

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

3.1.1 การเทียบเคียงตามสรีรวิทยา ลัทธิฐานวิทยา

สำหรับการเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มจำเป็นต้องเทียบเคียงทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิม ES 16 และสายพันธุ์กลาย N20 และ U7 จากการทำการกลายพันธุ์โดยวาทิต หมดหวาน (2545) เพื่อเป็นการยืนยันผลของการเทียบเคียงว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์หลังจากการกลายพันธุ์ จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ ES16, N20 และ U7 โดยนำผลที่ได้มาเทียบเคียงกับอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Staley *et al.*, 1989) พบว่าเชื้อเจริญได้ในสภาวะไร้อากาศ-ให้แสง จึงจัดเป็น Photoheterotroph ซึ่งใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน และสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งการทดลองนี้คือ ชักซินเทใน Succinate medium ในทำนองเดียวกันสามารถจัดรูปแบบการเจริญของทั้งสามสายพันธุ์เป็น Chemoheterotroph ซึ่งใช้สารอินทรีย์เป็นทั้งแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน โดยเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงในสภาวะให้อากาศ-ไร้แสง ดังนั้นจัดทั้งสามสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Photosynthetic bacteria หรือ Anoxygenic phototrophic bacteria อย่างไรก็ตาม ทั้งสามสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีซัลไฟด์ หรือไฮโดรซัลเฟต จึงจัดเป็นสมาชิกในกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสงประเภท Purple nonsulfur bacteria ในวงศ์ Rhodospirillaceae

สายพันธุ์ ES16 มีลักษณะเซลล์เป็นรูปไข่ ดิคลีแกรมลบ มีขนาด $0.5 \times 1.0 \mu\text{m}$ โดยเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด คือ 474, 588, 800, 855 และ 877 nm (ภาพที่ 9a) ซึ่งเป็นรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสงชนิด bacteriochlorophyll *a* โดยมีความต้องการวิตามินสำหรับส่งเสริมการเจริญ คือ ไบโอติน และไทอะมิน และมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแบ่งตัว (binary fission) โดยอาจพบเซลล์ต่อกันเป็นสาย

สายพันธุ์ N20 มีลักษณะเซลล์เป็นรูปไข่ ดิคลีแกรมลบ มีขนาด $0.5 \times 1.0 \mu\text{m}$ โดยเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด คือ 476, 588, 801, 855 และ 876 nm (ภาพที่ 9b) เป็นรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสงชนิด bacteriochlorophyll *a* โดยมีความต้องการวิตามินสำหรับส่งเสริมการเจริญ คือ ไบโอติน และไทอะมินและพบว่าการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแบ่งตัว (binary fission) โดยอาจพบเซลล์ต่อกันเป็นสาย

สายพันธุ์ U7 มีลักษณะเซลล์เป็นรูปไข่ ดิคลีแกรมลบ มีขนาด $0.8 \times 1.0 \mu\text{m}$ โดยเซลล์มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด คือ 474, 588, 800, 855 และ 877 nm (ภาพที่ 9c) เป็นรงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์แสงชนิด bacteriochlorophyll *a* โดยมีความต้องการวิตามินสำหรับส่งเสริมการเจริญ คือ ไบโอติน และไทอะมิน และพบว่าการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแบ่งตัว (binary fission) โดยอาจพบเซลล์ต่อกันเป็นสาย ในการพิจารณาลักษณะเซลล์ รวมถึงขนาดสามารถวิเคราะห์ได้จากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

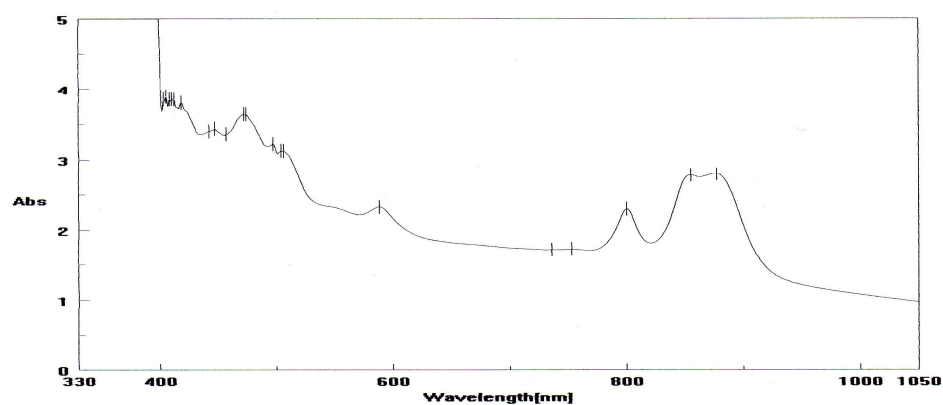
ในการเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถวิเคราะห์ผลดังนี้

1. ในการเทียบเคียงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในกลุ่ม Purple nonsulfur bacteria นั้นอาศัยคุณลักษณะของรูปร่างเซลล์เป็นหลักในการเทียบเคียงถึงสกุล (Genus) โดยเทียบเคียงเซลล์ที่มีลักษณะโค้งจนถึงเกลียวในจินัส *Rhodospirillum* และ *Rhodocyclus* ในขณะที่จัดเป็นจินัส *Rhodopila* ถ้าเซลล์มีรูปร่างกลม ถ้าเซลล์มีรูปทรงรีหรือรูปไข่จัดเป็นจินัส *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas* และ *Rhodomicrobium* (Staley et al., 1989) ซึ่งจากการบันทึกผลพบว่าทั้งสายพันธุ์ ES16, N20 และ U7 มีลักษณะของเซลล์เป็นรูปไข่ โดยพิจารณาจากรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ดังภาพที่ 10 จึงเทียบเคียงได้ว่าเป็นสมาชิกของจินัส *Rhodobacter* หรือ *Rhodopseudomonas* หรือ *Rhodomicrobium*

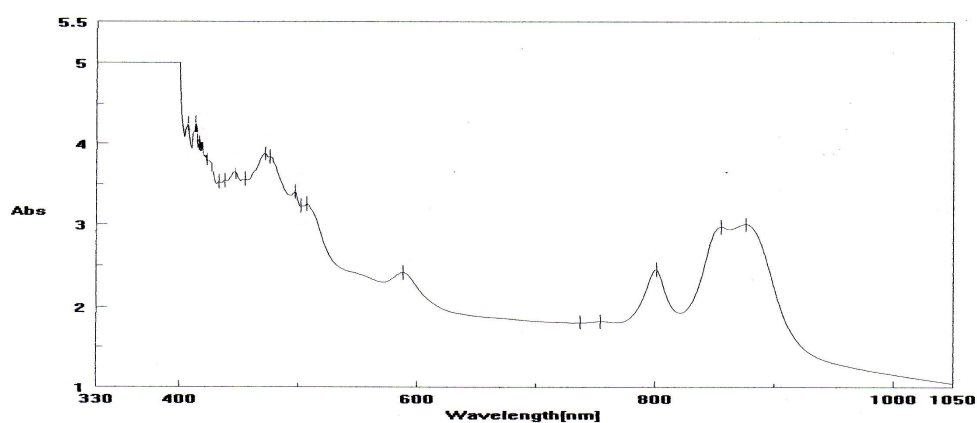
2. เมื่อพิจารณาการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ ES16, N20 และ U7 พบว่าการแบ่งเซลล์แบบ binary fission และเกาะติดกันเป็นสาย ซึ่งตรงกับคุณลักษณะของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในจินัส *Rhodobacter* ในขณะที่จินัส *Rhodopseudomonas* และ *Rhodomicrobium* จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการ budding จึงจัดทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ในสกุล *Rhodobacter*

3. สำหรับการระบุชนิด (species) ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงอาศัยคุณสมบัติของกระบวนการเมแทบอลิซึม หรือคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยพิจารณาความสามารถในการใช้สารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน หรือ electron donor ซึ่งจากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ ES16, N20 และ U7 ในแหล่งคาร์บอน 14 ชนิด พบว่าทุกสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่เดิมเบนโซเอทเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่สามารถใช้และเจริญได้ดีใน อะซิเตท, โพรพิโอเนท, แลคเตท, มาเลท, ซัคซิเนท, ทาเทรท, กลูตามาต, กลูโคส, ฟลูคโตส, แมนนิทอล, วาเลอเรท, ซอบิทอล และกลีเซอรอล โดยสามารถเจริญได้เล็กน้อยในอาหารที่มีซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจากผลการใช้สารอาหารสามารถนำมาใช้เพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้ดังนี้

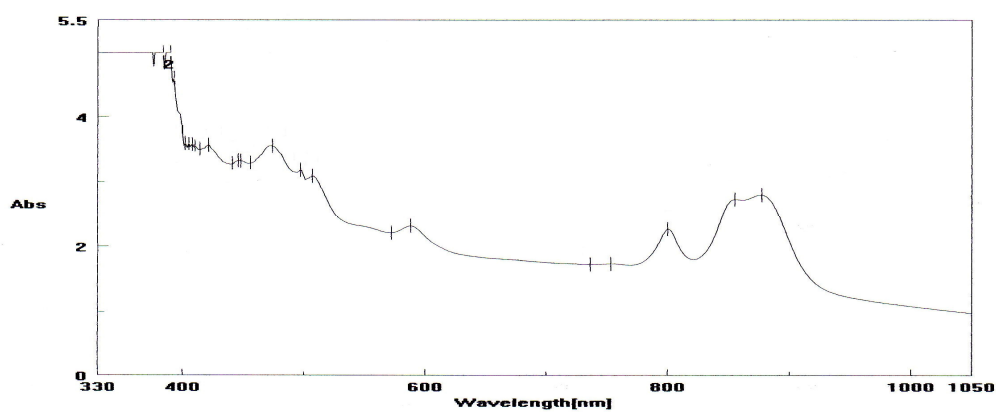
(a)



(b)

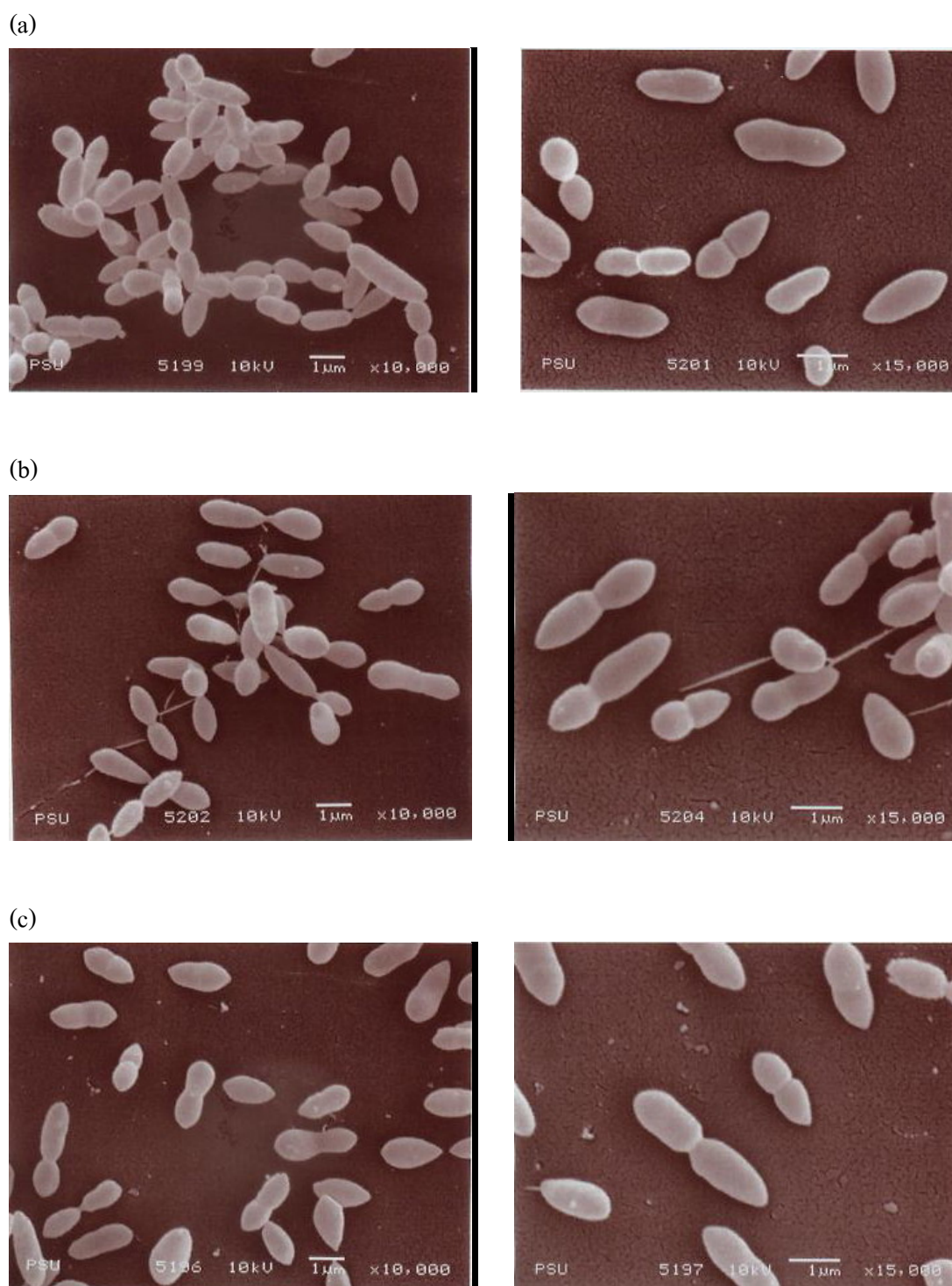


(c)



ภาพที่ 9 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง
(a) ES16 (b) N20 (c) U7

Figure 9. Optical spectra of whole photosynthetic bacterial cell suspension both wild type and mutant strains (a) ES16 (b) N20 (c) U7.



ภาพที่ 10 ภาพถ่ายอิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็ม กำลังขยาย x10,000 (ซ้าย) และ x15,000 (ขวา) (a) สายพันธุ์ ES16 (b) สายพันธุ์ N20 (c) สายพันธุ์ U7

Figure 10. Scanning electron micrograph (SEM) x10,000 (left) and x15,000 (right) of the halotolerant photosynthetic bacterial strain (a) ES16 (b) N20 (c) U7.

กรณีที่ไม่เจริญในอาหารที่มีเบนโซเอทสามารถระบุได้ว่าเป็น *Rhodobacter capsulatus*, *R. sphaeroides*, *R. sulfidophilus*, *R. adriaticus* และ *R. veldkampii* กรณีเจริญได้ในอาหารที่มี อะซิเตท โพรพิโอเนท แล็กเตท มาเลท ซัคซินัท วาเลอเรท กลูโคส และกลูตามัท สามารถระบุได้ว่าเป็น *R. capsulatus*, *R. sphaeroides*, *R. sulfidophilus*, *R. adriaticus* และ *R. veldkampii* กรณีเจริญได้ในอาหารที่มี ฟลักโตส, แมนนิทอล และซอบิทอล สามารถระบุได้ว่าเป็น *R. capsulatus*, *R. sphaeroides* และ *R. sulfidophilus* กรณีสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีซิเตรท สามารถระบุได้ว่าเป็น *R. capsulatus* และ *R. sphaeroides* กรณีเจริญได้ในอาหารที่มีกลีเซอรอลสามารถระบุได้ว่าเป็น *R. sphaeroides* และ *R. sulfidophilus* (Staley et al., 1989)

จากการวิเคราะห์การใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 14 ชนิดพบว่าความเป็นไปได้ของชนิดแบคทีเรียสังเคราะห์แสงคือ *R. capsulatus* หรือ *R. sphaeroides* หรือ *R. sulfidophilus* แต่จากการทดสอบการใช้ซิเตรทพบว่าการเจริญได้น้อยกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนอื่น ซึ่งการใช้ซิเตรทนั้นสำหรับ *R. capsulatus* จะไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อพิจารณาการใช้ทั้ง ซิเตรท และ กลีเซอรอล พบว่า *R. capsulatus* จะไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีกลีเซอรอล และ *R. sulfidophilus* ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีซิเตรท ในขณะที่ *R. sphaeroides* สามารถเจริญได้ทั้งในซิเตรท และ กลีเซอรอล ดังนั้นมีความเป็นไปได้ค่อนข้างสูงมากที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ ES16, N20 และ U7 จะเป็น *Rhodobacter sphaeroides* (Staley et al., 1989)

หากเชื้อเจริญได้ในอาหารที่มีทาทเรทสามารถระบุได้ว่าเป็น *Rhodobacter sphaeroides* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเจริญได้ดีในอาหารที่มีทาทเรทเป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ ES16, N20 และ U7 จัดเป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม Purple nonsulfur bacteria ในวงศ์ *Rhodospirillaceae* สกุล *Rhodobacter* และชนิด *sphaeroides* ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5

3.1.2 การเทียบเคียงเชื้อโดยวิธี 16S rDNA

จากการเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์ ES16 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม กับ สายพันธุ์ N20 และ U7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลาย โดยวิธี 16S rDNA ด้วยการใช้ forward primer คือ UFUL (5'-GCCTAACACATGCAAGTCGA-3') และ reverse primer คือ 536R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3') โดยพิจารณาโครมาโตแกรมของลำดับเบสจากการแปลผลลำดับเบสของยีน 16S rDNA และนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับ gene bank พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์ ES16 เทียบเคียงได้เป็น *Rhodobacter sphaeroides* (100%) เช่นเดียวกับสายพันธุ์ N20 และ U7 ซึ่งสามารถเทียบเคียงได้เป็น *Rhodobacter sphaeroides* (99%)

แสดงดังตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่ม *Rhodobacter sphaeroides* กับแบคทีเรียในกลุ่มใกล้เคียงซึ่งจัดเป็นกลุ่ม Proteobacteria ประเภท alpha subdivision จากการนำลำดับเบสที่ได้จาก gene bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ซึ่งสามารถแสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenetic tree ดังภาพที่ 11

ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางอนุกรมวิธาน และทางชีวเคมีของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ดั้งเดิม ES16 และสายพันธุ์กลาย N20 กับ U7

Table 5. Taxonomical and biochemical characteristics of photosynthetic bacterial wild type and mutant strain.

Characteristics	Results		
	Strain ES16	Strain N20	Strain U7
1. Growth form	Photoheterotroph Chemoheterotroph	Photoheterotroph Chemoheterotroph	Photoheterotroph Chemoheterotroph
2. Growth on sulfide and thiosulfate	-	-	-
3. Bacteriochlorophyll	a	a	a
4. Gram staining	negative	negative	negative
5. Cell shape	ovoid	ovoid	ovoid
6. Cell size (μm)	0.5x1.0	0.5x1.0	0.5-0.8x1.0
7. Motility	+	+	+
8. Gelatin degradation	-	-	-
9. Slime formation	+	+	+
10. Visible colour of cell suspension	An-L : brownish red, Ae-D : red	An-L : brownish-red, Ae-D : red	An-L : brownish red, Ae-D : red
11. Vitamin requirement	biotin, thiamine	biotin, thiamine	biotin, thiamine
12. Carbon source for electron donor			
Acetate	++	++	++
Propionate	++	++	++
Lactate	++	++	++
Malate	++	++	++

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (continued)

Characteristics	Results		
	Strain ES16	Strain N20	Strain U7
Tartrate	++	++	++
Citrate	+	+	+
Valerate	++	++	++
Glutamate	++	++	++
Benzoate	-	-	-
Glucose	++	++	++
Fructose	++	++	++
Mannitol	++	++	++
Sorbitol	++	++	++
Glycerol	++	++	++

+ คือ ผล positive, - คือ ผล negative

An-L คือ Anaerobic-Light, Ae-D คือ Aerobic-Dark

^a ++ คือ เจริญดีมาก ($OD_{660} \geq 0.8$), + คือ เจริญเล็กน้อย ($0.2 \leq OD_{660} \leq 0.8$) - คือ ไม่เจริญ

+ represented as positive result, - represented as negative result

An-L represented as anaerobic-light, Ae-D represented as aerobic-dark

^a ++ represented as well growth ($OD_{660} \geq 0.8$), + represented as little growth ($0.2 \leq OD_{660} \leq 0.8$), - represented as no growth

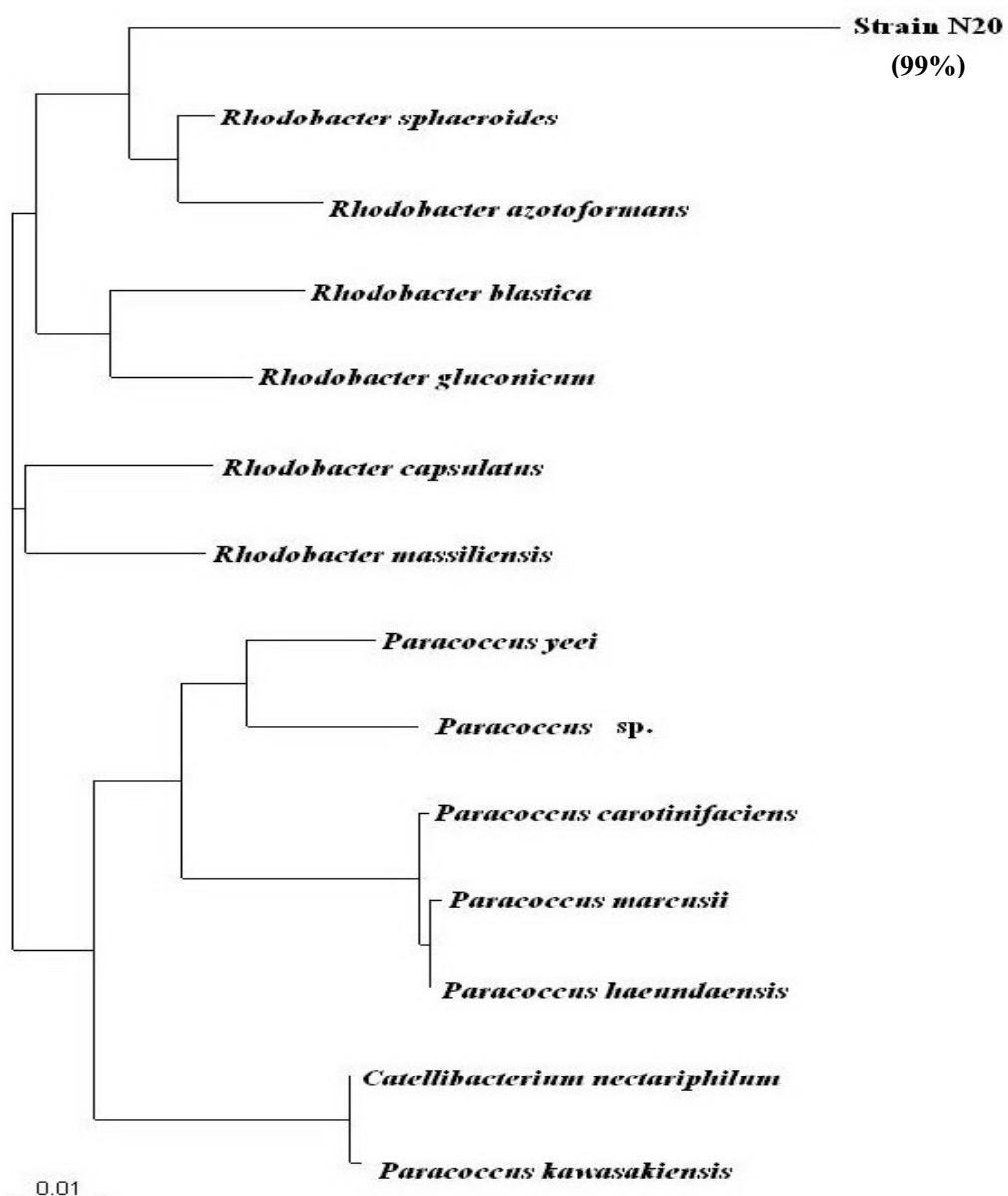
ตารางที่ 6 ผลการเทียบเคียงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ ES16 N20 และ U7
 Table 6. Identification of photosynthetic bacterial strain ES16 (wild type), N20 and U7 (mutant) with database in gene bank.

