

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2545

การผลิต Polyhydroxybutyrate (PHB) จากผลผลิตทางการเกษตรและกากของเสียจาก
อุตสาหกรรมเกษตรโดยใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย
(Polyhydroxybutyrate Production from Agricultural Products and Agroindustry Wastes
by Microorganisms from Natural Environments in Thailand)



นางสาวกุลวดี ทองภูเบศร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รช
อร
92
P58
กษ.๖๘๖

เลขหมู่.....

54630

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่มอบให้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ วันเดือนปี 21 ธ.ค. 2548

๖.๒๓๑๖๗๑๓
i.....

Abstract

The bacterial isolate (82 isolates) on Nutrient Agar (NA), collected from 18 soil and water samples, were screened on HB medium (0.5% 3-hydroxybutyrate) and PHB medium (0.5% poly- β -hydroxybutyrate) by replica plating technique. 45 isolates of HB-degrading bacteria and 32 isolates of PHB-degrading bacteria were selected from the primary screening. *Bacillus cereus* PHB-1 and *Escherichia coli* PHB-2, the most effective bacteria for PHB degradation, were eventually obtained after sequential screening in PHB broth by the enrichment technique. Efficiency of PHB degradation was studied by incubating the selective culture in PHB broth. The cultivations were operated at room temperature, and shaking at 200 rpm. The maximum specific growth rates of PHB-1 and PHB-2 were 0.112 and 0.153 h⁻¹, respectively. At day 7 of degradation, the residual PHB in media contained PHB-1 and PHB 2 were 58.5 and 40.9%, respectively. The statistical comparisons of residual PHB from 3 treatments of PHB medium (control, degradation by PHB-1, and degradation by PHB-2) indicated that each treatment was significantly different, at 95% confidence.

Growth and efficiency of PHB production in PHB medium were studied by comparing various carbon sources : glucose, whey, spent malt, waste-water from palm oil production, molasses, and coconut oil. PHB-degrading bacteria (PHB-1) and standard culture for PHB production (*A. utrophus* TISTR 1403) were cultivated in PHB medium with various carbon sources for 48 hours. Maximum specific growth rate of PHB degrading PHB-1 was 0.5254 h⁻¹ in whey, and maximum specific growth rate of *A. utrophus* TISTR 1403 was 0.0753 h⁻¹ in coconut oil. The highest efficiency for PHA production of PHB-1 by using coconut oil as carbon source was 0.39019 g.PHA/g.cell, significantly different from those of other carbon sources : waste-water from palm oil production, whey, spent malt, molasses and glucose, which were 0.23844, 0.11731, 0.04055, and 0.01226 g.PHA/g.cell, respectively. The highest efficiency for PHA production of PHB-1 was significantly higher than that of *A. utrophus* TISTR 1403. In addition, the highest efficiency for PHB production of PHB-1 by using whey as carbon source was 0.0879 g.PHB/g.cell, significantly different from those of other carbon sources: spent malt, waste water from palm oil production, glucose, molass, and coconut, which were 0.01328, 0.01139, 0.00862, 0.00433, and 0.00186 g.PHB/g.cell, respectively. The highest efficiency for PHB production of PHB-1 was significantly higher than that of *A. utrophus* TISTR 1403, at 95 percent confidence.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยการสนับสนุนจากหน่วยงานหลายฝ่าย คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาอำนวยความสะดวกทั้งด้านวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณโรงงานอุตสาหกรรม ที่กรุณาเอื้อเฟื้อตัวอย่างในการทำวิจัย รวมทั้งขอขอบพระคุณครอบครัวของคณะผู้วิจัยที่เป็นกำลังใจในการทำวิจัยครั้งนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	28
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย	38
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	71
เอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก	79

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบัน พลาสติกเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมกันใช้มากจนเป็นส่วนหนึ่งของการดำรงชีวิตประจำวัน โดยการนำมาใช้เป็นหีบห่อบรรจุภัณฑ์ ภาชนะ หรือผลิตภัณฑ์รูปแบบต่างๆ การใช้พลาสติกอย่างมากมาย ทำให้มีการผลิตพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์จากปิโตรเลียมเพื่อทำพลาสติกเป็นจำนวนมาก เช่น ในสหรัฐอเมริกา มีการผลิตพลาสติกประมาณ 50 ล้านตันต่อปี (Thayer, 1990) ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองทรัพยากรธรรมชาติจำพวกปิโตรเลียม และพอลิเมอร์เหล่านี้ยังยากต่อการกำจัดอีกด้วย (เกียรติศักดิ์, 2535) จึงได้มีความพยายามในการผลิตพอลิเมอร์ที่สลายตัวได้โดยใช้แสง (photodegradation) หรือ ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradation) หนึ่งในพอลิเมอร์ที่สลายตัวได้ ได้แก่ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate) หรือ PHA

พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (polyhydroxybutyrate) หรือ PHB เป็นพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ชนิดหนึ่งซึ่งจัดเป็นพอลิเมอร์ประเภทพอลิเอสเตอร์ (polyester) ที่สร้างและสะสมได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดเนื่องจากจุลินทรีย์จะสะสม PHB ในรูปกรานูล (granule) ภายในเซลล์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เนื่องจาก PHB เป็นเทอร์โมพลาสติกที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น ผลิตขวดพลาสติก อุปกรณ์การแพทย์ จึงสามารถเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้ PHB เป็นวัสดุทดแทนพอลิเมอร์จากปิโตรเลียม เพื่อลดปริมาณการใช้ปิโตรเลียมและยังสามารถลดมลพิษที่เกิดจากการตกค้างของพลาสติกในสภาวะแวดล้อมอีกด้วย

การศึกษากการผลิต PHB เป็นที่สนใจกันอย่างแพร่หลาย ทั้งการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHB การศึกษาสภาพแวดล้อมในการผลิต PHB รวมทั้งกระบวนการที่ใช้ผลิต PHB ให้มีประสิทธิภาพสูงสุดโดยใช้ต้นทุนต่ำ การผลิตในขณะนี้ยังมีต้นทุนสูง เนื่องจากต้นทุนวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต PHB และ PHA ชนิดอื่นๆ ในท้องตลาดมีราคาประมาณ 16 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม (Anderson และ Dawes, 1990; Fukui และ Doi, 1998; Maskow และ Babel, 2000) โดยต้นทุนส่วนหนึ่งในการผลิต PHB ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่จะนำมาใช้ในการผลิต เช่น กลูโคส ฟรุคโตส กลีเซอรอล กรดแลกติก รวมทั้งไตรกลีเซอไรด์จากไขมันและน้ำมันชนิดต่าง ๆ (Anderson และ Dawes, 1990; Shiotani และ Kobayashi, 1993; Shimamura และคณะ, 1994; Eggink และคณะ, 1995) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ PHB และ PHA จะช่วยลดปัญหาการตกค้างของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสติกในสิ่งแวดล้อมได้ ขณะที่ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีวัตถุดิบทางการเกษตรและของเสียจากอุตสาหกรรมหลายชนิด ที่น่าจะนำมาผลิต PHB ได้ดี เช่น ไขมันและน้ำมันจากพืชและสัตว์ทางนม จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำวัตถุดิบและของเสียเหล่านี้มาแปรรูปเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ และยังช่วยเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรได้ด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อผลิตพลาสติกทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ โดยใช้วัตถุดิบทางการเกษตรและของเสียจากอุตสาหกรรม
2. เพื่อควบคุมการผลิตและการใช้พลาสติกจากปิโตรเลียม ซึ่งจะช่วยลดปัญหามลพิษอันเนื่องมาจากการใช้พลาสติก
3. เพื่อหาแนวทางเพิ่มมูลค่าให้กับสินค้าทางการเกษตร และยังเป็นกรนำของเสียที่อาจก่อให้เกิดมลพิษมาใช้ประโยชน์ใหม่อันจะส่งผลให้เศรษฐกิจดีขึ้น

ขอบเขตการวิจัย

1. คัดเลือกจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่สามารถผลิต PHB ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. ศึกษาวัตถุดิบจากการเกษตรและของเสียจากอุตสาหกรรมที่สามารถผลิต PHB

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถเพิ่มทางเลือกในการผลิตพอลิเมอร์เพื่อใช้ประโยชน์ ซึ่งจะช่วยให้ลดความต้องการในการใช้และนำเข้าปิโตรเลียมได้
2. สามารถนำความรู้ที่ได้ ไปใช้ในเชิงพาณิชย์ โดยใช้ศักยภาพของบุคลากรและหน่วยงานภายในประเทศ ค้นคว้าวิจัยเพื่อให้อุตสาหกรรมที่ตนเองได้ต่อไป
3. สามารถควบคุมปัญหาพิษที่เกิดจากการใช้พลาสติกจากปิโตรเลียม โดยใช้พลาสติกที่ผลิตจากพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ
4. สามารถเพิ่มมูลค่าสินค้าทางการเกษตรและลดปัญหาการกำจัดของเสียจากอุตสาหกรรม โดยการนำมาผลิตพอลิเมอร์ทางชีวภาพแทน

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

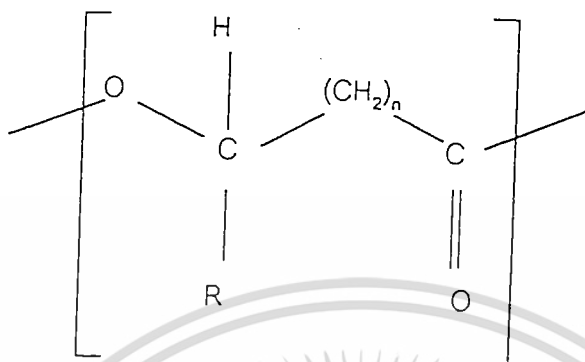
2.1 PHAs และ PHB

PHAs หรือ Polyhydroxyalkanoates เป็นสารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นและเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ พบในเซลล์จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ในสภาวะการเลี้ยงที่ไม่สมดุล เช่น สภาวะที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจน แม้ว่า PHAs จะถูกผลิตขึ้นในปริมาณมากและได้มีการศึกษามานานแล้วแต่เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการทำพลาสติก (Kessler และ Witholt, 2001) จึงยังมีการวิจัยเพื่อพัฒนาการผลิต PHAs กันอยู่ ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของ PHA ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ hydroxy acid หลายๆ โมเลกุลมาต่อเรียงกันโดยมีความแตกต่างกันที่หมู่อัลคิล (Agarwal และคณะ, 1995) ดังในรูปที่ 2.1

ส่วน PHB หรือ Poly-(β -hydroxybutyrate) เป็นอะลิวฟาติกพอลิเอสเทอร์ที่พบได้ในธรรมชาติเป็นอนุพันธ์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Polyhydroxyalkanoates ซึ่งถูกผลิตและเก็บสะสมได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด และมีชื่อทางการค้าว่า "Biopol" ซึ่งปัจจุบันได้หยุดทำการผลิต เนื่องจากสินค้ามีราคาแพง (Tokiwa และ Suzuki, 1977; Tokiwa a,b และคณะ, 1990; Witt และคณะ, 1994) ในปี ค.ศ. 1923 Lemoigne ค้นพบว่า PHB เป็นอนุพันธ์ของ Polyhydroxyalkanoates ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญจากแบคทีเรียเป็นครั้งแรกและในปี ค.ศ. 1927 Lemoigne ได้พบว่าการผลิต PHB มีความสัมพันธ์กับการสร้างสปอร์ของ *Bacillus spp.* ซึ่งในปัจจุบันนี้พบว่าองค์ประกอบของไขมันชนิดนี้ถูกสะสมได้ในแบคทีเรียหลายชนิดในช่วง stationary phase เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานทดแทน พอลิเมอร์ชนิดนี้จะถูกผลิตและถูกสะสมได้ดีภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมในกรณีที่มีการจำกัดแหล่งอาหารที่จำเป็น (Oeding และ Schlegel, 1973; Senior และ Dawes, 1973) ซึ่ง Dunlop และ Robards (1973) ได้ค้นพบโครงสร้างแบบจำลอง PHB เป็นครั้งแรกดังในรูปที่ 2.2 (Merrick และ Doudoroff, 1964)

