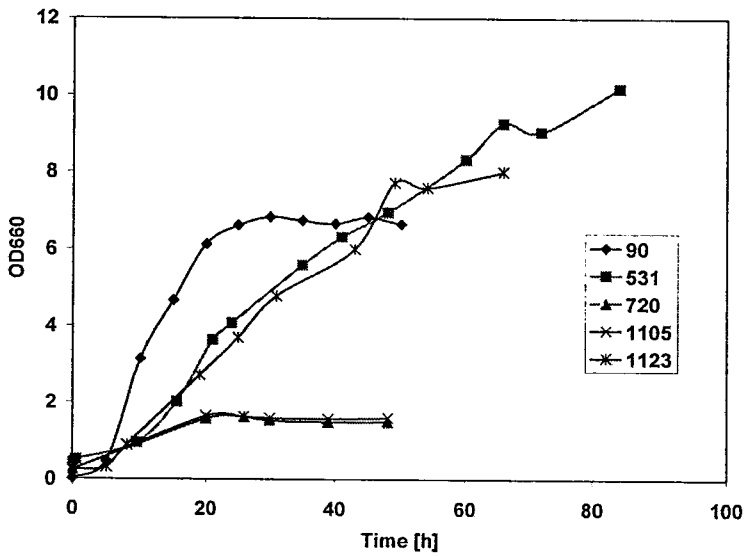
3. ผลการทดลอง

3.1 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดต่างๆในอาหารสูตร DSMZ

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่สามารถผลิต PHB ได้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร DSMZ ที่มีกลูโคสและแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ พบว่า *Bacillus megaterium* (90) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงเริ่มต้นและสูงกว่าสายพันธุ์อื่น เมื่อบ่มเชื้อไปได้ 24 ชั่วโมง การเจริญเติบโตจะขึ้นสูงสุดหลังจากนั้นเริ่มคงที่ ในขณะที่ *Alcaligenes eutrophus* (531) และ *Azohydromonas lata* (1123) มีการเจริญเติบโตค่อนข้างเป็นเส้นตรงตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงชั่วโมงที่ 88 และ 60 ตามลำดับ ส่วน *Azotobacter vinelandi* (720) และ *Ralstinia eutropha* (1105) มีการเจริญเติบโตต่ำกว่าสายพันธุ์อื่นประมาณ 3 เท่า และหลังจากบ่มเชื้อได้ 24 ชั่วโมงการเจริญเติบโตจะสูงสุดและเริ่มคงที่ (รูปที่ 3.1)

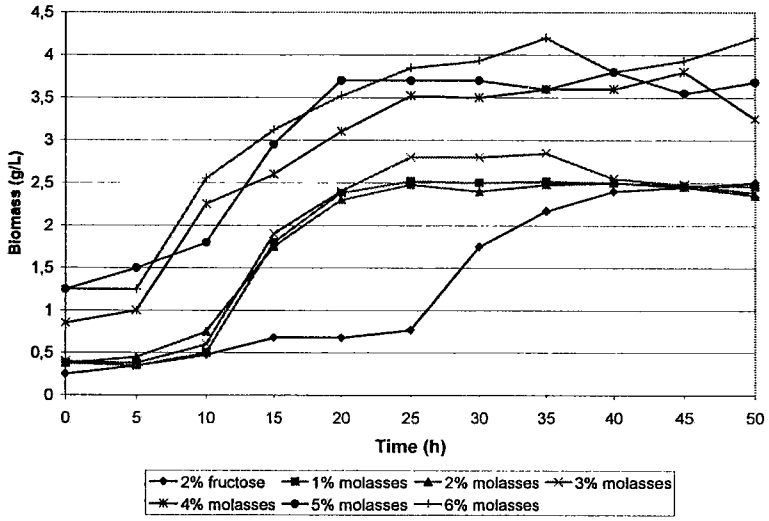


รูปที่ 3.1 อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารสูตร DSMZ

3.2 ความเข้มข้นของกากน้ำตาลและน้ำแช่ข้าวโพดที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

3.2.1 การเจริญเติบโตของ *B. megaterium* ในอาหารที่มีกากน้ำตาลร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์

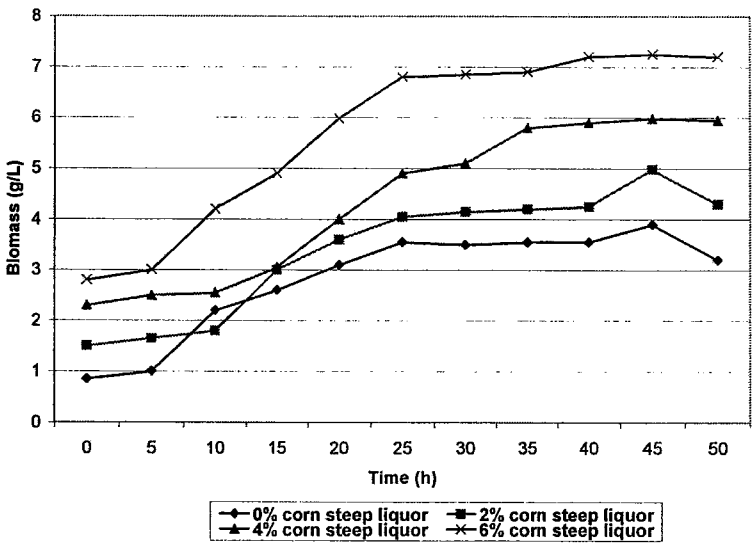
จากการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* โดยใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนแทนที่ฟรุคโตสของสูตรอาหาร DSMZ โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่มีความเข้มข้นคงที่ตามสูตรของ DSMZ จากการวัดน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาล 4% 5% และ6% มีอัตราการเจริญเติบโตสูงใกล้เคียงกัน หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 50 ชั่วโมง ปริมาณชีวมวลที่เลี้ยงในกากน้ำตาลความเข้มข้น 6% มีน้ำหนักแห้งเซลล์มากที่สุดคือ 4.2 g/L (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.2 การเจริญเติบโตของ *B. megaterium* ในอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นแตกต่างกันร่วมกับแอมโมเนียคลอไรด์ความเข้มข้นระดับหนึ่ง