Strain	Sequences producing significant alignments	Identity (%)	Score (bits)	E Value
ES 16	<i>R. sphaeroides</i> ribosomal RNA operon rrnB	100	1050	0.0
	<i>R. sphaeroides</i> ribosomal RNA operon rrnC	99	1026	0.0
	<i>R. sphaeroides</i> ribosomal RNA operon rrnA	99	1026	0.0
	<i>R. sphaeroides</i> gene for 16S ribosomal RNA	99	915	0.0
	<i>R. sphaeroides</i> gene for 16S ribosomal RNA	99	907	0.0
N20	<i>R. sphaeroides</i> ribosomal RNA operon rrnC	99	1249	0.0
	<i>R. sphaeroides</i> ribosomal RNA operon rrnB	99	1249	0.0
	<i>R. sphaeroides</i> ribosomal RNA operon rrnA	99	1249	0.0
	<i>R. sphaeroides</i> gene for 16S ribosomal RNA	99	1249	0.0
	<i>R. sphaeroides</i> 16S rRNA gene	99	1249	0.0
U7	<i>R. sphaeroides</i> ribosomal RNA operon rrnC	99	1156	0.0
	<i>R. sphaeroides</i> ribosomal RNA operon rrnB	99	1156	0.0
	<i>R. sphaeroides</i> ribosomal RNA operon rrnA	99	1156	0.0
	<i>R. sphaeroides</i> gene for 16S ribosomal RNA	99	1156	0.0
	<i>R. sphaeroides</i> 16S rRNA gene	99	1156	0.0

Score เป็นค่าแสดงความใกล้เคียงของ sequence ที่สนใจเปรียบเทียบกับ sequence ใน database ค่ายิ่งสูงแสดงว่ามีความใกล้เคียง, **E value** เป็นค่าพารามิเตอร์ซึ่งใช้อธิบายถึงค่า score ที่เกิดขึ้นมีนัยสำคัญระหว่าง sequence ที่สนใจ กับ sequence ใน database ค่ายิ่งน้อยจะมีนัยสำคัญมากกว่าและมีความใกล้เคียงมาก

Score is value derived from the raw sequence with database and high score that exists for matches between sequences. **E value** is parameter that describes the number of score can expect when searching a database of particular sequence. It decreases exponentially with the score that is assigned to a match between two sequences.

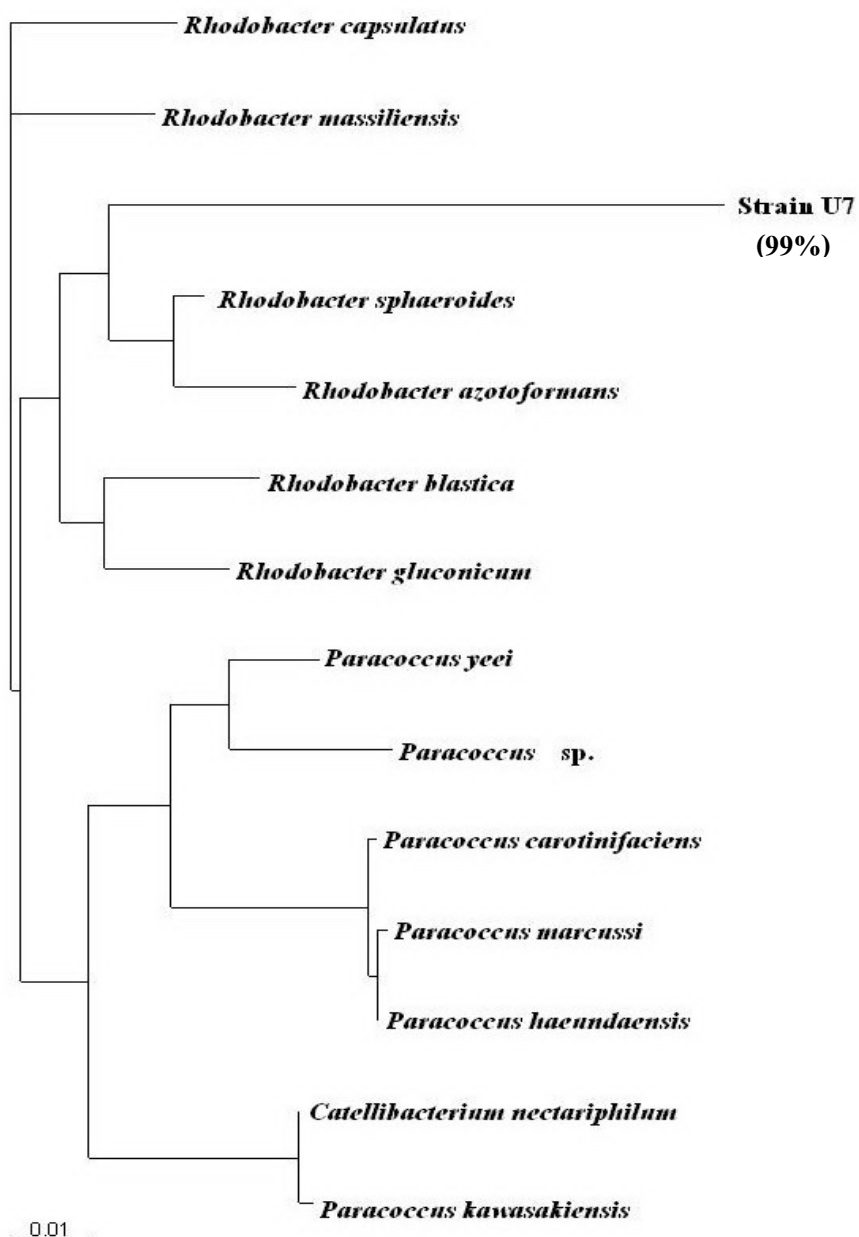
(b)



ภาพที่ 11 (ต่อ)

Figure 11. (continued)

(c)



ภาพที่ 11

(ต่อ)

Figure 11.

(continued)

3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติในการผลิตโพลีเมอร์

3.2.1 การผลิตพอลิเมอร์ภายในเซลล์

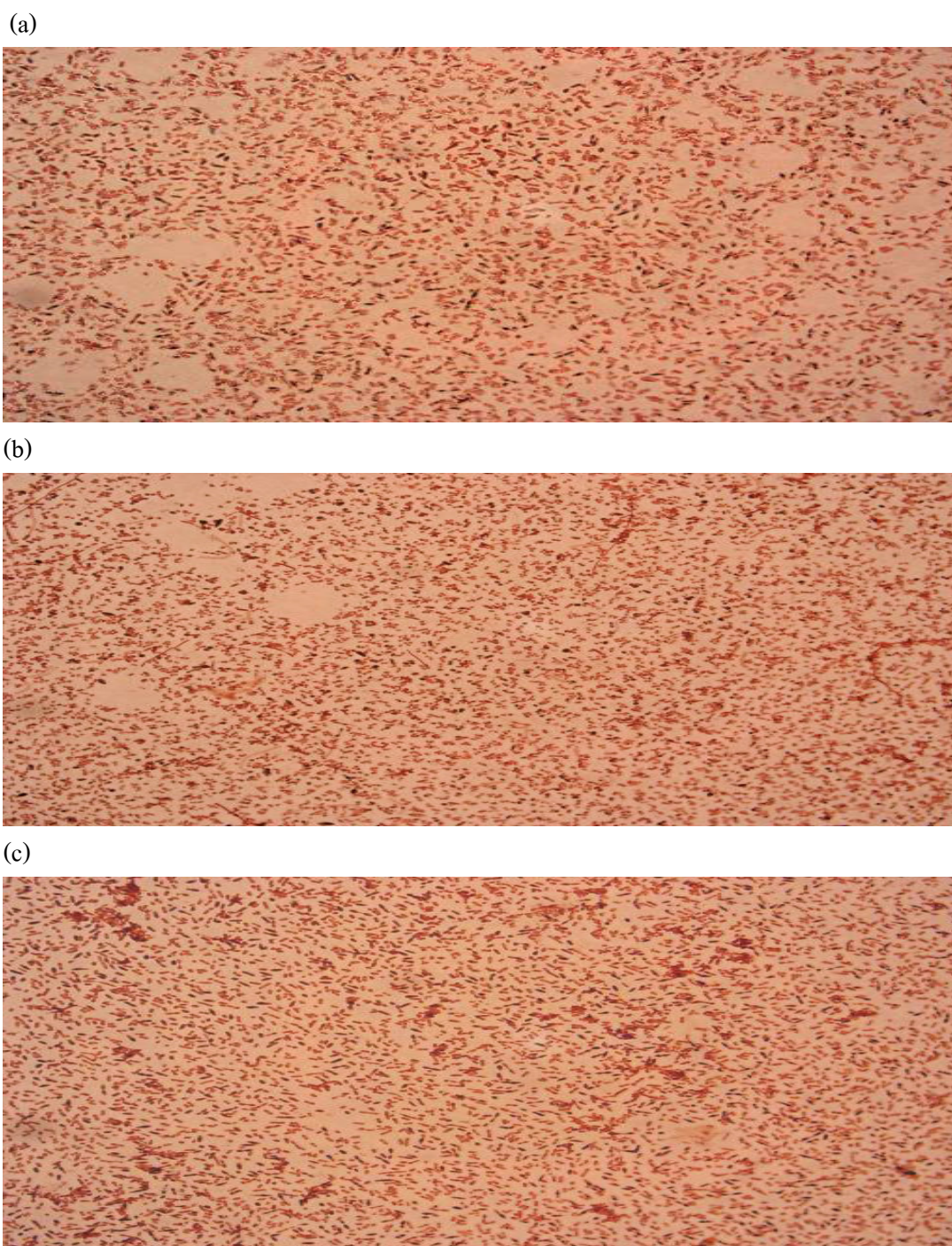
3.2.1.1 การย้อมเซลล์ด้วยสี Sudan black และการทำ Thin-section electron microscopy

นำเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ ES16, N20 และ U7 มาย้อมด้วยสี Sudan black **ภาคผนวก ข** เพื่อพิจารณาสารพอลิเมอร์ภายในเซลล์ในกลุ่มของ lipophilic material นั้นพบว่าสามารถย้อมติดสี Sudan black (**ภาพที่ 12**) ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงผลิตพอลิเมอร์กลุ่ม Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) (Kango and Patel, 2003) ซึ่งสังเกตุได้จากสีของเซลล์ที่ปรากฏสีฟ้าถึงดำ ทั้งสามสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิต PHB แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ ES16 มีความสามารถในการผลิต PHB ได้น้อยกว่าสายพันธุ์กลาย และสายพันธุ์กลายทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตสารพอลิเมอร์ได้ดีใกล้เคียงกันซึ่งพิจารณาจากปริมาณเซลล์ที่ติดสีของ Sudan black

สำหรับการทำ Thin-section electron microscopy (TEM) เพื่อให้เห็นลักษณะเซลล์และการผลิตพอลิเมอร์ภายในเซลล์ โดยมองเห็นเป็นลักษณะของแกรนูลสีขาว (**ภาพที่ 13**) ปริมาณของแกรนูลจะมากหรือน้อยขึ้นกับความสามารถในการผลิตของแบคทีเรียแต่ละชนิด

3.2.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์กลาย

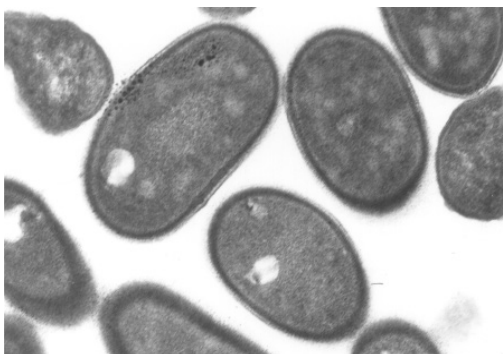
จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* สายพันธุ์กลาย 2 สายพันธุ์ N20 และ U7 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ES16 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตามัท-อะซิเตท (GA medium) เพื่อพิจารณาการเจริญและความสามารถในการผลิต PHA พบว่าทั้งสามสายพันธุ์เจริญได้ดีในอาหารสูตรดังกล่าว (**ภาพที่ 14**) ซึ่งพบว่า *R. sphaeroides* U7 และ N20 มีแนวโน้มการเจริญเข้าสู่ stationary phase ในชั่วโมงที่ 36 ในขณะที่ *R. sphaeroides* ES16 พบได้ในชั่วโมงที่ 48 ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.35, 3.7 และ 2.8 กรัมต่อลิตรจาก *Rhodobacter sphaeroides* N20, U7 และ ES16 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์กลายสามารถปรับตัวในอาหารได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งมาสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ พอลิเมอร์ชนิด PHA ภายในเซลล์ด้วยวิธี gravimetric method พบว่าการผลิตหรือการสังเคราะห์พอลิเมอร์ในกลุ่มดังกล่าวจะสอดคล้องหรือสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญ ปริมาณ PHA ที่เกิดขึ้นมีแนวโน้มคงที่เมื่อการเจริญเข้าสู่ stationary phase ปริมาณของ PHA อาจมีปริมาณลดลงเนื่องจากถูกนำกลับมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน หรือแหล่งคาร์บอนสำหรับเซลล์ต่อไป โดยปริมาณ PHA จาก *R. sphaeroides* U7 และ N20 ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.26 และ 2.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และมีแนวโน้มสูงกว่าที่ *R. sphaeroides* ES16 (1.8 กรัมต่อลิตร) หลังจาก 60 ชั่วโมง จึงพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์กลายในการศึกษาการผลิตโพลีเมอร์ต่อไป



ภาพที่ 12 ลักษณะเซลล์ที่ติดสี Sudan black จากการผลิตสารกลุ่มโพลีเอสเทอร์ (a) สายพันธุ์ ES16 (b) สายพันธุ์ U7 (c) สายพันธุ์ N20

Figure 12. Biopolyester material in photosynthetic bacterial cell stained by Sudan black (a) strain ES16 (b) strain N20 (c) strain U7.

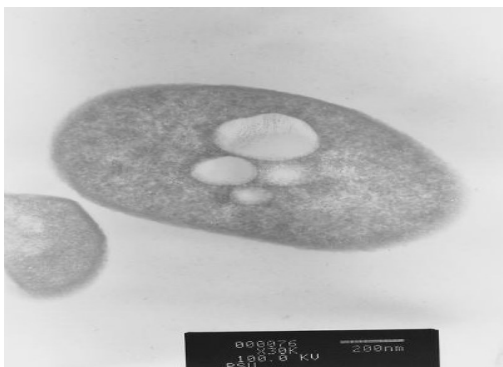
(a)



(b)

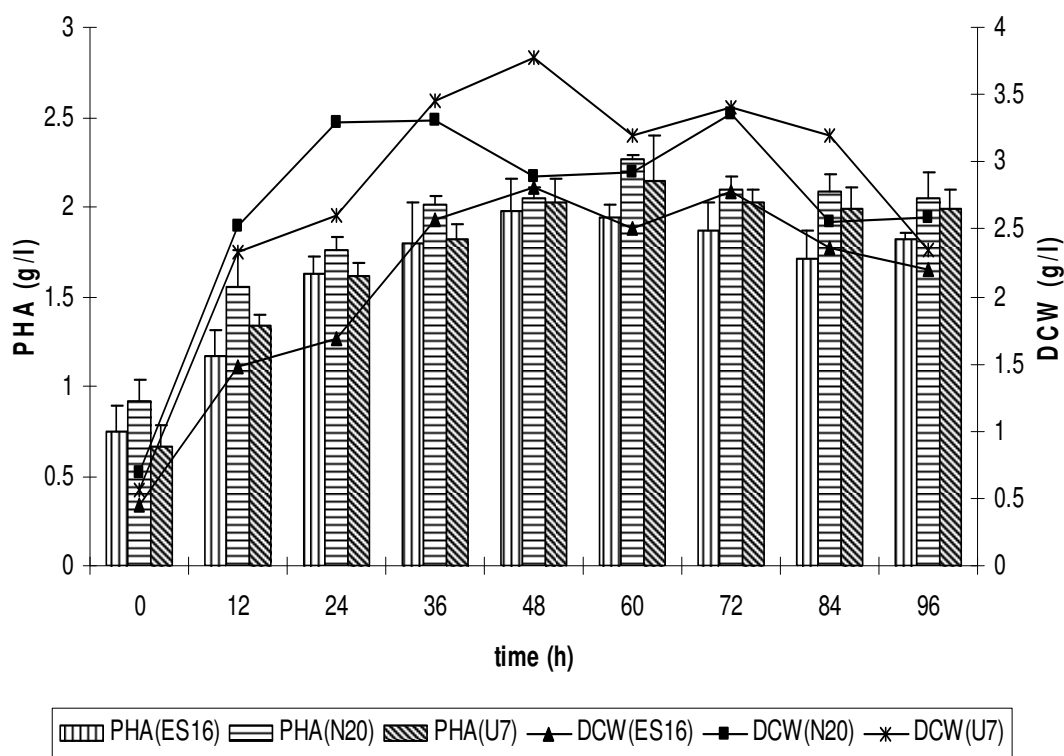


(c)



ภาพที่ 13 ภาพถ่ายอิเล็กตรอนแบบตัดขวางของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสำหรับพิจารณา PHA granule ภายในเซลล์ (a) สายพันธุ์ ES16 (b) สายพันธุ์ N20 (c) สายพันธุ์ U7

Figure 13. Transmission electron micrograph of the halotolerant photosynthetic bacterial mutant (a) strain ES16 (b) strain N20 (c) strain (U7) indicated PHA as the inclusion body.



ภาพที่ 14 การเจริญและปริมาณ PHA จากการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* ES16, N20 และ U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตามัท-อะซิเตท (GA medium) ในสภาวะให้อากาศ-ไร้แสง (200 รอบต่อนาที) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

Figure 14. Time course of growth and PHA production from *Rhodobacter sphaeroides* ES16, N20 and U7 cultivated in glutamate-acetate medium under aerobic-dark (200 rpm) at 37°C.

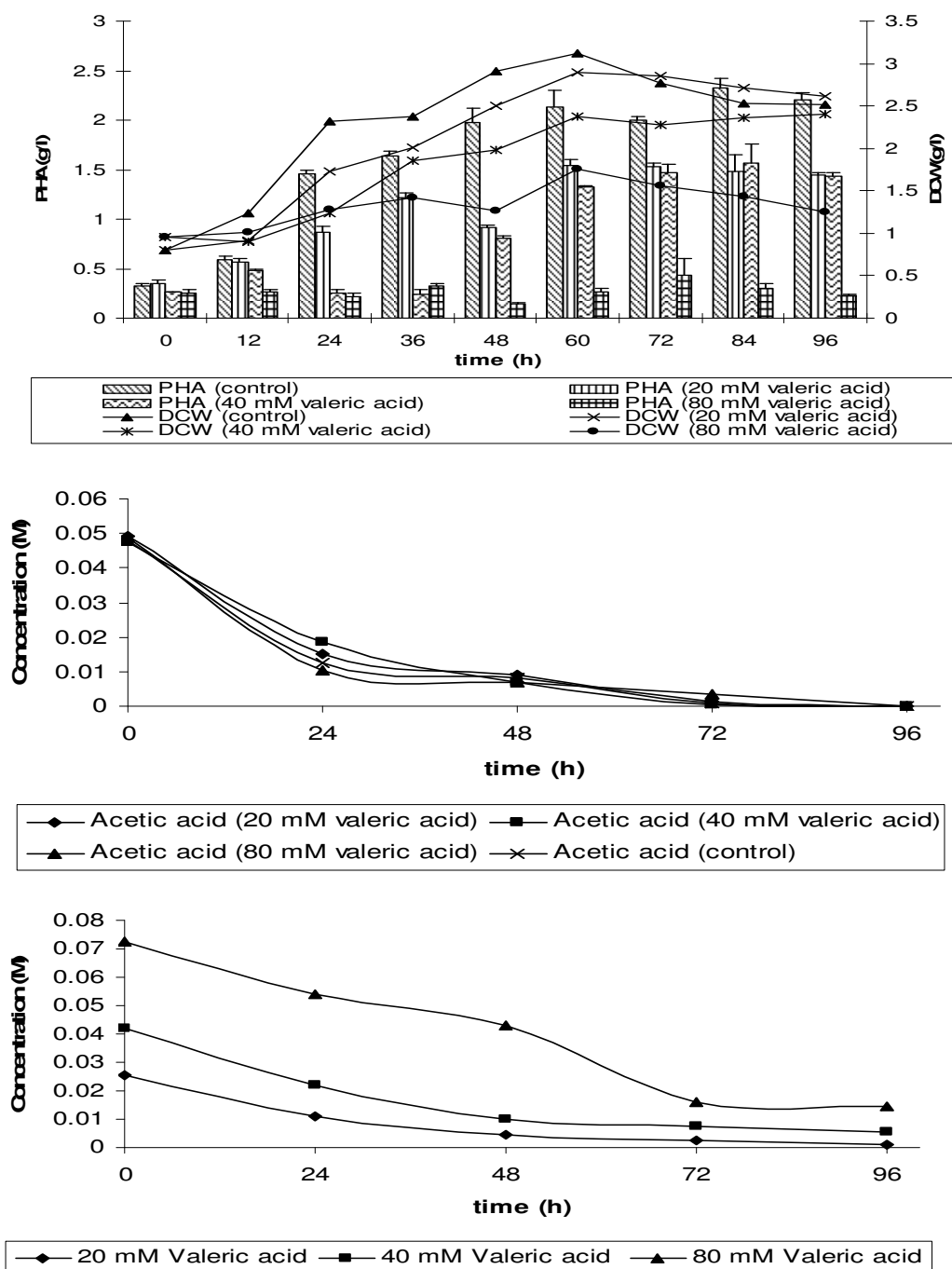
3.2.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร่วม

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* N20 และ U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ glutamate-acetate medium (GA) ซึ่งมีอะซิเตทความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน (Sangkharak *et al.*, 2005) และเติมแหล่งคาร์บอนร่วม คือ กรดวาลेरริก หรือกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะให้อากาศ-ไร้แสง โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

3.2.2.1 ผลของความเข้มข้นกรดวาลेरริก

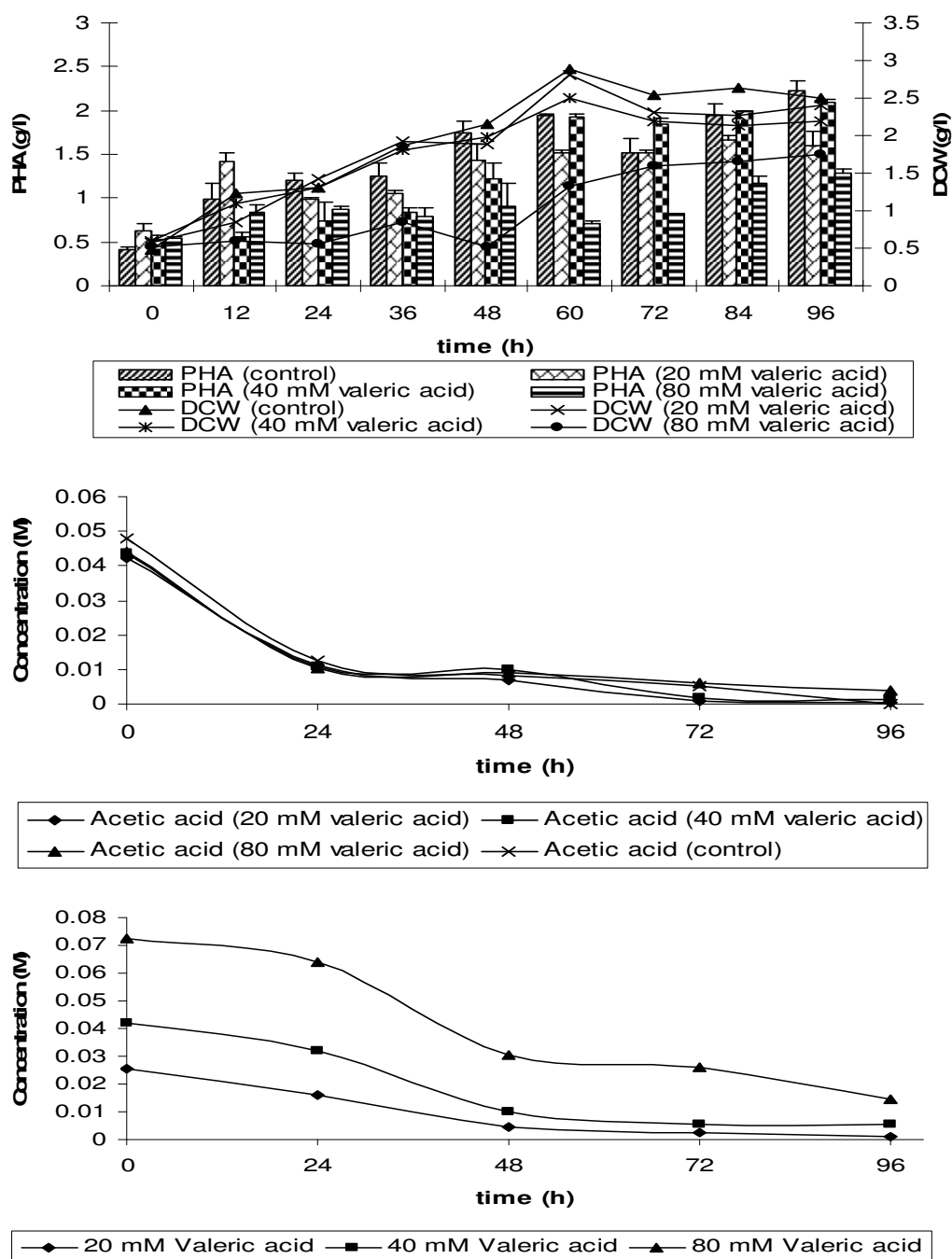
1. ผลการเจริญของ *Rhodobacter sphaeroides* N20 และ U7 ในอาหาร glutamate-acetate medium ที่เติมกรดวาลेरริกความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ แสดงใน **ภาพที่ 15 และภาพที่ 16 ตามลำดับ** พบว่าการเจริญที่วัดทั้งค่าความขุ่นกับปริมาณเซลล์แห้งให้ผลการเจริญในทิศทางเดียวกัน และการเจริญในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมกรดวาลेरริก (ชุดควบคุม) เชื้อมีเจริญได้ดีกว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาลेरริก โดยพบว่าช่วงที่เชื้อเจริญสูงสุดและระยะการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ใช้เวลาประมาณ 60 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ **3.0 และ 2.7 กรัมต่อลิตร** ตามลำดับส่วนการเติมกรดวาลेरริกความเข้มข้น 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ การเจริญจะน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัดมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.8, 2.4 และ 1.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับหลังการเลี้ยงเชื้อ 60 ชั่วโมง สำหรับเชื้อสายพันธุ์ N20 และมีค่าเท่ากับ 2.0, 2.5 และ 1.7 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อสายพันธุ์ U7

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารพบว่าการเจริญช่วงแรก (ตั้งแต่ 0-48 ชั่วโมง) มีการใช้ทั้งอะซิเตทและกรดวาลेरริกซึ่งความเข้มข้นลดลงอย่างเห็นได้ชัด อันเป็นผลมาจากอะซิเตทและกรดวาลेरริกเป็นกรดไขมันสายสั้นหรือเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมีจำนวนคาร์บอนเพียง 2 และ 5 อะตอม การนำอะซิเตทเข้าสู่เซลล์จึงง่าย โดยอาศัยกลไกการแพร่ผ่านของสารด้วยวิธีการ facilitated diffusion ซึ่งเป็นกระบวนการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารโดยอาศัยสารโปรตีนตัวกลางที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และไม่จำเป็นต้องอาศัยพลังงานจากกระบวนการเมตาบอลิซึม อาศัยเพียงพลังศักย์ของความเข้มข้นที่แตกต่างของสาร ซึ่งสารจะแพร่ผ่านด้วยความเข้มข้นที่เป็นลำดับ (concentration gradient) จากสิ่งแวดล้อม หรือในกรณีนี้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์ หรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นการเคลื่อนที่ของสารแบบกลับทิศทาง (opposite direction) สำหรับกรดวาลेरริกมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกันแต่ลดลงอย่างช้าๆ เนื่องจากกรดวาลेरริกมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่าอะซิเตท ในขณะที่การใช้สารอาหารกลุ่มกรดไขมันจำเป็นต้องอาศัยการเกิด β -oxidation (Wofford *et al.*, 1986) รวมถึงจำเป็นต้องเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางในหลายขั้นตอนทำให้แบคทีเรียพยายามใช้สารอาหารที่ใช้ได้ง่ายก่อน



ภาพที่ 15 ผลของกรดวาเลอริกที่เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และการผลิต PHA ในระหว่างการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* N20 ในอาหารกลูตาเมต-อะซิเตทภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงที่ 37°C

Figure 15. Effect of co-substrate valeric acid concentration on growth (DCW), substrate consumption and production of PHA from *Rhodobacter sphaeroides* N20 cultivated in glutamate-acetate medium under aerobic-dark condition at 37°C.



