้อากาศ 2 vvm จะมีค่า PHA มากกว่าที่ 1 vvm เมื่อผ่านชั่วโมงที่ 60 ปริมาณ PHA ของถังที่มีการให้อากาศ 2 vvm จะมีปริมาณที่ลดน้อยลงและมีค่าน้อยกว่าที่ 1 vvm ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์มีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่และสารอาหารเริ่มลดน้อยลงจึงมีผลทำให้เซลล์ดึงแหล่งพลังงานสำรองมาใช้ และจากการศึกษาของ Arunpan (1998) เกี่ยวกับการควบคุมการให้อากาศในการผลิต PHA โดยใช้เชื้อ *Rhizobium meliloti* TISTR 078 ซึ่งมีการควบคุมการให้อากาศที่ 0.2, 0.4 และ 0.8 vvm ที่มีฟรุ๊คโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การให้อากาศที่ 0.2 vvm จะไม่สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อเพราะว่าเป็นการจำกัดปริมาณออกซิเจนมากเกินไปทำให้เกิดการตายของเซลล์ แสดงให้เห็นได้ว่าการควบคุมปริมาณออกซิเจนจึงไม่ควรต่ำกว่าค่าความเข้มข้นวิกฤติของการละลายของออกซิเจนสำหรับเชื้อนั้นๆ ดังนั้นการควบคุมปริมาณออกซิเจนจึงเป็นสิ่งสำคัญต่อการผลิต PHA

ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนและมีปริมาณคาร์บอนมากเพียงพอกิจกรรมของเอนไซม์ NADPH oxidase จะลดลง ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าภายใต้สภาวะเหล่านี้จะเกิด NADH เพิ่มขึ้นและจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซิเตรตซินเทสและเอนไซม์ไอโซซิเตรตดีไฮโดร-จีเนสทำให้อะซิทิลโคเอเพิ่มสูงขึ้นถึงระดับที่จะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคเอ-เอซิลทรานเฟอเรสโดยโคเอไซม์เอเป็นตัวยับยั้งเป็นผลทำให้เกิดปฏิกิริยาการรวมกันของอะซิทิลโคเอและเริ่มกระบวนการสังเคราะห์ PHB อัตราส่วนของ NADPH/NAD ที่สูงจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงการจำกัดอากาศอย่างรวดเร็วจึงทำให้มีการสังเคราะห์ PHB และสามารถคาดการณ์ได้ว่า PHB มีหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนทางเลือก (Richie *et al*., 1969; Senior and Dawes, 1971 อ้างโดย Arunpan, 1998)

อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณหาการสะสม PHA ภายในเซลล์ พบว่า ที่ชั่วโมง 54 เมื่อให้อากาศ 1 และ 2 vvm ได้ PHA สะสมในเซลล์เท่ากับ 48.04 และ 44.63 ของน้ำหนักเซลล์ ตามลำดับ ขณะที่ชั่วโมงที่ 60 เมื่อให้อากาศ 1 และ 2 vvm ได้ PHA สะสมในเซลล์เท่ากับ 51.30 และ 40.23 ของน้ำหนักเซลล์ ตามลำดับ จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA อยู่ที่ 1.0 vvm ซึ่งให้ปริมาณเซลล์และ PHA เท่ากับ 2.94 และ 1.51 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 60 ซึ่งคิดเป็นการสะสม PHA ภายในเซลล์ร้อยละ 51.36 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเปรียบเทียบการสะสม PHA ในเซลล์เมื่อให้อากาศ 1 และ 2 vvm มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกการควบคุมการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm ในชุดการทดลองต่อไป

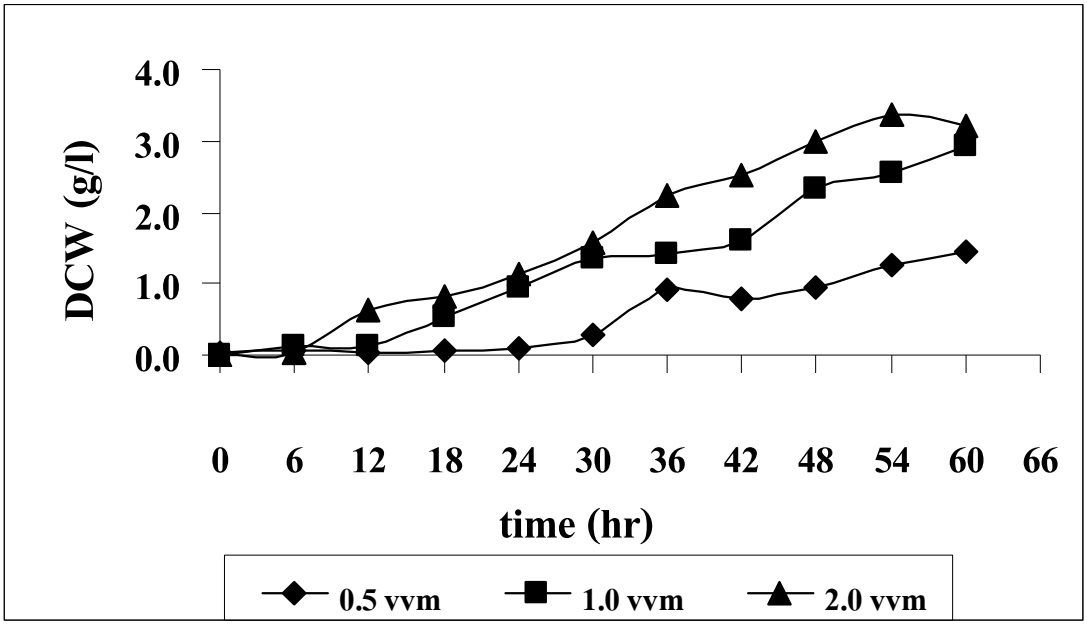
4.2 ศึกษาอัตราการกวน

การผลิต PHA จำนวนมากมีความจำเป็นต้องใช้ถังหมักขนาดใหญ่ ดังนั้นการละลายของแก๊ส ตัวอย่างเช่น ออกซิเจนจะไม่สามารถผสมอย่างทั่วถึงและการสะสมของเสียที่เป็นพิษเป็นผลมาจากการกวนหรือการขาดการควบคุมที่รัดกุมในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบกะหรือกึ่งกะซึ่งเป็นผลทำให้เซลล์ที่มีความไวสูงตาย คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นมีผลในการยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์ในการเพาะเลี้ยงที่ต้องการอากาศ (Arunpan, 1998) ดังนั้นในขั้นตอนนี้จะทำการศึกษาหาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHA โดยทำการเปลี่ยนแปลงอัตราการการกวนที่ 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที ควบคุมอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm พีเอช 7 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต PHA ในแต่ละช่วงเวลาภายใต้สภาวะอัตราการกวนที่แตกต่าง แสดงดังในภาพที่ 21 และ 22 ตามลำดับ พบว่า การเพิ่มอัตราการกวนจะมีผลทำให้เพิ่มอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วแต่ไม่มีผลในการส่งเสริมให้มีการเก็บสะสมสาร PHA ที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที จะให้ผลการเจริญและการผลิต PHA สูงสุด ที่ชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 5.25 และ 4.05