ลักษณะพิเศษของ PHB คือผลิตได้ในเฉพาะจุลินทรีย์และพบได้แพร่หลายในแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะ *Azotobacter* ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เช่น *Azotobacter beijerinckii* สามารถสะสม PHB ได้ถึง 70% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Stockdale และคณะ, 1968) ในบางสภาวะที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจนและเติมแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่มากเกินไป จะทำ

ให้เซลล์จุลินทรีย์สามารถผลิต PHB ซึ่งเป็นสารที่เซลล์สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานต่อไปได้ (Wilkinson, 1959)

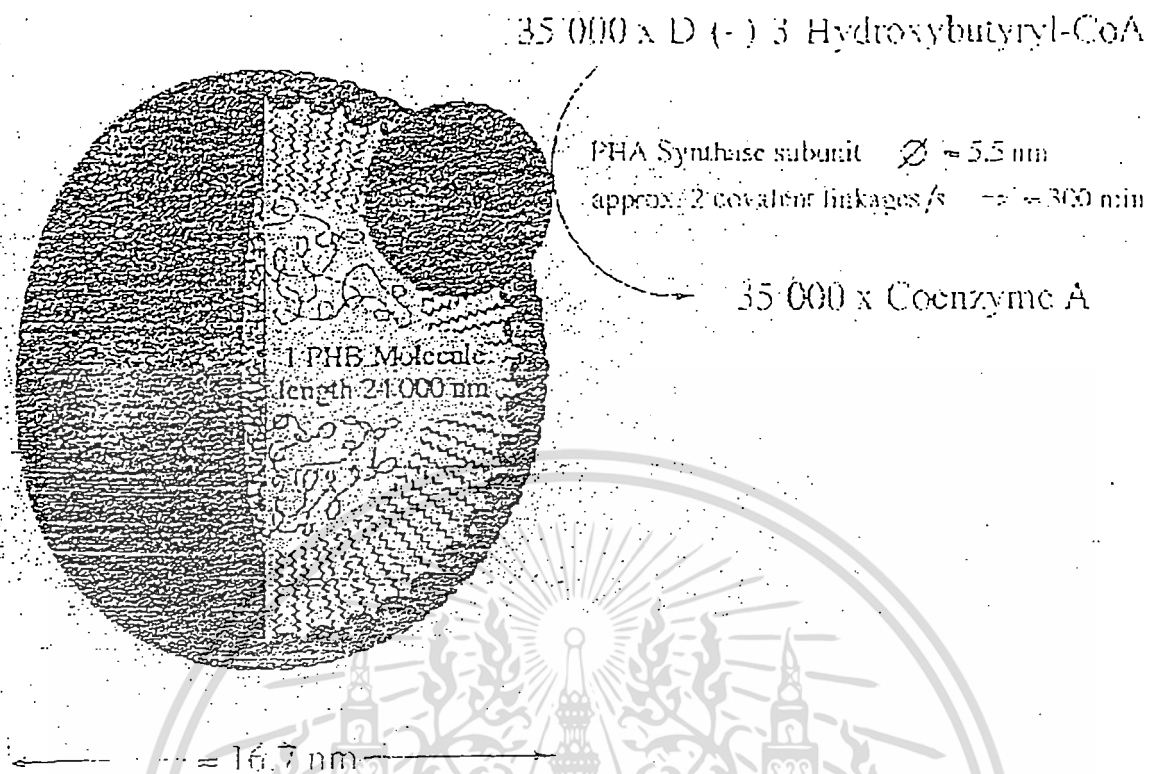


เมื่อ	n=1	R=hydrogen	Poly(3-hydroxypropionate)
		R=methyl	Poly(3-hydroxybutyrate)
		R=ethyl	Poly(3-hydroxyvalerate)
		R=propyl	Poly(3-hydroxyhexanoate)
		R=pentyl	Poly(3-hydroxyoctanoate)
		R=nonyl	Poly(3-hydroxydodecanoate)
	n=2	R=hydrogen	Poly(4-hydroxybutyrate)
		R=methyl	Poly(4-hydroxyvalerate)
	n=3	R=hydrogen	Poly(5-hydroxyvalerate)
		R=methyl	Poly(5-hydroxyhexanoate)
	n=4	R=hexyl	Poly(6-hydroxydodecanoate)

รูปที่ 2.1 โครงสร้างทั่วไปของ PHAs

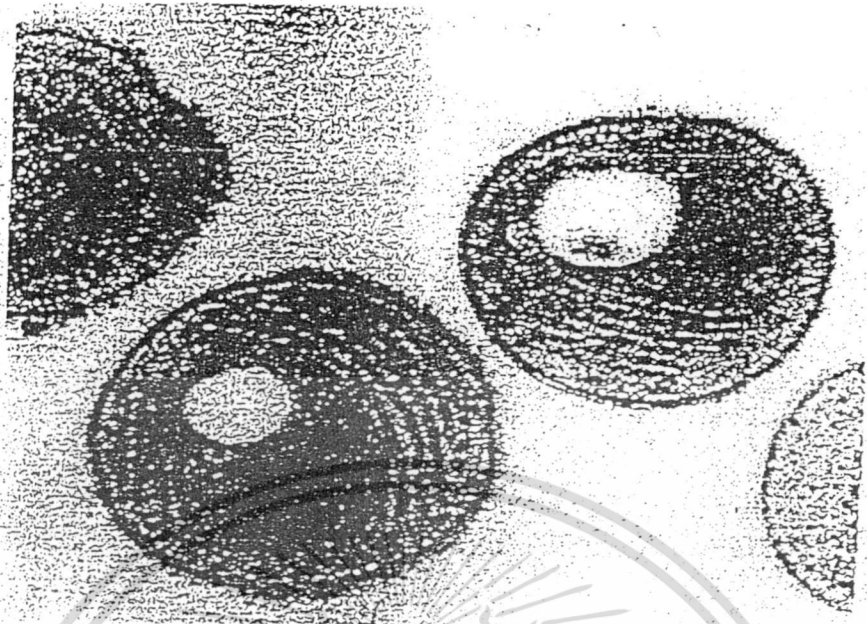
ที่มา : Lee (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

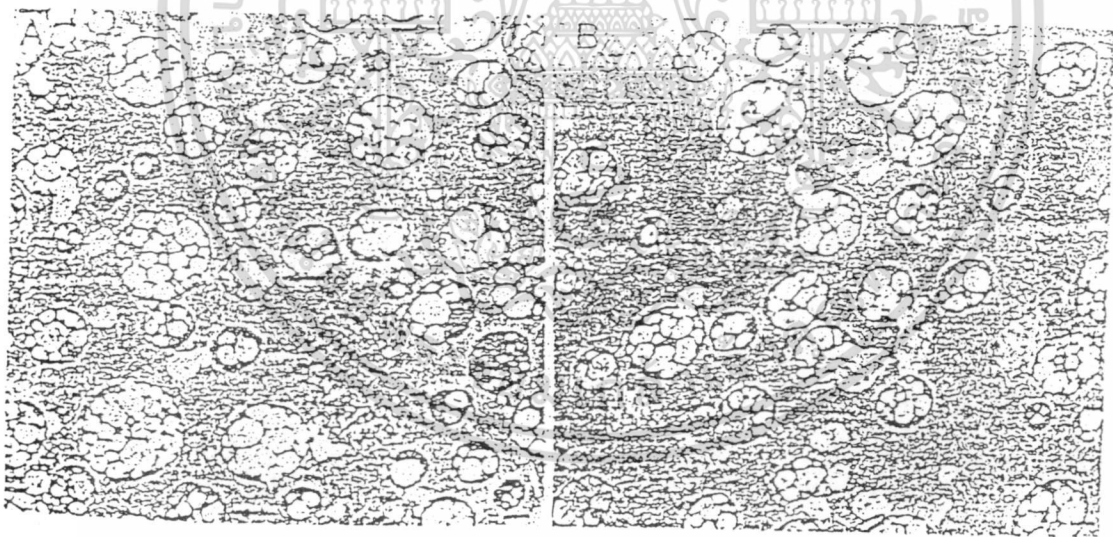


รูปที่ 2.2 ภาพลามมิติของกรานูล PHB ในอุดมคติขนาดเล็กที่บรรจุโมเลกุลเดี่ยวๆของ PHB
ที่มา : Steinbuchelc และคณะ (1995)

ลักษณะของ PHB กรานูล (granule) มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.5 ไมโครเมตร ประกอบด้วยไขมัน 0.5% และโปรตีน 2% ของน้ำหนักกรานูล โดยกิจกรรมของเอนไซม์ PHB synthase และ depolymerase มีความสัมพันธ์กับโปรตีนในเยื่อหุ้มกรานูลนี้ (Lundgren และคณะ, 1964) มวลโมเลกุลเฉลี่ยของ PHB กรานูล มีค่าประมาณ 5×10^9 (Ellar และคณะ, 1968) ในแต่ละกรานูลจะบรรจุสายพอลิเมอร์ได้อย่างน้อยที่สุด 1000 สาย ซึ่งแสดงในภาพจำลองดังรูปที่ 2.3 (Mas และคณะ, 1985) Dunlop และ Robard (1973) ได้ศึกษาโครงสร้างภายในของ PHB กรานูลในเซลล์ของ *Bacillus cereus* พบว่าภายในกรานูลมีเยื่อหุ้มชั้นนอกและจุดศูนย์กลางการผลิต PHB กรานูลในเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Methylocystis sp.*, *Azotobacter vinelandii* UWD แสดงในรูปที่ 2.3-2.7



รูปที่ 2.3 PHB กราณูลของ *Methylocystis* sp. โดยให้มีแทนเป็นริบเลตรา
ที่มา : Wendlandt และคณะ (2001)

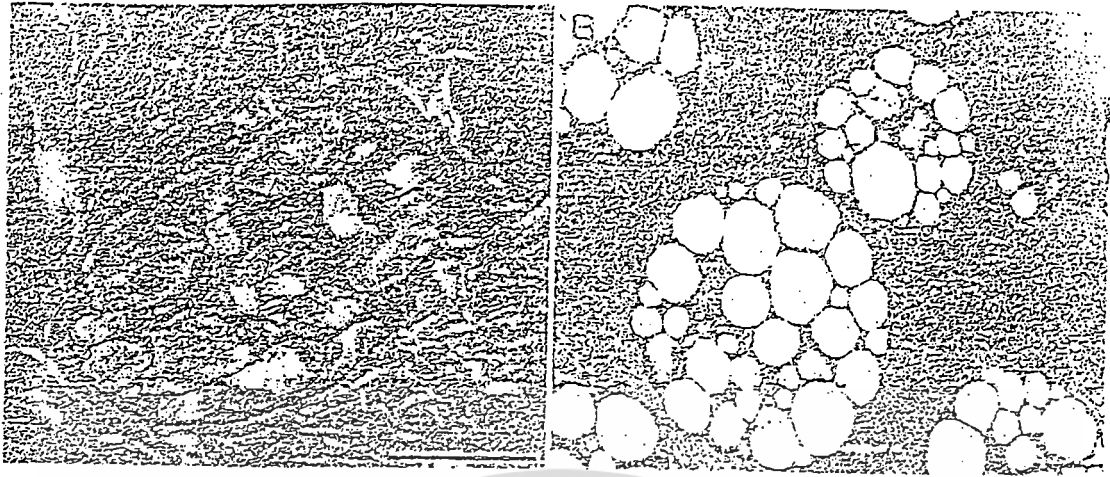


รูปที่ 2.4 PHB กราณูลภายในเซลล์ของ *Azotobacter vinelandii* UWD หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา
24 ชั่วโมง