ภาพที่ 16 ผลของกรดวาเลอริกที่เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมต่อน้ำหนักมวลเซลล์ และการผลิต PHA ในระหว่างการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารกลูตามาต-อะซิเตท ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงที่ 37°C

Figure 16. Effect of co-substrate valeric acid concentration on growth (DCW), substrate consumption and production of PHA from *Rhodobacter sphaeroides* U7 cultivated in glutamate-acetate medium under aerobic-dark condition at 37°C.

เมื่อพิจารณาค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงตลอดการเลี้ยงเชื้อพบว่า ชุดการทดลองควบคุมและที่เติมกรดวาลेरริก 20 และ 40 มิลลิโมลาร์ จะมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชโดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 7 เป็น 8.5 เมื่อมีการเลี้ยงเชื่อนานขึ้น โดยเป็นผลมาจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงและผลิตเมตาบอไลต์บางชนิดซึ่งเมื่อเกิดการละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลให้สัดส่วนของปริมาณไฮโดรเนียม (H_3O^+) ต่อไฮดรอกไซด์ (OH^-) ลดลงจึงมีผลให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้น (Luli and Strohl, 1990) ในขณะที่การเติมกรดวาลेरริก 80 มิลลิโมลาร์ การเปลี่ยนแปลงของพีเอชมีน้อยมากหรือเกือบไม่มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากเชื้อเจริญได้น้อย

เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งมาสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณพอลิเมอร์ชนิด PHB ภายในเซลล์ด้วยวิธี gravimetric method พบว่าการผลิตหรือการสังเคราะห์พอลิเมอร์ในกลุ่มดังกล่าวจะสอดคล้องหรือสัมพันธ์กันโดยตรงกับการเจริญ โดยเชื้อจะเจริญไปพร้อมๆกับการสังเคราะห์ PHB อันเป็นผลมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ GA ที่ใช้ได้มีการปรับอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนให้เหมาะสมต่อการผลิต PHB โดยกำหนดให้อัตราส่วนของคาร์บอนมากกว่าไนโตรเจนประมาณ 8 (Sangkharak et al., 2005) สำหรับ *R.sphaeroides* N20 เชื้อมีการผลิต PHB ในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมกรดวาลेरริกได้สูงกว่าในชุดการทดลองอื่นๆ โดยผลิตได้สูงสุดประมาณ 2.2 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 60 การผลิตลดลงตามการเจริญ อันเป็นผลมาจากการย่อยสลาย PHB ภายในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งพลังงานเนื่องจากปริมาณสารอาหารต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อลดน้อยลง (Quillaguaman et al., 2005) ปริมาณ PHB ในชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาลेरริก 20 และ 40 มิลลิโมลาร์ มีค่าประมาณ 1.5 และ 1.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับการเติมกรดวาลेरริก 80 มิลลิโมลาร์ เชื้อไม่สามารถเจริญได้แต่วิเคราะห์ปริมาณ PHB ได้ประมาณ 0.3 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณพอลิเมอร์ที่ได้จากหัวเชื้อที่เติมไปในตอนเริ่มต้น สำหรับสายพันธุ์กลาย U7 ในชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาลेरริก 40 มิลลิโมลาร์ มีการผลิต PHB ได้สูงกว่าในชุดการทดลองอื่นๆ โดยผลิตได้สูงสุดในช่วงเวลาที่ 60 ประมาณ 2.0 กรัมต่อลิตร การผลิตที่คงที่ตามการเจริญที่คงที่ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมกรดวาลेरริกสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดในช่วงเวลาที่ 60 ประมาณ 2.0 กรัมต่อลิตร แต่ในชุดการทดลองที่เติมกรดวาลेरริก 20 มิลลิโมลาร์ พบว่าการผลิต PHB มีการผลิตควบคู่กับการเจริญแต่ปริมาณที่ผลิตได้มีค่าน้อยกว่าชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาลेरริก 40 มิลลิโมลาร์ สำหรับในบางช่วงเวลาของการเจริญของแต่ละชุดการทดลองอาจจะมีการผลิตที่ลดลง อันเป็นผลมาจากการสลาย PHB ซึ่งเป็นการดึงพลังงานสำรองภายในเซลล์ออกมาใช้เพื่อคงความมีชีวิตและการผลิตค่อยๆ มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ขณะที่การเติมกรดวาลेरริก 80 มิลลิโมลาร์ จะสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดในช่วงเวลาที่ 96 อันเป็นผลมาจากความสามารถในการเจริญได้น้อยมาก กล่าวคือเชื้อมีระยะการพักตัว หรือระยะ lag phase ค่อนข้างนานจึงทำให้การเจริญ

เกิดขึ้นได้ช้า และเนื่องด้วยการผลิต PHB ของ *Rhodobacter sphaeroides* เป็นแบบควบคู่พร้อมกับการเจริญทำให้การวิเคราะห์ปริมาณ PHB ที่ได้จึงน้อย สำหรับความสัมพันธ์ระหว่าง PHA กับแหล่งคาร์บอนร่วมในรูป Yp/s แสดงดัง**ตารางที่ 7** จากการนำตัวอย่างเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในอาหารที่เติมกรดวเลอริกความเข้มข้นต่างๆมาวิเคราะห์หาโคพอลิเมอร์ชนิด PHBV โดยพิจารณาการเกิด methylester ชนิด methyl hydroxybutyrate กับ methyl hydroxyvalerate จากโครมาโตแกรมที่เกิดขึ้นหลังจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์นั้นจะใช้ lyophilized cell ของทั้งแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ N20 และ U7 ในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 60 ซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวเป็นเวลาที่ปริมาณของพอลิเมอร์ชนิด PHA เกิดขึ้นในปริมาณมากจึงเลือกมาวิเคราะห์ต่อ สำหรับการพิจารณาชนิดของโคพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้น จากการทำการวิเคราะห์ พบว่าทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญและผลิต PHA ได้เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนร่วมกัน 2 ชนิด คือ อะซิเตท และกรดวเลอริก เมื่อพิจารณาสายพันธุ์ N20 พบว่าความเข้มข้นของกรดวเลอริก 40 mM ให้ปริมาณ PHA content สูงสุด เท่ากับ 64.23 % แต่น้อยกว่าชุดควบคุม ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 72.37 % โดยพบว่ามีปริมาณของ hydroxybutyrate (HB) และ hydroxyvalerate (HV) คิดเป็นสัดส่วนในรูป mol % เท่ากับ 17.16 และ 82.84 ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ U7 สามารถเจริญและผลิตโคพอลิเมอร์ได้เมื่อมีการเติมกรดวเลอริก 40 mM โดยพบว่ามีปริมาณของ HB และ HV คิดเป็นสัดส่วนในรูป mol % เท่ากับ 15.23 และ 84.77 ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ PHA ภายในเซลล์ของ *R. sphaeroides* N20 หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ในอาหารที่มีการเติมกรดวเลอริก 0, 20, 40 และ 80 mM ตามลำดับ พบว่ามีค่า PHA content เท่ากับ 72.37, 53.8, 64.23 และ 28.05% ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ปริมาณของ hydroxybutyrate (HB) และ hydroxyvalerate (HV) คิดเป็นสัดส่วนในรูป mol % พบว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกรดวเลอริกไม่พบ HV จึงมี HB mol % เป็น 100 ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวเลอริก 20 40 และ 80 mM พบ HB เท่ากับ 20.69, 17.16 และ 30.06% ขณะที่พบ HV เท่ากับ 79.31, 82.84 และ 69.94% ตามลำดับ สำหรับ *R. sphaeroides* U7 พบว่ามีค่า PHA content เท่ากับ 67.36, 54.04, 77.42 และ 53.38% ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดวเลอริก 0, 20, 40 และ 80 mM ตามลำดับ โดยพบ HB เท่ากับ 100, 20.51, 15.23 และ 22.83% ขณะที่พบ HV เท่ากับ 0, 79.49, 84.77 และ 77.17% จากการเติมกรดวเลอริก 0, 20, 40 และ 80 mM ตามลำดับ สำหรับปริมาณเซลล์ และพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ทำการวิเคราะห์แสดงดัง**ตารางที่ 9**

ตารางที่ 7 ค่าความเข้มข้นและผลผลิตของพอลิเมอร์เมื่อใช้อะซิเตทร่วมกับกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมหลังการเลี้ยงเชื้อ *R. sphaeroides* N20 และ U7 ที่เวลา 60 ชั่วโมง

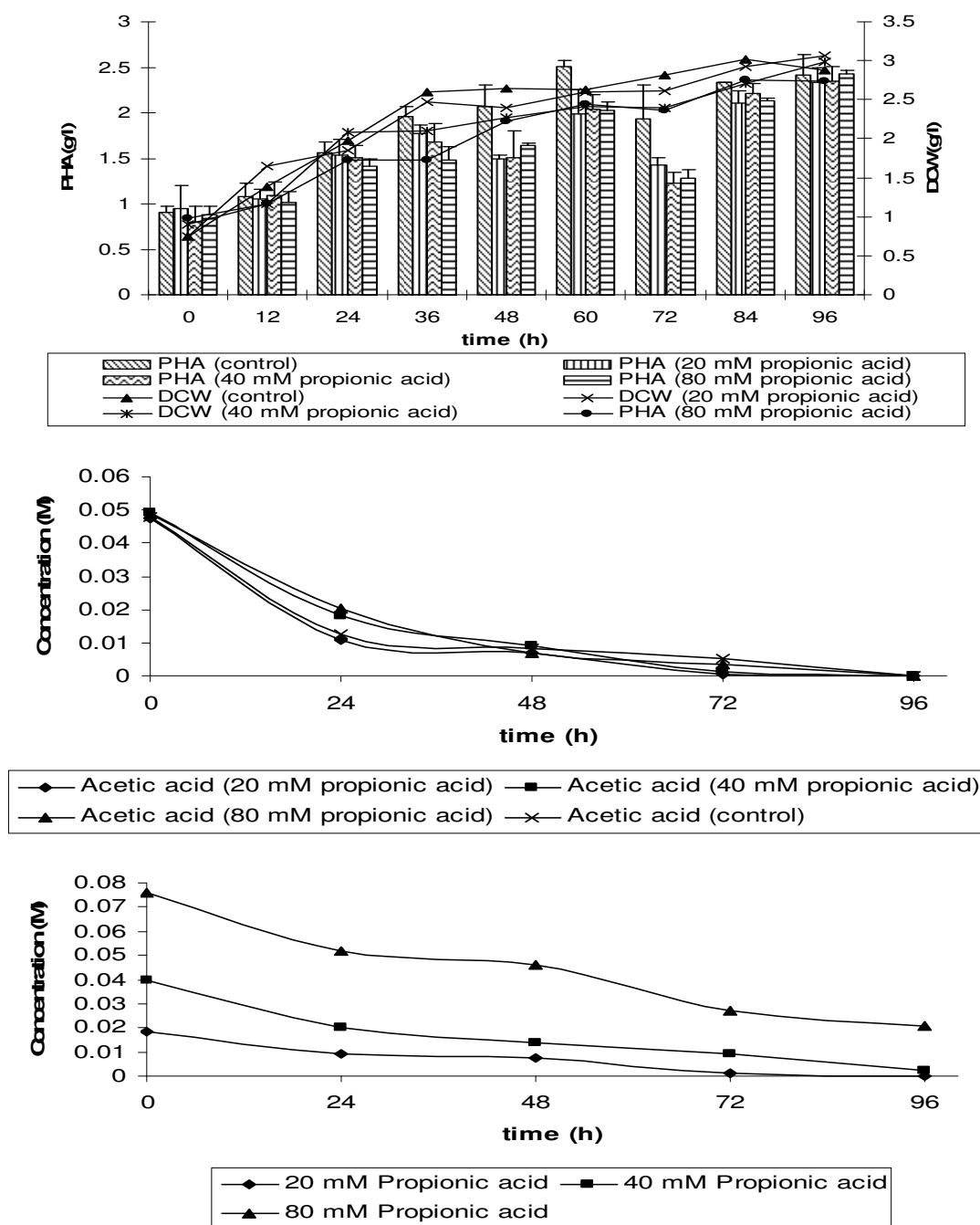
Table 7. Concentration and yield of polymer from using acetate with valeric acids as co-substrate after 60 h cultivation of *R. sphaeroides* N20 and U7.

Mutant	Culture medium	Volatile fatty acid		PHA concentration (g/l)	Yp/x	Yp/s Acetic acid	Yp/s Valeric acid
		concentration					
		(g/l)					
		Acetic acid	Valeric acid				
N20	40 mM acetate	2.68	-	2.0	0.64	0.75	-
	40 mM acetate + 20 mM valeric acid	2.68	1.53	1.546	0.53	0.58	1.0
	40 mM acetate + 40 mM valeric acid	2.68	3.06	1.326	0.56	0.49	0.43
	40 mM acetate + 80 mM valeric acid	2.68	5.11	0.263	0.15	0.098	0.05
U7	40 mM acetate	2.68	-	1.94	0.67	0.94	-
	40 mM acetate + 20 mM valeric acid	2.92	1.53	1.513	0.54	0.52	0.98
	40 mM acetate + 40 mM valeric acid	2.8	3.06	1.93	0.77	0.68	0.63
	40 mM acetate + 80 mM valeric acid	2.68	5.11	0.71	0.53	0.26	0.14

3.2.2.2 ผลของกรดโพรฟิโอนิกที่ความเข้มข้นต่างๆ

1. ผลการเจริญของ *Rhodobacter sphaeroides* N20 ในอาหาร glutamate-acetate medium ที่เติมกรดโพรฟิโอนิกความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 17) การเจริญที่วัดทั้งค่าความขุ่นกับปริมาณเซลล์แห้งให้ผลของการเจริญไปในทิศทางเดียวกัน และการเจริญในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมกรดโพรฟิโอนิก (ชุดควบคุม) เชื้อเจริญได้ดีกว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมกรดโพรฟิโอนิก 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่มีการเจริญใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่มีการเติมกรดโพรฟิโอนิก 20 มิลลิโมลาร์ ช่วงที่เชื้อเจริญสูงสุดและระยะการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ใช้เวลาประมาณ 36 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์แห้ง (Dry cell weight) พบว่ามีปริมาณเซลล์เริ่มคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 2.5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ทุกชุดการทดลองที่มีการเติมกรดโพรฟิโอนิก การเจริญจะน้อยกว่าชุดควบคุม เนื่องจากเชื้อจะมีระยะการเจริญในช่วงของ lag phase นานกว่าโดยในชุดการทดลองที่มีการเติมกรดโพรฟิโอนิก ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ มีน้ำหนักเซลล์ประมาณ 2.6 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณเซลล์สูงสุดประมาณ 2.8 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ในทำนองเดียวกันกับชุดการทดลองที่มีการเติมกรดโพรฟิโอนิก 40 มิลลิโมลาร์ การเจริญของเชื้อน้อยกว่าชุดการทดลอง 2 ชุดแรกอย่างมีนัยสำคัญมีน้ำหนักเซลล์สูงสุดประมาณ 2.3 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 การทดลองการเติมกรดโพรฟิโอนิก 80 มิลลิโมลาร์ เชื้อสามารถเจริญได้ดีเช่นกันแต่น้อยกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase รวมถึงน้ำหนักเซลล์ที่ได้ตลอดการทดลองมีแนวโน้มเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมีค่าประมาณ 2.4 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารพบว่าการเจริญช่วงแรก (ตั้งแต่ 0-48 ชั่วโมง) มีการใช้ทั้งอะซิเตทและกรดโพรฟิโอนิกซึ่งความเข้มข้นมีแนวโน้มลดลง อันเป็นผลมาจากอะซิเตทและกรดโพรฟิโอนิกเป็นกรดไขมันสายสั้นหรือเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมีจำนวนคาร์บอนเพียง 2 และ 3 อะตอม การนำอะซิเตทเข้าสู่เซลล์จึงง่าย โดยอาศัยกลไกการแพร่ผ่านของสารด้วยวิธีการ facilitated diffusion สำหรับกรดโพรฟิโอนิกมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกันแต่ลดลงอย่างช้าๆ ถึงแม้กรดโพรฟิโอนิกจะมีขนาดโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับอะซิเตท แต่เนื่องด้วยสารอาหารกลุ่มกรดไขมันจำเป็นต้องอาศัยการเกิด β -oxidation (Wofford *et al.*, 1986) รวมถึงจำเป็นต้องเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางในหลายขั้นตอน ดังนั้นแบคทีเรียจึงพยายามใช้สารอาหารที่ใช้ได้ง่ายก่อน



ภาพที่ 17 ผลของกรดโพรพิโอนิกที่เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมต่อน้ำหนักมวลเซลล์และการผลิต PHA ในระหว่างการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* N20 ในอาหารกลูตามาเทอะซีเตภายใต้สภาวะมืด-ไร้อากาศที่ 37°C

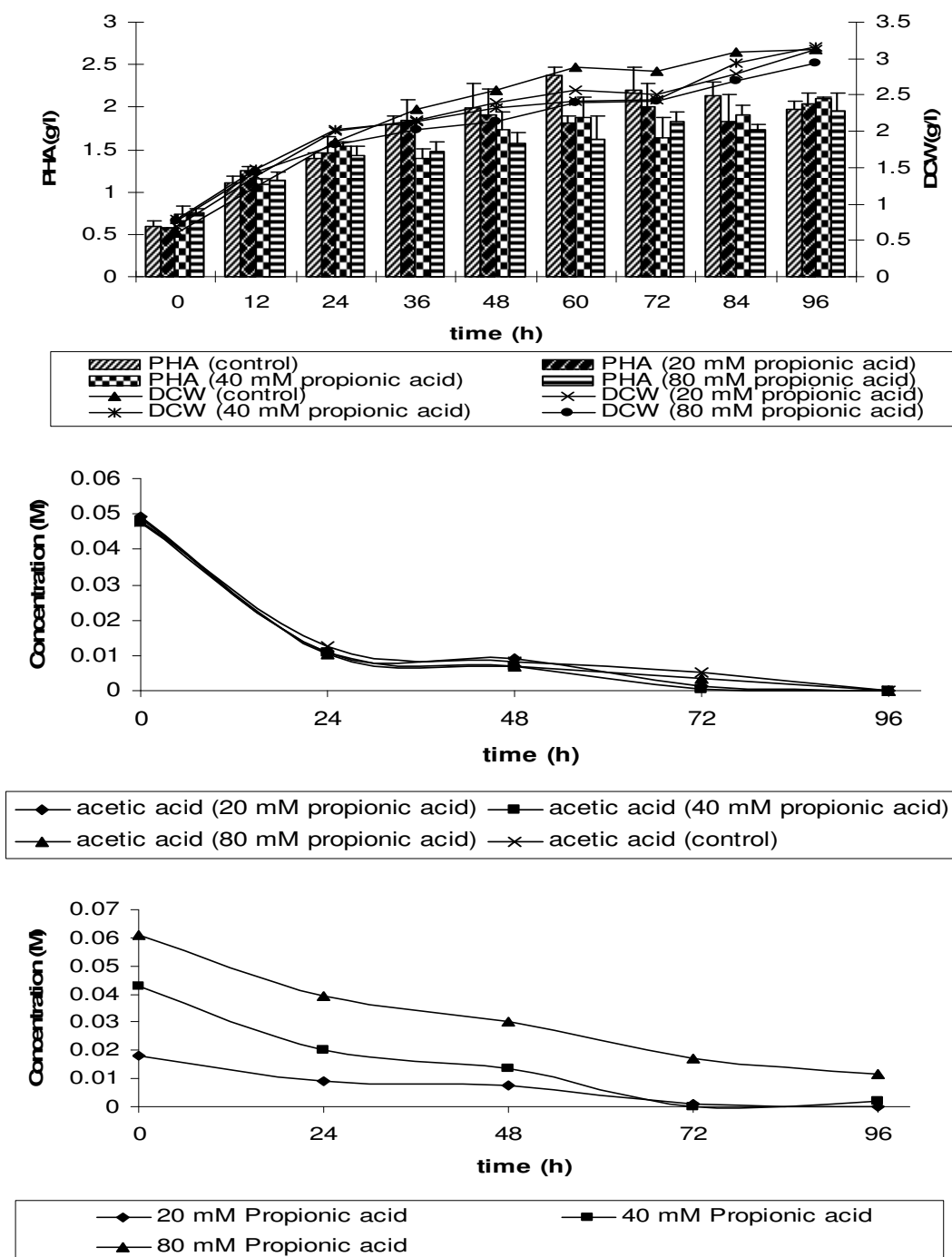
Figure 17. Effect of co-substrate propionic acid concentration on growth (DCW), substrate consumption and production of PHA from *Rhodobacter sphaeroides* N20 cultivated in glutamate-acetate medium under aerobic-dark condition at 37°C.