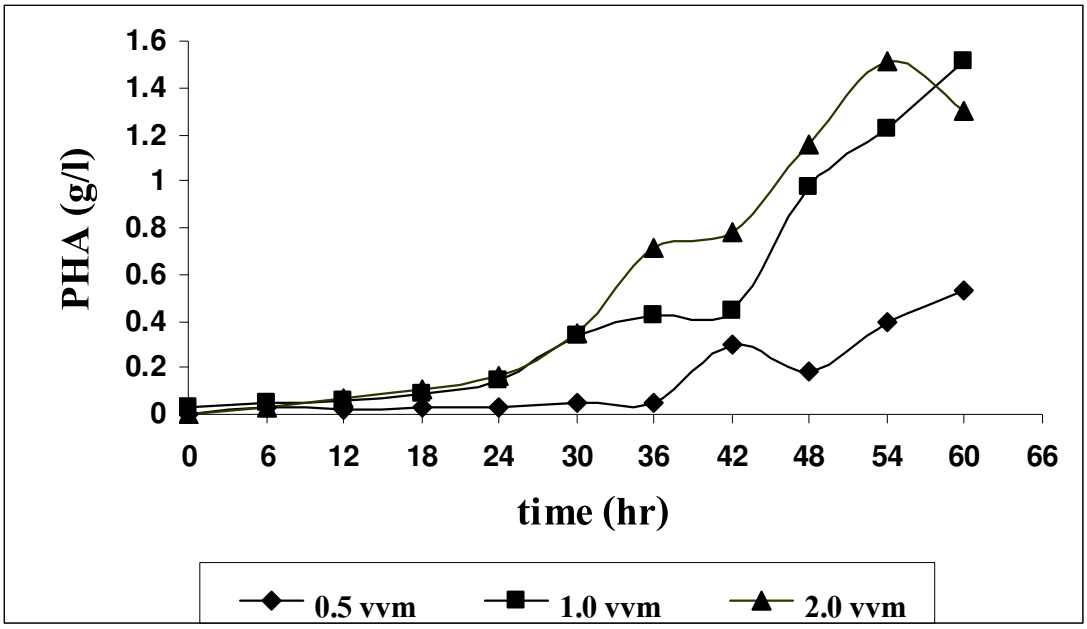
กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีการเก็บสะสมสาร PHA ไว้ภายในเซลล์สูงถึงร้อยละ 77.11 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่จะให้ผลแตกต่างจากผลการศึกษาของ Arunpan (1998) ได้ทำการศึกษาการผลิต PHA จากเชื้อ *R. meliloti* TISTR 078 ใช้ฟรุ๊คโตสร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.05 เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนตั้งแต่ 200, 300 และ 400 rpm และควบคุมอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.4 vvm พบว่า การใช้ความเร็วในการกวนที่ความเร็ว 300 rpm จะให้การเจริญสูงสุดหลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 45 ชั่วโมง และมีการเก็บสะสม PHA สูงสุดในช่วงระยะการเจริญคงที่หลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 48 ชั่วโมง

จากผลการทดลองโดยใช้ความเร็วการกวนที่ 100 200 และ 300 rpm พบว่า จุลินทรีย์สามารถเก็บสะสม PHA ไว้ภายในเซลล์ที่ชั่วโมงที่ 66 เท่ากับ 74.11, 74.22 และ 60.33 ตามลำดับ และชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 77.11, 66.29 และ 59.86 จะเห็นว่าที่ความเร็วการกวน 100 rpm ให้การสะสม PHA ในเซลล์สูงสุดซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติจากชุดการทดลองที่ความเร็วการกวน 200 และ 300 rpm อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกการควบคุมอัตราการกวน เท่ากับ 100 rpm ในชุดการทดลองต่อไป



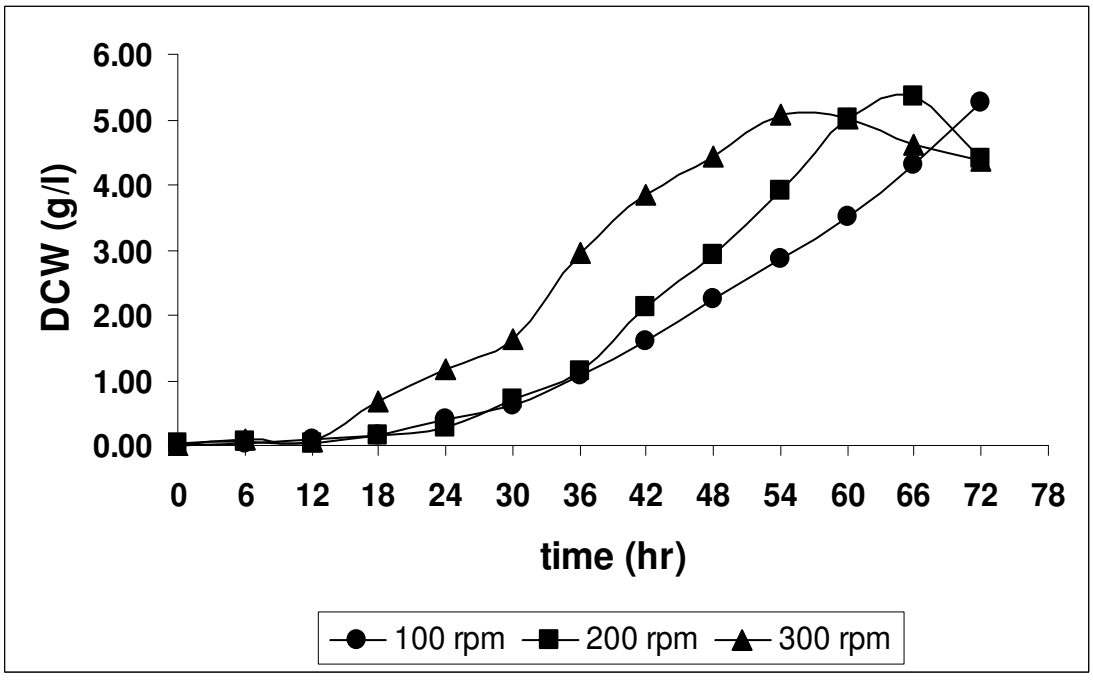
ภาพที่ 19 ผลของการให้อากาศต่อการเจริญของเชื้อ

Figure 19. Effect of aeration rate on cell growth.