- A) เป็นเซลล์ที่เจริญในอาหารกลูโคส
- B) เป็นเซลล์ที่เจริญในอาหารผสมกลูโคสกับเปปโตินจากปลา

ที่มา : Page และคณะ (1995)

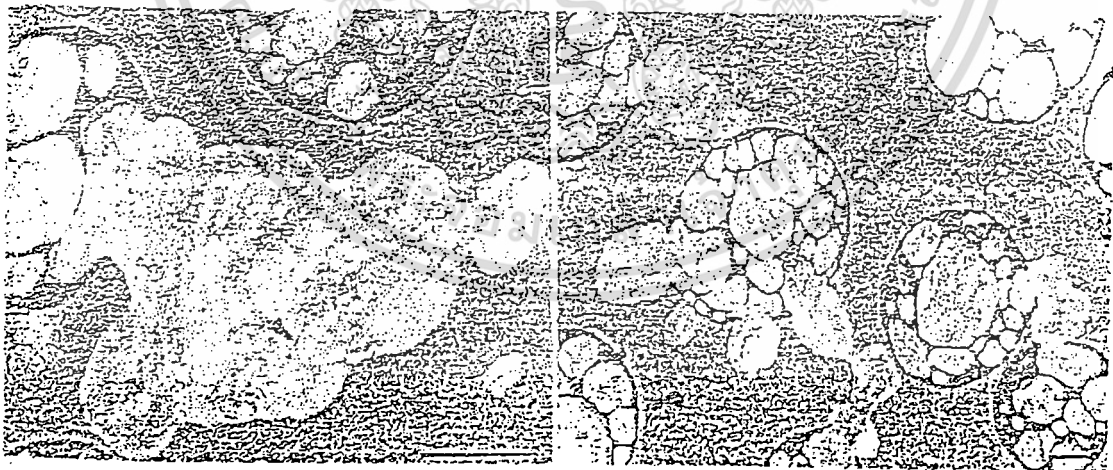
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 การเปรียบเทียบลักษณะของ PHB ในเซลล์ *Azotobacter vinelandii* UWD : ที่กำลังมีชีวิตอยู่และเซลล์ที่ตายแล้ว

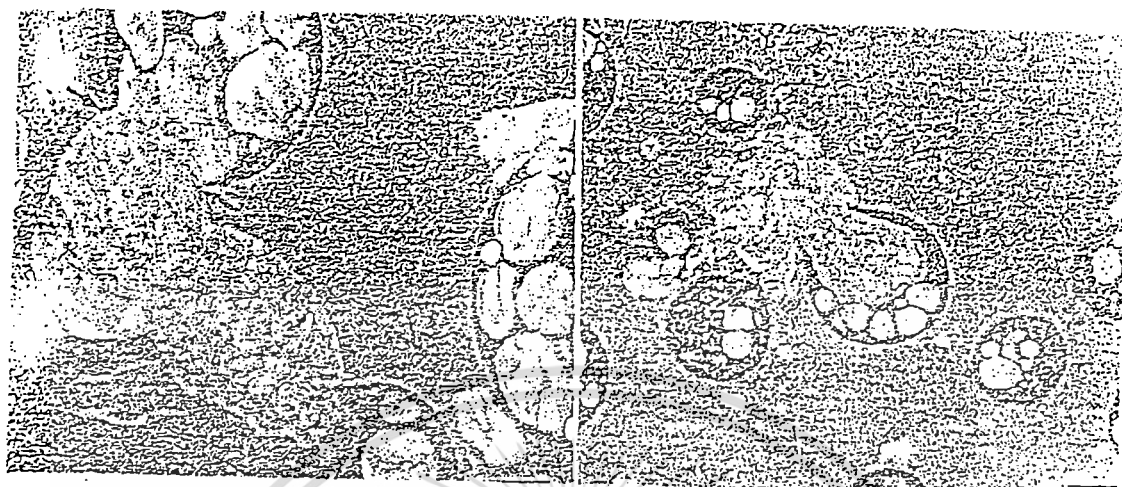
- A) เซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงด้วยกลูโคสในถังหมักและเก็บเกี่ยวเซลล์ออกมาในขณะที่กำลังผลิต PHB
- B) เซลล์ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวในถังหมักและนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในน้ำกลั่นเป็นเวลาหลายสัปดาห์ เพื่อให้เซลล์ตาย ซีดสเกลมีขนาดเท่ากับ 11 ไมโครเมตร

ที่มา : Page และคณะ (1995)



รูปที่ 2.6 การปลดปล่อย PHB ออกจากเซลล์ *Azotobacter vinelandii* UWD โดยเลี้ยงในอาหารกลูโคสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตำแหน่งที่ลูกศรชี้เป็นเซลล์ที่ตายแล้ว

ที่มา : Page และคณะ (1995)

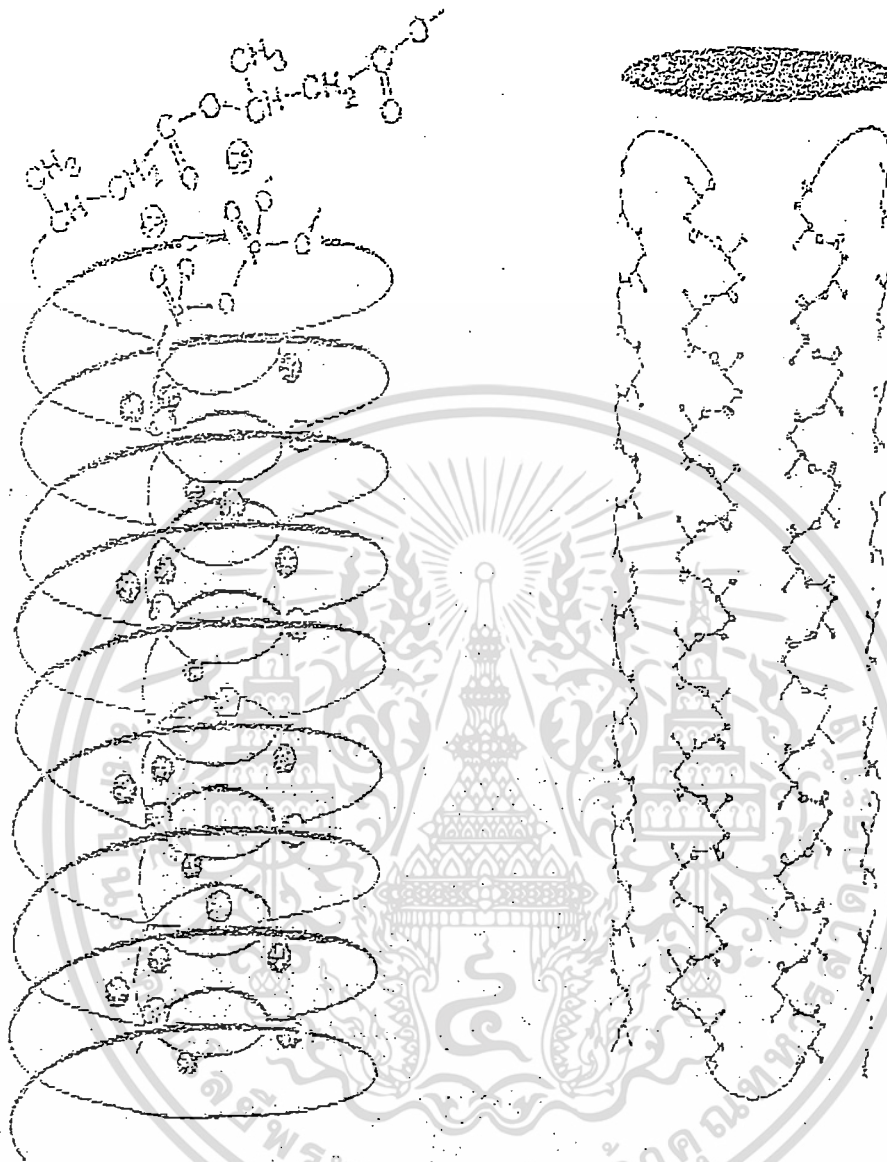


รูปที่ 2.7 การปลดปล่อย PHB ออกจากเซลล์ *Azotobacter vinelandii* UWD โดยเลี้ยงในอาหารกลูโคสเป็นเวลา 36 ชั่วโมงและตำแหน่งที่ถูกครีชีเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายปาก และเลี้ยงในภาคน้ำตาลจากหัวบีทเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามลำดับ โดยขีดสเกลมีขนาดเท่ากับ 1 ไมโครเมตร

ที่มา : Page และคณะ (1995)

2.2 ลักษณะคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีของ PHA และ PHB

Marchessault และ Colleagues (1989) ได้เสนอโครงสร้างของ PHB ว่าเป็นเกลียววนขวาซ้อนกัน 2 ชั้น อยู่ห่างกัน 0.596 นาโนเมตร บิดเป็นเกลียวตามแนวอน มีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.8 โครงสร้างของ PHB คล้ายกับโครงสร้างของพอลิไพร์ฟิซีน คือ มีโครงสร้างเป็นเกลียวเหมือนกัน และมีจุดหลอมเหลวใกล้เคียง 180 องศาเซลเซียสแต่เปราะบางมากกว่าพอลิไพร์ฟิซีน นอกจากนี้ PHB ยังมีค่าความเป็นผลึกเหมือนกับพอลิไพร์ฟิซีน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ละลายได้ในตัวทำละลายหลายชนิด และยังต่อทนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ดีอีกด้วย (Holms, 1985)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน PHB - Ca^{2+} -PPi และแบบจำลองแสดงโครงสร้างของสาย PHB ที่ล้อมรอบด้วย CaPPi

ที่มา : Reusch (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพ เคมีของพอลิโพรพิลีนและ PHB

พารามิเตอร์	พอลิโพรพิลีน	PHB
Melting point T_m ($^{\circ}\text{C}$)	171-186	171-182
Glass transition temperature T_g ($^{\circ}\text{C}$)	-15	5-10
Crystallinity (%)	65-70	65-80
Density (g cm^{-3})	0.905-0.94	1.23-1.25
Molecular weight M_w ($\times 10^{-5}$)	2.2-7	1-8
Molecular weight distribution	5-12	2.2-3
Flexural modulus (GPa)	1.7	3.5-4
Tensile strength (MPa)	3.9	40
Extension to break (%)	400	6-8
UV resistance.	poor	good
Solvent resistance	good	poor
Oxygen permeability ($\text{cm}^3 \text{m}^{-2} \text{atm}^{-1} \text{d}^{-1}$)	1700	45
Biodegradability	+	-
Approx.U.S.annual Production (Mio.t)	1.8	ND

ที่มา : Agarwel และคณะ (1995)