เมื่อพิจารณาค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงตลอดการเลี้ยงเชื้อพบว่าชุดควบคุมและที่เติมกรดโพธิฟิโอนิกทุกความเข้มข้น พบว่าค่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากค่าเริ่มต้น 7 เป็น 8 เมื่อมีการเลี้ยงเชื้อ โดยให้ค่าพีเอชไม่แตกต่างกันโดยสามารถเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ อันอาจเป็นผลมาจากเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมีการเจริญและผลิตเมตาบอไลต์บางชนิดซึ่งเมื่อเกิดการละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลให้สัดส่วนของปริมาณไฮโดรเนียม (H_3O^+) ต่อไฮดรอกไซด์ (OH^-) ลดลงจึงมีผลให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้น (Luli and Strohl, 1990)

เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งมาทำการสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณพอลิเมอร์ชนิด PHB ภายในเซลล์ด้วยวิธี gravimetric method พบว่าการผลิตหรือการสังเคราะห์พอลิเมอร์ในกลุ่มดังกล่าวสอดคล้องหรือสัมพันธ์กับการเจริญ โดยเชื้อเจริญพร้อมกับการสังเคราะห์ PHB และขณะเดียวกันก็เกิดการย่อยสลายเมื่อเซลล์จำเป็นต้องการใช้ทั้งในแง่ของการใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรอง หรือย่อยสลายเพื่อนำหน่วยย่อยมาเปลี่ยนกลับให้เป็น Acetyl-CoA ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิต 12 เมตาบอไลต์ของวัฏจักรเครปส์เพื่อให้เซลล์ยังคงดำเนินกิจกรรมต่างๆ รวมถึงกระบวนการเมตาบอลิซึมสามารถดำเนินอย่างเป็นปกติ (Lehninger and Nelson, 2005) อันเป็นผลมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสูตรอาหารที่มีการปรับอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนให้มีค่าสูงซึ่งเหมาะสมต่อการผลิต PHB (Luengo et al., 2003) *Rhodobacter sphaeroides* N20 เจริญได้ดีในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมกรดโพธิฟิโอนิกแสดงให้เห็นถึงผลของอาหารเลี้ยงเชื้อของชุดการทดลองดังกล่าวมีผลต่อการเจริญโดยตรง สำหรับชุดควบคุมเชื้อสามารถผลิต PHB ได้สูงสุด 2.4 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 แต่เมื่อพิจารณาชุดการทดลองที่มีการเติมกรดโพธิฟิโอนิก 20 และ 40 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการผลิต PHB สูงสุดในช่วงเวลาเดียวกันคือ ชั่วโมงที่ 60 โดยผลิตได้ 1.7 และ 1.75 กรัมต่อลิตร ส่วนการใช้กรด โพธิฟิโอนิก 80 มิลลิโมลาร์ เชื้อผลิต PHB ได้ 2.3 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96

2. ผลการเจริญของ *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหาร glutamate-acetate medium (GA) ที่เติมกรดโพธิฟิโอนิกความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 18) กับน้ำหนักเซลล์แห้ง ให้ผลการเจริญในทิศทางเดียวกัน เชื้อมีการเจริญสูงสุดและใช้ระยะการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ประมาณ 60 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 2.5, 2.5-2.8, 2.4 และ 2.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารพบว่ามีการเจริญช่วงแรก (ตั้งแต่ 0-48 ชั่วโมง) มีการใช้ทั้งอะซิเตทและกรดโพธิฟิโอนิกซึ่งความเข้มข้นมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้เนื่องจากอะซิเตทและกรดโพธิฟิโอนิกเป็นกรดไขมันสายสั้นหรือเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมีจำนวนคาร์บอนเพียง 2 และ 3 อะตอม การนำอะซิเตทเข้าสู่เซลล์จึงง่าย โดยอาศัยกลไกการแพร่ผ่านของสารด้วยวิธีการ facilitated diffusion สำหรับกรดโพธิฟิโอนิกมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกันแต่ลดลงอย่างช้าๆ ถึงแม้



ภาพที่ 18 ผลของกรดโพรพิโอนิกที่เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมต่อน้ำหนักมวลเซลล์และการผลิต PHA ในระหว่างการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารกลูตามทอะซิเตท ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงที่ 37°C

Figure 18. Effect of co-substrate propionic acid concentration on growth (DCW), substrate consumption and production of PHA from *Rhodobacter sphaeroides* U7 cultivated in glutamate-acetate medium under aerobic-dark condition at 37°C.

กรดโพรพิโอนิกจะมีขนาดโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับอะซิเตท แต่เนื่องด้วยสารอาหารกลุ่มกรดไขมัน จำเป็นต้องอาศัยการเกิด β -oxidation (Wofford *et al.*, 1986) รวมถึงจำเป็นต้องเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางในหลายขั้นตอน ดังนั้นแบคทีเรียจึงพยายามใช้สารอาหารที่ใช้ได้ง่ายก่อน

เมื่อพิจารณาค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงตลอดการเลี้ยงเชื้อพบว่าชุดการทดลองควบคุม และที่เติมกรดโพรพิโอนิกทุกความเข้มข้น พบว่าค่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากค่าเริ่มต้น 7 เป็น 8 เมื่อมีการเลี้ยงเชื้อ โดยให้ค่าพีเอชไม่แตกต่างกันโดยสามารถเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ อันเป็นผลมาจากเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงมีการเจริญและผลิตเมตาบอไลต์บางชนิดซึ่งเมื่อเกิดการละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลให้สัดส่วนของปริมาณไฮโดรเนียมต่อไฮดรอกไซด์ลดลงจึงมีผลให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้น

เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งมาสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณพอลิเมอร์ชนิด PHB ภายในเซลล์ ด้วยวิธี gravimetric method พบว่าการผลิตหรือการสังเคราะห์พอลิเมอร์ในกลุ่มดังกล่าวสอดคล้องหรือสัมพันธ์กับการเจริญ โดยเชื้อเจริญพร้อมกับการสังเคราะห์ PHB และขณะเดียวกันก็เกิดการย่อยสลาย เมื่อเซลล์จำเป็นต้องการใช้ทั้งในแง่ของการใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองหรือย่อยสลายเพื่อนำหน่วยย่อยมาเปลี่ยนกลับให้เป็น Acetyl-CoA ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิต 12 เมตาบอไลต์ของวัฏจักรเครปส์เพื่อให้เซลล์ยังคงดำเนินกิจกรรมต่างๆ รวมถึงกระบวนการเมตาบอลิซึมสามารถดำเนินอย่างเป็นปกติอันเป็นผลมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ GA ที่ใช้ได้มีปรับอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนให้เหมาะสมต่อการผลิต PHB (Luengo *et al.*, 2003) การผลิต PHB มีค่าสูงสุดประมาณ 2.3, 1.8, 1.8 และ 1.63 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 60 จากการเติมกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ สำหรับการเติมกรดโพรพิโอนิก 80 มิลลิโมลาร์ มีการผลิตน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองอื่น เป็นผลมาจากช่วงเวลาดังกล่าวการเจริญอยู่ในระยะ stationary phase จึงมีการย่อย PHA ภายในเซลล์ เพื่อเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน สำหรับความสัมพันธ์ระหว่าง PHA กับแหล่งคาร์บอนรวมในรูป Yp/s แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ค่าความเข้มข้นและผลผลิตของพอลิเมอร์เมื่อใช้อะซิเตทร่วมกับกรดโพรพิโอนิก
เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมหลังการเลี้ยงเชื้อ *R. sphaeroides* N20 และ U7 ที่ 60 ชั่วโมง

Table 8. Concentration and yield of polymer from using acetate with propionic acids as
co-substrate after 60 h cultivation of *R. sphaeroides* N20 and U7.

Mutant	Culture medium	Volatile fatty acid		PHA concentration (g/l)	Yp/x	Yp/s Acetic acid	Yp/s Propionic acid
		concentration					
		(g/l)					
		Acetic acid	Propionic acid				
N20	40 mM acetate	2.8	-	1.93	0.68	0.69	-
	40 mM acetate + 20 mM propionic acid	2.86	1.11	1.42	0.55	0.5	1.28
	40 mM acetate + 40 mM propionic acid	2.68	1.48	1.23	0.51	0.46	0.83
	40 mM acetate + 80mM propionic acid	2.68	2.97	1.29	0.54	0.48	0.43
U7	40 mM acetate	2.68	-	2.37	0.82	0.88	
	40 mM acetate + 20 mM propionic acid	2.98	1.11	1.81	0.7	0.61	1.63
	40 mM acetate + 40 mM propionic acid	2.86	1.48	1.88	0.77	0.66	1.27
	40 mM acetate + 80 mM propionic acid	2.68	3.7	1.63	0.68	0.61	0.73

ภายใต้สภาวะที่ขาดความสมดุลของปริมาณคาร์บอนกับไนโตรเจน ซึ่งพิจารณาในรูปของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีค่าสูงและในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนมากกว่าหนึ่งชนิด พบว่าเป็นการส่งเสริมการผลิตโคพอลิเมอร์ภายในเซลล์ในรูปของไบโอพอลิเอสเทอร์ (มีการผลิตมอนอเมอร์มากกว่า 1 ชนิด) (Lenz and Marchessault, 2003) โดยแหล่งคาร์บอนภายนอกเซลล์มีผลโดยตรงต่อมอนอเมอร์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ทำให้เอนไซม์ PHA synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการเชื่อมต่อหน่วยย่อยหรือมอนอเมอร์ให้เกิดเป็นพอลิเมอร์ด้วยการเร่งการเกิดพันธะเอสเทอร์ระหว่างหน่วยย่อยที่เกิดขึ้น ถ้าแหล่งคาร์บอนดังกล่าวเป็นกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนในสาย หรือโครงสร้างเป็นเลขคี่จะมีผลให้เกิดพอลิเมอร์ชนิดโคพอลิเมอร์มากกว่าโฮโมพอลิเมอร์ (Kelly *et al.*, 2001) ดังนั้นการใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนมีผลให้เกิดการสังเคราะห์มอนอเมอร์ชนิด 3-hydroxyvalerate (3HV) และเมื่อใช้กรดวาเลอริกพร้อมกับอะซิเตตซึ่งพบว่าการใช้อะซิเตตมีผลในการสังเคราะห์มอนอเมอร์ชนิด 3-hydroxybutyrate (3HB) เมื่อเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันด้วยเอนไซม์ PHA synthase ทำให้เกิดโคพอลิเมอร์ชนิด polyhydroxybutyrate-co-valerate; PHBV เกิดขึ้น สำหรับการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนตั้งต้นในการผลิต hydroxyvalerate จากกรดวาเลอริกนั้นมีการเปลี่ยนแปลงดังนี้ จากกรดวาเลอริกถูกเปลี่ยนเป็น Valeryl-CoA จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น L(+)-3-hydroxyvaleryl-CoA และ 3-ketovaleryl-CoA ตามลำดับ จากนั้น 3-ketovaleryl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น D(+)-3-hydroxyvaleryl-CoA ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารตัวกลางสำคัญในการที่จะเปลี่ยนแปลงเป็น 3-hydroxyvalerate หรือ 3HV unit (Eschenlauer *et al.*, 1996)

ในทำนองเดียวกันเมื่อมีการใช้แหล่งคาร์บอนในกลุ่มของกรดไขมันระเหยง่ายนอกเหนือจากกรดวาเลอริก เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์หน่วยย่อยต่างๆในวิธีการผลิตโคพอลิเมอร์นั้น พบว่ากรดโพรพิโอนิกก็สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหรือสารตั้งต้นสำหรับการผลิตโคพอลิเมอร์ได้เช่นกัน ซึ่งกลไกการเปลี่ยนแปลงกรดโพรพิโอนิกนั้นมีความคล้ายคลึงกับการเปลี่ยนแปลงของกรดวาเลอริก โดยเริ่มต้นจากกรดโพรพิโอนิกจากนั้นถูกเปลี่ยนไปเป็น propionyl-CoA จากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น 3-ketovaleryl-CoA พ่ายที่สุดจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ D(+)-3-hydroxyvaleryl-CoA ซึ่งเป็นสารตัวกลางสำคัญในการที่จะเปลี่ยนเป็น 3-hydroxyvalerate หรือ 3HV unit (Yamane *et al.*, 1996) การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ให้เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์กลายของ *Rhodobacter sphaeroides* ผลิตโคพอลิเมอร์ดังกล่าว

จากการนำตัวอย่างเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมกรดโพรพิโอนิกและเลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาโคพอลิเมอร์ชนิด PHBV โดยพิจารณาการเกิด methylester ชนิด methyl hydroxybutyrate กับ methyl hydroxyvalerate จากโครมาโตแกรมที่เกิดขึ้นหลังจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS (ตารางที่ 9) พบว่าทั้ง *R. sphaeroides* N20 และ U7 สามารถเจริญและผลิต

ตารางที่ 9 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร่วมต่อการผลิตพอลิเมอร์จากเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* N20 และ U7

Table 9. Effect of type and concentration of co-substrate for PHBV production from *Rhodobacter sphaeroides* N20 and U7.

Strain of <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Auxiliary carbon sources	Culture medium	Dry cell weight (g/l)	PHA concentration (g/l)	PHA content (%)	HB fraction (mol %)	HV fraction (mol %)
N20	Propionic acid	40 mM acetic acid	2.82	1.93	68.56	100	-
		40 mM acetic acid +20 mM propionic acid	2.61	1.42	54.34	86.16	13.84
		40 mM acetic acid +40 mM propionic acid	2.42	1.23	50.75	82.77	17.23
		40 mM acetic acid + 80mM propionic acid	2.36	1.29	54.60	78.88	21.12
	Valeric acid	40 mM acetic acid	3.12	2.0	72.37	100	-
		40 mM acetic acid +20 mM valeric acid	2.89	1.55	53.80	20.69	79.31
		40 mM acetic acid +40 mM valeric acid	2.37	1.33	64.23	17.16	82.84
		40 mM acetic acid +80 mM valeric acid	1.76	0.26	28.05	30.06	69.94

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Table 9. (continued)

Strain of	Auxiliary	Culture medium	Dry cell	PHA	PHA	HB	HV
<i>Rhodobacter</i>	carbon		weight	concentration	content	fraction	fraction
<i>sphaeroides</i>	sources		(g/l)	(g/l)	(%)	(mol %)	(mol %)
U7	Propionic acid	40 mM acetic acid	2.88	2.37	82.29	100	-
		40 mM acetic acid +20 mM propionic acid	2.56	1.81	70.57	80.38	19.62
		40 mM acetic acid +40 mM propionic acid	2.42	1.88	77.68	80.88	19.12
		40 mM acetic acid + 80mM propionic acid	2.40	1.63	67.78	79.25	20.75
	Valeric acid	40 mM acetic acid	2.88	1.94	67.36	100	-
		40 mM acetic acid +20 mM valeric acid	2.8	1.51	54.04	20.51	79.49
		40 mM acetic acid +40 mM valeric acid	2.49	1.93	77.42	15.23	84.77
		40 mM acetic acid +80 mM valeric acid	1.33	0.71	53.38	22.83	77.17

PHA ได้เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนร่วมกัน 2 ชนิด คือ กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก โดยสายพันธุ์ N20 มีค่า PHA content เท่ากับ 68.56, 54.34, 50.76 และ 54.59 % จากมีการเติมกรดโพรพิโอนิก 0, 20, 40 และ 80 mM ตามลำดับ และมีปริมาณของ hydroxybutyrate (HB) ในรูป mol % เท่ากับ 100, 86.16, 82.77 และ 78.88% ตามลำดับ และมี hydroxyvalerate (HV) เท่ากับ 13.84, 17.23 และ 21.12% ตามลำดับ สำหรับ *R. sphaeroides* U7 ให้ค่า PHA content เท่ากับ 82.29, 70.57, 77.68 และ 67.78% ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นว่าการใช้ความเข้มข้น 20 และ 40 mM ให้ค่าสัดส่วน mol % ใกล้เคียงกันมาก คือ HB เท่ากับ 80.38 และ 80.88% และ HV เท่ากับ 19.62 และ 19.12% ตามลำดับ

จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่าเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทั้ง *R. sphaeroides* N20 และ U7 สามารถใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์กลุ่ม PHA เนื่องจากโมเลกุลของกรดมีขนาดเล็ก การผ่านเข้าสู่เซลล์จึงผ่านได้ง่ายกว่าสารที่มีโมเลกุลใหญ่หรือสารที่มีจำนวนคาร์บอนมากกว่า โดยอาศัยกลไกการแพร่ผ่านของสารด้วยวิธีการ facilitated diffusion ซึ่งเป็นกระบวนการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารโดยอาศัยสารโปรตีนตัวกลางที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และไม่จำเป็นต้องอาศัยพลังงานจากกระบวนการเมตาบอลิซึม อาศัยเพียงพลังศักย์ของความเข้มข้นที่แตกต่างของสาร ซึ่งสารจะแพร่ผ่านด้วยความเข้มข้นที่เป็นลำดับ (concentration gradient) จากสิ่งแวดล้อม หรือในกรณีนี้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์ หรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นการเคลื่อนที่ของสารแบบกลับทิศทาง (opposite direction) สำหรับการแพร่ผ่านของเซลล์โดยอาศัยกลไกดังกล่าวจำกัดเฉพาะสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กหรือไม่มีประจุ รวมถึงสารที่ไม่มีขั้วและสารที่มีคุณสมบัติในการละลายในไขมันอาจรวมถึงก๊าซออกซิเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แอมโมเนีย เอทานอล และสารที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic molecules) ดังนั้นความสามารถในการนำกรดโพรพิโอนิกไปใช้จึงมีความเป็นไปได้สูงกว่ากรดที่มีปริมาณคาร์บอนจำนวนมาก ในขณะที่เดียวกันกรดโพรพิโอนิก สามารถเปลี่ยนเป็นโพรพิโอนิลโคเอ (propionyl-CoA) หรืออะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในวิธีการผลิต PHA ได้ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีความสามารถเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้นสำหรับมอนอเมอร์ต่างกัน โดยอะซิเตทสามารถเปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) ในขณะที่กรดโพรพิโอนิกสามารถเปลี่ยนเป็นโพรพิโอนิลโคเอ (propionyl-CoA) เมื่อมีการสลายด้วยกระบวนการเบต้าออกซิเดชัน (β -Oxidation) โอกาสที่จะเกิดโคพอลิเมอร์ก็มีความเป็นไปได้สูง (Du *et al.*, 2001)

เนื่องจาก *R. sphaeroides* N20 และ U7 สามารถผลิตพอลิเมอร์กลุ่ม PHA ได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิกหรือกรดควาเลอริก และการใช้กรดควาเลอริกส่งเสริมการผลิต HV ได้ดีกว่าการใช้กรดโพรพิโอนิก (ประมาณ 5.6 เท่า) ดังนั้นจึงเลือกกรดควาเลอริกสำหรับการ

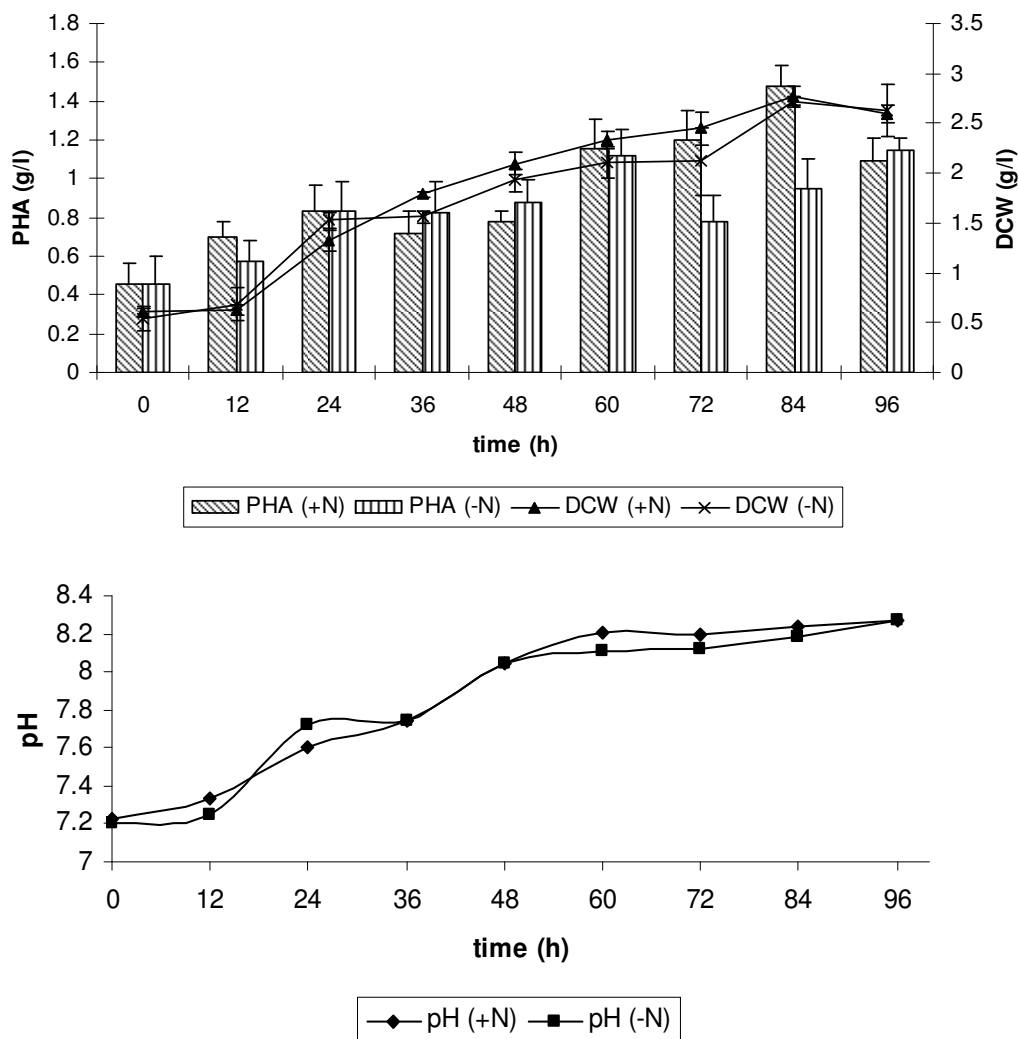
ทดลองต่อไป ในขณะที่เดียวกันพบว่า *R. sphaeroides* U7 ให้สัดส่วนของ hydroxyvalerate (HV) คิดเป็นสัดส่วนในรูป mol % ที่สูงกว่า *R. sphaeroides* N20 จึงเลือก *R. sphaeroides* U7 สำหรับการทดลองต่อไป

3.3 สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB

3.3.1 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อศึกษาผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ซึ่งปกติมีการเติม 0.2 กรัมต่อลิตร) ต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์กลุ่ม PHA ของ *Rhodobacter sphaeroides* U7 (ภาพที่ 19) พบว่าเชื้อเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมและไม่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต แนวโน้มของการเจริญและการผลิต PHB เป็นในลักษณะเดียวกัน มีช่วง log phase ในช่วง 12-48 ชั่วโมง และเข้าสู่ระยะ stationary phase เมื่อเจริญเข้าสู่ชั่วโมงที่ 60 ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.77 และ 2.72 กรัมต่อลิตรและผลิต PHB เท่ากับ 1.14 และ 1.4 กรัมต่อลิตรตามลำดับหลังการเลี้ยงเชื้อ 60 และ 84 ชั่วโมงตามลำดับ และมีค่าอัตราการผลิต (productivity) เท่ากับ 0.0185 และ 0.016 กรัมพอลิเมอร์ต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อพิจารณาค่าใช้จ่ายและค่า productivity สำหรับเป็นดัชนีชี้วัดในการเลือกชุดการทดลอง จึงเลือกการไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นเป็น 17.5 ซึ่งเป็นอัตราส่วนในการส่งเสริมการผลิต PHA ถึงแม้มีรายงานว่าแอมโมเนียมซัลเฟตจะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการผลิตพอลิเมอร์ในกลุ่ม PHA ได้ดีกว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ หรือ แอมโมเนียมไนเตรท รวมถึงยูเรีย สำหรับเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Alcaligenes eutrophus* (Groth *et al.*, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตโคพอลิเมอร์ชนิด poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) จากเชื้อ *Sinorhizobium fredii* ที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน (Liangqi *et al.*, 2006)

Kim และคณะ (2003) พบว่าการเจริญและการผลิต PHB ของเชื้อ *Methylobacterium* sp. ไม่ถูกยับยั้งเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมากถึง 10 เท่า แต่สำหรับกรณีของ *Rhodobacter sphaeroides* U7 ไม่จำเป็นต้องเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากมีกลูตามัทในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งของไนโตรเจนด้วย และมีปริมาณเพียงพอต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ กลูตามัทจึงเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์



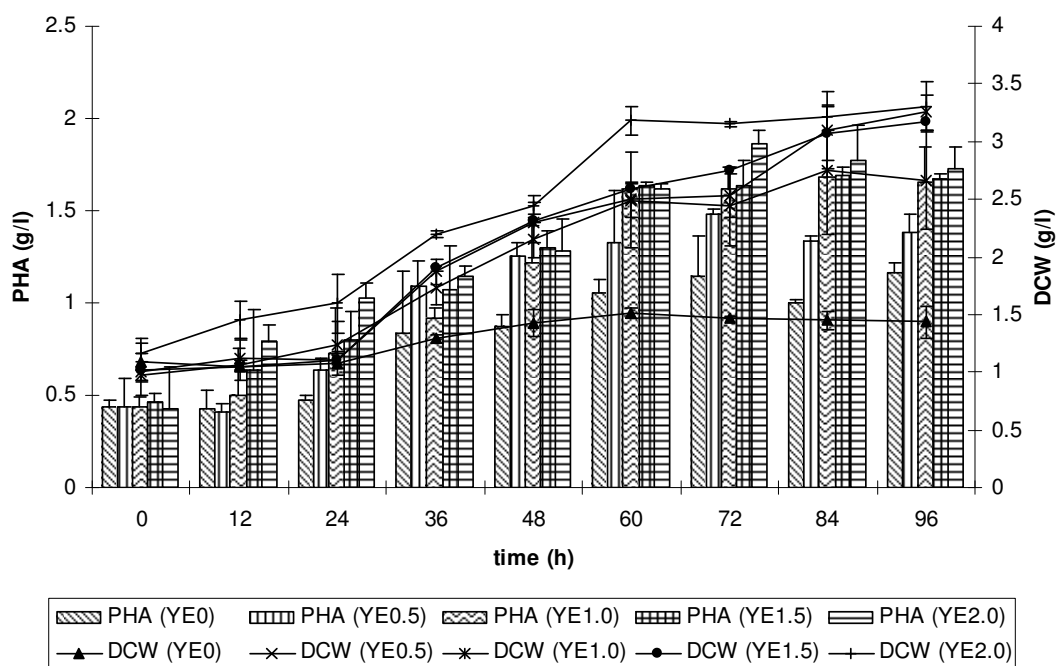
ภาพที่ 19 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเจริญและการผลิต PHA จากการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารกลูตามาต-อะซิเตทโดยเติมกรดวาเลอริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 37°C +N คือ มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต -N คือ ไม่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต

Figure 19. Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ addition on growth and PHA production from *R.sphaeroides* U7 cultivated in glutamate-acetate medium supplemented 40 mM valeric acid under shaking flask-dark (200 rpm) at 37°C. +N represented as medium with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. -N represented as medium without $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

นอกจากกลูตาเมตแล้วอีสต์สก็ดยังสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยอยู่ในรูปของไนโตรเจนเชิงซ้อน (complex nitrogen) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชพบว่าหลังการเจริญของเชื้อพีเอชมีค่าสูงขึ้น

3.3.2 ผลของอีสต์สก็ด

เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของอีสต์สก็ดที่ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* U7 (ภาพที่ 20) พบว่าให้ค่าน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 1.48, 2.7, 3.2, 3.25 และ 3.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่าการเจริญมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณอีสต์สก็ดที่เพิ่มขึ้นในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมอีสต์สก็ด ระยะการพักตัว (lag phase) ก่อนข้างนาน ประมาณ 36 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดการทดลองอื่นๆมีระยะพักตัวเพียง 24 ชั่วโมง และการเจริญของชุดการทดลองที่มีการเติมอีสต์สก็ด 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดประมาณ 3.25 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง ในขณะที่การเติมอีสต์สก็ด 2.0 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 และมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.026 h^{-1} ในชุดการทดลองที่มีการเติมอีสต์สก็ด 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร มีการเจริญอย่างช้าๆ อันเป็นผลมาจากแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความจำเป็น เซลล์จึงต้องใช้ระยะเวลาในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม หรืออาหารเลี้ยงเชื่อนั้นๆ รวมถึงปรับกลไกหรือกระบวนการภายในเซลล์เพื่อให้มีการผลิตสารเมตาบอไลต์ให้เพียงพอต่อการดำรงชีวิต ซึ่งในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณไนโตรเจนอย่างจำกัด เซลล์จึงต้องสังเคราะห์ตัวกลางเพื่อทดแทนไนโตรเจนที่ขาดแคลน เช่น ATP ส่งผลให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ซิเตรทซินเทส (citrate synthase enzyme) (Sato et al., 2003) ดังนั้นวัฏจักรเครปส์จึงขาดสารตัวกลาง เซลล์จึงจำเป็นต้องอาศัยวิถีอื่นๆในการผลิตสารตัวกลาง ในขณะที่เดียวกันกระบวนการผลิตแหล่งพลังงานสำรองเกิดขึ้นเช่นเดียวกัน สำหรับการผลิต PHA พบว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมอีสต์สก็ด 2.0 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณ PHA สูงสุดที่ชั่วโมง 72 ประมาณ 1.8 กรัมต่อลิตร แต่ในกรณีของการลดปริมาณอีสต์สก็ดซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์กลับมีผลให้การเจริญลดลงและการผลิต PHA ลดลงเช่นกัน นั้นแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของไนโตรเจนอินทรีย์ ซึ่งประกอบขึ้นจากสารประกอบไนโตรเจนหลากหลายชนิด รวมถึงมีสารส่งเสริมการเจริญ ในปริมาณที่เพียงพอต่อการเจริญ อีสต์สก็ดเป็นแหล่งสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเนื่องจากมีองค์ประกอบของสารประกอบจำเป็นหลายชนิด ได้แก่ กรดอะมิโน, วิตามินบีรวม รวมถึงสามารถเป็นแหล่งคาร์บอนได้เช่นกัน ดังนั้นเมื่อลดปริมาณอีสต์สก็ดสารดังกล่าวจึงลดปริมาณเช่นกัน และยังผลให้ความแตกต่างของสีจากการเลี้ยงเชื่อดังภาพที่ 21 ซึ่งแสดงว่าขาดสารเหล่านี้มีผลต่อการสังเคราะห์รงควัตถุของเชื้อด้วย ในการเลี้ยงเชื้อบางสายพันธุ์การใช้อีสต์สก็ดเป็นแหล่งไนโตรเจนจะดีกว่าการใช้อนินทรีย์ไนโตรเจน โดยพบว่าการเติมอีสต์สก็ดชนิดเดียวสำหรับ



ภาพที่ 20 ผลของยีสต์สกัดต่อการเจริญและการผลิต PHA จากการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตาเมต-อะซิเตท ร่วมกับกรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ พีเอชเริ่มต้น 7 ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Figure 20. Effect of yeast extract to growth and PHA production from *R. sphaeroides* U7 cultured in glutamate-acetate medium supplemented 40 mM valeric acid without $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and various yeast extract under shaking flask-dark (200rpm) at 37°C.

- (a) เติมนีสต์สกัด 2.0 กรัมต่อลิตร (ซ้าย) และ 1.5 กรัมต่อลิตร (ขวา)



- (b) เติมนีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร (ซ้าย) และ 0.5 กรัมต่อลิตร (ขวา)



ภาพที่ 21 ผลของความเข้มข้นของยีสต์สกัดต่อการสังเคราะห์รงควัตถุของสารละลายเซลล์ *R. sphaeroides* U7 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตามาเทท-อะซิเตทที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับ กรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

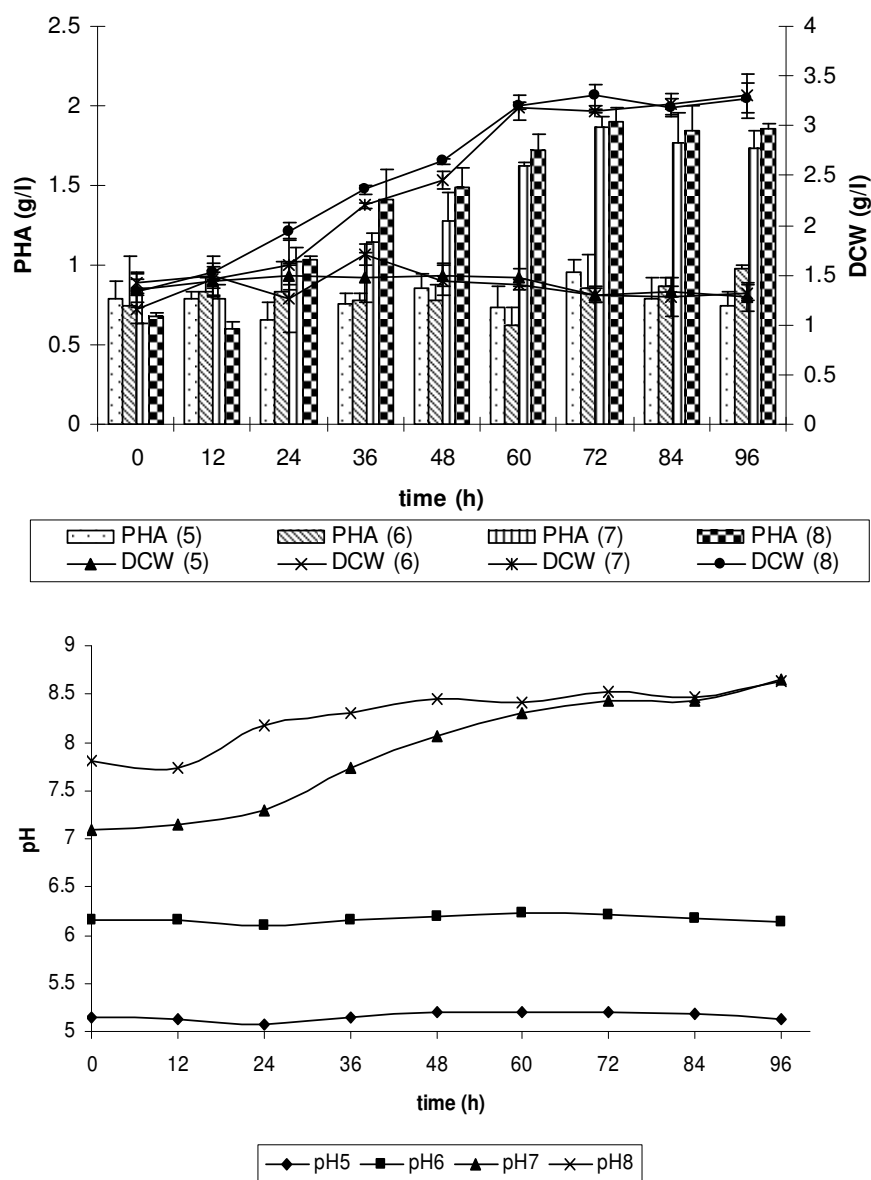
Figure 21. Effect of yeast extract concentration on pigmentation of cell suspension of *R. sphaeroides* U7 cultivated in glutamate-acetate medium without $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ supplemented with 40 mM valeric acid without under aerobic-dark (200 rpm) at 37°C.

เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเลี้ยง *Pseudomonas pseudomallei* พบว่า ส่งเสริมการเจริญของเชื้อได้ดีกว่าการเติมยีสต์สกัดร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต หรือใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเพียงชนิดเดียวมากถึงประมาณ 8 เท่า (Das *et al.*, 2005) และให้ผลทำนองเดียวกับการเลี้ยงเชื้อ *Listeria murrayi* โดยพบว่าการเติมยีสต์สกัดสำหรับเป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดเดียว ส่งเสริมการเจริญของเชื้อได้ดีกว่าการเติมยีสต์สกัดร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต หรือใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเพียงชนิดเดียว (Das *et al.*, 2004) ในขณะที่ Lorrungruang และคณะ (2006) ใช้ยีสต์สกัดสำหรับเป็นแหล่งไนโตรเจนโดยพบว่าการใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ส่งเสริมการผลิต PHA ให้ค่าอยู่ในช่วง 1-5 กรัมต่อลิตร

ในกรณีอัตราส่วนโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงอันเกิดจากการลดปริมาณยีสต์สกัด ควรจะส่งผลให้เกิดการส่งเสริมการสะสมหรือการผลิต PHA สูงขึ้น แต่พบว่าการทดลองไม่สอดคล้องกับการกล่าวอ้างข้างต้น เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหลัก เช่นเดียวกับคาร์บอนต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์หรือการสร้างผนังเซลล์ และปริมาณของไนโตรเจนในปริมาณหนึ่งซึ่งเซลล์มีความจำเป็นต้องใช้นั้น เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง ทั้งในแง่ของความเข้มข้นของไนโตรเจน หรืออัตราส่วนโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงย่อมมีผลต่อการเจริญของเซลล์ ดังนั้นการปรับค่าอัตราส่วนโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนจึงสามารถปรับได้จนถึงค่าๆหนึ่งซึ่งการเจริญและการผลิต PHA ยังคงเกิดขึ้นเป็นอย่างดี ซึ่งอัตราส่วนข้างต้นพบว่าถ้าปรับให้มีค่าเท่ากับ 20 จะส่งเสริมการเจริญของ *Pseudomonas putida* KT2442 (Huijberts and Eggink, 1996) แต่ถ้าปรับค่าอัตราส่วนโมลของคาร์บอนต่อไนโตรเจนให้มากกว่าค่าที่เหมาะสมมากเกินไปจะส่งผลลบทั้งการเจริญและการผลิต PHA ซึ่งเห็นได้ชัดจากชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมยีสต์สกัด การเจริญและการผลิต PHA ลดลงอย่างเห็นได้ชัด การเจริญที่เกิดขึ้นเป็นผลสืบเนื่องมาจาก *Rhodobacter sphaeroides* U7 สามารถใช้ไนโตรเจนจากกลูตามาเท ซึ่งจัดเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ แต่การทดลองก็สามารถชี้ให้เห็นว่ากลูตามาเทในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเดียว ไม่สามารถส่งเสริมการเจริญและการผลิต PHA ได้

3.3.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์กลุ่ม PHA โดยทำการปรับให้มีค่าเป็น 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ โดยใช้ชุดการทดลองที่มีพีเอช 7 เป็นชุดควบคุม จากการทดลอง (ภาพที่ 22) พบว่าการเจริญของเชื้อ *R. sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 และ 8 มีแนวโน้มเดียวกัน กล่าวคือมีการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่ 60 ชั่วโมง ได้



ภาพที่ 22 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญ ค่าพีเอช และการผลิต PHA จากการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตามาต-อะซิเตทที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับ กรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และยีสต์สกัด 2.0 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสง บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

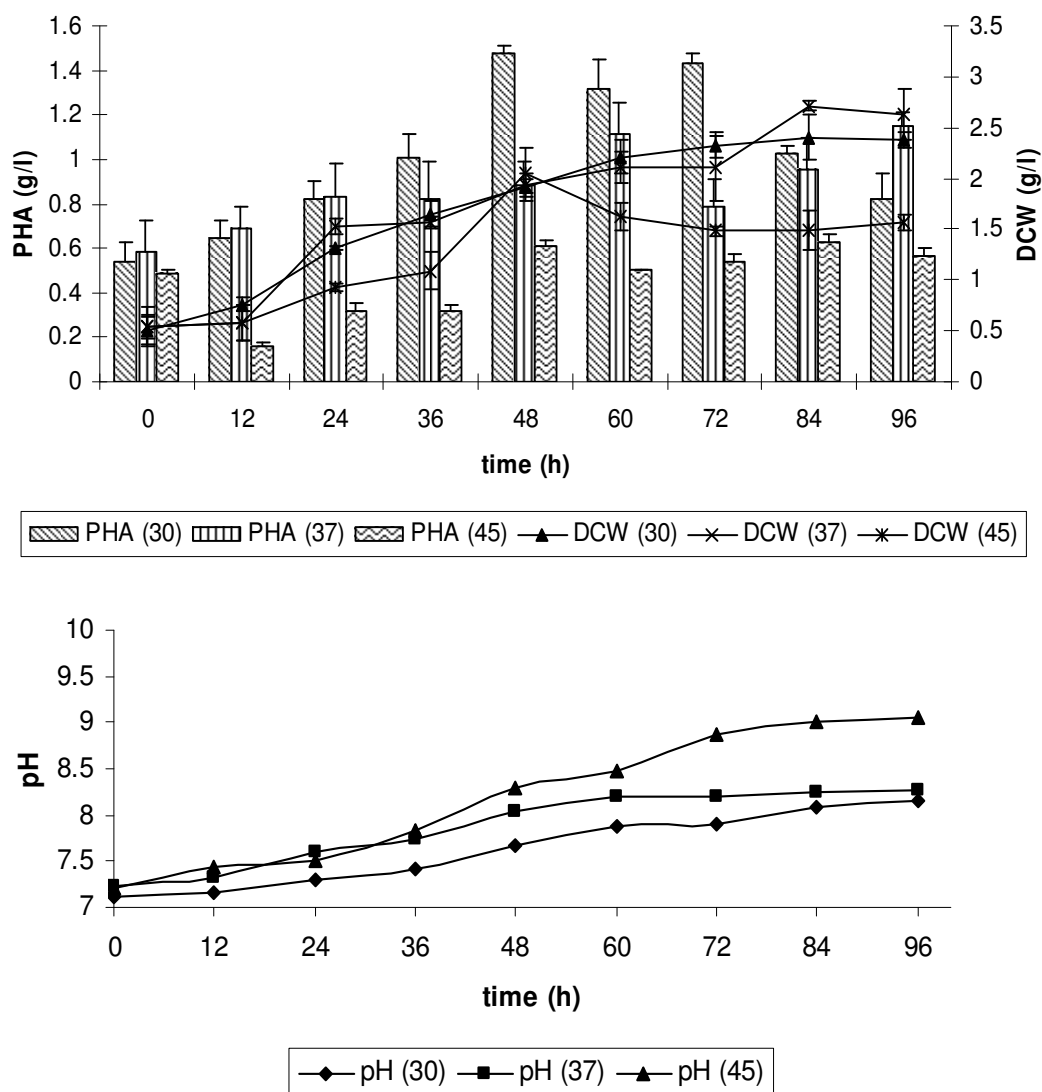
Figure 22. Effect of initial pH on growth, pH and PHA production from *R.sphaeroides* U7 cultivated in glutamate-acetate medium without $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ supplemented 40 mM valeric acid and 2.0 g/l yeast extract under shaking flask-dark (200rpm) at 37°C.

น้ำหนักเซลล์แห้ง 3.3 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) 0.018 และ 0.012 h^{-1} ตามลำดับ ในขณะที่ *R. sphaeroides* U7 ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 และ 6 อันเป็นผลสืบเนื่องจากขาดความสมดุลระหว่างปริมาณไฮโดรเจนไอออนกับปริมาณไฮดรอกไซด์ ซึ่งจะส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหาร เซลล์จึงไม่สามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ หรืออีกนัยหนึ่งเป็นผลมาจากความเป็นพิษของปริมาณกรดในระบบ (Luli and Strohl, 1990) ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการใช้อะซิเตทความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับกรดวเลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ซึ่งปกติจะมีการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 เป็นการปรับปริมาณไฮโดรเจนไอออนอิสระที่แสดงประจุบวกให้ลดลงด้วยไฮดรอกไซด์ซึ่งมีประจุลบ จึงทำให้ไฮโดรเจนไอออนไม่สามารถส่งผลกระทบต่อเซลล์ (Du et al., 2001) จะมีผลเพียงจากปริมาณสารอาหารเริ่มต้นที่มากเกินไป หรือการยับยั้งการเจริญจากสับสเตรท (substrate inhibition) แต่เมื่อทำการปรับพีเอชเริ่มต้นให้มีค่าลดลง หรือมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นทำให้อะซิเตทในระบบกลายเป็นกรดอะซิติก และส่งผลร่วมกับกรดวเลอริกทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญ น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่มีการปรับพีเอช 5 และ 6 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และพีเอชไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดการทดลอง ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเจริญของ *R. sphaeroides* U7

เมื่อเชื้อไม่เจริญที่พีเอชเริ่มต้น 5 และ 6 ดังนั้นจึงไม่มีการผลิตพอลิเมอร์ โดยพบว่าปริมาณ PHA แทบจะไม่เปลี่ยนแปลงจากเริ่มต้นซึ่งสอดคล้องกับการเจริญข้างต้น และแนวโน้มของพอลิเมอร์โดยรวมก็คงที่ ต่างจากชุดการทดลองที่มีการปรับพีเอชเป็น 7 และ 8 การผลิตจะเกิดขึ้นควบคู่กับการเจริญ อันเป็นผลจาก PHA เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำรอง จึงมีการสะสมควบคู่กับการเจริญและจัดเป็นสารกลุ่ม primary metabolite หรือ growth-associated substance การสะสมเกิดขึ้นสูงสุดเมื่อเชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase และค่อนข้างคงที่ ปริมาณ PHA สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 72 มีค่า 1.86 และ 1.89 กรัมต่อลิตร ตามลำดับที่พีเอชเริ่มต้น 7 และ 8 จึงให้ค่าอัตราการผลิต productivity เท่ากัน (0.026 และ 0.0262 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ) แต่เนื่องด้วยการปรับพีเอชเริ่มต้นต้องอาศัยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จึงไม่จำเป็นต้องสิ้นเปลืองสารเพื่อใช้ในการปรับพีเอชเริ่มต้นให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นเบส เพราะการปรับพีเอชให้เป็นกลางก็ให้ผลเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่มีความเป็นเบสของอาหารสูง ดังนั้นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *R. sphaeroides* U7 จึงมีค่าเป็น 7

3.3.4 ผลของอุณหภูมิ

จากการเลี้ยงเชื้อ *R. sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนรวม คือ กรดวเลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร โดยไม่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ ค่าพีเอช และการผลิต PHA จากการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตามาเท-อะซิเตทที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับ กรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 mM และยีสต์สกัด 2.0 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 ภายใต้สภาวะมีอากาศ ไร้แสง บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที)

Figure 23. Effect of temperature on growth, pH and PHA production from *R.sphaeroides* U7 cultivated in glutamate-acetate medium without $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ supplemented 40 mM valeric acid and 2.0 g/l yeast extract adjusted initial pH to 7 under shaking flask-dark condition (200 rpm).

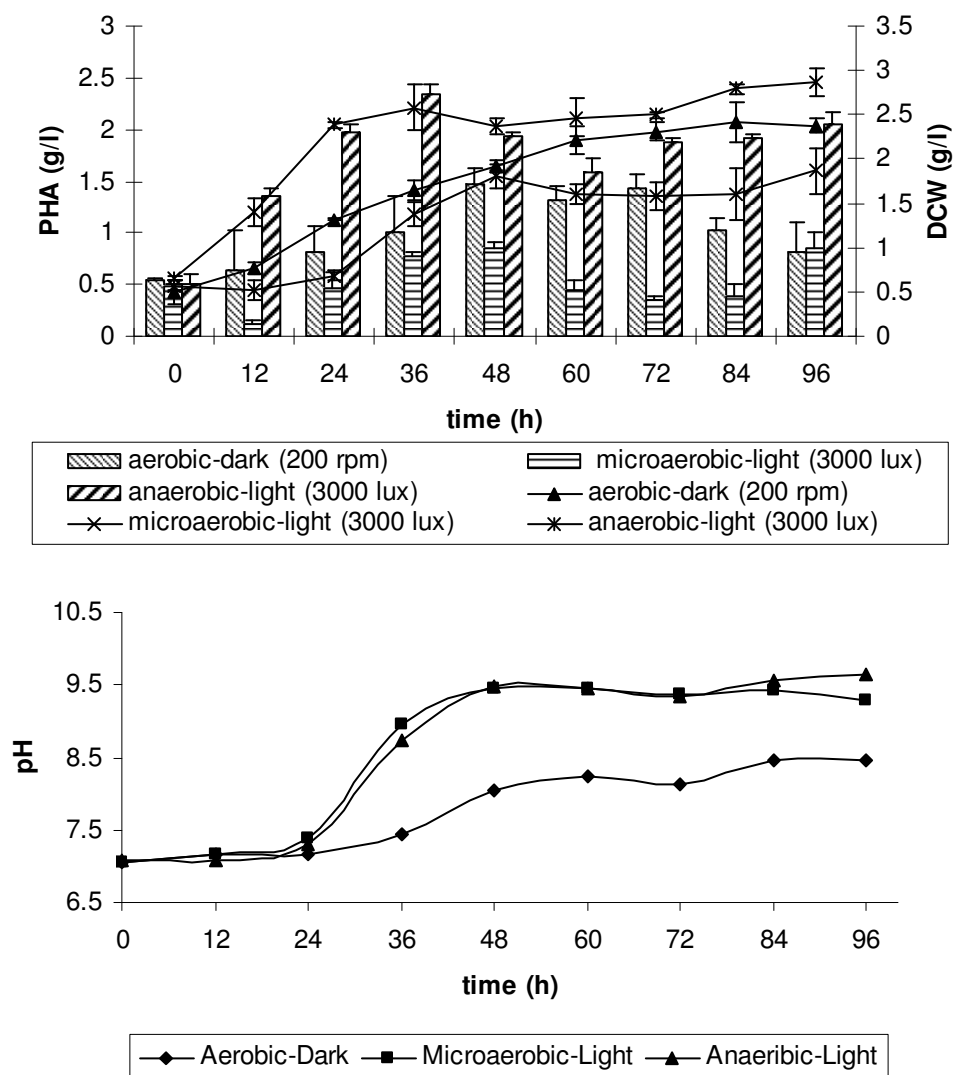
พบว่าเชื้อเจริญได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.4, 2.6 และ 1.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 กับ 37 องศาเซลเซียส มีการเจริญของเชื้อไม่แตกต่างกัน แต่ระยะการเจริญเข้าสู่ stationary phase ต่างกันคือ ชั่วโมงที่ 60 และ 84 ตามลำดับ อันอาจเป็นผลมาจากอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็นผลให้การใช้แหล่งคาร์บอนร่วมกันสองชนิดคือกรดอะซิติกและกรดวาเลอริกมีการใช้ในสัดส่วนไม่เท่ากันในอุณหภูมิต่างกัน อย่างไรก็ตามในช่วงแรกของการเจริญเป็นการใช้กรดอะซิติกควบคู่กับกรดวาเลอริก โดยสัดส่วนการใช้กรดอะซิติกมากกว่า และในการเจริญช่วงหลังจะเป็นการเจริญจากการใช้กรดวาเลอริกเป็นส่วนใหญ่ (จากผลการทดลองก่อนหน้านี้) เมื่อบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส แบคทีเรียไม่จำเป็นต้องทำการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดในสิ่งแวดล้อมดังกล่าว จึงสามารถใช้สารอาหารที่มีได้อย่างดี การเพิ่มอุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส แบคทีเรียต้องปรับตัว ทำให้จำเป็นต้องนำแหล่งคาร์บอนที่ง่ายต่อการใช้นามาใช้ก่อน คือ กรดอะซิติก ความสามารถในการปรับตัวของ *R. sphaeroides* ในอุณหภูมิต่างกันเป็นไปได้ค่อนข้างดี สังเกตจากการเจริญรวมถึงช่วงอุณหภูมิที่ *R. sphaeroides* สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 30-34 องศาเซลเซียส (Staley et al., 1989) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHA จากเชื้อ *R. sphaeroides* 14F คือ 37 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร การผลิต PHA ลดลงเมื่อบ่มที่ 42 และ 45 องศาเซลเซียส ได้ PHA ไม่แตกต่างกันเพียง 0.51 กรัมต่อลิตร (Lorrungruang et al., 2006)