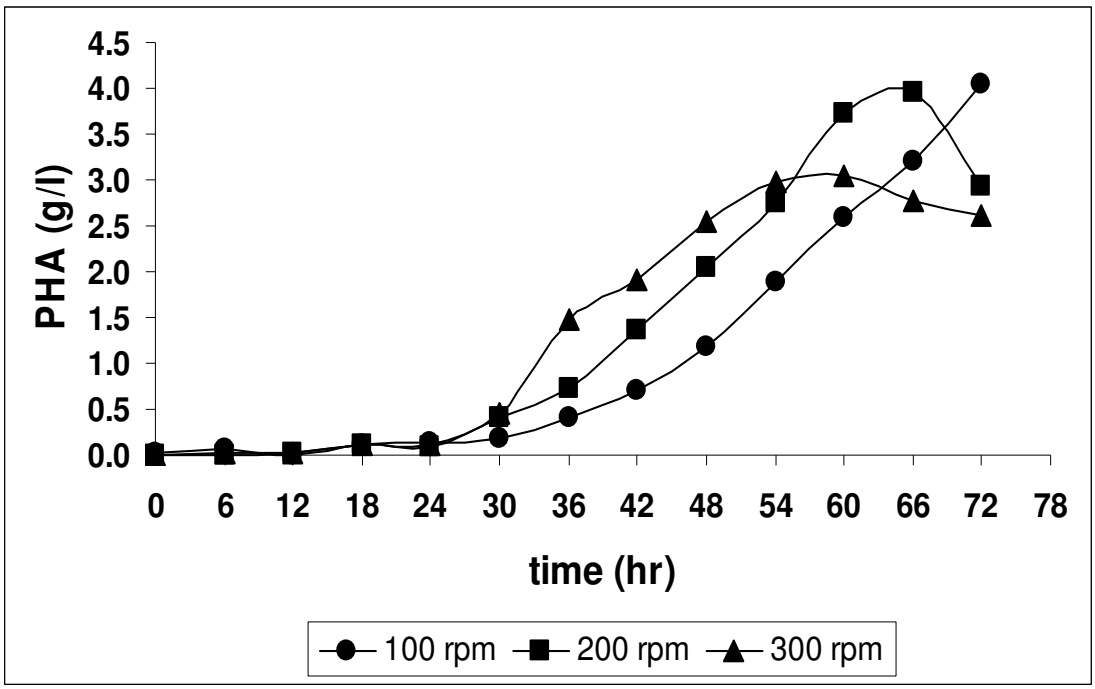
ภาพที่ 20 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการผลิต PHA

Figure 20. Effect of aeration rate on PHA production.



ภาพที่ 21 ผลของอัตราการกวนต่อการเจริญของเชื้อ

Figure 21. Effect of agitation rate on microbial growth.

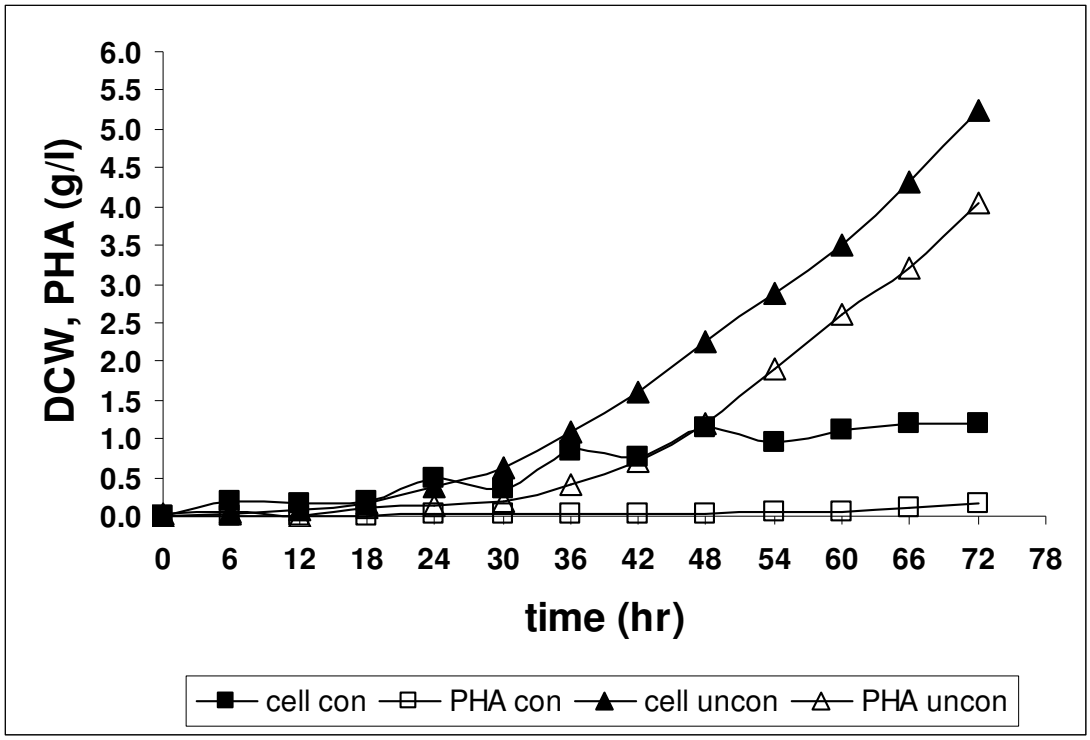


ภาพที่ 22 ผลของอัตราการกวนต่อการผลิต PHA ของเชื้อ

Figure 22. Effect of agitation rate on PHA production.

4.3 ศึกษาการควบคุมพีเอช

การศึกษาในหัวข้อนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีการควบคุมพีเอชที่ 7 และไม่มีการควบคุมพีเอชโดยจะทำการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* TISTR 1095 ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย โพรพิโอเนต 2.5, กรดบิวทิริก 6.5, แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 และฟอสเฟต 0.03 (กรัมต่อลิตรน้ำหมัก) ตามลำดับ และควบคุมอัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที และอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHA ที่ได้ทำการศึกษามาตั้งแต่ขั้นต้น พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่ทำการควบคุมพีเอชจะให้ผลดีกว่าชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอชอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในภาพที่ 23 ดังนั้นในการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* TISTR 1095 เพื่อผลิต PHA จึงไม่ต้องทำการควบคุมพีเอช ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นนี้ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ryu และคณะ (1997) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิต PHA จากเชื้อ *A. eutrophus* และใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการควบคุมพีเอช พบว่า โซเดียมไฮดรอกไซด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และเป็นสาเหตุให้เซลล์ลดลง