2.3 รายงานการศึกษาอื่นๆ

Imperial Chemical Industries Ltd. (ICI) ได้รายงานเกี่ยวกับ PHB ว่า มีคุณสมบัติเหมือนกับ พอลิโพรพิลีนมาก PHB เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพจริง ผลิตได้ทั้งในภาวะที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพอลิเมอร์ชนิดนี้พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำ ดินและกองขยะ ซึ่งมีความน่าสนใจเป็นอย่างมากในการศึกษาความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพอลิเมอร์กับเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ปล่อยออกมา (King, 1982)

ในงานวิจัยของ Slater และคณะ (1989) และ Schubert และคณะ (1988) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการโคลนนิ่ง และการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์ PHB โดยใส่ยีนใน *A. eutrophus* ลงใน *Escherichia coli* ได้สำเร็จ ในปี ค.ศ. 1992 Poinier และคณะพบว่าแม้ว่าแบคทีเรียจะสะสมพอลิเมอร์ได้ 80-90% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ในกระบวนการผลิตก็ยังมีเซลล์ตกค้างอยู่ 10-20 % ซึ่งต้องใช้กระบวนการที่ใช้ค่าใช้จ่ายสูงในการนำเซลล์ตกค้างออกมา ซึ่งข้อจำกัดเหล่านี้นำไปสู่การโคลนยีน *A. eutrophus* ลงในพืช *Arabidopsis thaliana* ซึ่งมีขนาดเซลล์ใหญ่ การกำจัดเซลล์ที่ตกค้างอยู่จึงทำได้ง่ายกว่า

De Smet และคณะ (1983) ค้นพบว่า *Pseudomonas oleovorans* สามารถเจริญได้ใน 50% v/v octane และสามารถสะสมแกรนูลที่มีลักษณะคล้าย PHB ได้ ส่วน Reusch (1995) ได้ทำการผลิต PHA จากเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมีไซโลสเป็นน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอมเป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุล โดยใช้เชื้อ *Pseudomonas cepacia* พบว่าสามารถผลิต PHB ได้ 0.11 กรัมต่อกรัมไซโลส และต่อมาได้มีการผลิต PHB จาก ไซโลส ซึ่งพบได้ในเนื้อไม้ นำมาใช้เป็นขั้วเสถียรของเชื้อ *Lactococcus lactis* ในการผลิต L-lactic acid ได้ในปริมาณสูง L-lactate ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในโรงงานอุตสาหกรรม และยังใช้เป็นแหล่งผลิตวัตถุดิบในการผลิต PHA โดยใช้เชื้อ *Alcaligenes eutrophus* อีกด้วย

2.4 การนำ PHB ไปใช้ประโยชน์

PHB และพอลิเอสเทอร์ชนิดอื่นๆผลิตได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด ด้วยความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพและคุณสมบัติพิเศษอื่นๆ ทำให้ PHB มีประโยชน์หลายด้าน โดยเฉพาะทางด้านทางการแพทย์และการเกษตร (Wendlandt และคณะ, 2001) นอกจากนั้นการที่ PHB มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพอลิโพรพิลีน ทำให้บริษัท ICI หันมาให้ความสนใจที่จะนำ PHB มาผลิตเป็นไฟเบอร์และพลาสติก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการแพทย์ ซึ่งมีความสามารถในการเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อและย่อยสลายได้เป็นสำคัญ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PHB ภายใต้ชื่อทางการค้าว่า

"Biopol" ซึ่งมีผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น ขวดแชมพู ด้ามมีดโกน หมุดตั้งลูกกอล์ฟ และตาข่ายดักปลา (Lee, 1998) ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างการนำ PHB ไปใช้ประโยชน์

ประเภท	การนำไปใช้ประโยชน์
การแพทย์และเภสัชกรรม	คัลยกรรมเย็บแผล สารหล่อลื่นสำหรับถุงมือแพทย์ หลอดเลือดเทียม
เกษตรกรรม	หลอดฉีดยา แคปซูลยา
อุตสาหกรรมยาสูบ	ท่อระบายน้ำ ฟิล์มคลุมต้นไม้
อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์	ตัวกรองบุหรี่ ขวด ถุงพลาสติก ฟิล์ม
อุตสาหกรรมประมง	บรรจุภัณฑ์ชิ้นเล็กๆ เคสือบกระดาศ
อุตสาหกรรมอาหาร	แหดักปลา
อุตสาหกรรมเคมี	อิมัลซิไฟเออร์
อื่นๆ	วัตถุติดการทำสี ขาตั้งลูกกอล์ฟ กระถางดอกไม้ แสตมป์

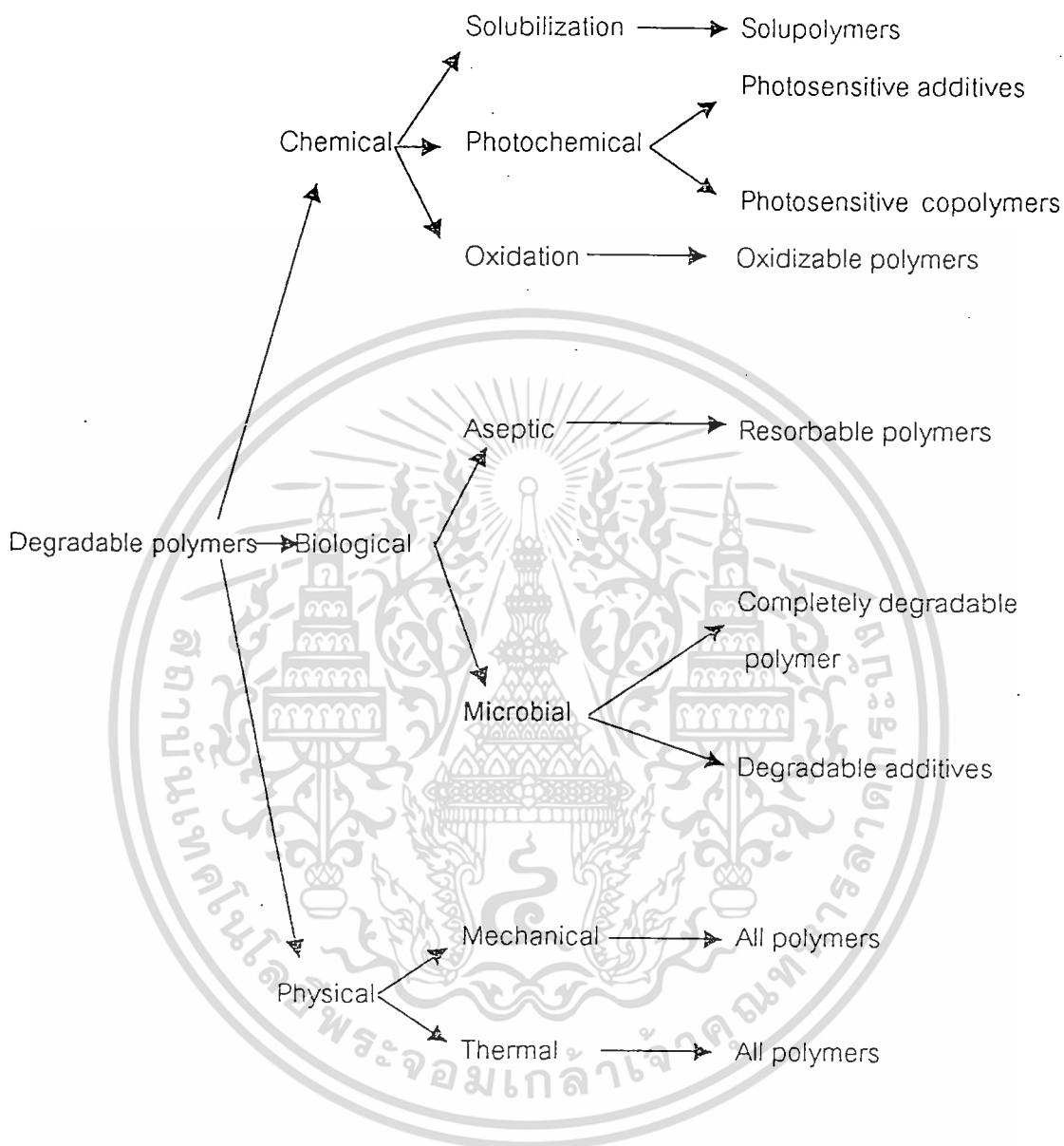
ที่มา : Renh (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พอลิเมอร์ชีวภาพที่ย่อยสลายได้สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทตามวิธีการย่อยสลาย ดังแสดงในรูปที่ 2.9 ดังนี้

1. Chemical Degradable polymers คือ พลาสติกที่ย่อยสลายได้ด้วยวิธีการทางเคมี ซึ่งแบ่งย่อยออกตามปฏิกิริยาการย่อยสลายได้ 3 ชนิด คือ Solubilization Degradable polymers, Photochemical Degradable polymers และ Oxidation Degradable polymers
2. Biological Degradable polymers คือ พลาสติกที่ย่อยสลายได้ด้วยวิธีการทางชีวภาพ แบ่งออกเป็น Aseptic Degradable polymers และ Microbial Degradable polymers
3. Physical Degradable polymers คือ พลาสติกที่ย่อยสลายได้ด้วยวิธีการทางกายภาพเช่น Mechanical Degradable polymers และ Thermal Degradable polymers

การย่อยสลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเกิดจากการที่จุลินทรีย์ปล่อยเอนไซม์ออกมาทำลายพันธะเอสเทอร์ หรือพันธะเอไมด์ที่อยู่ในพอลิเมอร์เพื่อเปลี่ยนสภาพให้เป็นมอนอเมอร์ที่มีความสามารถในการละลายน้ำ เซลล์จุลินทรีย์จึงจะสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์เพื่อเมทาบอลิซึม (metabolized) ได้ บางกรณีขั้นตอนแรกของการย่อยสลายอาจเป็นการไฮโดรไลซิสไม่ใช่การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ แต่ในขั้นตอนสุดท้ายจุลินทรีย์ก็สามารถดูดซึมสารเข้าสู่เซลล์ได้เช่นเดียวกัน (Doi, 1991)



รูปที่ 2.9 การจัดจำแนกชนิดของพลาสติกที่ย่อยสลายได้
ที่มา : Brandi และคณะ (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PHA ได้มีหลายประเภททั้งโพรคาริโอต และยูคาริโอต พบได้ทั้งในดินและในน้ำ ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PHA ได้

จุลินทรีย์	สิ่งแวดล้อมที่พบ	กลุ่ม	ประเภท
<i>Acidovorax facilis</i>	ดิน	แกรมลบ	โพรคาริโอต
<i>Alcalineges faecalis</i>	สลัดจ์	แกรมลบ	โพรคาริโอต
<i>Aspergillus sp.</i>	ดิน	แอสโคไมซีตีส	ยูคาริโอต
<i>Bacillus megaterium</i>	ดิน	แกรมบวก	โพรคาริโอต
<i>B. polymyxa</i>	ดิน	แกรมบวก	โพรคาริโอต
<i>Comamonas testosteroni</i>	น้ำทะเล	แกรมบวก	โพรคาริโอต
<i>Mucor sp.</i>	ดิน	ไซโกไมซีตีส	ยูคาริโอต
<i>Penicillium chermisinum</i>	ดิน	แอสโคไมซีตีส	ยูคาริโอต
<i>P. daleae</i>	ดิน	แอสโคไมซีตีส	ยูคาริโอต
<i>Pseudomonas sp.</i>	ดิน	แกรมลบ	โพรคาริโอต
<i>P. cepacia</i>	น้ำจากทะเลสาบ	แกรมลบ	โพรคาริโอต
<i>P. fluorescens</i>	สลัดจ์	แกรมลบ	โพรคาริโอต
<i>Streptomyces sp.</i>	ดิน	แอคติโนไมซีตีส	โพรคาริโอต
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	ดิน	แกรมลบ	โพรคาริโอต