สำหรับที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การเจริญมีระยะพักตัวค่อนข้างนานประมาณ 36-48 ชั่วโมง สำหรับการผลิต PHA พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเจริญและมีปริมาณสูงสุด (1.4 กรัมต่อลิตร) เมื่อเลี้ยงในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง โดยปริมาณ PHA ที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังนั้นดัชนีชี้วัดจึงเป็นค่าอัตราการผลิต productivity ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0307 และ 0.0199 กรัมพอลิเมอร์ต่อลิตรต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามอุณหภูมิเป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการผลิต PHA เมื่อพิจารณาชุดการทดลองพบว่าชุดควบคุมให้ผลค่อนข้างต่ำกว่าชุดการทดลองก่อนหน้านี้ อันเป็นสาเหตุของการปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้น ถึงแม้จะทำการปรับความขุ่นเชื้อให้ได้ OD_{660} เท่ากับ 0.5 แต่ความคลาดเคลื่อนของความขุ่นมีผลต่อปริมาณเซลล์เริ่มต้นจึงทำให้การทดลองนี้ให้ค่าที่น้อยกว่า (< 0.3 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงเริ่มต้น) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าฟิโอสตอดการทดลองพบว่าค่าฟิโอสให้แนวโน้มเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ โดยมีค่าฟิโอสเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถเป็นตัวชี้วัดถึงการเจริญ *R. sphaeroides*

3.3.5 ผลของสภาวะการเลี้ยง

จากการศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อ *R. sphaeroides* U7 ภายใต้สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สภาวะมีอากาศเล็กน้อย-ให้แสง และสภาวะไร้อากาศ-ให้แสง (ภาพที่ 24) พบว่าสภาวะไร้อากาศ-ให้แสง เชื้อมีการเจริญและการผลิตพอลิเมอร์สูงกว่าสภาวะ

มีอากาศ-ไร้แสงและสภาวะมีอากาศเล็กน้อย-ให้แสง โดยเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary phase ภายในเวลา 36, 60 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.87 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 96 ให้ 2.41 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 84 และ 1.87 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 48 ตามลำดับ จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะไร้อากาศ-มีแสงแล้วมีการเจริญดีกว่า อาจเป็นผลมาจากความเข้มแสง 3,000 lux เพียงพอสำหรับกลไกหรือกระบวนการสังเคราะห์แสง (Prasertsan *et al.*, 1993) โดยความเข้มแสงที่ 3,000 ลักซ์ จากหลอดไฟทั้งสแตนด์เพียงพอต่อการใช้สังเคราะห์แสง และสารอาหารต่างๆสามารถถูกเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้นในวัฏจักรเครปส์ได้อย่างสมบูรณ์ (Ivanovsky *et al.*, 2001) แสดงให้เห็นว่าความยาวคลื่นของแสงที่ได้จากหลอดไฟทั้งสแตนด์ให้ค่าความยาวคลื่นที่กระตุ้นระบบแสงหนึ่งและสอง (Photosystem I and II) ซึ่งอาศัยความยาวคลื่นแสงที่ในช่วง 800-1000 นาโนเมตร นอกเหนือจากการเจริญแล้ว พบว่าการผลิต PHA ในสภาวะไร้อากาศ-มีแสงให้ผลสูงสุดเช่นกันคือ 2.34 กรัมต่อลิตร ที่ 36 ชั่วโมง ขณะที่สภาวะมีอากาศ-ไร้แสงผลิตได้เพียง 1.47 กรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมง และที่สภาวะมีอากาศ-ให้แสงได้เพียง 1.0 กรัมต่อลิตรที่ 48 ชั่วโมง เมื่อมีการเจริญของเชื้อ *R. sphaeroides* U7 พบว่าค่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น อันเป็นผลสืบเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในกลุ่มของ *R. sphaeroides* มีความสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมกรดวาลेरริก ซึ่งเมื่อทั้งกรดอะซิติกและกรดวาลेरริกละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะแตกตัวให้ไฮโดรเจนไอออน ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเริ่มต้นต่ำประมาณ 3.5-4 และปรับให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งจะทำให้หมู่คาร์บอกซิลของกรดวาลेरริกซึ่งแตกตัวแสดงประจุลบจับกับโซเดียมไอออน จึงทำให้เกิดความสมดุลระหว่างโมเลกุลของสารที่แตกตัวให้ไฮโดรเจนไอออน กับสารที่สามารถแตกตัวให้ไฮดรอกไซด์ไอออน (Luli and Strohl, 1990) แต่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในสภาวะไร้อากาศ-มีแสง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเพิ่มขึ้น อันเป็นผลมาจากเชื้อสามารถนำโมเลกุลของกรดวาลेरริกผ่านเข้าสู่เซลล์ได้โดยอาศัยกลไกการแพร่ผ่านของสารด้วยวิธีการ facilitated diffusion ดังได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 3.2.2

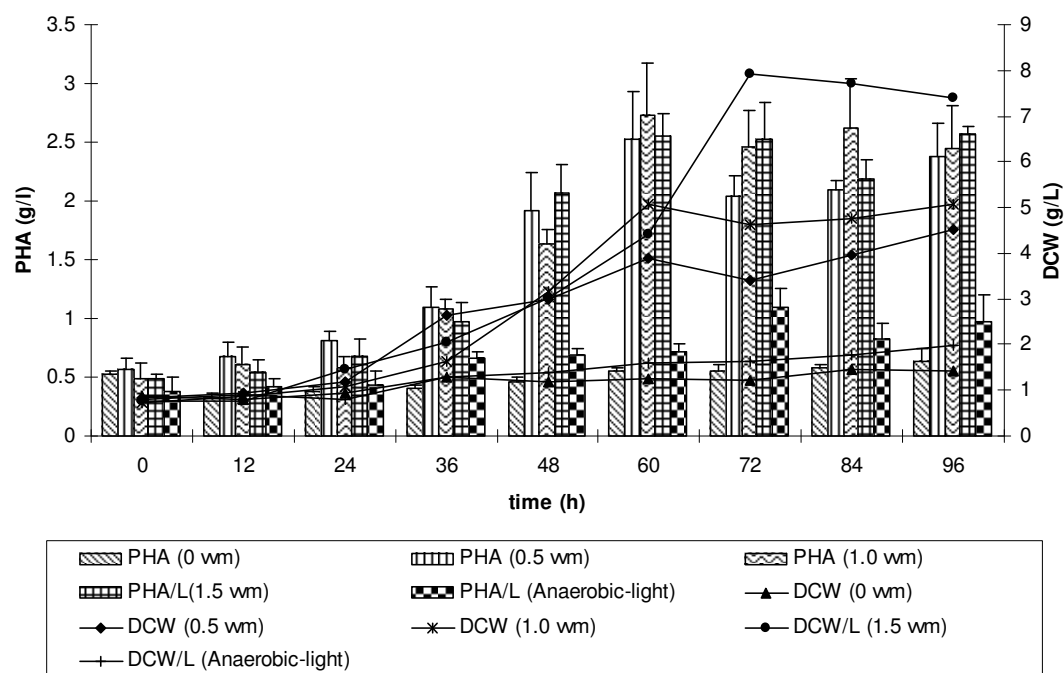


ภาพที่ 24 ผลของสภาวะการเลี้ยงต่อการเจริญ ค่าพีเอช และการผลิต PHA จากการเลี้ยง *R. sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตามาต-อะซิเตตที่ไม่เติมแอมโมเนียม ซัลเฟตร่วมกับกรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และยีสต์สกัด 2.0 กรัมต่อ ลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Figure 24. Effect of different culture condition on growth, pH and PHA production from *R. sphaeroides* U7 cultivated in glutamate-acetate medium without $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ supplemented with 40 mM valeric acid and 2.0 g/l yeast extract adjusted initial pH at 7 incubated at 30°C.

3.3.6 ผลของอัตราการใช้อากาศ

จากการศึกษาผลของอัตราการใช้อากาศในถังหมักขนาด 5 ลิตร ต่อการเจริญและการผลิต PHA ของเชื้อ *R. sphaeroides* U7 โดยให้อากาศในอัตรา 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm มีการกวน 200 รอบต่อนาที เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ-มีแสง (3,000 ลักซ์) ซึ่งพบว่า การเจริญในสภาวะไร้อากาศ-มีแสง (3,000 ลักซ์) เกิดขึ้นเล็กน้อยให้ปริมาณเซลล์ประมาณ 2 กรัมต่อลิตร โดยการเจริญเมื่อไม่มีการให้อัตราการใช้อากาศ มีเพียงการกวนความเร็ว 200 รอบต่อนาที ให้ผลเช่นเดียวกับการเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ-มีแสง (3000 ลักซ์) ซึ่งโดยปกติแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถดำรงอยู่ได้ในสภาพสิ่งแวดล้อมต่างๆ ในกรณีไม่มีแสงสำหรับเป็นแหล่งพลังงานแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจะอาศัยกลไก หรือกระบวนการเมตาบอลิซึมเช่นเดียวกับแบคทีเรียกลุ่มต้องการอากาศทั่วไป โดยจะใช้ออกซิเจนสำหรับเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายของกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) แต่ผลการทดลองเมื่อไม่มีการให้อากาศ (0 vvm) พบว่าการเจริญเกิดขึ้นเล็กน้อยมีปริมาณเซลล์สูงสุดประมาณ 1.5 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าการกวนความเร็ว 200 รอบต่อนาที ไม่สามารถช่วยเพิ่มปริมาณอากาศ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสังเคราะห์จำเป็นต้องใช้กลไก หรือ กระบวนการหนึ่งกระบวนการใดสำหรับใช้ในการผลิตสารตัวกลางในวิถีต่างๆภายในเซลล์ เช่น วิถีจักรเครปส์ การไม่มีออกซิเจนเพื่อใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย และไม่มีแสงสำหรับเป็นแหล่งพลังงานจึงทำให้กระบวนการเจริญเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ แต่เมื่อมีการให้อากาศพบว่าการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งผลการทดลองเมื่อมีการให้อัตราการใช้อากาศ 0.5 vvm พบว่าการเจริญ เข้าสู่ระยะ stationary phase ที่ 60 ชั่วโมง โดยปริมาณเซลล์สูงสุดมีค่าประมาณ 4.5 กรัมต่อลิตร ที่ 96 ชั่วโมง และการเจริญเป็นชนิด diauxic growth เป็นผลจากการมีแหล่งคาร์บอนสองชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเกิดขึ้นเช่นเดียวกับการให้อัตราการใช้อากาศ 1.0 vvm ซึ่งมีการเจริญสูงสุดที่ 60 ชั่วโมง ให้ปริมาณเซลล์ประมาณ 5.2 กรัมต่อลิตร โดย diauxic growth ที่เกิดขึ้นไม่ค่อยชัดเจน ซึ่งการให้อากาศด้วยอัตรา 0.5 vvm จะเห็นได้ชัดเจนกว่า ในขณะที่การให้อัตราการใช้อากาศ 1.5 vvm การเจริญเกิดขึ้นอย่างทวีคูณโดยมีระยะพักตัวยาวกว่าการให้อัตราการใช้อากาศ 0.5 และ 1.0 vvm ที่ 36 ชั่วโมง อันเป็นผลมาจากปริมาณอากาศที่มากเกินไปมีผลต่อการยับยั้งหรือชะลอการเจริญของแบคทีเรียในระยะแรก เมื่อเซลล์สามารถปรับตัวได้จึงสามารถเจริญเป็นปกติและเข้าสู่ stationary phase ที่ 72 ชั่วโมง โดยพบว่ามีปริมาณเซลล์สูงสุดเวลาเดียวกันนี้ประมาณ 8 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการเจริญ และการผลิต PHA จากการเลี้ยง *R.sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตามาต-อะซิเตทไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับ กรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และยีสต์สกัด 2.0 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

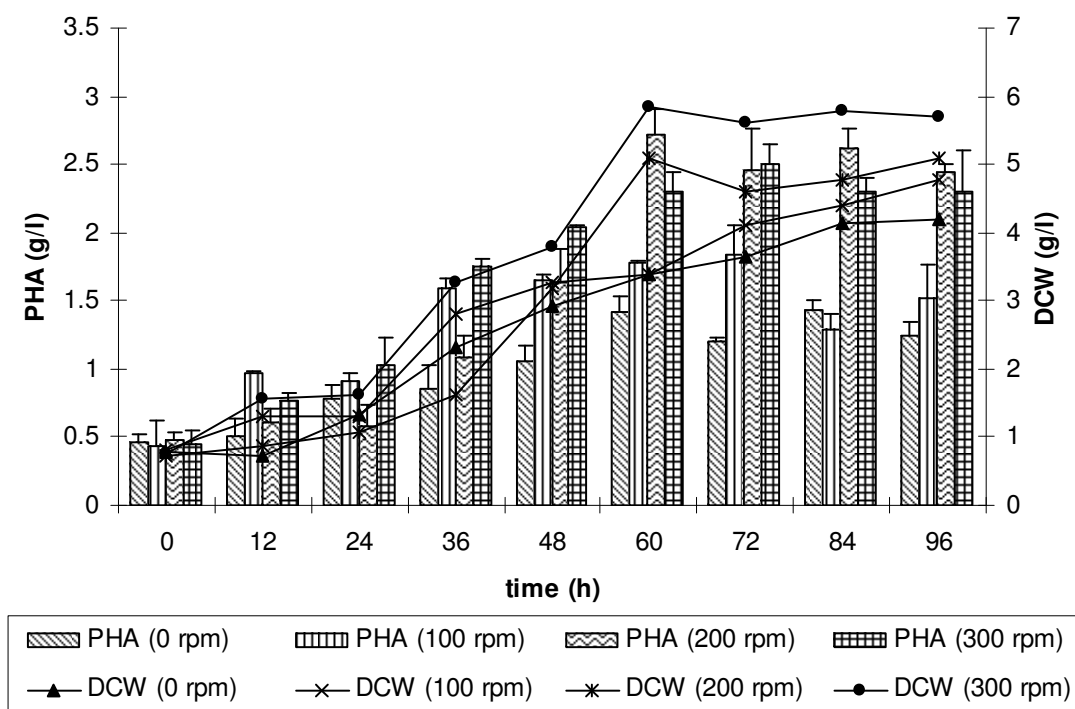
Figure 25. Effect of aeration rate on growth and PHA production from *R. sphaeroides* U7 cultivated in glutamate-acetate medium without $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ supplemented with 40 mM valeric acid and 2.0 g/l yeast extract, adjusted initial pH to 7 and incubated at 30°C.

การผลิต PHA เกิดควบคู่กับการเจริญ พบว่าในทุกชุดการทดลองที่มีการให้อากาศจะมีการผลิต PHA สูงสุดในช่วง 60 ชั่วโมง แต่เมื่อพิจารณาการสะสม PHA ภายในเซลล์ พบว่าไม่ได้เพิ่มขึ้น แม้มีการเพิ่มอัตราการให้อากาศ โดยปริมาณ PHA ที่เกิดขึ้น 2.5-2.7 กรัมต่อลิตร โดยการให้อากาศสูงจะช่วยส่งเสริมต่อการเจริญมากกว่า และพบว่าการเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ-มีแสง (3,000 ลักซ์) ให้ผลผลิตแตกต่างจากการเลี้ยงในสภาวะเดียวกันในพลาสติก อันเป็นผลมาจากปริมาณเซลล์หรือความหนาแน่นของเซลล์ที่เกิดขึ้นในถังหมักมีปริมาณมากกว่า ส่งผลให้เกิดการบดบังซึ่งกันและกัน ในขณะที่สัดส่วนพื้นที่ผิวที่สามารถรับแสงกับปริมาณเซลล์ไม่สมดุลกัน จึงทำให้เซลล์ได้รับแสงซึ่งเป็นแหล่งพลังงานต่อการเจริญในปริมาณความเข้มที่น้อย จึงทำให้มีแหล่งพลังงานไม่เพียงพอต่อการเจริญ

ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดปริมาณออกซิเจน แต่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินไป พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ NADPH oxidase จะลดลงทำให้เกิดการสะสมของ NADPH มากขึ้น ส่งผลให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ citrate synthase และเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase ทำให้เกิดการสะสมของ Acetyl-CoA เพิ่มมากขึ้นจนถึงระดับความเข้มข้นหนึ่ง ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการยับยั้งเอนไซม์ Acetyl-CoA transferase ด้วยกระบวนการ feedback inhibition ในทำนองเดียวกันการสะสมของ NADPH ในปริมาณมากขึ้นหรืออีกนัยหนึ่งสัดส่วนของ NADPH/NAD มีค่าสูง ในสภาวะมีการจำกัดปริมาณออกซิเจน จะส่งเสริมให้เกิดวิถีการผลิต PHA โดยพบว่า PHA จะมีบทบาทในการเป็นตัวรับอิเล็กตรอนทางเลือก (alternative electron acceptor) (Hocker and Marchesault, 1994)

3.3.7 ผลของอัตราการกวน

ศึกษาผลของอัตราการกวน (0, 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ต่อการเจริญและการผลิต PHA ด้วย *R. sphaeroides* U7 โดยให้อากาศในอัตรา 1.0 vvm (ภาพที่ 26) พบว่า การกวนมีผลต่อการเจริญโดยการเจริญมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการกวน โดยการเจริญที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที กับการไม่กวน (0 รอบต่อนาที) ใกล้เคียงกันมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.3 และ 4.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับที่ 96 ชั่วโมง การกวนด้วยความเร็ว 200 และ 300 รอบต่อนาทีให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 5.1 และ 5.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับที่ 60 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการกวนด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ส่งผลส่งเสริมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *R. sphaeroides* U7 บทบาทความสำคัญของการกวนส่วนใหญ่ในถังหมักเป็นเพียงการผสมระหว่างเซลล์กับอาหารเลี้ยงเชื้อให้สัมผัสกันมีผลต่อการซึมผ่านของอากาศบ้าง



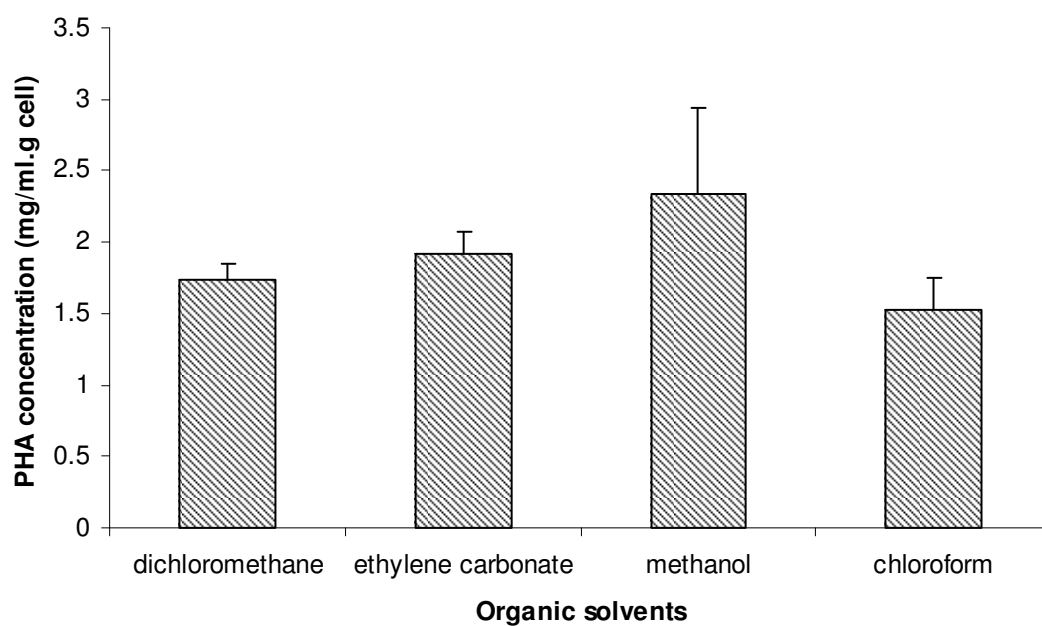
ภาพที่ 26 ผลของการกวนต่อการเจริญและการผลิต PHA จากการเลี้ยง *R. sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตาเมต-อะซิเตทที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับกรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และยีสต์สกัด 2.0 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Figure 26. Effect of agitation on growth and PHA production from *R. sphaeroides* U7 cultivated in glutamate-acetate medium without $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ supplemented with 40 mM valeric acid and 2.0 g/l yeast extract, adjusted initial pH at 7 under aeration rate at 1.0 vvm and incubated at 30°C.

ดังนั้นการไม่กวนแบบที่เรีย *R. sphaeroides* U7 ยังคงสามารถเจริญได้ เป็นผลเนื่องจากปริมาณอากาศที่ส่งผ่านในปริมาณเพียงพอ โดยการกวน 300 รอบ ต่อนาที ผลิต PHA ได้ 2.5 กรัมต่อลิตร ที่ 72 ชั่วโมง ขณะที่ 200 รอบต่อนาทีได้ PHA สูงสุดมีค่า 2.7 กรัมต่อลิตร ที่ 60 ชั่วโมง ในขณะที่การกวน 100 รอบต่อนาที ได้ PHA 1.8 กรัมต่อลิตร ที่ 60 ชั่วโมง แต่การไม่กวนให้ PHA ต่ำสุดเท่ากับ 1.3 กรัมต่อลิตร ที่ 60 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณ PHA ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเร็วรอบของการกวนเริ่มมีแนวโน้มคงที่แสดงว่าปริมาณ PHA ดังกล่าวเป็นปริมาณที่เซลล์สามารถผลิตได้สูงสุด ถึงแม้จะมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะของสิ่งแวดล้อมอันเป็นผลมาจากความสามารถ หรือศักยภาพสูงสุดของเซลล์ต่อการตอบสนองกับปัจจัยที่กระตุ้นวิธีการผลิต PHA

3.4 การคัดเลือกตัวทำละลายสำหรับสกัดพอลิเมอร์ภายในเซลล์

จากการนำเซลล์แห้ง (lyophilized cell) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R.sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตามัท-อะซิเตทร่วมกับกรวดาเลอริกความเข้มข้น 40 mM ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และกวนที่ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตามปัจจัยและภายใต้สภาวะที่เหมาะสมข้างต้น จากนั้นนำเซลล์แห้งที่ได้มาศึกษาความสามารถของตัวทำละลายได้แก่ เมทานอล, ไดคลอโรมีเทน, เอเทรลินคาร์บอนेट (Ganzeveld *et al.*, 1999) และคลอโรฟอร์ม (Hahn *et al.*, 1994) โดยนำตัวทำละลายดังกล่าวมาสกัดพอลิเมอร์ภายในเซลล์ จากนั้นเตรียมสารละลายในรูป methyl ester สำหรับการวิเคราะห์ด้วย GC-MS (ภาพที่ 27) พบว่าสารละลายทั้งสี่ชนิดให้โครมาโตแกรมในช่วงเวลาเดียวกับสาร methyl hydroxybutyrate แสดงให้เห็นเบื้องต้นว่าตัวทำละลายดังกล่าวสามารถละลาย PHA ได้ โดยปริมาณที่ละลายนั้นแตกต่างกัน เท่ากับ 2.34, 1.91, 1.73 และ 1.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับเมื่อพิจารณาสเปกตรัมของสารประกอบที่แยกได้จาก GC ด้วย mass spectroscopy พบว่าสารประกอบที่ได้จากการใช้คลอโรฟอร์มมีสเปกตรัมตรงกับ methyl hydroxybutyrate ในขณะที่สเปกตรัมที่เกิดขึ้นของสารประกอบจากตัวทำละลายชนิดอื่นให้สเปกตรัมไม่ตรงกับ methyl hydroxybutyrate แสดงให้เห็นว่าคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการใช้สกัด PHA ภายในเซลล์ ซึ่งคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายมาตรฐานที่ใช้ในการสกัด PHA ในขณะที่ไดคลอโรมีเทนถึงแม้ว่าความมีขั้วจะใกล้เคียงกับคลอโรฟอร์มและสามารถละลาย PHA ได้ดี แต่พบว่าควรใช้ไดคลอโรมีเทนสำหรับการทำบริสุทธิ์ PHA ซึ่งกระบวนการทำบริสุทธิ์ PHA จะอาศัยการตกตะกอนด้วย non solvent เพื่อทำการลดความสามารถในการละลายของ PHA ในตัวทำละลาย และแยกออกจากตัวทำละลาย



ภาพที่ 27 ผลของชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ต่างกันต่อปริมาณ PHA ที่สกัดได้จากเชื้อ *R. sphaeroides* U7

Figure 27. Effect of different organic solvents on PHA concentration extraction from *R. sphaeroides* U7.