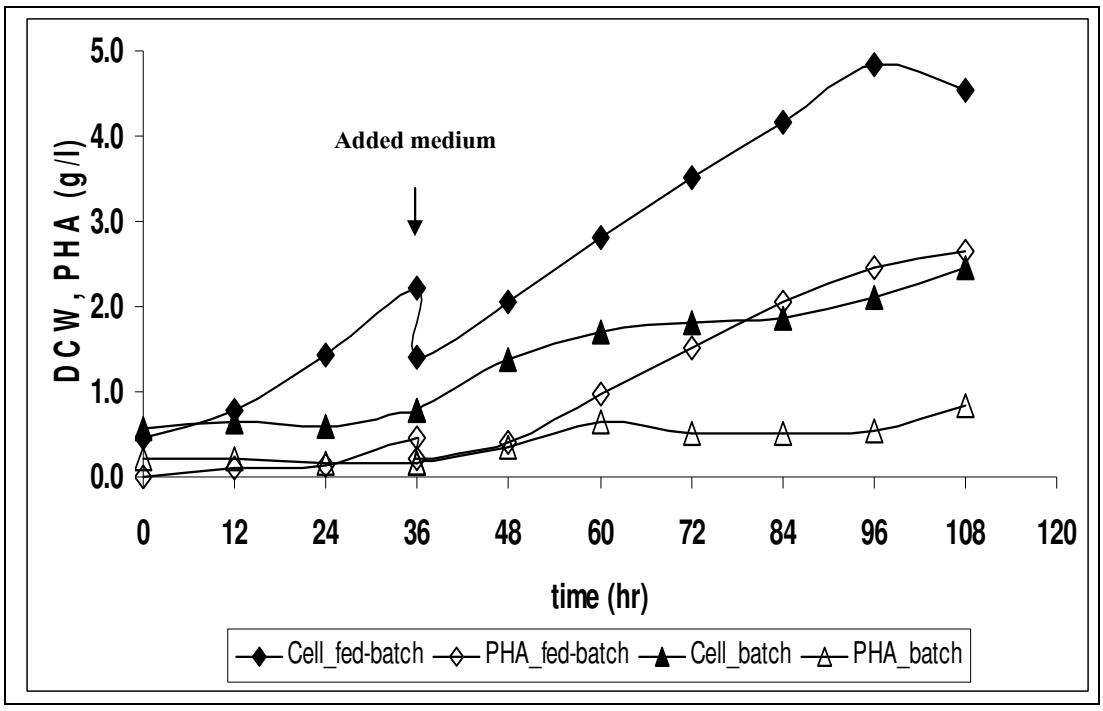
ภาพที่ 23 ผลของการควบคุมและไม่ควบคุมพีเอชต่อการเจริญและการผลิต PHA

Figure 23. Effect of controlled and uncontrolled pH on cell growth and PHA production.

5. ศึกษาการผลิต PHA ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ แบบเติมสารอาหาร 2 ครั้ง ทำการศึกษาในถังหมักขนาด 3 ลิตร ปริมาตรใช้งาน 2 ลิตร ซึ่งในการศึกษาในครั้งนี้จะทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะทำการเติมสารอาหารส่วนที่เหลือเพิ่มอีก 1 ลิตร และทำการควบคุมสภาวะต่างๆ ตามสภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในขั้นต้น การเจริญและการผลิต PHA ของเชื้อที่ชั่วโมงต่างๆ แสดงดังภาพที่ 24 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าชุดการทดลองที่มีการเติมสารอาหารเพียงครึ่งหนึ่งจะมีอัตราการเจริญของเชื้ออย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2 ลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 108 ชั่วโมง จะได้ปริมาณเซลล์และปริมาณ PHA สูงสุดแบบกะ เท่ากับ 2.47 และ 0.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และคิดเป็นการสะสม PHA ภายในเซลล์ร้อยละ 33.6 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และแบบกึ่งกะเท่ากับ 4.53 และ 2.64 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และคิดเป็นการสะสม PHA ภายในเซลล์ร้อยละ 58.3 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (ดังแสดงในตารางที่ 8) และเมื่อคิดเป็นความสามารถในใช้สารอาหาร พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้สารอาหารเพิ่มขึ้นร้อยละ 14.28 ซึ่งให้ผลการทดลอง

เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Yu (2001) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. eutrophus* เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเพาะเลี้ยงระหว่างการเติมอาหารครั้งเดียวกับการเติมอาหารสองครั้งแบบแบ่งเติมทีละครึ่ง ซึ่งใช้กรดผสมสองชนิดคือ กรดโพรพิโอนิคกับกรดบิวทิริกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบการเติมอาหารสองครั้งจะส่งเสริมให้เชื้อมีการเจริญและเก็บสะสม PHA สูงขึ้น มีประสิทธิภาพในการใช้สารอาหารเพิ่มขึ้นร้อยละ 17



ภาพที่ 24 ผลการผลิต PHA ในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งกะ

Figure 24. PHA production in Batch and Fed-batch culture condition.

6. ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิต PHA

การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ แบบเติมสารอาหาร 2 ครั้ง ทำการศึกษาในถังหมักขนาด 3 ลิตร ปริมาตรใช้งาน 2 ลิตร ซึ่งในการศึกษาในครั้งนี้จะทำการเลี้ยงเชื้อโดยทำการควบคุมสภาวะต่างๆ ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 3.4 พบว่า มีการเจริญของเซลล์และการผลิต PHA เท่ากับ 4.53 และ 2.64 กรัมต่อลิตร คิดเป็นการสะสม PHA ประมาณร้อยละ 58.28 PHAต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง มีอัตราการเจริญสูงสุดจำเพาะเท่ากับ 0.03 ต่อชั่วโมง ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 1.43 กรัมเซลล์ต่อกรัมTOC และผลได้ของ PHA จากสารอาหาร ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.83 กรัมต่อกรัมTOC ซึ่งสามารถลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำหมักคิดเป็นร้อยละ 28.74 และเมื่อศึกษาอัตราการเจริญและอัตราการผลิต PHA จะมีค่าเท่ากับ 0.042 และ 0.024 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบกะจะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะนั้นจะมีผลทำให้เชื้อเจริญได้ดีขึ้นจาก 2.46 เป็น 4.53 กรัมต่อลิตร (เพิ่มขึ้น 1.84 เท่า) และมีผลให้การผลิต PHA เพิ่มขึ้นจาก 0.83 เป็น 2.64 กรัมต่อลิตร (เพิ่มขึ้น 3.18 เท่า) (ดังแสดงในตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 จลพลศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะและแบบกะของการผลิต PHA

Table 8. Kinetic of fed-batch and batch culture on PHA production.

	Fed-batch	Batch
DCW (g/l)	4.53	2.46
PHA (g/l)	2.64	0.83
PHA content (%)	58.27	33.77
Productivity (g/l/h)	0.024	0.01
μ (h^{-1})	0.03	0.02
$Y_{(x/s)}$ (g cell/gTOC)	1.30	1.03
$Y_{(p/s)}$ (g PHA/gTOC)	0.83	0.45
TOC removal (%)	28.74	23.52

7. คุณลักษณะของพอลิเมอร์

7.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบของพอลิเมอร์ด้วย Gas chromatography mass spectrometer ; GC-MS