ที่มา : Brandi และคณะ (1995)

การย่อยสลายของ PHA และ PHB โดยทั่วไปแล้วจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่ออัตราการย่อยสลาย และอายุการใช้งานของพอลิเมอร์ที่ใช้ทำพลาสติกในธรรมชาติ ประกอบด้วยประเภทของสิ่งแวดล้อม จำนวนของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพลาสติกได้ ความหนาของพลาสติก น้ำอุณหภูมิ ลักษณะสัมผัสของพลาสติก องค์ประกอบอื่นๆในพลาสติก เช่น สี ตัวอย่างการย่อยสลายแผ่นฟิล์ม ดังตารางที่ 2.4 โดยทั่วไป PHB homopolymer ในสภาวะการย่อยสลายที่ไม่ใช้อากาศในสิ่งปฏิภูลจะใช้เวลาในการย่อยสลาย 6 สัปดาห์ ส่วนในสภาวะที่มีอากาศใช้เวลาในการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย่อยสลายของ PHA และ PHB โดยทั่วไปแล้วจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่ออัตรา การย่อยสลาย และอายุการใช้งานของพอลิเมอร์ที่ใช้ทำพลาสติกในธรรมชาติ ประกอบด้วย ประเภทของสิ่งแวดล้อม จำนวนของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพลาสติกได้ ความหนาของพลาสติก น้ำ อุณหภูมิ ลักษณะสัมผัสของพลาสติก องค์ประกอบอื่นๆในพลาสติก เช่น สี ตัวอย่างการย่อยสลาย แผ่นฟิล์ม ดังตารางที่ 2.4 โดยทั่วไป PHB homopolymer ในสภาวะการย่อยสลายที่ไม่ใช้อากาศ ในสิ่งปฏิกูลจะใช้เวลาในการย่อยสลาย 6 สัปดาห์ ส่วนในสภาวะที่มีอากาศใช้เวลาในการย่อย สลายนานถึง 60-65 สัปดาห์ ตามลำดับ การย่อยสลายในน้ำทะเลเกิดขึ้นน้อยมาก ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แผ่นฟิล์มจะถูกย่อยสลายภายใน 350 สัปดาห์ (Agarwal และคณะ, 1995)

ลักษณะการย่อยสลาย PHA และ PHB ตามธรรมชาตินั้นจะถูกย่อยสลายโดยปฏิกิริยา ของเอนไซม์ depolymerase หรือ esterase โดยจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น *Alcaligenes faecalis* , *Pseudomonas lemoignei*, *Penicillium*, *Simplicissimum* ซึ่งหลังเอนไซม์เผลออกมาร่ง ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพอลิเมอร์ โดย PHA และ PHB ที่มีหมู่เอสเตอร์จะส่งผลให้ใช้เวลาในการ ย่อยสลายในสิ่งแวดล้อมนาน (Agarwal และคณะ, 1995) ตัวอย่างของแบบจำลองการย่อยสลาย พอลิเมอร์ดังรูปที่ 2.10

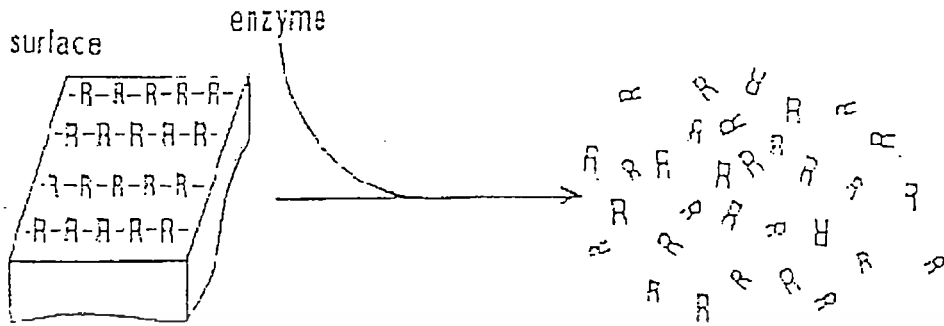
ตารางที่ 2.4 ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายพลาสติก

พารามิเตอร์	ปัจจัย
ลักษณะทางกายภาพของสิ่งแวดล้อม	อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณน้ำที่เป็นองค์ประกอบ ปริมาณออกซิเจน แหล่งอาหารของจุลินทรีย์
ลักษณะของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม	ความหนาแน่นของจุลินทรีย์ ความหลากหลายของจุลินทรีย์ ความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ ความสามารถในการปรับตัว
คุณสมบัติของพลาสติกที่ใช้ย่อย	พอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ น้ำหนักโมเลกุล ลักษณะผลึก พันธะระหว่างมอนอเมอร์
กระบวนการผลิตพลาสติก	ชนิดของกระบวนการผลิต ความหนาของพลาสติก สารที่เติมลงไปในการบวนการผลิต การเคลือบผิวผลิตภัณฑ์

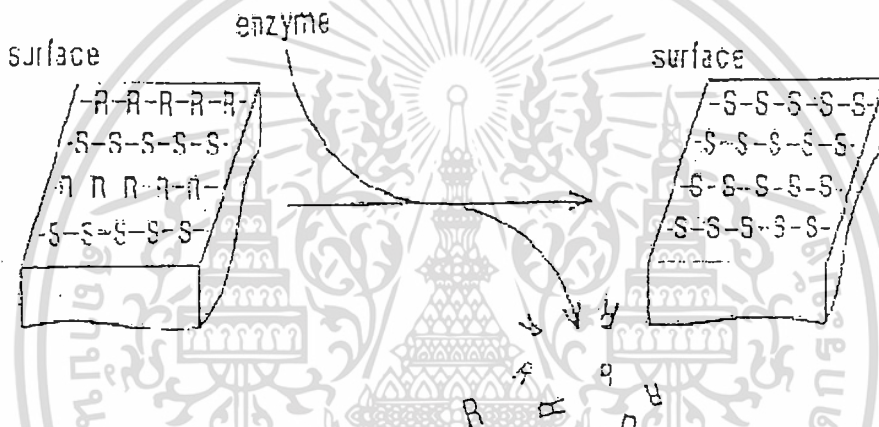
ที่มา : Brandi และคณะ(1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

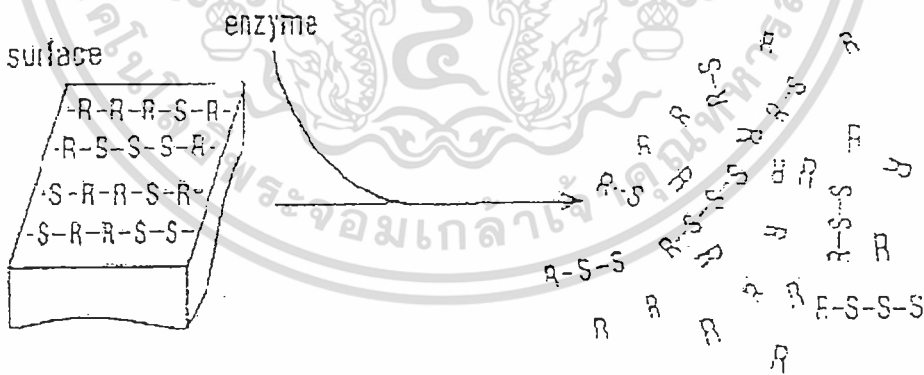
Microbial P(i(R))-HB



Isotactic P[(R,S)]-HB



Atactic P[(R,S)]-HB



รูปที่ 2.10 รูปแบบจำลองการย่อยสลาย P(3HB)

ที่มา : Doi และคณะ (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การผลิต PHA และ PHB

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA และ PHB ได้นั้นมีหลายประเภทซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA ได้แสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสม PHA ไว้ภายในเซลล์ได้

จีแนส	ปริมาณ PHA ที่สะสมได้มากที่สุด (%น้ำหนักแห้ง)	ซับสเตรทที่ใช้ผลิต PHA
<i>Acinetobacter</i>	<1	กลูโคส
<i>Alcaligenes</i>	96	ฟรุกโตส
<i>Azotobacter</i>	73	กลูโคส
<i>Bacillus</i>	25	กลูโคส
<i>Beijerinckia</i>	38	กลูโคส
<i>Chlorogloea</i>	10	อะซิเตท คาร์บอนไดออกไซด์
<i>Clostridium</i>	13	ทริปโตน เปปโตน กลูโคส
<i>Escherichia</i>	ND	ทริปโตน ยีสต์เอ็กแทรกซ์ กลูโคส
<i>Halobacterium</i>	38	กลูโคส
<i>Methylobacterium</i>	47	เมทานอล
<i>Methylocystis</i>	70	มีเทน
<i>Micrococcus</i>	28	ทริปโตน เปปโตน
<i>Pseudomonas</i>	67	เมทานอล
<i>Rhizobium</i>	57	แมนิทอล
<i>Rhodobacter</i>	80	อะซิเตท
<i>Rhodospillum</i>	47	อะซิเตท
<i>Spirillum</i>	40	แลคเตท
<i>Spirulina</i>	6	คาร์บอนไดออกไซด์
<i>Streptomyces</i>	4	กลูโคส
<i>Syntrophomonas</i>	30	โครโทเนต

ที่มา : Agarwal และคณะ (1995)