3.2.2 การเจริญเติบโตของ *B. megaterium* ในกากน้ำตาลร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพด

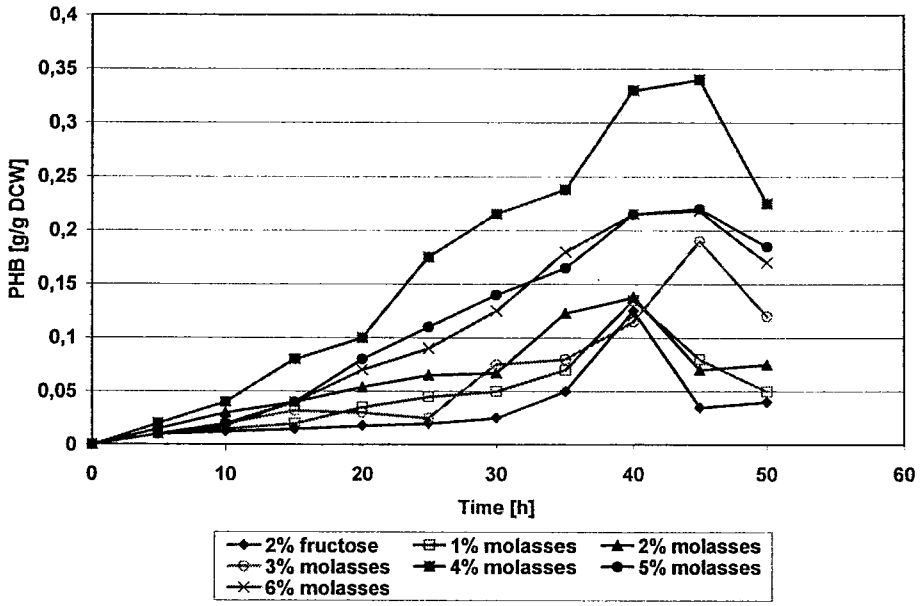
จากการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* โดยเลือกใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถให้การเจริญเติบโตสูงสุดคือ 4% ร่วมกับการแปรผันน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าความเข้มข้นของน้ำแช่ข้าวโพด 6% ให้การเจริญเติบโตสูงสุด มีปริมาณน้ำหนักแห้งมากที่สุดหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 50 ชั่วโมง คือ 7.29 g/L (รูปที่ 3.3)



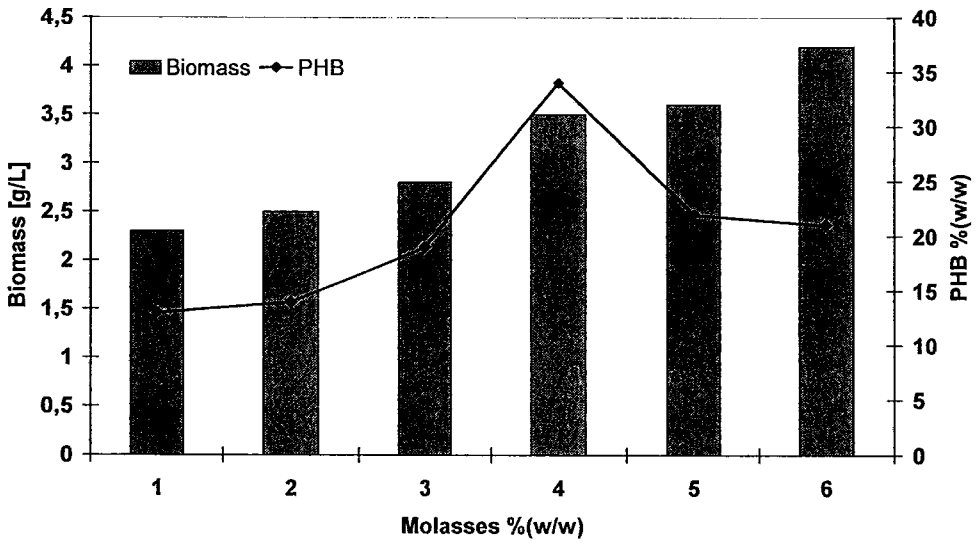
รูปที่ 3.3 การเจริญเติบโตของ *B. megaterium* ในอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 4% ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้นแตกต่างกัน วัดจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.3 การผลิต PHB ของ *B. megaterium* ในอาหารกากน้ำตาลร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์