หลังจากการเตรียม methyl ester ของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดเซลล์แบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 ด้วย GC-MS ปรากฏโครมาโตแกรมซึ่งแสดงถึง methyl ester ของมอนอเมอร์พีคเด่นเพียง 2 พีค ได้แก่ methyl hydroxybutyrate ที่ retention time เท่ากับ 8.91 นาที และ methyl hydroxyvaleraterate ซึ่งมี retention time เท่ากับ 10.96 นาที ดังแสดงในภาพที่ 25 จากผลของโครมาโตแกรมสามารถคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเป็นเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ แสดงว่า PHA ที่ได้ประกอบด้วยหน่วยย่อยของ hydroxybutyrate (HB) ร้อยละ 81.69 และหน่วยย่อยของ hydroxyvalerate (HV) ร้อยละ 18.31 ดังนั้น PHA ที่ผลิตได้จาก *R. eutropha* ในการทดลองนี้อาจจะอยู่ในกลุ่มโคพอลิเมอร์ชนิด polyhydroxybutyrate-co-polyhydroxyvalerate (PHBV) องค์ประกอบของโคพอลิเมอร์โดยทั่วไปนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีผลต่อสัดส่วนขององค์ประกอบของโคพอลิเมอร์เช่นกัน (Doi, 1990)

7.2 ผลการศึกษาหาหมู่ฟังก์ชั่นของพอลิเมอร์

การศึกษาคุณสมบัติของสารประกอบด้วยวิธีการ Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) เป็นการศึกษาคุณสมบัติโดยการวัดความเข้มของแสงหรือกำลังของแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ กันอย่างต่อเนื่องเทียบกับเวลา เรียกว่า Time-Domain Spectroscopy หรือโดยทั่วไปเรียกว่า Fourier transform spectroscopy จากนั้น Time-Domain Spectroscopy จะถูกเปลี่ยนเป็น frequency-domain spectrum ด้วย Fourier Transform จากการใช้ดิจิตอลคอมพิวเตอร์ โดยทั่วไปแล้ว อินฟราเรดสเปกโตรสโกปีนิยมใช้เป็นเทคนิคสำหรับหาหรือพิสูจน์เกี่ยวกับโครงสร้างสารอินทรีย์ซึ่งออกมาเป็นความถี่ต่างๆ กัน โดยตารางแสดงรายการของ wave number กับหมู่ฟังก์ชันที่ดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ปานกลางและดีมาก พิจารณาจากเมื่อทำการวิเคราะห์ พอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R. eutropha* TISTR 1095 ด้วยเทคนิค FT-IR เปรียบเทียบกับพอลิเมอร์มาตรฐาน PHBV (12% HV ของบริษัท Aldrich) ผลของสเปกตรัมที่เกิดขึ้นแสดงดังภาพที่ 26b และเมื่อพิจารณาสเปคตรัมของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้กับพอลิเมอร์มาตรฐาน พบว่า สเปคตรัมของพอลิเมอร์ทั้งสองมีความคล้ายคลึงกัน และเนื่องด้วยพอลิเมอร์ PHBV เป็นพอลิเมอร์ที่ทราบสูตรโครงสร้างที่แน่นอนจึงทำให้สามารถวิเคราะห์และพิจารณาสเปคตรัมที่เกิดขึ้นได้ง่าย ประกอบกับการเทียบเคียงกับสเปคตรัมของพอลิเมอร์ PHBV มาตรฐานจึงทำให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น โดยสามารถระบุสเปคตรัมเด่นๆ ของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *Ralstonia eutropha* TISTR 1095

ดังแสดงในตารางที่ 9 เมื่อพิจารณาอินฟราเรดสเปคตรัมของพอลิเมอร์ พบว่า ในตำแหน่งความถี่เท่ากับ 3439.22 ซึ่งเป็นตำแหน่งของอินฟราเรดสเปคตรัมของหมู่ไฮดรอกซิล โดยพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ให้ค่าสเปคตรัมในช่วงกว้างอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นถึงปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลที่มีมากอันอาจเป็นผลมาจากในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างอาจมีความชื้นของตัวอย่างสูงจึงทำให้เกิดสเปคตรัมของหมู่ไฮดรอกซิลมาจากโมเลกุลของน้ำหรืออาจเป็นผลมาจากสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ มีการทำลายโครงสร้างของพอลิเมอร์จากสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ทำให้พอลิเมอร์มีขนาดสั้นลง และมีผลให้เกิดหมู่ไฮดรอกซิลอิสระของปลายพอลิเมอร์สายสั้นๆ

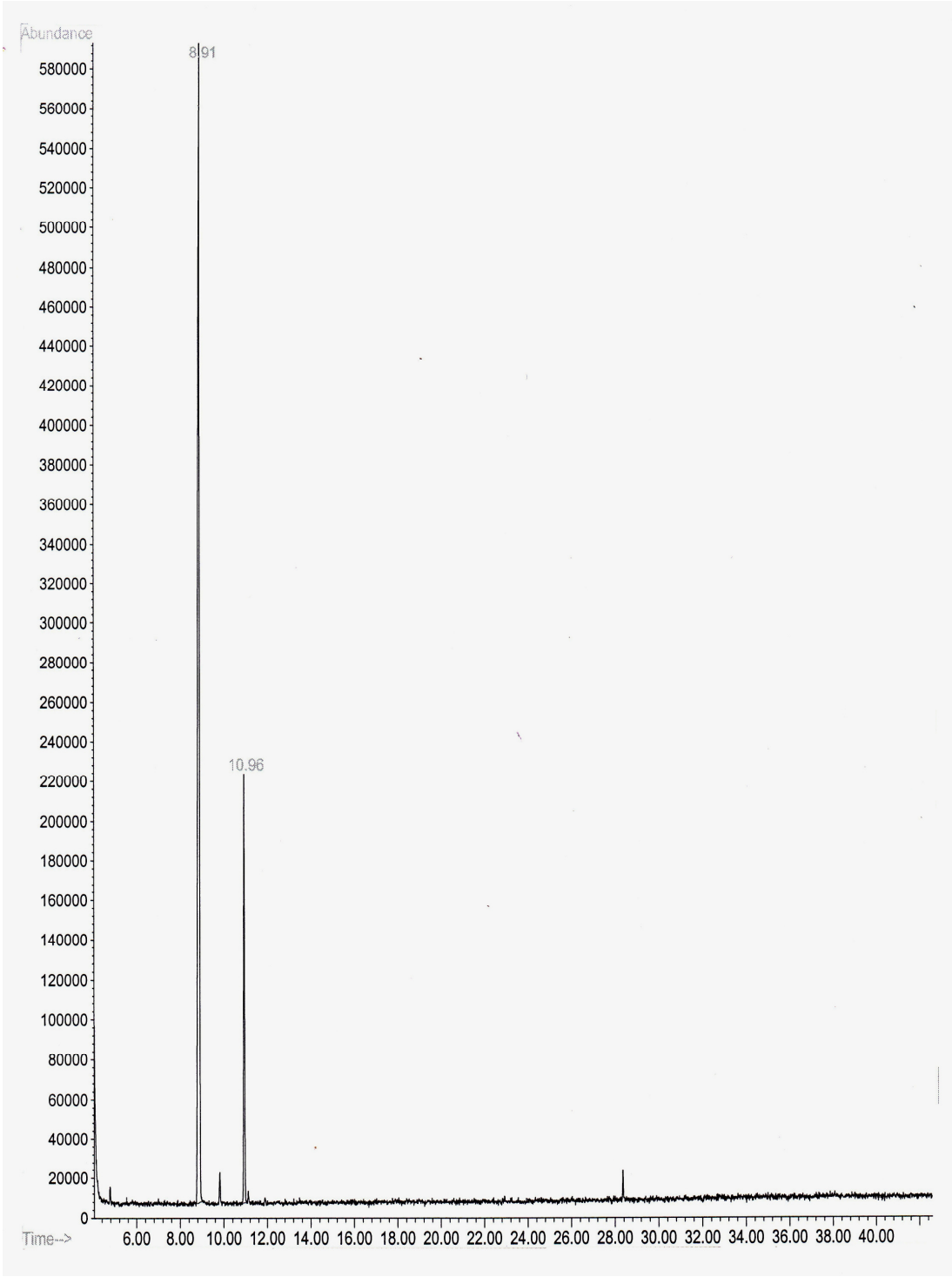
ตารางที่ 9 สเปคตรัมที่เกิดขึ้น และ wave number ของหมู่ฟังก์ชันที่ดูดกลืนแสงของพอลิเมอร์

Table 9. The dominant spectrum and wave number of extracted purified polymer.