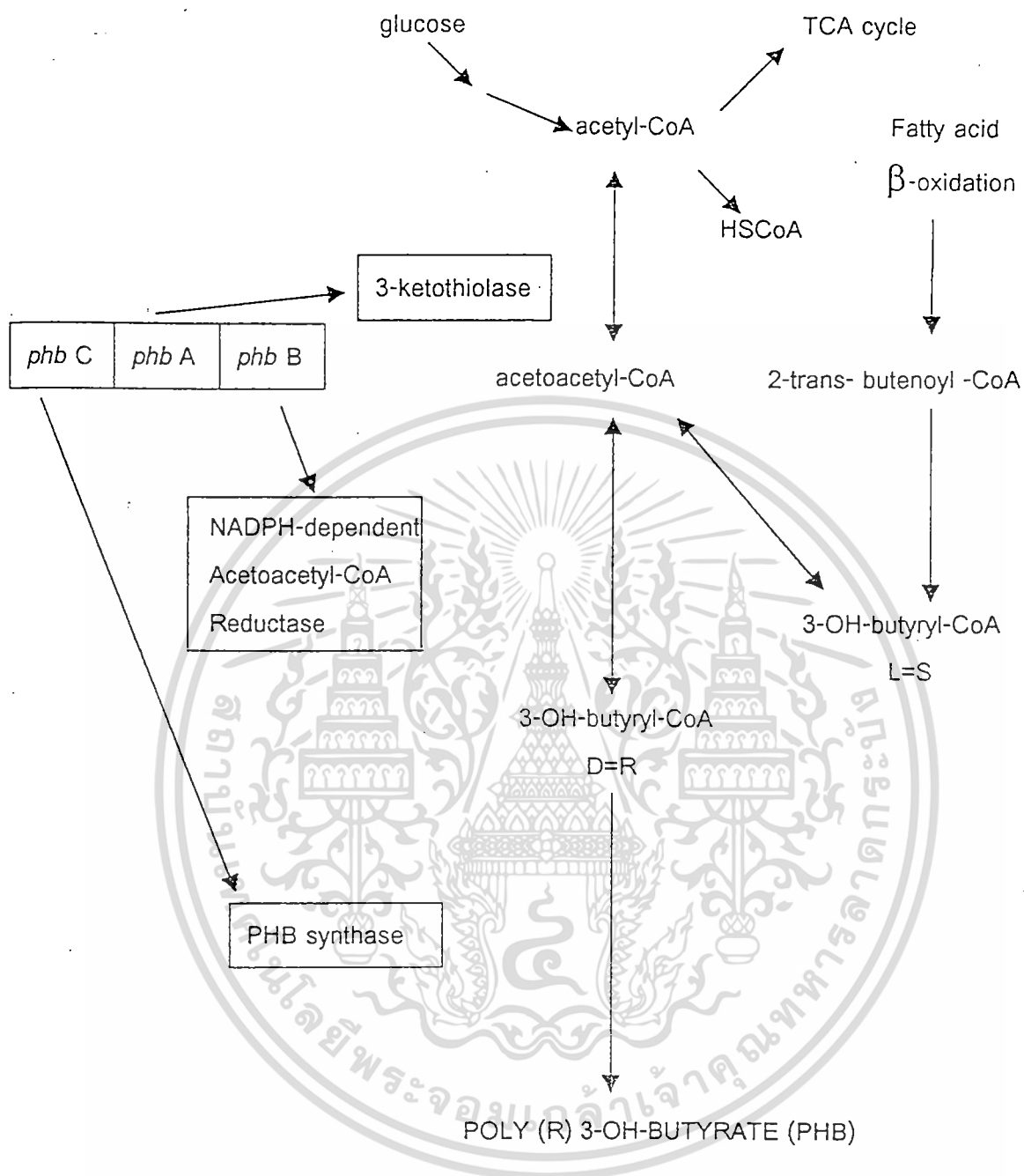
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาการผลิต PHB ในจุลินทรีย์พบว่ามักมีความคล้ายคลึงกันโดยเริ่มจาก acetyl-CoA ดังรูปที่ 2.11 โดยใช้ เอนไซม์ 3 ตัวเป็นตัวควบคุมการผลิต PHB คือ 3-ketotiolase (acetyl-CoA acetyltransferase; EC 2.3.1.9), acetoacetyl-CoA reductase (hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; EC 1.1.1.36), poly(3-hydroxybutyrate) synthase โดยใน *Azotobacter vinelandii* (Reusch และ Sadoff, 1981) PHB จะถูกปล่อยออกจากกรานูล เข้าสู่ central metabolism ผ่าน acetyl-coenzymeA และยังเป็นสารตั้งต้นของการสร้างกรดไขมันจำเป็นอีกด้วย (Leij และ Witholt, 1995)



รูปที่ 2.11 วิธีการผลิต PHB ในจุลินทรีย์
ที่มา : Leij และ Witholt (1995)

ใน *A. eutrophus* ยีน *phbC*, A, B จะควบคุมเอนไซม์ในการผลิต PHB โดยยีน *phbA* จะควบคุมการทำงานของเอนไซม์ Thiolase เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไปเป็น coenzyme A (HSCoA) ซึ่ง acetyl-CoA จะเข้าสู่ TCA cycle ไปพร้อมๆกันด้วย โดย acetyl-CoA 2 โมเลกุล จะมาเชื่อมต่อกันเป็น acetoacetyl-CoA โดยเอนไซม์ Thiolase เช่นเดียวกัน ยีน *phbB* จะควบคุมการทำงานของ NADPH-depedent acetoacetyl-CoA- reductase เอนไซม์ชนิดนี้จะต่างจาก reductase โดยทั่วไปคือจะกระตุ้นการย่อยสลายกรดไขมันด้วย กระบวนการ β -oxidation และ NAD^+ จะมารับโปรตอนและอิเล็กตรอน ทำให้ได้ (R)-3-OH-butryryl-CoA ซึ่งการถูกกระตุ้นด้วย R-form ของมอนอเมอร์ จะทำให้เกิดการสร้างสายพอลิเมอร์ PHB ที่เป็น R-form เช่นเดียวกัน (Leij และ Witholt, 1995) ดังรูปที่ 2.12

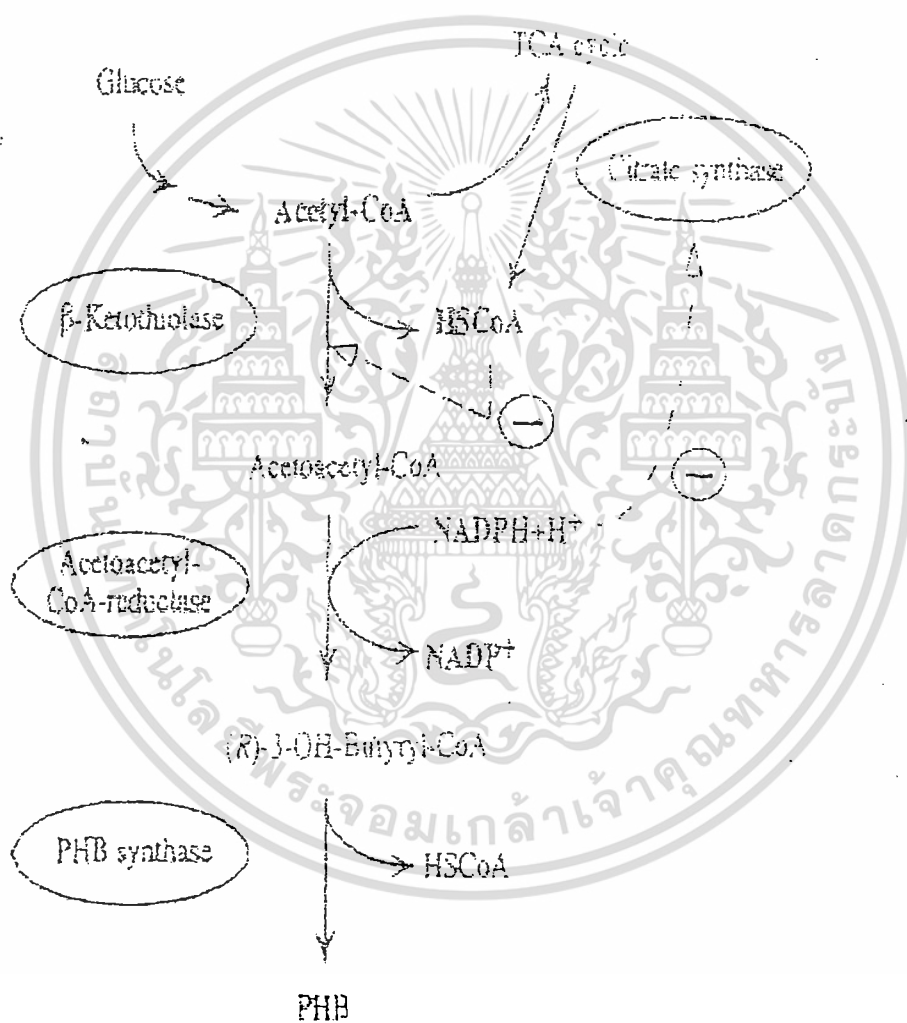


รูปที่ 2.12 วิธีการสังเคราะห์ PHB ของ *A. eutrophus*

ที่มา : Leij และ Witholt (1995)

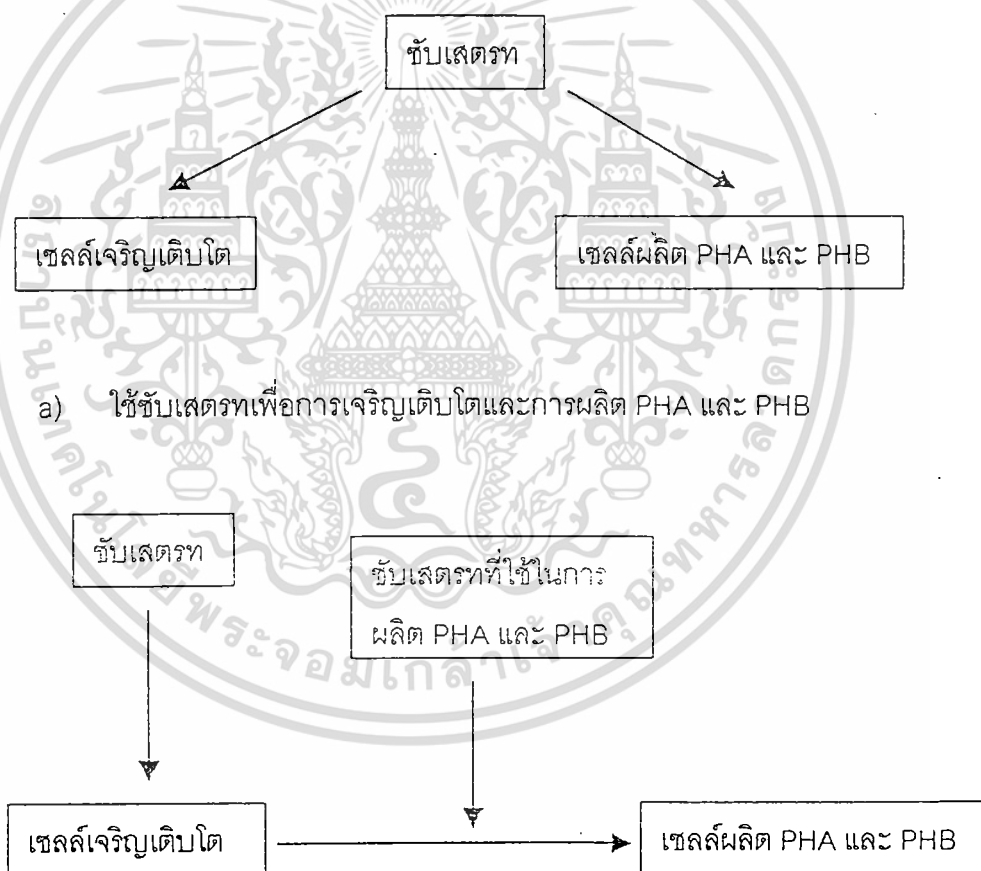
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใน *Ralstonia eutropha* วิธีการสังเคราะห์ PHB จะเกิดขึ้นใน 3 ขั้นตอนโดยเริ่มจาก acetyl-CoA 2 โมเลกุลมารวมกันเป็น acetoacetyl-CoA ในปฏิกิริยาการควบแน่น (condensation) ถูกเร่งโดย β -ketothiolase ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็น (R)-3-hydroxybutyryl-CoA ในปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดย NADH-dependent acetoacetyl-Co-A reductase การที่มีตัวรีดิวซิงแพวเวอร์ (NADH และ NADH) สูงจะทำให้ยับยั้ง citrate synthase สุดท้ายการสร้าง PHB โดย PHB synthase จะได้ (R)-3-hydroxybutyryl-CoA (Leij และ Witholt, 1995) ดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 วิธีการสังเคราะห์ PHB ใน *Ralstonia eutropha*
ที่มา : Leij และ Witholt (1995)