การเพาะเลี้ยง *B. megaterium* ในอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 4% นำมาสกัด PHB ด้วยตัวทำละลายละลาย Chloroform พบว่าให้ปริมาณ PHB มากที่สุด 0.346 g/g น้ำหนักเซลล์แห้ง (รูปที่ 3.4) หลังจากบ่มเชื้อได้ 45 ชั่วโมง ซึ่งที่สภาวะนี้ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) 3.8 g/L สามารถผลิต PHB ได้ 1.32 g/L หรือ 34.6% (w/w) (รูปที่ 3.5)



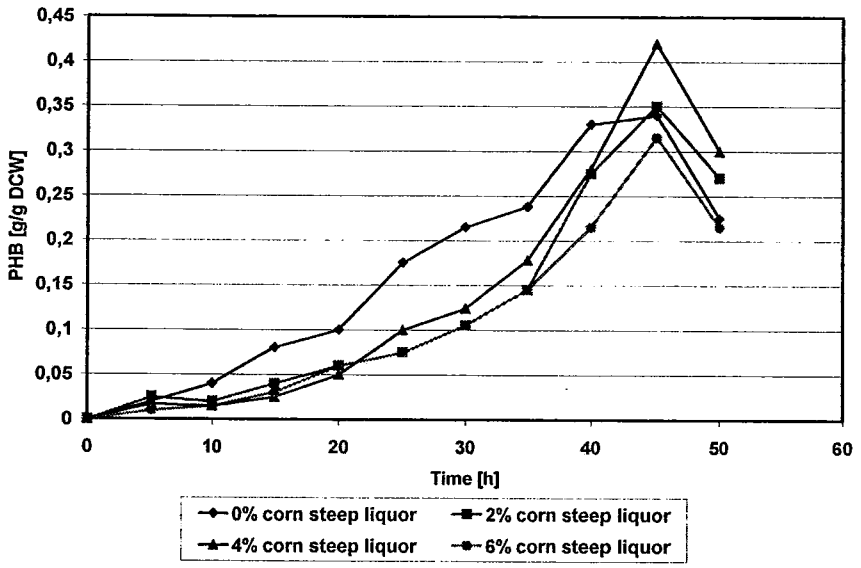
รูปที่ 3.4 ปริมาณ PHB ที่สกัดจากเซลล์ *B. megaterium* หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นแตกต่างกัน ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นคงที่



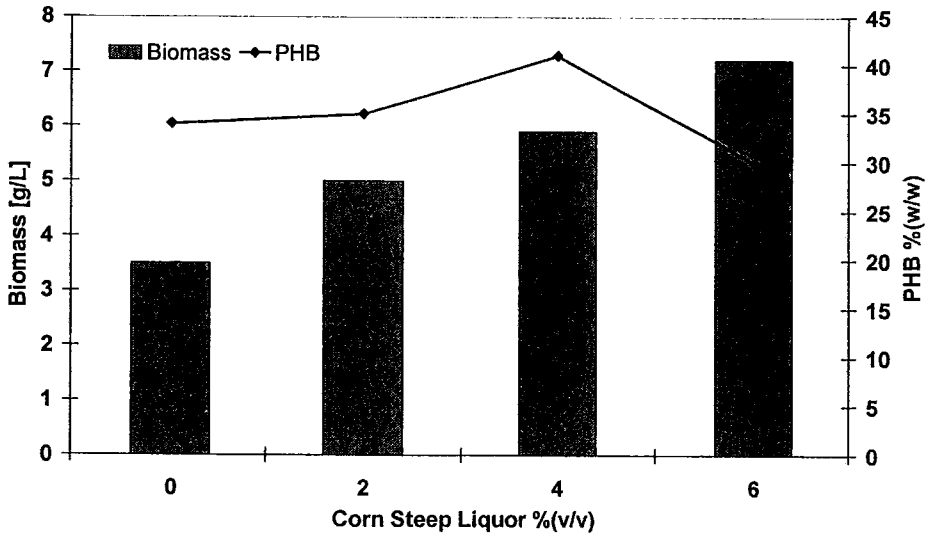
รูปที่ 3.5 ปริมาณชีวมวลและ PHB ของ *B. megaterium* หลังจากเพาะเลี้ยง 45 ชั่วโมง ในอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นแตกต่างกัน ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นคงที่

3.2.4 การผลิต PHB ของ *B. megaterium* ในอาหารกากน้ำตาลร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพด

จากการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* ในอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 4% ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพด 4% มีปริมาณ PHB มากที่สุด คือ 0.413 g/g น้ำหนักเซลล์แห้ง หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 45 ชั่วโมง (รูปที่ 3.6) ซึ่งที่สภาวะนี้ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) 6 g/L สามารถผลิต PHB ได้ 2.48 g/L หรือ 41.3% (w/w) (รูปที่ 3.7)