Frequency (cm^{-1})	Functional group
3439.22	OH (H_2O)
2978.50, 2935	CH_3, CH_2 (CH stretching)
2879	CH (CH stretching)
1723.54	C=O (esters)
1456.93	CH_3, CH_2 (CH deformation)
1381	CH_3 (CH_3 symmetrical deformation)
978	C-O-C streching

7.3 ผลการศึกษาหาโครงสร้างของพอลิเมอร์

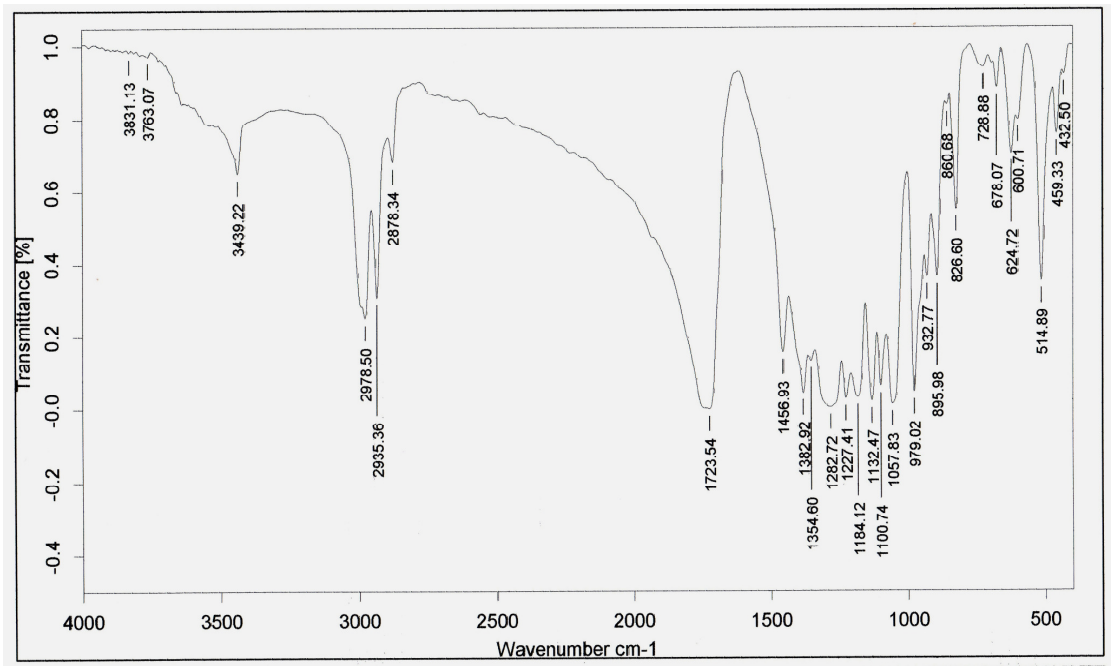
การศึกษาโครงสร้างของพอลิเมอร์นั้นจะเป็นตัวที่ใช้บ่งชี้ชนิดของพอลิเมอร์ได้ดีที่สุด เนื่องจากโครงสร้างจะมีความแน่นอนของตำแหน่งคาร์บอน ซึ่งพอลิเมอร์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยนำเอาเซลล์ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 มาสกัดสาร PHA โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วจึงทำการล้างด้วยอะซีโตน และล้างด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.8 เก็บส่วนของตะกอนที่ได้มาละลายด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มแล้วให้ความร้อนเพื่อให้ PHA ละลายอย่างสมบูรณ์ ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนทำการกรองเก็บส่วนใสไว้ จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาตกตะกอนด้วยเฮกเซน ทำการแยกตะกอนของ PHA ที่ได้ด้วยกรวยแยก จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นำตะกอน PHA ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเฮกเซนมาศึกษาคุณลักษณะหรือคุณสมบัติโดยใช้เทคนิค ^{13}C-NMR โดยนำพอลิเมอร์ที่ได้ละลายในสารละลายคลอโรฟอร์มทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Fourier Transform NMR spectrometer 500 MHz รุ่น UNITY INOVA, Varian แล้วนำมาพิจารณาถึงตำแหน่งของ chemical shift ของคาร์บอนในโครมาโตแกรมซึ่งผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 26 ซึ่งสเปคตรัมที่เกิดขึ้นมีการแยกของพีคอย่างชัดเจน และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับผลการศึกษาสูตรโครงสร้างพอลิเมอร์ P(3HB-co-19%HV) ของ Doi (1990) พบว่า ลักษณะของสเปคตรัมที่เกิดขึ้นมีลักษณะที่เหมือนกัน เมื่อพิจารณาถึงหมู่ฟังก์ชันของแต่ละพีคสามารถเทียบเคียงได้จากโครงสร้างทางเคมีที่แสดงคู่กับภาพที่ 27 โดยในช่วง 169 ppm จะพบกลุ่มสเปคตรัมของหมู่คาร์บอนิลซึ่งมีผลมาจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 5 ซึ่งเมื่อพิจารณาอย่างละเอียด พบว่า ประกอบด้วย 9 พีคหลัก ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องจากความแตกต่างของมอนอเมอร์ระหว่าง 3HB และ 3HV โดยสามารถพิจารณาแยกแต่ละพีคได้ว่าเป็นคาร์บอนที่ตำแหน่งใดในโครงสร้างของสายพอลิเมอร์ แสดงดังตารางที่ 10