กระบวนการผลิต PHA และ PHB มี 2 กระบวนการที่สำคัญ โดยกระบวนการแรก คือ การเติมซัลเฟอร์ทลงไปเพียงครั้งเดียวเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHA อีกกระบวนการหนึ่งคือการเติมซัลเฟอร์ทลงไป 2 ครั้งเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHA ตามลำดับ ดังรูปที่ 2.14 ซึ่งการผลิต PHA ในอุตสาหกรรมนิยมเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในผลิตพอลิเมอร์ที่มีความจำเพาะในสภาวะการเลี้ยงที่แน่นอน เช่น Photosynthetic bacteria เพราะจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถใช้พลังงานจากแสงมาเป็นแหล่งพลังงานในการผลิตพอลิเอสเทอร์เหล่านี้ได้ เนื่องจากว่ากลไกการผลิตพอลิเมอร์มีความยืดหยุ่น โดยทั่วไปแล้วใน *Pseudomonas* พบว่าพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างเป็นแบบเกลียววนขวานั้นจะถูกยับยั้งหรือป้องกันการย่อยสลายจากเอนไซม์เอสเทอเรส (Agarwal และคณะ, 1995)



รูปที่ 2.14 กระบวนการผลิต PHA และ PHB

ที่มา : Agarwal และคณะ (1995)

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต PHA และ PHB นั้นต้องมีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHA และ PHB จากจุลินทรีย์มีหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.6 และ 2.7

ตารางที่ 2.6 ความสัมพันธ์ของต้นทุนราคาวัตถุดิบกับผลผลิต PHB ที่ได้จากกระบวนการผลิต

วัตถุดิบ	ราคาประมาณ (US\$ kg ⁻¹)	ผลผลิต PHB [g(PHB)(g substrate) ⁻¹]	ราคาวัตถุดิบ {US\$[kg P(3HB)] ⁻¹ }
glucose	0.493 ^a (0.220 ^c)	0.380 ^b	1.300 (0.580)
sucrose	0.290 ^c	0.400 ^b	0.720
methanol	0.180 ^e	0.430 ^b	0.420
acetic acid	0.595 ^e	0.380 ^b	1.560
ethanol	0.502 ^a	0.500 ^b	1.000
mollase	0.220 ^a	0.420 ^a	0.520
whey	0.071 ^a	0.330 ^a	0.220
hemicellulose hydrolysate	0.069 ^a	0.200 ^a	0.340

เมื่อ a คือ ข้อมูลที่นำมาจาก Hocking Marchessault, 1994

b คือ ข้อมูลที่ผ่านการคำนวณโดยสันนิษฐานว่าจุลินทรีย์สามารถสะสม PHB ได้ 80% ของพอลิเมอร์ทั้งหมด

c คือ การประมาณค่าของแป้งข้าวโพดที่ถูกไฮโดรไลซ์

d คือ ราคาน้ำตาลดิบในตลาดทั่วโลก

e คือ ราคาสลัดทั่วโลกจาก Chem.J. (Korea)

ที่มา : Lee (1996)

ตารางที่ 2.7 การผลิต PHAs โดยจุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

แบคทีเรีย	PHA ^a	แหล่งคาร์บอนที่ใช้ส่วนใหญ่	เวลาในการเพาะเลี้ยง (h)	ความเข้มข้นของเซลล์ (g l ⁻¹)	ความเข้มข้นของ PHA (g l ⁻¹)	ปริมาณ PHA ที่เป็นองค์ประกอบ (%)	อัตราการผลิต (g l ⁻¹ h ⁻¹)
<i>A. eutrophus</i>	P(3HB)	กลูโคส	50	164	121	76	2.42
<i>Al. eutrophus</i>	P(3HB)	คาร์บอนไดออกไซด์	40	91.3	61.9	67.8	1.55
<i>Al. latus</i>	P(3HB)	ซูโครส	18	143	71.4	50	3.97
<i>Methylbacterium organophilum</i>	P(3HB)	เมทานอล	70	250	130	52	1.86
<i>Protomonas extorquens</i>	P(3HB)	เมทานอล	170	233	149	64	0.88

เมื่อ a คือ ตัวย่อของ P(3HB), poly(3-hydroxybutyrate)

ที่มา : Lee (1996)

นอกจากแหล่งคาร์บอนจะมีผลต่อการผลิต PHB แล้ว ยังมีสารอาหารบางชนิดยังมีผลต่อการผลิต PHB ด้วย พบว่าการขาดแคลนสารอาหารขณะเจริญเติบโตจะเป็นผลชักนำให้เกิดการผลิต PHB ได้ เช่น แอมโมเนีย คาร์บอน เหล็ก ดังในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 การจำกัดปริมาณสารประกอบชนิดต่างๆซึ่งนำไปสู่การผลิต PHA

สารประกอบ	ชนิดจุลินทรีย์
แอมโมเนีย	<i>Alcaligenes eutrophus</i> <i>Alcaligenes latus</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Methylocystis parvus</i> <i>Spirillum sp.</i> <i>Hyphomicrobium sp.</i> <i>Pseudomonas sp. K</i> <i>Pseudomonas sp. K</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Rhizobium ORS571</i> <i>Pseudomonas sp. K</i> <i>Azotobacter beijerinckii</i> <i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Pseudomonas sp. K</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i>
คาร์บอน	
เหล็ก	
แมกนีเซียม	
แมงกานีส	
ออกซิเจน	
ฟอสเฟต	
โพแทสเซียม	
ซัลเฟต	

ที่มา : Agarwal และคณะ(1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามในระดับโรงงานอุตสาหกรรม ต้องการความก้าวหน้าในการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีประสิทธิภาพใน ICI PROCESS ใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหาร และใช้ *A. eutrophus* ผลิต PHB copolymer ต้นทุนการผลิตพลาสติกจากการใช้น้ำมันและปิโตรเลียมเป็นแหล่งวัตถุดิบจะเพิ่มสูงขึ้น จนถึงจุดที่พลาสติกชีวภาพที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหารสามารถแข่งขันราคาในตลาดได้ (King, 1982) แต่ผลิตภัณฑ์ของ ICI ก็ยังคงมีราคาสูงอยู่ จึงได้มีการค้นคว้าวิจัยการใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก เช่น กรดแลคติกในหางนม ไชโลสจากโรงงานไม้ หรือน้ำตาลดิบจากกากน้ำตาลหัวบีท (Page, 1992) ซึ่งจะต้องมีการออกแบบถังหมัก การเฝ้าระวังติดตามผล และการควบคุมกระบวนการผลิตที่ดีควบคู่ไปด้วย



บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อ

ตะเกียงอัลกอฮอล์ ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ไม้จิ้มฟัน เครื่องแก้วชนิดต่างๆ แผ่นสไลด์ และแผ่นสไลด์หลุม กระจกปิดสไลด์ (Cover glass) กล้องจุลทรรศน์ กล้องจุลทรรศน์ที่มีอุปกรณ์ถ่ายภาพ เครื่องชั่ง ช้อนตักสาร ไมโครปิเปตต์ (micropipette) และทิว (tip) ขนาดต่างๆ คิวเวท (cuvette) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ตู้อบ (hot air oven) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อไฟฟ้า (Autoclave) และเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Shimadzu รุ่น uv-1601

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด และวิเคราะห์ปริมาณ PHB

หลอดทดลองฝาเกลียว กรวยแยก ring stand ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร ปีเปตต์วัดปริมาตร (volumetric pipette) ขนาด 1 มิลลิลิตร เข็มฉีดยาอย่าง เครื่องวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC) Shimadzu รุ่น GC-17A และ Capillary column ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิเมตร เคลือบด้วย DB-Wax หนา 1 ไมโครเมตร (J&W Scientific Co.)

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการคัดเลือกและเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. Polyhydroxybutyrate (PHB)
2. 3-hydroxybutyrate Sodium Salt (D-3HB)
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
4. ไคโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-3-ไฮเดรต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)
5. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
6. แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
7. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. อัลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (95% v/v C₂H₅OH)
9. ไอโอดีน (I₂)
10. โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)
11. น้ำยาแกรมไอโอดีน
12. สารละลายคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet solution)
13. สารละลายซาฟรานิน (Safranin solution)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณ PHB

1. คลอโรฟอร์ม (CHCl₃)
2. กรดเบนโซอิก (C₇H₆O₂)
3. เมทานอล (CH₃OH)
4. กรดซัลฟิวริก 96 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (96% v/v H₂SO₄)
5. น้ำกลั่น 2 ครั้ง (double distilled water)

3.2.3 สารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ PHB

1. สารละลาย A ซึ่งประกอบด้วย สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร เมทานอล 97 มิลลิลิตร กรดเบนโซอิก 100 มิลลิกรัม
2. สารละลายมาตรฐาน PHB ซึ่งประกอบด้วย PHB 20 มิลลิกรัม ในคลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตร

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol-sulfonic acid

1. สารละลายฟีนอล 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (94% phenol)
2. สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H₂SO₄)

3.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาร์

1. สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H₂SO₄)
2. สารละลายกรดซัลฟิวริก 0.1 นอร์มัล (1 N H₂SO₄)
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร (50% m/v NaOH)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สารละลายกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (4% v/v Boric acid)
5. ไดโทแทสเทียมซัลเฟต (K_2SO_4)
6. คอปเปอร์ซัลเฟต-5-ไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
7. สารละลายเมทิลเรด (Methyl red solution)
8. สารละลายบรอมครีซอลกรีน (Bromocresol green solution)

3.3. อาหารในการเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar (NA)
2. Nutrient broth (NB)
3. 3-HB medium ในปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

- ไดโทแทสเทียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-3-ไฮเดรต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	0.6 กรัม
- โทแทสเทียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2 กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.2 กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	0.2 กรัม
- 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรตโซเดียมซอลท์ (D-3HB)	0.5 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. PHB medium ในปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

- ไดโทแทสเทียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-3-ไฮเดรต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	0.6 กรัม
- โทแทสเทียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2 กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.2 กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	0.2 กรัม
- PHB	0.5 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.4. จุลินทรีย์มาตรฐานในการทดลอง

Alcaligenes eutrophus TISTR 1403 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ส่งชื่อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติ

นำตัวอย่างที่เป็นน้ำและน้ำเสียจะเก็บโดยใช้ขวดเก็บตัวอย่างพลาสติกชนิดที่ทำจาก โพลีเอทิลีน ปิดขวดให้แน่น ส่วนตัวอย่างที่เป็นดินจะเก็บใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้แน่นเช่นเดียวกัน จดบันทึกวัน เวลา และตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างทั้งดิน และน้ำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดลองชั้นต่อไป

3.5.2 การคัดแยกจุลินทรีย์

ปิเปตน้ำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 9 มิลลิลิตร และทำการเจือจาง (dilution) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-6} เท่า จากนั้นปิเปตสารละลายเจือจางที่ 10^{-3} - 10^{-5} แต่ละความเข้มข้น 0.1 มิลลิลิตร มา spread บน NA ในจานเพาะเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดแยกเชื้อที่ลักษณะต่างๆ กันจากลักษณะทางลักษณะวิทยา บันทึกผล แล้วทำให้เชื้อบริสุทธิ์โดยเทคนิค cross streak บน NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการติดสีแกรมโดยการนำจุลินทรีย์มาเลี้ยงบน NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วนำมาย้อมสีแกรม จดบันทึกผลที่ได้ เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดอาหารวุ้นเอียง (slant)

ส่วนในกรณีตัวอย่างที่เป็นดินจะชั่งดิน 1 กรัมละลายในสารละลายน้ำเกลือ 9 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-6} จากนั้นทำตามขั้นตอนการคัดแยกจุลินทรีย์เช่นเดียวกับตัวอย่างที่เป็นน้ำ