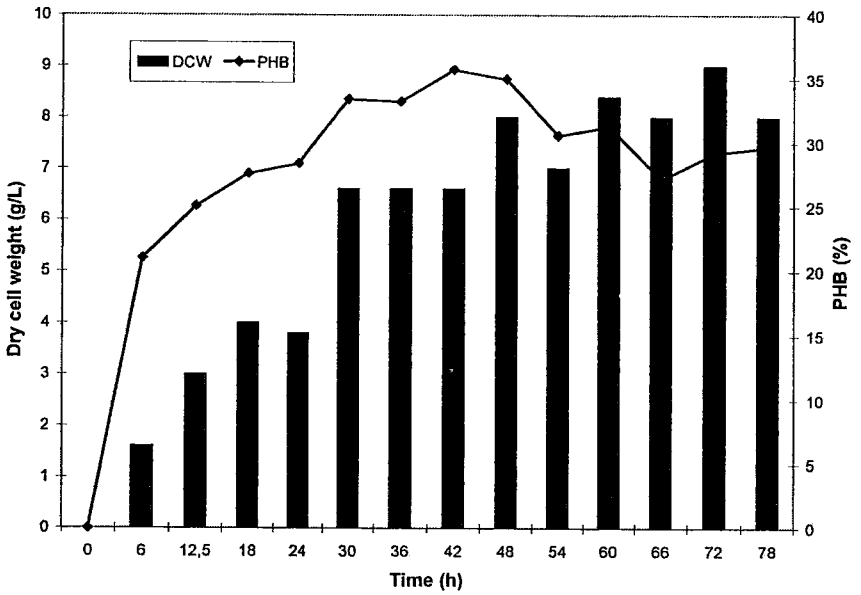
รูปที่ 3.6 ปริมาณ PHB ที่สกัดจาก *B. megaterium* หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกากน้ำตาล 4% ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้นแตกต่างกัน



รูปที่ 3.7 ปริมาณชีวมวลและ PHB ของ *B. megaterium* หลังจากเพาะเลี้ยง 45 ชั่วโมง ในอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 4% ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้นแตกต่างกัน

3.3 การจริญเติบโตและการผลิต PHB ของ *Alcaligenes eutrophus*

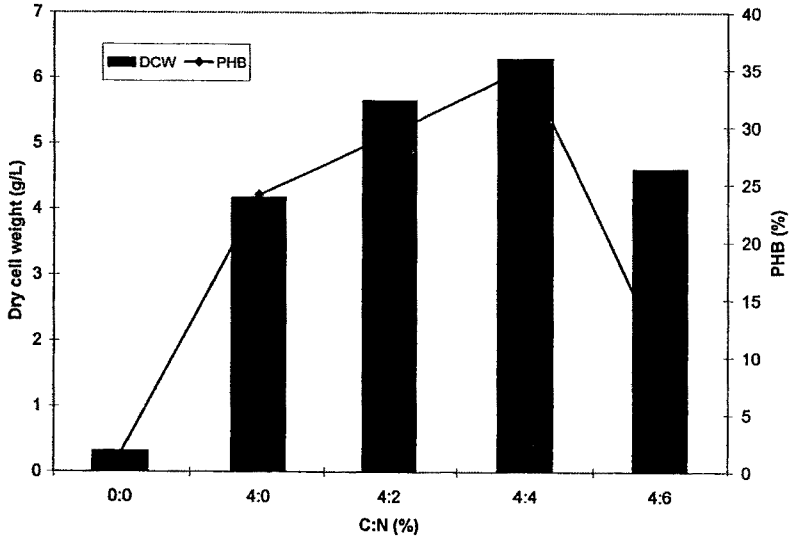
การใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4% ร่วมกับกากน้ำตาลความเข้มข้น 4% เป็นอาหารเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* พบว่าชั่วโมงที่ 42 ให้การผลิต PHB สูงสุด 2.1 g/L หรือ 35% (w/w) มีการเจริญเติบโตให้น้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) 6.6 g/L (รูปที่ 3.8)



รูปที่ 3.8 การเจริญเติบโตและการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 4% ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4%

3.3.1 อัตราส่วน C:N ที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB

อัตราส่วน C:N ที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* เหมือนกับ *B. megaterium* คือ ความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อน้ำแช่ข้าวโพด 4:4 (%) ให้ปริมาณ PHB สูงสุด 1.96 g/L หรือ 35% (w/w) ให้การเจริญเติบโตมีน้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) 6.3 g/L (รูปที่ 3.9)

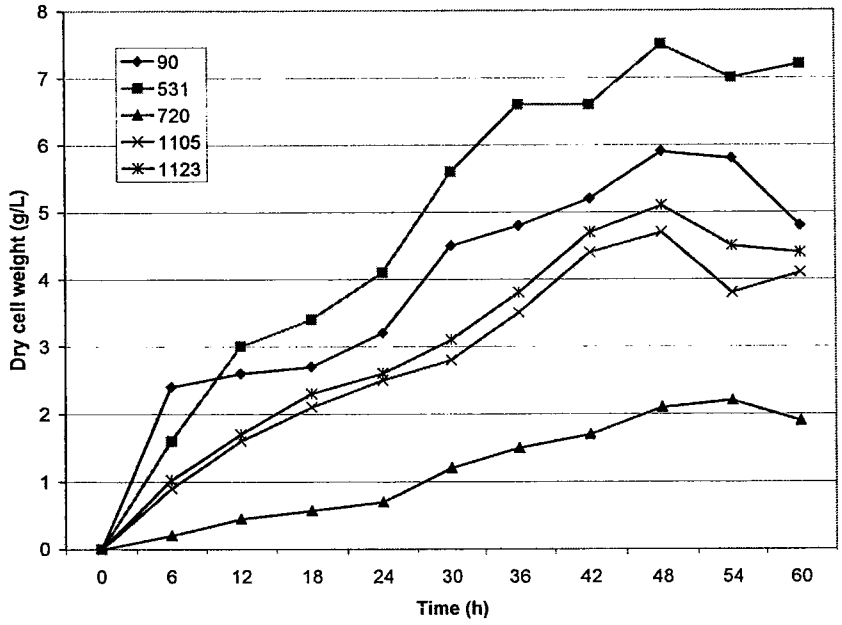


รูปที่ 3.9 อัตราส่วนความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อน้ำแช่ข้าวโพด (C:N) ที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ของ *A. eutrophus*