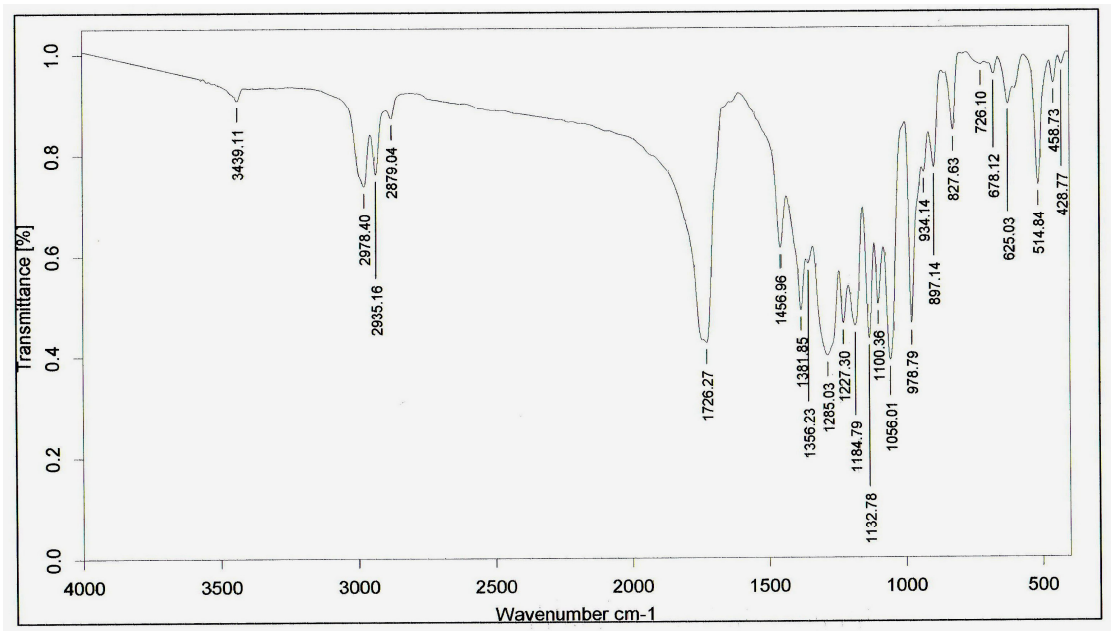
ภาพที่ 25 โครมาโตแกรมของพอลิเมอร์ที่ผลิตจากการเลี้ยงเชื้อ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095

Figure 25. Chromatogram of polymer produced from *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 cultivated.

(a)



(b)



ภาพที่ 26 อินฟราเรดสเปคตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์ (a) เปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ PHBV มาตรฐาน (b)

Figure 26. The infrared spectra of purified polymer (a) and standard PHBV (b).

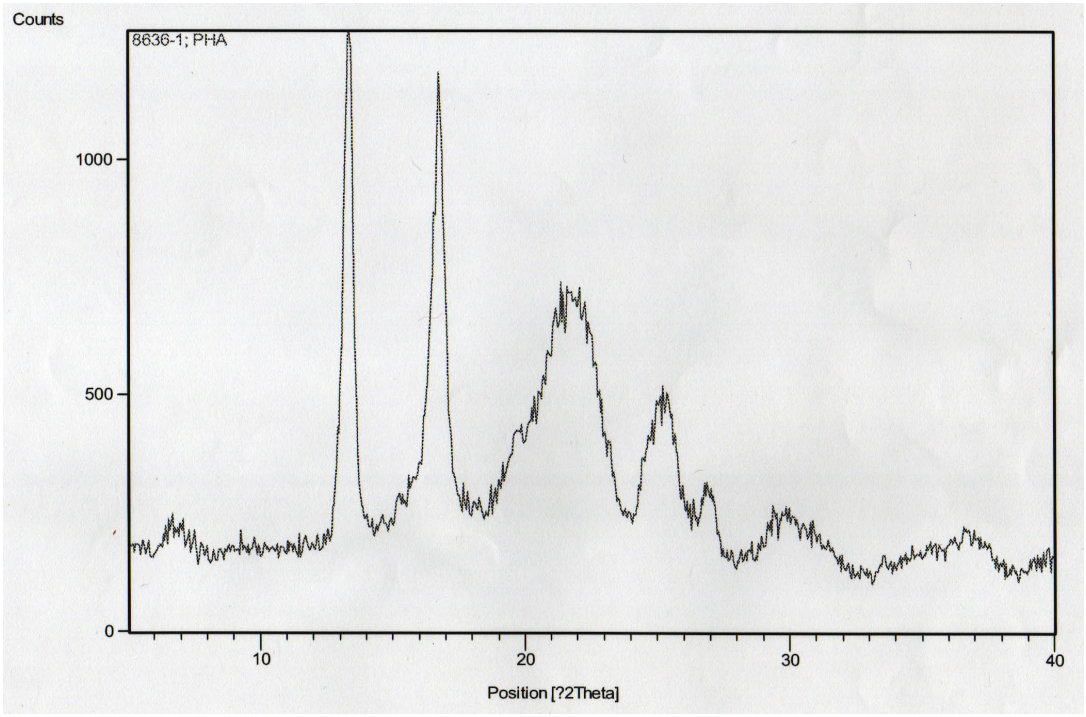
ตารางที่ 10 สเปคตรัมที่เกิดขึ้นจากมอนอเมอร์ของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 ด้วย 500 MHz ^{13}C-NMR

Table 10. The typical 500 MHz ^{13}C-NMR spectrum of purified polymer from *Ralstonia eutropha* TISTR 1095.

Chemical shift (ppm)	Position	Carbon unit	
169.1	1, 5	CO	
40.7	2	CH_2	
67.5	3	CH	hydroxy butyrate (HB)
19.7	4	CH_3	
38.7	6	CH_2	
71.8	7	CH	hydroxy valerate (HV)
26.8	8	CH_2	
9.3	9	CH_3	

7.4 ผลการศึกษาหาค่า Crystallinity ของผลึกพอลิเมอร์

จากการศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติเบื้องต้นของ PHA กลุ่มโฮโมพอลิเมอร์ได้แก่ PHB พบว่าจะมีคุณสมบัติโดยทั่วไปคือ แข็ง แต่เปราะ ดังนั้นการผลิตโคพอลิเมอร์เพื่อมาทดแทนการใช้โฮโมพอลิเมอร์นั้น จึงต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของความคงทนของโครงสร้างของพอลิเมอร์เมื่อทำการขึ้นรูปเป็นภาชนะ การใช้เครื่อง X-ray diffractometer สำหรับวิเคราะห์หาการเกิดผลึก crystallinity ของพอลิเมอร์จึงมีความจำเป็น เพื่อประเมินถึงความเหมาะสมของสัดส่วนของพอลิเมอร์ที่ประกอบขึ้นจากมอนอเมอร์ทั้งแบบ block และ random polymer หรืออีกนัยหนึ่งเพื่อพิจารณาความแข็งแรงทนทาน หรือความคงทนของพอลิเมอร์ที่ผลิต โดยค่า crystallinity จะรายงานในรูปของ degree of crystallinity ซึ่งจากการวิเคราะห์ PHA ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จากเชื้อ *R. eutropha* TISTR 1095 พบว่ามี % crystallinity เท่ากับ 55.88 ซึ่งมีค่ามากกว่า 50 % จึงจัดว่าพอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีความคงทน หรือความแข็งแรงค่อนข้างสูง จากรายงานของ Doi (1990) พบว่า % crystallinity เพิ่มขึ้นจาก 55 % ถึง 70 % เมื่อมี HV เป็นองค์ประกอบของ P(3HB-co-3HV) มากขึ้นจาก 0 % ถึง 95 %โมล อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถใช้ค่า % crystallinity มาใช้ประกอบการวิเคราะห์ชนิดของพอลิเมอร์ว่าเป็นโฮโมพอลิเมอร์ หรือ โคพอลิเมอร์และเมื่อเปรียบเทียบค่า % crystallinity กับพอลิโพรไพลีน และไนลอนพบว่าให้ค่าเท่ากับ 30-50 และ 40-60% ตามลำดับ จากการที่ค่า % crystallinity ของโคพอลิเมอร์มีค่าสูง น่าจะเป็นผลเนื่องมาจากโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ มีความเป็น amorphous มากกว่า โฮโมพอลิเมอร์ จึงทำให้โครงสร้างมีความยืดหยุ่นหรือเหนียวเพิ่มขึ้น (Doi, 1990) รูปแบบของพีคที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์พอลิเมอร์ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer แสดงดังภาพที่ 28