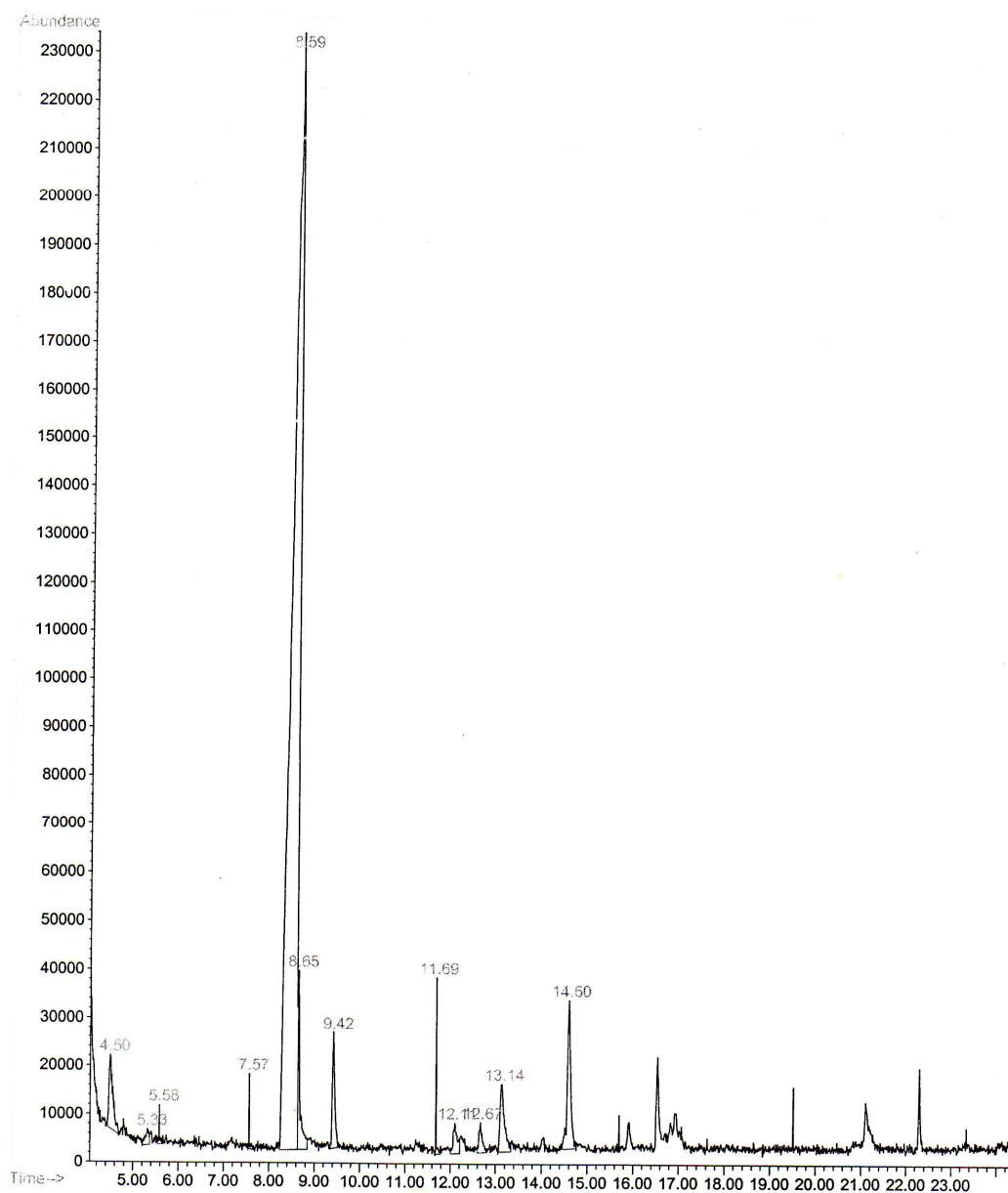
3.5 คุณสมบัติของโคพอลิเมอร์

3.5.1 วิเคราะห์องค์ประกอบย่อยของพอลิเมอร์ด้วย Gas chromatography mass spectrometer; GC-MS

หลังจากการเตรียม methylester ของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดจากเซลล์ของ *Rhodobacter sphaeroides* U7 ด้วย GC-MS ปรากฏโครมาโตแกรมซึ่งแสดงถึง methylester ของมอนอเมอร์ เมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร กลูตามาต-อะซิเตท (glutamate-acetate medium) กับสูตรกลูตามาต-อะซิเตทร่วมกับกรดวาเลอริก (glutamate-acetate-valeric acid medium) พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกลูตามาต-อะซิเตท ส่งเสริมการผลิตโฮโมพอลิเมอร์ เนื่องจากในโครมาโตแกรมมีพีคเด่นเพียง 1 พีคของ methyl hydroxybutyrate และมี retention time เท่ากับ 8.371 นาที (ภาพที่ 28) ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกลูตามาต-อะซิเตทร่วมกับกรดวาเลอริก ส่งเสริมการผลิตโคพอลิเมอร์ เนื่องจากโครมาโตแกรมแสดง 2 พีคเด่นของ methyl hydroxybutyrate ที่ retention time เท่ากับ 8.371 นาที และ methyl hydroxyvalerate ซึ่งมี retention time เท่ากับ 13.36 นาที (ภาพที่ 29)

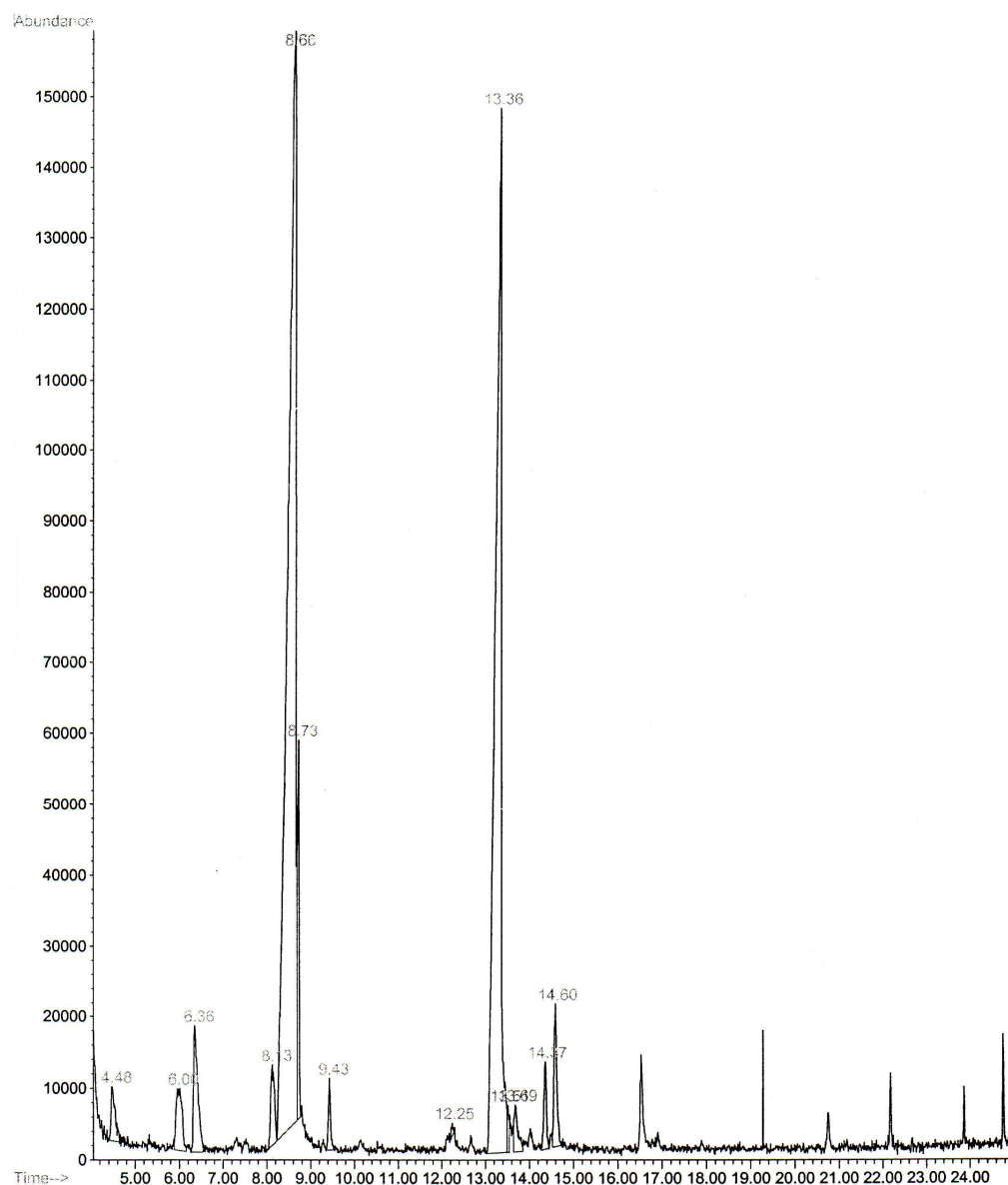
3.5.2 วิเคราะห์หาอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) และอุณหภูมิแข็งตัว (T_c) ของผลึกพอลิเมอร์ ด้วยวิธี DSC

จากการนำพอลิเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารกลูตามาต-อะซิเตทร่วมกับกรดวาเลอริกและพอลิเมอร์มาตรฐานทั้ง PHB และ PHBV (8 % PHV) (ของบริษัท Aldrich) มาศึกษาอุณหภูมิหลอมเหลว และอุณหภูมิแข็งตัวของผลึกพอลิเมอร์ด้วยการใช้เครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10 พบว่าเมื่อมีการให้ความร้อนครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 จะปรากฏพีคของอุณหภูมิหลอมเหลวตัวผลึก (T_m) ที่มีค่าใกล้เคียงกันโดยพีคที่ได้จากพอลิเมอร์ประเภทโฮโมพอลิเมอร์มีลักษณะยอดแหลม และหลังจากการวิเคราะห์พอลิเมอร์มาตรฐาน PHB พบว่ามีค่า T_m เท่ากับ 172.7°C ในขณะที่ค่า glass temperature (T_g) เท่ากับ 1.038°C และค่าอุณหภูมิแข็งตัวของผลึก (T_c) เท่ากับ 121.2°C เมื่อนำพอลิเมอร์มาตรฐาน PHBV ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ประเภทโคพอลิเมอร์ จะปรากฏลักษณะของยอดกว้าง (broad band) ลักษณะพีคดังกล่าวเป็นลักษณะของโคพอลิเมอร์ โดยมีค่า T_m เท่ากับ 156.7°C และค่า T_g เท่ากับ -0.777°C สำหรับค่า T_c มีค่าเท่ากับ 118.866°C แต่เมื่อทำการวิเคราะห์พอลิเมอร์ตัวอย่างที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง U7 พบว่าให้ลักษณะพีคของค่า T_m เป็นลักษณะยอดกว้าง และให้ค่า T_m เท่ากับ 166.033°C ในขณะที่พบว่ามีค่า T_g ลดลงจากพอลิเมอร์ PHB ซึ่งมีค่าเท่ากับ -5.855°C ในขณะที่ T_c มีค่าเท่ากับ 121.033°C



ภาพที่ 28 โครมาโตแกรมของพอลิเมอร์บริสุทธิ์ (วิเคราะห์ด้วย GC-MS) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกลูตามาต-อะซิเตท

Figure 28. Chromatogram of purified polymer (analyzed by GC-MS) from *R. sphaeroides* U7 cultivated in glutamate-acetate medium.



ภาพที่ 29 โครมาโตแกรมของพอลิเมอร์บริสุทธิ์ (วิเคราะห์ด้วย GC-MS) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* U7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกลูตาเมต-อะซิเตท ร่วมกับกรดวาเลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

Figure 29. Chromatogram of purified polymer (analyzed by GC-MS) from *R. sphaeroides* U7 cultivated in glutamate-acetate medium with 40 mM valeric acid.

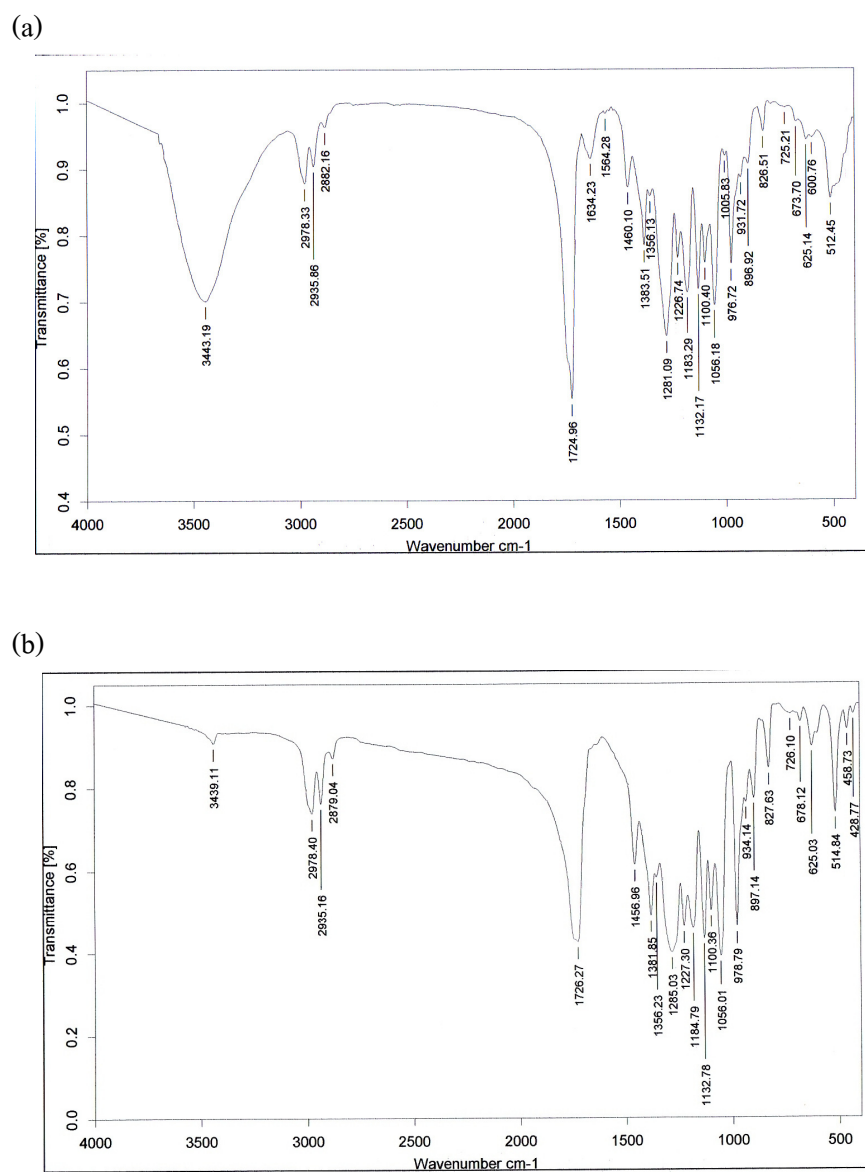
ตารางที่ 10 อุณหภูมิหลอมเหลวตัวผลึก และอุณหภูมิแข็งตัวผลึกของพอลิเมอร์บริสุทธิ์จากเชื้อ *R. sphaeroides* U7 เปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ทางการค้า 4 ชนิด

Table 10. The melting point and crystalline temperature of extracted purified polymer from *R. sphaeroides* U7 compared to other four commercial polymers.

Samples	First heat			Second heat		
	T _g	T _c	T _m	T _g	T _c	T _m
PHB (Aldrich Nature origin)	-	120.5	173.83	1.04	121.2	172.7
PHBV (Aldrich PHV 8%)	-	119.5	150.67	-0.78	118.86	156.7
Polypropylene	-	-	-	-10	176	267
Nylon-6,6	-	-	-	50	190	265
<i>R. sphaeroides</i> U7 extracted polymer	-	120.5	162	-5.86	121.03	166.03

3.5.3 หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์

การศึกษาคุณสมบัติของสารตัวอย่างด้วย Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) เป็นการวัดความเข้มของแสง หรือกำลังของแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆกันอย่างต่อเนื่องเทียบกับเวลา เรียกว่า Time-Domain Spectroscopy หรือโดยทั่วไปเรียกว่า Fourier Transform Spectroscopy จากนั้น Time-Domain Spectroscopy จะถูกเปลี่ยนเป็น frequency-domain spectrum ด้วย Fourier Transform จากการใช้ดิฟเฟอเรนเชียลคอนโวลูชัน โดยทั่วไปแล้วอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีนิยมใช้เป็นเทคนิคสำหรับหาหรือพิสูจน์เกี่ยวกับโครงสร้างของสารอินทรีย์ ซึ่งจะปรากฏออกมาที่ความถี่ต่างๆกัน โดยตารางแสดงรายการของ wave number กับฟังก์ชันหลักที่ดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ปานกลางและดีมาก (Oliveira *et al.*, 2007) พิจารณาจากเมื่อทำการวิเคราะห์พอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *R. sphaeroides* U7 ด้วยเทคนิค FT-IR เปรียบเทียบกับ PHBV (12% PHV ของบริษัท Aldrich) ผลของสเปกตรัมที่เกิดขึ้นแสดง **ดังภาพที่ 30** และเมื่อพิจารณาสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ กับ



ภาพที่ 30 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *R. sphaeroides* U7 (a) เปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ PHBV มาตรฐาน (b)

Figure 30. The intrared spectrum of extracted purified polymer and standard PHBV compound from *R. sphaeroides* U7 by FT-IR (a) extracted purifying polymer (b) standard PHBV.

พอลิเมอร์ PHBV มาตรฐาน พบว่าสเปกตรัมของทั้งสองมีความคล้ายคลึงกัน และเนื่องด้วยพอลิเมอร์ PHBV เป็นพอลิเมอร์ที่ทราบโครงสร้างหลักหรือสูตรโครงสร้างที่แน่นอนจึงทำให้สามารถวิเคราะห์และพิจารณาสเปกตรัมที่เกิดขึ้นได้ง่าย ประกอบกับการเทียบเคียงกับสเปกตรัมของพอลิเมอร์ PHBV มาตรฐาน จึงทำให้ผลของการวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น โดยสามารถระบุสเปกตรัมเด่นๆของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *R. sphaeroides* U7 ดังตารางที่ 11 เมื่อพิจารณาอินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *R. sphaeroides* U7 พบว่าในตำแหน่งความถี่เท่ากับ 3443.19 ซึ่งเป็นตำแหน่งของอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่ไฮดรอกซิล โดยพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ให้ค่าสเปกตรัมในช่วงกว้างอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นถึงปริมาณของหมู่ไฮดรอกซิลที่มีมากอันอาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างอาจมีความชื้นของตัวอย่างสูงจึงทำให้เกิดสเปกตรัมของหมู่ไฮดรอกซิลที่มาจากโมเลกุลของน้ำ แต่ไม่ได้เป็นผลมาจากขั้นตอนการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่มีการทำลายโครงสร้างของพอลิเมอร์จากสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ทำให้พอลิเมอร์มีขนาดสั้นลง และมีผลให้เกิดหมู่ไฮดรอกซิลอิสระของปลายพอลิเมอร์สายสั้นๆ เพราะการวิเคราะห์ด้วย FT-IR เป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์หรือคุณลักษณะของสาร ดังนั้นพอลิเมอร์ที่ใช้วิเคราะห์จะมีปริมาณหรือจำนวนโมเลกุลมากหรือน้อยสเปกตรัมจะเกิดขึ้นเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 11 สเปกตรัมที่เกิดขึ้น และ wave number (วิเคราะห์ด้วย FT-IR) ของหมู่ฟังก์ชันที่ดูดกลืนแสงจากพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *R. sphaeroides* U7

Table 11. The dominant spectrum and wave number (analyzed by FT-IR) of extracted purified polymer from *R. sphaeroides* U7.

Frequency (cm ⁻¹)	Functional group
3443.19	OH (H ₂ O, ROH, PhOH)
2978.33	-CH ₂ - , -CH ₃ (C-H stretching)
2935.86	-CH ₂ - , -CH ₃ (C-H stretching)
2882.16	C-H (C-H stretching)
1724.96	C=O (ester)
1460	-CH ₂ -, -CH ₃ - (C-H deformations)
1383	-CH ₃ (-CH ₃ symmetrical deformation)
725	-CH ₂ (CH ₂ rocking)

3.5.4 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของโพลีเมอร์

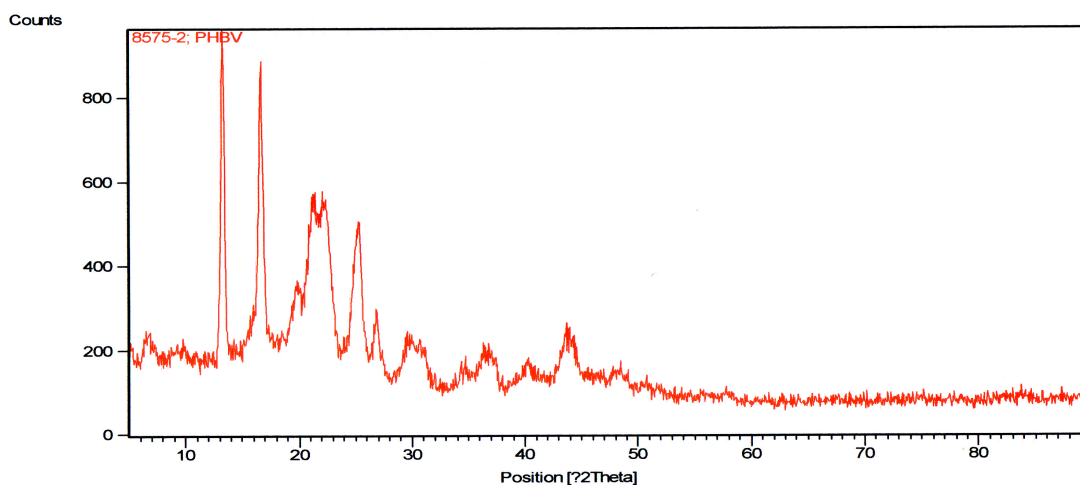
การวัดค่ามวลโมเลกุลโดยวิธีการวัดความหนืดนั้นมีความเกี่ยวข้องกับขนาดของโมเลกุล และลักษณะการจัดตัวของโมเลกุล ไม่เกี่ยวข้องกับน้ำหนักหรือมวลของโมเลกุลแต่อย่างใด ดังนั้นค่ามวลโมเลกุลที่วัดได้ด้วยวิธีวัดความหนืดจึงไม่ใช่ทั้งค่า number-averaged molecular weight (M_n) และ weight-averaged molecular weight (M_w) แต่เป็นค่ามวลโมเลกุลเฉลี่ยเชิงความหนืด (viscosity-average molecular weight, M_v) โดยมีความสัมพันธ์กับค่า M_n และ M_w ดังนี้ $M_n < M_v \leq M_w$ โดยความสัมพันธ์ของ M_n , M_w และ M_v มีความเกี่ยวข้องกับค่า a ซึ่งเป็นค่าคงที่ที่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการละลายของสารพอลิเมอร์ในตัวทำละลาย และการจัดรูปร่างของโมเลกุลสารพอลิเมอร์ในสารละลาย โดยจะมีค่าอยู่ในช่วง $0 \leq a \leq 1$ ซึ่งเมื่อ a เท่ากับ 0 สารพอลิเมอร์ไม่ละลายในตัวทำละลายที่กำหนด เมื่อ a เท่ากับ 0.5 สารพอลิเมอร์สามารถละลายในตัวทำละลายที่กำหนดได้บ้างและมีแรงกระทำระหว่างโมเลกุลสารพอลิเมอร์กับสารตัวทำละลายน้อยมาก ทำให้โมเลกุลสารพอลิเมอร์มีการจัดตัวแบบขดกลม (coil or sphere) แต่กรณีที่ a เท่ากับ 1 สารพอลิเมอร์สามารถละลายในตัวทำละลายที่กำหนดให้เป็นอย่างดี มีแรงกระทำระหว่างโมเลกุลสารพอลิเมอร์กับสารตัวทำละลายสูงมาก ทำให้โมเลกุลสารพอลิเมอร์มีการจัดตัวแบบเชิงเส้น (linear or rod) แต่สำหรับค่า a ของสารละลายพอลิเมอร์โดยทั่วไปมีค่าอยู่ในช่วง 0.6-0.8 ที่อุณหภูมิคงที่หนึ่งๆ จากค่า a ในช่วงดังกล่าวจึงมีแรงกระทำระหว่างโมเลกุลพอลิเมอร์กับตัวทำละลายพอสมควร โมเลกุลพอลิเมอร์มีการจัดตัวในลักษณะขดตัวแบบสุ่ม (random coil) สำหรับการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ PHBV สามารถกำหนดค่า a ได้เป็น 0.78 ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม (Luo and Netravali, 2003) และผลจากการทดลองจะได้ค่า intrinsic viscosity $[\eta]$ ซึ่งเป็นค่าความหนืดของสารละลาย เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับศูนย์ และคำนวณน้ำหนักโมเลกุลตามสมการของ Mark Houwick Sakurada Equation โดยกำหนดค่า K เท่ากับ 1.18×10^{-4} (Luo and Netravali, 2003)