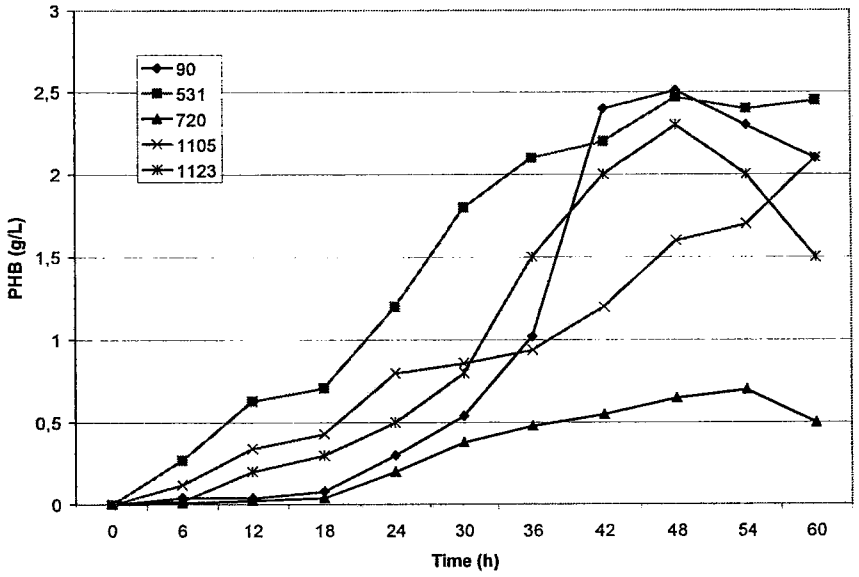
3.4 การเจริญเติบโตและการผลิต PHB ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 4% ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4% พบว่า *A. eutrophus* (531) ให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดหลังจากเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง รองลงไปได้แก่ *B. megaterium* (90) *Azohydromonas lata* (1123) *Ralstonia eutropha* (1105) และ *Azotobacter vinelandi* (720) ตามลำดับ (รูปที่ 3.10)

ส่วนการผลิต PHB พบว่า *A. eutrophus* (531) และ *B. megaterium* (90) จะให้การผลิต PHB สูงสุดเท่ากันคือ 2.5 g/L หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 48 ชั่วโมง รองลงไปคือ *Azohydromonas lata* (1123) และ *Ralstonia eutropha* (1105) ผลิต PHB ได้ 2.3 g/L และ 1.6 g/L ตามลำดับ ที่เวลาบ่มเชื้อเดียวกัน คือ 48 ชั่วโมง สำหรับ *Azotobacter vinelandi* (720) ให้การผลิต PHB ต่ำสุด 0.7 g/L หลังจากเพาะเลี้ยงนานกว่าคือ 54 ชั่วโมง (รูปที่ 3.11) เมื่อเทียบอัตราการผลิต PHB พบว่า *A. eutrophus* (531) และ *B. megaterium* (90) จะเท่ากันคือ 52 mg/L.h^{-1} รองลงไปคือ *Azohydromonas lata* (1123) และ *Ralstonia eutropha* (1105) ให้อัตราการผลิต 48 mg/L.h^{-1} และ 33.7 mg/L.h^{-1} สำหรับ *Azotobacter vinelandi* (720) ให้อัตราการผลิต PHB ต่ำสุดคือ 13.5 mg/L.h^{-1} (ตารางที่ 3.1)



รูปที่ 3.10 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 4% และน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4%



รูปที่ 3.11 การผลิต PHB ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 4% และน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4%

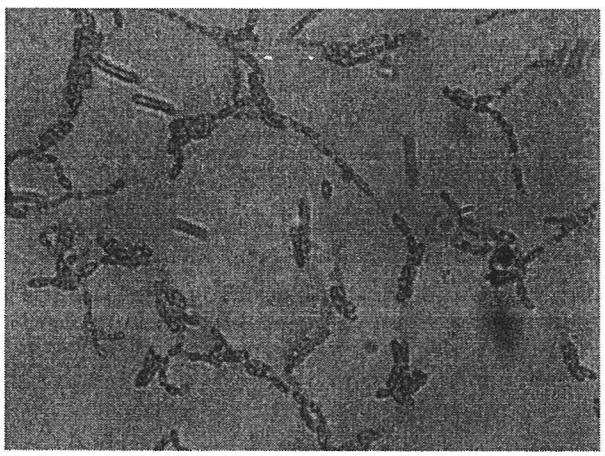
ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบปริมาณการผลิต PHB ได้สูงสุดของแบคทีเรียชนิดต่างๆ

Microorganisms	code	Time [h]	Dry cell wt. [g/L]	PHB content [%w/w]	PHB productivity mg/L.h^{-1}
Bacillus megaterium	90	48	5.9	43	52
Alcaligenes eutrophus	531	48	7.5	33	52
Azotobacter vinelandi	720	48	2.1	31	13.5
Ralstonia eutropha	1105	48	4.7	34	33.7
Azohydromonas lata	1123	48	5.1	45	48