ภาพที่ 28 รูปแบบที่เกิดขึ้นของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จากเชื้อ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095ใน สารละลายคลอโรฟอร์ม ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer

Figure 28. X-ray diffraction patterns from extracted purifying polymer in a chloroform solution.

7.5 ผลการศึกษาหาอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) และอุณหภูมิแข็งตัว (T_c) ของผลึกพอลิเมอร์ด้วยวิธี Differential scanning calorimeter (DSC)

จากการนำพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดเซลล์แบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 และพอลิเมอร์มาตรฐานทั้ง PHB และ PHBV (8% HV) (ของบริษัท Aldrich) มาศึกษาอุณหภูมิหลอมเหลว และอุณหภูมิแข็งตัวของผลึกพอลิเมอร์ด้วยการใช้เครื่อง Differential scanning calorimeter (DSC) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 11 พบว่า เมื่อมีการให้ความร้อน 2 ครั้ง จะปรากฏพีคของอุณหภูมิหลอมเหลวตัวของผลึก (T_m) ที่มีค่าใกล้เคียงกันโดยพีคที่ได้จากพอลิเมอร์ประเภทโฮโมพอลิเมอร์ พีคจะมีลักษณะเป็นยอดแหลม และหลังจากการวิเคราะห์พอลิเมอร์มาตรฐาน PHB พบว่า มีค่า T_m เท่ากับ 172.7 องศาเซลเซียส ในขณะที่ glass temperature (T_g) เท่ากับ 1.038 องศาเซลเซียส และมีค่า T_c เท่ากับ 121.2 องศาเซลเซียส เมื่อนำพอลิเมอร์มาตรฐาน PHBV ซึ่งเป็นประเภทโคพอลิเมอร์ จะปรากฏพีคมีลักษณะเป็นยอดกว้าง (broad band) ลักษณะของพีคดังกล่าวเป็นลักษณะของโคพอลิเมอร์ โดยมีค่า T_m เท่ากับ 156.7 องศาเซลเซียส และค่า (T_g) เท่ากับ -0.777 องศาเซลเซียส สำหรับค่า T_c มีค่าเท่ากับ 118.866 องศาเซลเซียส และเมื่อนำพอลิเมอร์ที่ผลิต

ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R. eutropha* TISTR 1095 พบว่า ลักษณะของพีคที่ได้จากการวิเคราะห์มีลักษณะเป็นยอดกว้าง และให้ค่า T_m เท่ากับ 135.3 องศาเซลเซียส และค่า T_g เท่ากับ -9.72 องศาเซลเซียส สำหรับค่า T_c มีค่าเท่ากับ 49.2 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองในตารางที่ 11 จะเห็นได้ว่าเมื่อสัดส่วนของ %HV เพิ่มสูงขึ้นจะมีผลทำให้ T_m, T_c และ T_g มีค่าลดน้อยลงเนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์เปลี่ยนไป จากการศึกษาผลของสัดส่วนของ HB และ HV ที่มีต่อคุณสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์ พบว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณ HV จะทำให้พอลิเมอร์มีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้นทำให้สามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์มที่มีความคงทนต่อแรงดึงได้มากยิ่งขึ้นด้วย (Doi, 1990)

ตารางที่ 11 อุณหภูมิหลอมเหลวตัวผลึก และอุณหภูมิแข็งตัวผลึกของพอลิเมอร์

Table 11. The melting point and crystalline temperature of polymer

Sample	Temperature (^{0}C)		
	T_g	T_c	T_m
Polypropylene	-15	nd	171-182
PHB (Aldrich)	1.038	121.2	172.7
PHBV (Aldrich HV 8 %)	-0.777	118.8	156.7
PHA(*R .eutropha*) (HV 18.3%)	-9.72	49.2	135.3
PHBV (HV 20%)*	-1	nd	145
PHBV (HV 25%)*	-6	nd	137
PHBV (HV 34%)*	-8	nd	97
PHBV (HV 55%)*	-10	nd	77

nd : no data

* : Doi, (1990)

7.6 ผลการศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิเมอร์

การวัดค่ามวลโมเลกุลโดยวิธีการวัดความหนืดนั้นมีความเกี่ยวข้องกับขนาดโมเลกุลและลักษณะการจัดวางตัวของโมเลกุล ไม่เกี่ยวข้องกับน้ำหนักหรือมวลโมเลกุลแต่อย่างใด ดังนั้นค่ามวลโมเลกุลที่วัดได้ด้วยวิธีวัดความหนืดจึงไม่ใช่ทั้งค่า number - averaged weight (M_n) และ weight-averaged molecular weight (M_w) แต่เป็นค่ามวลโมเลกุลเฉลี่ยเชิงความหนืด (viscosity-average molecular weight, M_v) จากการทดลองวัดความหนืดของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายโดยใช้วิสโคมิเตอร์ชนิด Ubbelohde viscometer ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลการวัดความหนืดสารละลายพอลิเมอร์เจือจาง

Table12. Polymer viscosity determination of dilute solution.

No.	Conc (g/dl)	Flow-time (s)	t/t_0	η(SP)	η (rad)	η (inh)
1	0.25	463	1.362	0.362	1.447	1.235
2	0.167	450	1.324	0.324	1.937	1.678
3	0.125	428	1.259	0.259	2.071	1.841
4	0.1	396	1.165	0.165	1.647	1.525

และจากการวัดค่าการไหลของตัวทำละลายบริสุทธิ์ซึ่งเป็นค่าความหนืดของสารละลายเมื่อความเข้มข้นเท่ากับศูนย์ พบว่า มีระยะเวลาการไหลเท่ากับ 340 วินาที และเมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Via M_v version 1.0 โดยกำหนดค่า a ได้เป็น 0.78 และค่า K เท่ากับ 1.18×10^{-4} (Netravali and Luo, 2003) คำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลตามสมการของ Mark Houwick Sakurada Equation จากผลการทดลองพบว่า พอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จากเชื้อ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 ให้ค่าของน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 448,900 ดาลตัน