จากการทดลองพบว่าพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *R. sphaeroides* U7 ให้ค่าของน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ 200,000 ถึง 500,000 ดาลตัน ซึ่งสามารถอธิบายผลการทดลองดังกล่าวได้ว่าเป็นผลมาจากสารสกัดในขั้นตอนการแยกแกรนูล PHA ออกจากเซลล์ของ *R. sphaeroides* U7 ซึ่งวิธีการที่ใช้เป็น Gravimetric method มีการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็นสาร oxidizing agent เพื่อทำลายผนังเซลล์ให้เซลล์แตกและสามารถละลายส่วนที่เป็น cell pellet เกือบทั้งหมดยกเว้น PHA granule จากนั้นจึงทำการหมุนเหวี่ยงแยก PHA ออกมาเพื่อทำบริสุทธิ์ต่อไป ในขั้นตอนของการย่อยเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์นั้นไม่ควรใช้เวลานานจนเกินไป ช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง (Hahn et al., 1994) การใช้เวลาในการย่อยด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์นานเกินไปจะมีผลทำให้เกิดการ

แตกหักของสายพอลิเมอร์ทำให้มีสายพอลิเมอร์สั้นลง ทำให้เมื่อทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล จึงให้ค่าที่แตกต่างกัน นอกเหนือจากระยะเวลาในการย่อยเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์อีกสิ่งหนึ่งที่สามารถเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดการลดขนาดสายของพอลิเมอร์นั้นคือความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ ซึ่งความเข้มข้นสูงจะมีโอกาสทำลายสายพอลิเมอร์ได้สูงกว่าความเข้มข้นต่ำ ในทางตรงกันข้ามการใช้ความเข้มข้นของ ตัวทำลายต่ำเกินไปมีผลให้เซลล์แตกไม่สมบูรณ์ หรือไม่สามารแยก PHA granule ออกจากตะกอนเซลล์ ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์และระยะเวลาในการย่อยเซลล์จึงมีส่วนสำคัญต่อขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุล ดังนั้นเมื่อมีการใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์มากขึ้นควรใช้เวลาให้น้อยลง

3.5.5 ค่าการเกิดผลึก (Crystallinity) ของผลึกพอลิเมอร์

จากการศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติเบื้องต้นของ PHA กลุ่มโฮโมพอลิเมอร์ได้แก่ PHB พบว่าจะมีคุณสมบัติโดยทั่วไปคือแข็งแต่เปราะ ดังนั้นการผลิตโคพอลิเมอร์เพื่อมาทดแทนการใช้โฮโมพอลิเมอร์นั้น จึงต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของความคงทนของโครงสร้างของพอลิเมอร์เมื่อทำการขึ้นรูปเป็นภาชนะ การใช้เครื่อง X-ray diffractometer สำหรับวิเคราะห์การเกิดผลึก (crystallinity) ของพอลิเมอร์จึงมีความจำเป็น เพื่อประเมินถึงความเหมาะสมของสัดส่วนของพอลิเมอร์ที่ประกอบขึ้นจากมอนอเมอร์ทั้งแบบ block และ random polymer หรืออีกนัยหนึ่งเพื่อพิจารณาความแข็งแรงทนทานหรือความคงทนของพอลิเมอร์ที่ผลิต โดยค่าการเกิดผลึกจะรายงานในรูปของระดับการเกิดผลึก (degree of crystallinity) ซึ่งการมีค่า crystallinity สูงควรมีค่าสูงกว่า 50% (Doi, 1990) จากการวิเคราะห์ PHBV ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จากเชื้อ *R. sphaeroides* U7 พบว่ามี % crystallinity เท่ากับ 66.84 ซึ่งมีค่ามากกว่า 50 % จึงจัดว่าพอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีความคงทน หรือความแข็งแรงค่อนข้างสูง ในการนำค่า % crystallinity มาใช้ประกอบการวิเคราะห์ชนิดของพอลิเมอร์ว่าเป็นโฮโมพอลิเมอร์ หรือ โคพอลิเมอร์นั้นจำเป็นต้องใช้คุณสมบัติหรือเทคนิคอื่นมาเสริมกันเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ การใช้เกณฑ์ % crystallinity ที่มีค่าสูงกว่า 50 % ยังไม่สามารถชี้ชัดได้ เนื่องจาก PHB ซึ่งมี 0 % PHV มีค่า % crystallinity เท่ากับ 55 % แต่แนวโน้มของค่า % crystallinity ของพอลิเมอร์ที่มีค่าสูงจะมีโอกาสเป็นพอลิเมอร์กลุ่มโคพอลิเมอร์ ดังนั้นค่า % crystallinity ควรมากกว่าหรือเท่ากับ 55 % (Doi, 1990) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า % crystallinity กับพอลิโพรไพลีน และไนลอน พบว่าให้ค่าเท่ากับ 30-50 และ 40-60% ตามลำดับ จากการที่ค่า % crystallinity ของโคพอลิเมอร์มีค่าสูง น่าจะเป็นผลเนื่องมาจากโครงสร้างของโคพอลิเมอร์ มีความเป็น amorphous มากกว่าโฮโมพอลิเมอร์ จึงทำให้โครงสร้างมีความยืดหยุ่นหรือเหนียวเพิ่มขึ้น (Doi, 1990) รูปแบบของฟิล์มที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์พอลิเมอร์ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer แสดงดังภาพที่ 31



ภาพที่ 31 รูปแบบที่เกิดขึ้นของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จากเชื้อ *R. sphaeroides* U7 ในสารละลายคลอโรฟอร์ม ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer

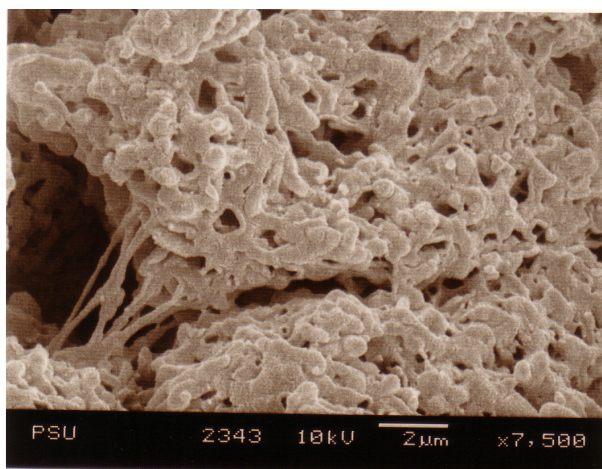
Figure 31. X-ray diffraction patterns from polymer extracted from *R. sphaeroides* U7 in a chloroform solution analyzed by X-ray diffractometer.

3.5.6 ลักษณะผลึกกายภาพของพอลิเมอร์

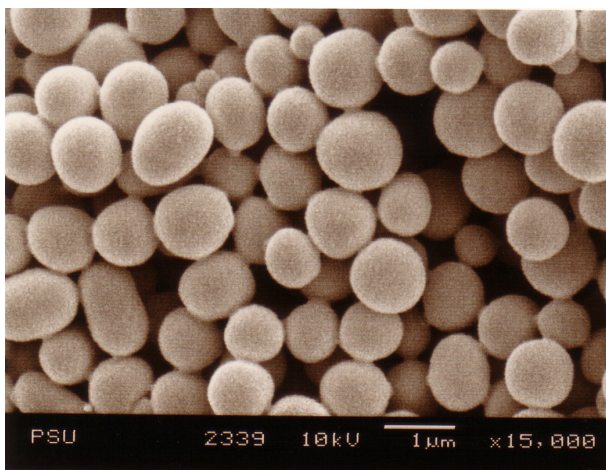
หลังจากการสกัด PHA จากเซลล์ *R. sphaeroides* U7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือคลอโรกซ์ เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอะซิโตนและล้างด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ 99.8% เก็บส่วนของตะกอนที่ได้แล้วละลายด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม ให้ความร้อนเพื่อให้ PHA ละลายอย่างสมบูรณ์ ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาตกตะกอนด้วยเฮกเซน แล้วกรองจะได้ตะกอน PHA จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่ 80 องศาเซลเซียส นำตะกอน PHA ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเฮกเซนมาศึกษาคุณลักษณะหรือคุณสมบัติด้วยเครื่อง scanning electron microscopy (SEM) เพื่อพิจารณาขนาดและรูปร่างของตะกอน PHA พบว่าในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ PHA ด้วยการละลายในสารละลายคลอโรฟอร์มนั้น การเตรียมพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดจาก *R. sphaeroides* U7 ความเข้มข้นในสารละลายคลอโรฟอร์มนั้น เมื่อทำการตกตะกอน PHA ด้วยเฮกเซน ตะกอนที่ได้จะเป็นตะกอนสีขาว มีลักษณะฟูคล้ายโฟม มีการเชื่อมต่อกันของอนุภาค PHA และมีรูพรุนเกิดขึ้นดังภาพที่ 32 (a) อันเป็นผลมาจากการลดความสามารถในการละลายในตัวทำละลายอย่างทันทีด้วยสารละลายที่จัดเป็น non solvent ซึ่งในกรณีนี้เป็นเฮกเซน โดยสามารถเกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซนได้ดีกว่าคลอโรฟอร์มกับ PHBV หรืออาจกล่าวว่าการเติมเฮกเซนเป็นการลดค่า dielectric constant ของ PHBV ทำให้ไม่สามารถเกิดแรงดึงดูดระหว่าง

โมเลกุลของพอลิเมอร์กับตัวทำละลาย จึงทำให้พอลิเมอร์ตกตะกอน แต่แทนที่จะตกตะกอนลงอย่างช้าๆอย่างต่อเนื่อง กลับมีผลให้เกิดการตกตะกอนตกตะกอนอย่างรวดเร็วทำให้อนุภาคของ PHBV ไม่สามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน จึงมีการเชื่อมต่อกันของอนุภาคมีลักษณะเป็นเส้นสาย ในขณะที่การเตรียมตัวอย่างเพื่อตกตะกอนด้วยเฮกเซนในความเข้มข้นที่ไม่สูงเกินไป คือไม่มีการระเหยตัวทำละลาย ตะกอน PHA ที่เกิดขึ้นจะเป็นผงสีขาว มีลักษณะเป็นอนุภาคทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.7-1.0 μm ดังภาพที่ 32 (b)

(a)



(b)



ภาพที่ 32

ภาพถ่าย scanning electron micrograph แสดงลักษณะตะกอน PHBV ที่ได้จากการสกัดและตกตะกอนด้วยเฮกเซนเมื่อเตรียมในคลอโรฟอร์มความเข้มข้นต่างกัน

(a) PHBV จากการเตรียมในความเข้มข้นสูงในสารละลายคลอโรฟอร์ม ใช้กำลังขยาย 7500 เท่า

(b) PHBV จากการเตรียมในความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายคลอโรฟอร์ม ใช้กำลังขยาย 15,000 เท่า

Figure 32.

Scanning electron micrograph of PHBV extracted and precipitated with different concentration of n-hexane.

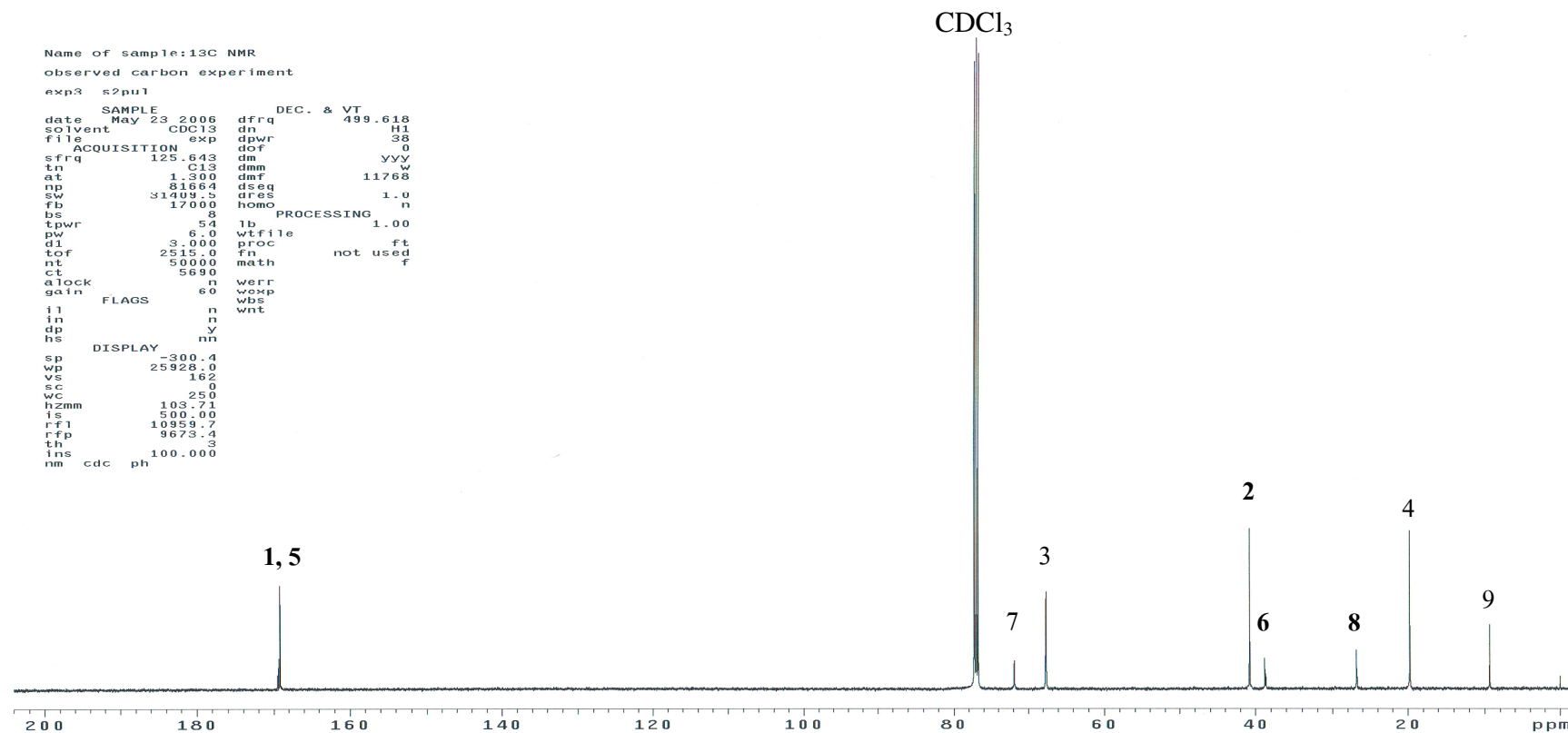
(a) PHBV obtained by using high concentration of chloroform (x7500).

(b) PHBV obtained by using optimal concentration of chloroform (x15,000).

3.5.7 สัดส่วนองค์ประกอบมอนอเมอร์ของพอลิเมอร์

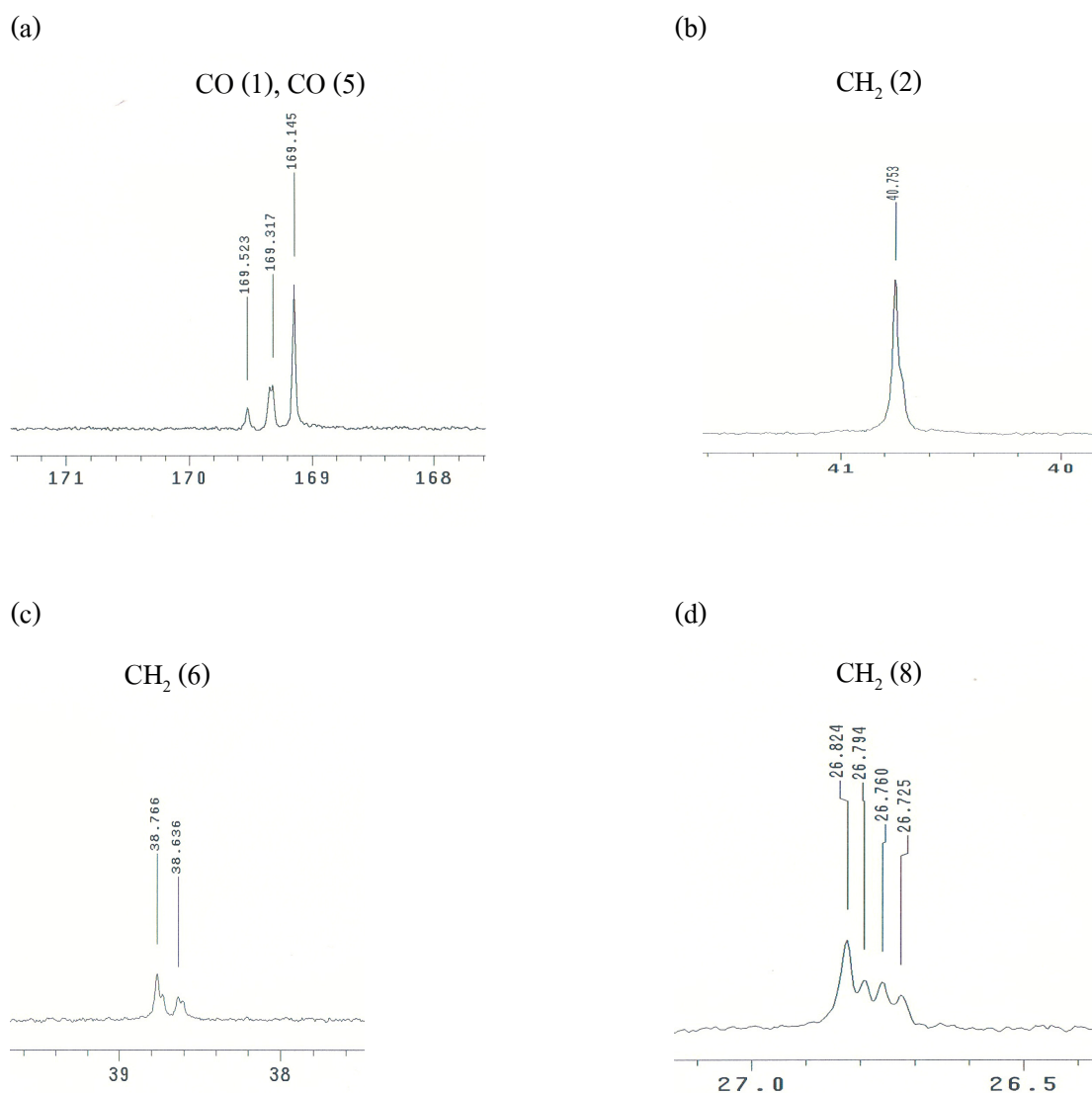
หลังจากการสกัด PHA จากเซลล์ *R. sphaeroides* U7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือคลอโรกซ์ เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอะซิโตนและล้างด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ 99.8% เก็บส่วนของตะกอนที่ได้ละลายด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม ให้ความร้อนเพื่อให้ PHA ละลายอย่างสมบูรณ์ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้ จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาตกตะกอนด้วยเฮกเซน แล้วกรองจะได้ตะกอน PHA จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่ 80 องศาเซลเซียส นำตะกอน PHA ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเฮกเซนมาศึกษาคุณลักษณะหรือคุณสมบัติด้วย 500 MHz ^{13}C -NMR โดยนำพอลิเมอร์ที่ได้ละลายในสารละลายคลอโรฟอร์มแล้วนำมาพิจารณาถึง chemical shift เพื่อให้ง่ายต่อการเข้าใจจะกำหนด 3HB และ 3HV ด้วยสัญลักษณ์ B กับ V ตามลำดับ ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 32 ซึ่งพบว่าในช่วง 169.1-169.6 ppm จะพบกลุ่มของสเปกตรัมของหมู่คาร์บอนิล เมื่อพิจารณาอย่างละเอียดพบว่าประกอบด้วย 3 พิกหลัก ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องจากความแตกต่างของมอนอเมอร์ระหว่าง 3HB และ 3HV โดยสามารถพิจารณาแยกแต่ละพิกได้ว่า ที่ตำแหน่ง 169.14 ppm เป็นส่วนของหมู่คาร์บอนิลที่ได้จากลำดับของมอนอเมอร์แบบ BB ซึ่งเป็นสเปกตรัมที่เกิดขึ้นอย่างเช่นเดียวกันเมื่อเทียบกับสเปกตรัมของ PHB homopolymer สำหรับพิกที่ตำแหน่ง 169.31, 169.34 และ 169.51 ppm สามารถพิจารณาได้ว่าเป็นส่วนของหมู่คาร์บอนิลที่ได้จาก BV, VB และ VV ตามลำดับ เมื่อพิจารณาพิกที่ 2, 6 และ 8 ซึ่งเป็นพิกของ CH_2 พบว่าในตำแหน่งที่ 2 ซึ่งอยู่ในช่วง 40.6-41.0 ppm ซึ่งจะสามารถเกิดจาก BV และ BB ที่ตำแหน่ง 40.8 และ 40.85 ppm ตามลำดับ ในขณะที่ CH_2 ของพิกที่ 6 อยู่ในช่วง 38.7-38.9 ppm ซึ่งจะสามารถเกิดจาก VV*V, BV*V, VV*B และ BV*B ตามลำดับ สำหรับพิกที่ 8 สามารถเกิดจาก VV*V, BV*V, VV*B และ BV*B ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 33

จากค่า chemical shift และ peak number ที่ปรากฏข้างต้นสามารถระบุถึงตำแหน่งของคาร์บอนภายในโครงสร้างของ PHBV (ตารางที่ 12) ซึ่งโคพอลิเมอร์ชนิด PHBV ประกอบขึ้นด้วย 2 มอนอเมอร์คือ 3HB และ 3HV ประกอบกันเป็นหน่วยย่อยของพอลิเมอร์ จึงทำให้ค่าสเปกตรัมที่เกิดขึ้นเป็นค่าที่ได้มาจากมอนอเมอร์ทั้งสอง



ภาพที่ 33 สเปกตรัมที่เกิดขึ้นของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *R. sphaeroides* U7

Figure 33. The typical 500 MHz ^{13}C -NMR spectrum of extracted purified polymer from *R. sphaeroides* U7.



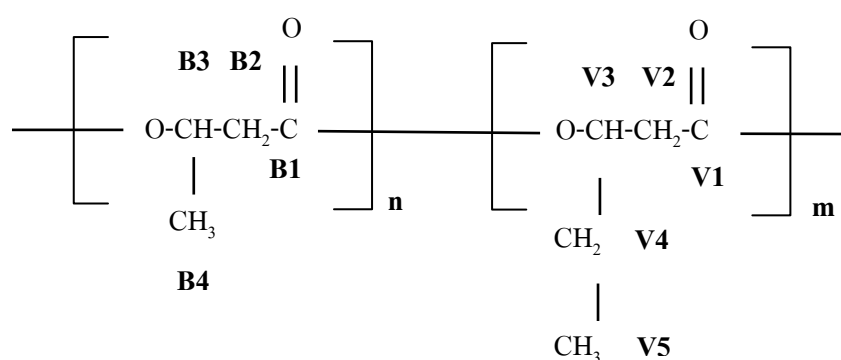
ภาพที่ 34 สเปกตรัมที่เกิดขึ้นของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์จาก *R. sphaeroides* U7 ด้วยการใช้อยู่ 500 MHz ¹³C-NMR สำหรับการบ่งชี้ถึงคุณลักษณะของพอลิเมอร์
 (a) CO (1), CO (5) (b) CH₂ (2) (c) CH₂ (6) (d) CH₂ (8)

Figure 34. The typical 500 MHz ¹³C-NMR spectrum of extracted purified polymer from *R. sphaeroides* U7.

(a) CO (1), CO (5) (b) CH₂ (2) (c) CH₂ (6) (d) CH₂ (8)

ตารางที่ 12 ค่า chemical shift และ peak number (วิเคราะห์ด้วย 500 MHz ^{13}C -NMR) ของพอลิเมอร์บริสุทธิ์จาก *R. sphaeroides* U7 สำหรับพิจารณาอะตอมของคาร์บอนในแต่ละมอนอเมอร์ที่ต่อกันในโครงสร้างของพอลิเมอร์

Table 12. Chemical shift and peak number (analyzed by 500 MHz ^{13}C -NMR) of extracted purified polymer from *R. sphaeroides* U7 to determine carbon atom in each monomer of polymer structure.



Chemical shift (ppm)	Peak number	Carbon position
169	1, 5	B1
40	2	B2
68	3	B3
20	4	B4
169	1, 5	V1
38	6	V2
72	7	V3
27	8	V4
9	9	V5

สัญลักษณ์ B ใช้แทน hydroxybutyrate (HB)

สัญลักษณ์ V ใช้แทน hydroxyvalerate (HV)

B; hydroxybutyrate (HB)

V; hydroxyvalerate (HV)