3.5 การศึกษาลักษณะการสะสม PHB ภายในเซลล์

3.5.1 การย้อมสีแกรมและส่องด้วยกล้อง Light microscopy

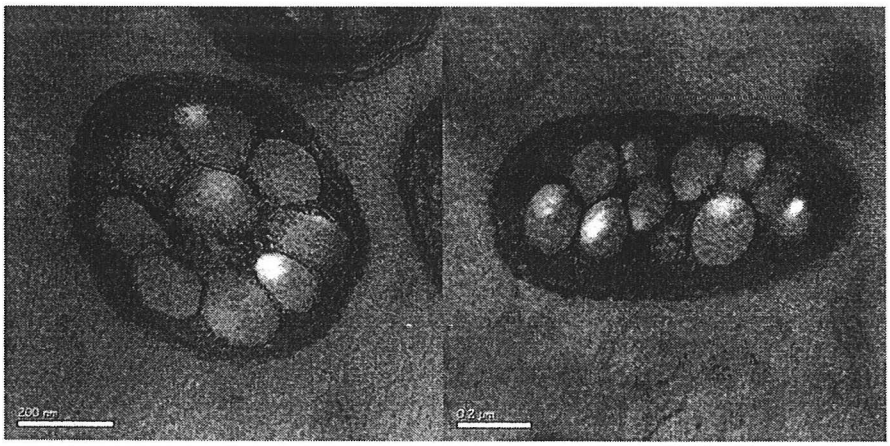
พบการสะสมของ PHB ภายในเซลล์ *B. megaterium* โดยสังเกตจากการติดสีส้มแดงของ scarlet-R- sudan บริเวณตรงกลางเซลล์ (รูปที่ 3.12)



รูปที่ 3.12 การสะสมของ PHB ภายในเซลล์ *B. megaterium*

3.5.2 การเตรียมชิ้นงานและส่องด้วยกล้อง Transmission electron microscope (TEM)

พบว่ามีการสะสม PHB ภายในเซลล์ *Alcaligenes eutrophus* โดยเป็นลักษณะมีเยื่อหุ้มรอบ ซึ่งสังเกตจากบริเวณเยื่อหุ้มจะถูกย้อมด้วย OsO_4 (สีดำ) และ Uranyl acetate ทำให้มองเห็นลักษณะของแกรนูล (granule) ชัดเจนมากขึ้น (รูปที่ 3.13)



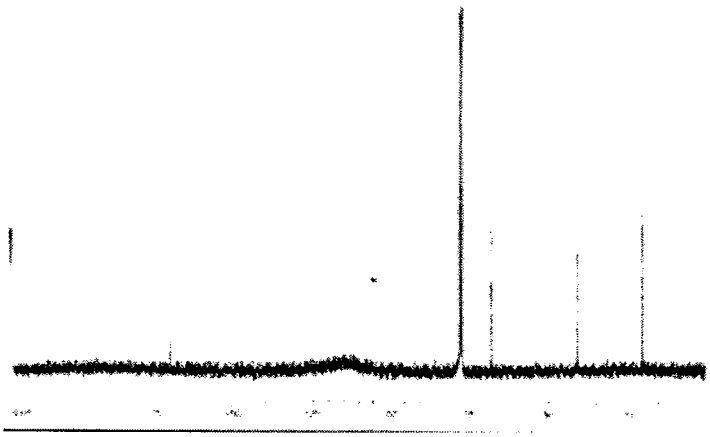
รูปที่ 3.13 การสะสมของ PHB ภายในเซลล์ของ *A. eutrophus* แบบ granule; ภาพตัดเซลล์ตามขวาง (ซ้าย) ภาพตัดเซลล์ตามยาว (ขวา)

3.6 การวิเคราะห์โครงสร้างและมวลโมเลกุลของ PHB

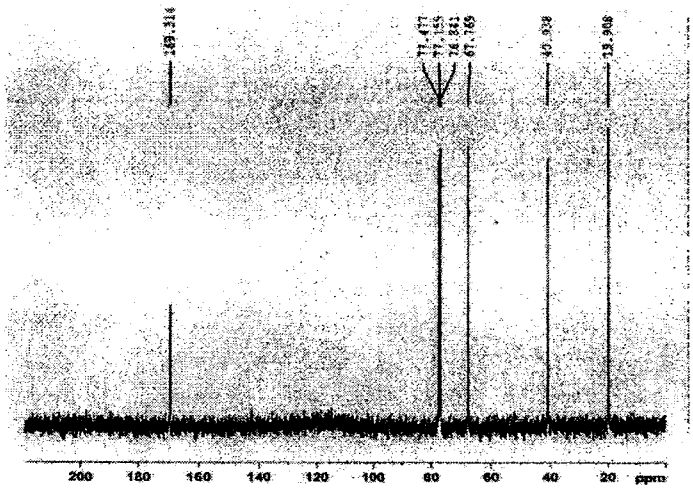
3.6.1 การวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลด้วย Nuclear magnetic resonance (NMR)

A การวิเคราะห์โครงสร้างด้วย ^{13}C NMR

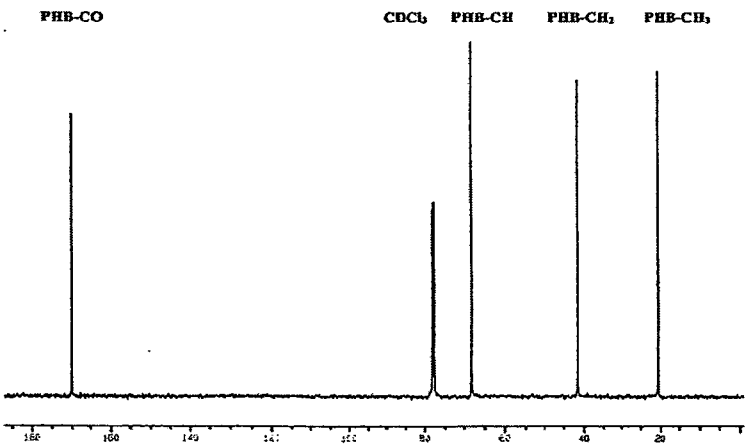
ในการวิเคราะห์ ^{13}C NMR ของ PHB ที่สกัดได้จาก *B. megaterium* (รูปที่ 3.14) และที่สกัดจาก *A. eutrophus* (รูปที่ 3.15) ด้วยวิธี Chloroform extraction จะใช้ตัวทำละลายในการวิเคราะห์คือ deuterated-chloroform ปรากฏให้พีคจำนวน 5 พีค โดยมีพีคที่สูงสุดคือ พีคของ deuterated-chloroform และพีคต่ำ 4 พีค คือสารตัวอย่างหรือ PHB ที่ได้จากการสกัด โดยพบว่ามีจำนวนคาร์บอนอะตอมจำนวน 4 อะตอม ตามโครงสร้างอ้างอิง (รูปที่ 3.16) นอกจากนี้ PHB ที่ได้จากแบคทีเรียชนิดอื่นก็ให้ลักษณะพีคเช่นเดียวกัน ซึ่งมีค่า chemical shift ใกล้เคียงกันมาก (ตารางที่ 3.2)



รูปที่ 3.14 แสดง ^{13}C NMR spectra ของ PHB ที่ได้จากการสกัด *B. megaterium* ด้วย Chloroform



รูปที่ 3.15 แสดง ^{13}C NMR spectra ของ PHB ที่ได้จากการสกัด *A. eutrophus* ด้วย Chloroform



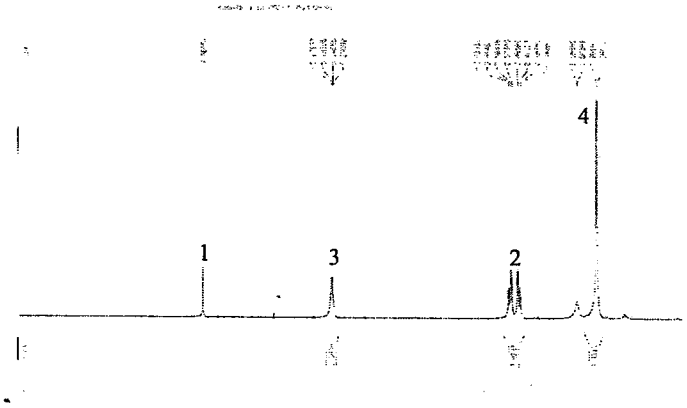
รูปที่ 3.16 แสดง ^{13}C NMR spectra ของ PHB จาก *A. eutrophus* (Hahn et al.,1994)

B การวิเคราะห์โครงสร้างด้วย ^{1}H NMR

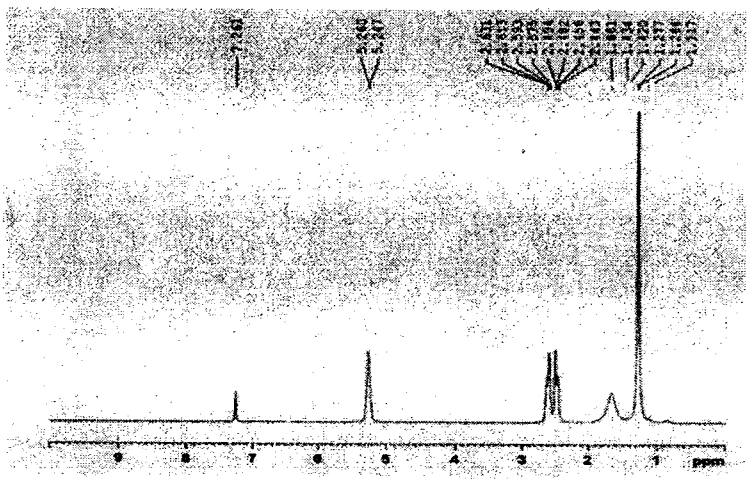
ในการวิเคราะห์ ^{1}H NMR ของ PHB ที่สกัดได้จาก *B. megaterium* (รูปที่ 3.17) และ *A. eutrophus* (รูปที่ 3.18) ด้วยวิธี Chloroform extraction จะใช้ตัวทำละลายในการวิเคราะห์คือ deuterated-chloroform ปรากฏให้พีคจำนวน 4 พีค โดยแต่ละพีค คืออะตอมของคาร์บอน ซึ่งประกอบด้วยไฮโดรเจนอะตอมดังนี้ คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ไม่มีไฮโดรเจนอะตอม คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 มีไฮโดรเจน 2 อะตอม คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 มีไฮโดรเจน 1 อะตอม และคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 มีไฮโดรเจน 3 อะตอม รวมไฮโดรเจนทั้งหมด 6 อะตอม ตามโครงสร้างอ้างอิง (รูปที่ 3.19) นอกจากนี้ PHB ที่ได้จากแบคทีเรียชนิดอื่นก็ให้ลักษณะพีคเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 3.2 The chemical shift signals obtained the ^{13}C NMR spectra for PHB sample and commercial PHB, compared to the results by Fabiane et al. (2007)

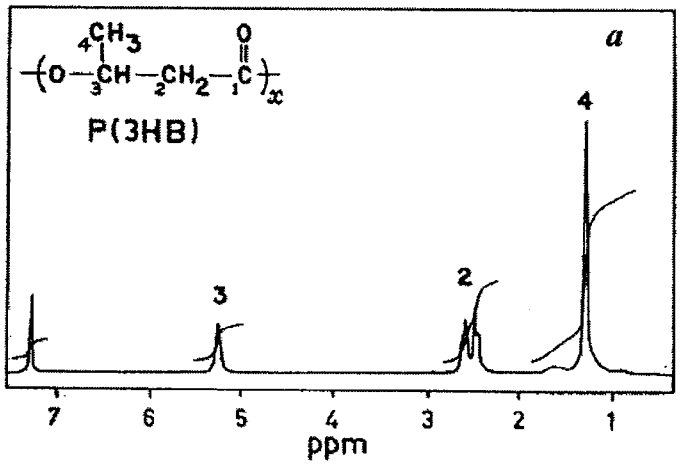
C atom	Chemical shift (ppm)						
	PHB_{90}	PHB_{531}	PHB_{720}	PHB_{1105}	PHB_{1123}	Commercial PHB	PHB (Fabiane et al., 2007)
CH_3	19.92	19.91	19.77	19.77	19.91	19.81	19.65
CH_2	40.96	40.94	40.79	40.79	40.94	40.72	40.66
CH	67.77	67.77	67.62	67.62	67.77	67.34	67.48
C=O	169.29	169.31	169.16	169.17	169.31	169.48	169.03



รูปที่ 3.17 แสดง ^{1}H NMR spectra ของ PHB ที่ได้จากการสกัด *B. megaterium* ด้วย Chloroform



รูปที่ 3.18 แสดง ^{1}H NMR spectra ของ PHB ที่ได้จากการสกัด *A. eutrophus* ด้วย Chloroform



รูปที่ 3.19 แสดง ^{13}H NMR spectra ของ PHB จาก Azotobacter chroococcum (Pal et al., 2002)

3.6.2 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของ PHB

โดยใช้ gel permeation chromatography มาวิเคราะห์ซึ่งได้กล่าวไว้แล้วในบทนำ โดยในงานวิจัยนี้จะใช้น้ำหนักโมเลกุลของ Polystyrene เป็นค่ามาตรฐานเทียบหามวลโมเลกุลของ PHB ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการของ สาขาวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พบว่าโมเลกุลของ PHB ที่สกัดได้จาก *B. megaterium* มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า $39x10^5$ Da มี Retention time ประมาณ 10 นาที ใช้ chloroform เป็น Mobile phase ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของ PHB ที่ได้จากแบคทีเรียชนิดอื่น จะมีค่าอยู่ในช่วง 21- $53x10^4$ Da (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 The molecular weight of PHB; weight average ($\overline{M_w}$), number average ($\overline{M_n}$) and polydispersity ($\overline{M_w}/\overline{M_n}$) was determined by GPC.

Microorganisms	code	$\overline{M_w}$ (kDa)	$\overline{M_n}$ (kDa)	$\overline{M_w}/\overline{M_n}$
Bacillus megaterium	90	3900	2651	1.47
Alcaligenes eutrophus	531	588	174	3.38
Azotobacter vinelandi	720	384	157	2.45
Ralstinia eutropha	1105	425	165	2.58
Azohydromonas lata	1123	210	620	3.40
Commercial PHB		275	168	1.64
Chen and Page (1994)		4100	3300	1.24
Galego et al. (2000)		177	91	1.95
Fabiane et al. (2007)		790	349	2.26

T_g: glass transition temperature, T_{hc}: crystallization temperature on heating, T_m: melting temperature, T_{cc}: crystallization temperature on cooling, ΔH_m: melting enthalpy of the sample, X_C: degree of crystallinity.

3.7 การทดสอบคุณสมบัติทนความร้อนของ PHB (Thermal property)

3.7.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทนต่อความร้อนด้วย Differential Scanning Calorimetry (DSC)

พบว่า PHB ที่สกัดได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ให้ค่าคุณสมบัติทนต่อความร้อนใกล้เคียงกัน อาทิ เช่น ค่า melting temperature (T_m) คือ 167.30 °C, glass transition (T_g) คือ -1.83 °C และ crystallinity (X_c %) คือ 57% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ PHB ที่ผลิตเป็นการค้า (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 คุณสมบัติทนต่อความร้อนของ PHB ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ

Microorganisms	code	T_g (°C)	T_{hc} (°C)	T_m (°C)	T_{cc} (°C)	ΔH_m (J g^{-1})	X_c (%)
Bacillus megaterium	90	-1.00	40.32	177.2	113.8	87.7	60
Alcaligenes eutrophus	531	-1.83	40.32	167.3	113.8	84.4	57
Azotobacter vinelandi	720	-1.83	84.39	163.55	99.89	84.30	58
Ralstinia eutropha	1105	-0.44	69.48	163.28	94.45	80.80	55
Azohydromonas lata	1123	1.87	50.64	164.36	80.86	75.92	52
Commercial PHB		1.01	44.9	172.1	99.4	90.2	62