3.5.3 การคัดเลือกเชื้อที่ย่อย PHB ได้ขั้นต้น โดยวิธี replica plating

ใช้เข็มเย็บเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วแต่ละชนิด เขี่ยลงใน HB agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-28 ชั่วโมง แล้วใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยโคโลนีที่เจริญบน HB agar ลงใน PHB agar คัดเลือกจุลินทรีย์โคโลนีที่เจริญได้บนอาหารแข็งมาทำการทดลองต่อ

3.5.4 การคัดเลือกเชื้อที่ย่อย PHB ได้ขั้นที่สอง

ทำเชื้อตั้งต้นโดยเขี่ยเชื้อจากแต่ละแหล่ง 1 ลูบ ลงในอาหาร NB บ่มเลี้ยง 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อตั้งต้นของเชื้อที่แยกได้จากแหล่งเดียวกันเจือจางให้ได้ $OD_{600} = 0.5$ ถ่ายเชื้อทั้งกลุ่มลงในอาหารเหลว PHB medium ที่มี PHB เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อผสม (mixed culture) เป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อที่เหลืออยู่ในอาหารผสมกับเชื้อจากแหล่งอื่นๆ แล้วคัดเลือกอย่างต่อเนื่อง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

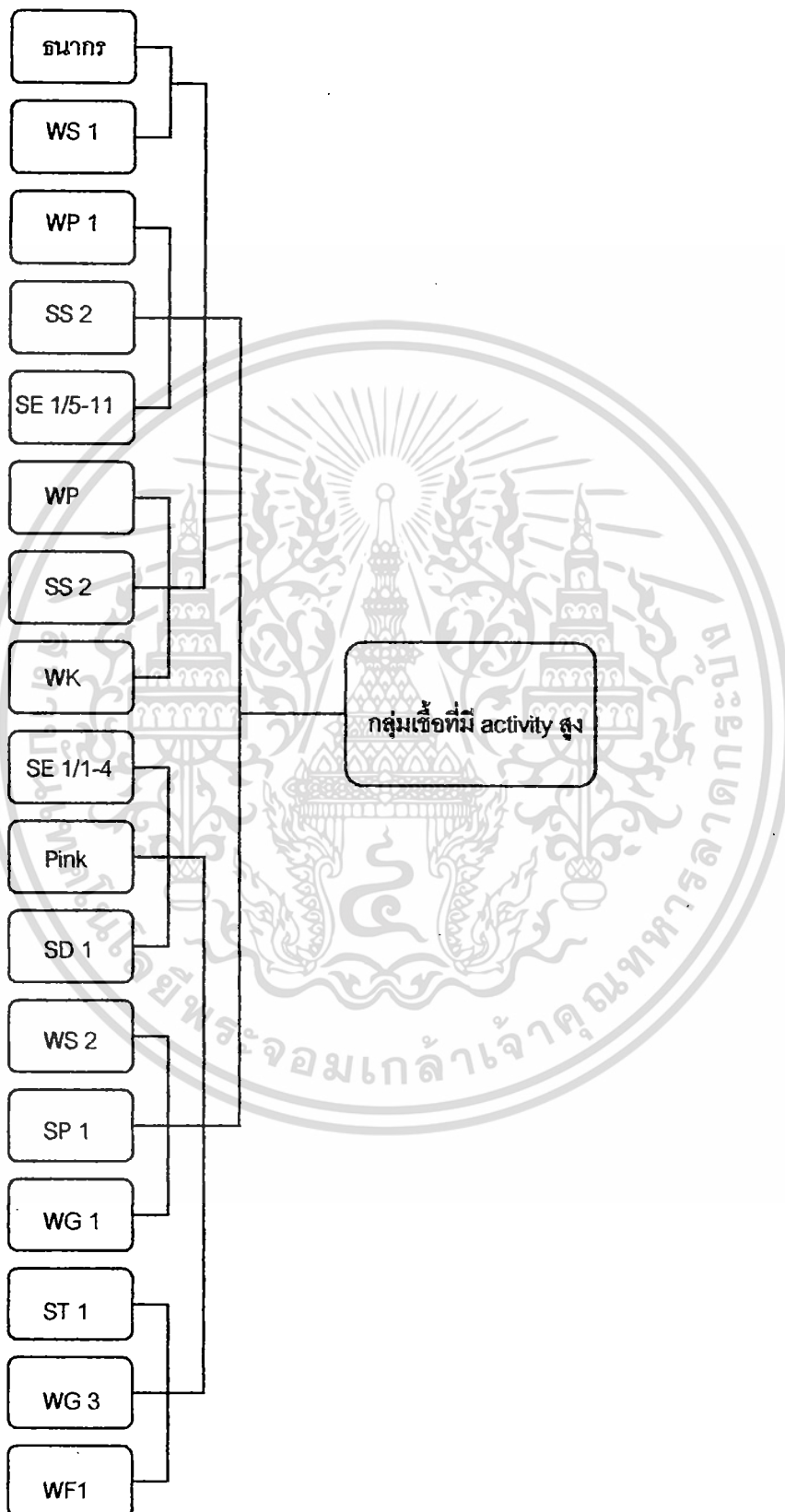
(Sequential screening) ดังแผนภาพในรูปที่ 3.1 แยกเชื้อผสมที่ได้ในขั้นสุดท้ายมาทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์โดย cross streak บน NA บ่ม 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการติดสีแกรม บันทึกผล แล้วเก็บรักษาในอาหารวุ้นเย็ง

3.5.5 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อที่ย่อย PHB ได้

เตรียมเชื้อตั้งต้น โดยเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 3.5.4 จำนวน 1 ลูบลงในอาหาร NB บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเจือจางให้ได้ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 ถ่ายเชื้อที่เจือจางได้ลงใน PHB medium 1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหาร ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่ได้ไปนับจำนวนโคโลนีโดย spread ตัวอย่างบนอาหาร NA บ่ม 24 ชั่วโมง นับโคโลนีและจดบันทึกผลเขียนกราฟการเจริญเติบโตแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ (CFU/มิลลิลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง) ของเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิด

3.5.6 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อย PHB ได้ดีที่สุดโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

นำอาหารเหลว PHB medium ที่เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว เต็มคลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วใช้กรวยแยก แยกชั้นที่เป็นคลอโรฟอร์ม เต็มสารละลาย A และเติมกรดเบนโซอิก (internal standard) จำนวน 30 มิลลิกรัม นำไปแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่า แล้วใช้กรวยแยก แยกชั้นคลอโรฟอร์มที่ละลายอยู่ จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณ PHB ที่เหลือในรูปเมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้ GC-17A โดยใช้พารามิเตอร์ในตารางที่ 3.1



เอกสารที่ เป็น 3.1 สารที่ แผนภาพการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์แบบต่อเนื่อง (sequential screening) การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ PHB ที่เหลือจากการย่อยด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

พารามิเตอร์	ค่าที่ใช้
Injection volume	1 μ l
Column Temperature	50 $^{\circ}$ C
Injector Temperature	200 $^{\circ}$ C
Detector Temperature	220 $^{\circ}$ C
Column Flow	3.37437 ml/min
Linear Velocity	24.4118 cm/s
Split Ratio	1:30
Operating Time	30 min
Program Temperature (4 steps)	1. 50 $^{\circ}$ C 1 min 2. 8 $^{\circ}$ C/min, 160 $^{\circ}$ C 5 min 3. 200 $^{\circ}$ C 4 min 4. 50 $^{\circ}$ C 3 min

หา normalized area ของ peak PHB ที่ได้จากสูตร

$$\text{normalized area ของ PHB} = \frac{\text{peak area ของ PHB}}{\text{peak area ของกรดเบนโซอิก}}$$

คำนวณปริมาณ PHB ที่เหลือจากการย่อยสลายโดยใช้สูตร

$$\text{มวล PHB ที่เหลือในอาหาร 100 มิลลิลิตร (มิลลิกรัม)} = \frac{20 \text{ มิลลิกรัม} \times A \times 100}{B \times 4}$$

เมื่อ A = normalized area ของ PHB ที่เหลือจากการย่อย

B = normalized area เฉลี่ยของ PHB มาตรฐาน จำนวน 20 มิลลิกรัม

จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาทำการทดลองผลิต PHB จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

3.5.7. การเพาะเลี้ยงเชื้อที่แยกได้สำหรับผลิต PHB จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

เตรียมเชื้อตั้งต้นโดย เชื้อเชื้อจากหลอดอาหารวันเลี้ยงใส่ในอาหารเหลว NB นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วเจือจางด้วยอาหาร NB ให้ได้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5

ถ่ายเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว PHB medium ที่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจาก PHB มาเป็นแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน (กลูโคส กากน้ำตาล หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว) บ่มในอุณหภูมิห้อง พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่า total viable count และน้ำหนักเซลล์แห้ง แล้วสกัด PHB และ PHA ออกจากเซลล์แห้งที่เก็บเกี่ยวได้

3.5.8. การสกัดแยก PHA ออกจากเซลล์จุลินทรีย์

นำเซลล์แห้งที่ได้จากข้อ 3.5.7 ด้วยวิธีระเหิดแห้ง มาเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี freeze thaw จากนั้นเทเซลล์ที่ได้ลงในหลอดฝาเกลียว เติมหคลอโรฟอร์ม 4 มิลลิลิตรแล้วปิดฝาให้สนิท นำไปต้มในน้ำเดือด 3.5 ชั่วโมง ทั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมคลอโรฟอร์มให้ครบ 4 มิลลิลิตร ดูดส่วนที่เป็นคลอโรฟอร์มชั้นล่าง มา 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนที่เป็นคลอโรฟอร์มมา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดฝาเกลียวยาว นำไปอบในตู้ 85 องศาเซลเซียสให้แห้ง ซึ่งน้ำหนัก PHA แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้ง PHA (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง) คำนวณประสิทธิภาพการผลิต PHA จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{ประสิทธิภาพในการผลิต PHA ของเซลล์} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ PHA (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}$$

3.5.9. การเตรียมและการวิเคราะห์ PHB โดยก๊าซโครมาโตกราฟี

นำ PHA ที่ได้มาเติมคลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย A 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดต่ออีก 1.5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดชั้นคลอโรฟอร์ม นำมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB ในรูปเมทิลเอสเทอร์ ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟี โดยใช้ GC-17A และใช้พารามิเตอร์ ดังแสดงในตาราง 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ PHB ที่ผลิตจากเซลล์วิถีก๊าซโครมาโตกราฟี

พารามิเตอร์	ค่าที่ใช้
High pressure injector	OFF
Injection volume	2 μ l
Column Temperature	50 $^{\circ}$ C
Injector Temperature	120 $^{\circ}$ C
Detector Temperature	120 $^{\circ}$ C
Column Flow	1.18508 ml/min
Linear Velocity	29.0763 cm/s
Total flow	40 ml/min
Split Ratio	1:30
Operating Time	28.75 min
Program Temperature (4 steps)	1. 50 $^{\circ}$ C 1 min 2. 8 $^{\circ}$ C/min, 160 $^{\circ}$ C 5 min 3. 200 $^{\circ}$ C 4 min 4. 50 $^{\circ}$ C 3 min

หา normalized area ของ peak PHB ที่ได้จากสูตร

$$\text{normalized area ของ PHB} = \frac{\text{peak area ของ PHB}}{\text{peak area ของ PHB มาตรฐาน}}$$

ปริมาณ PHB ในตัวอย่าง (มิลลิกรัม) = $\frac{\text{normalized area ของตัวอย่าง} \times 20 \text{ มิลลิกรัม}}{\text{Normalized area ของ PHB มาตรฐาน}}$

น้ำหนักของ PHB ในตัวอย่างทั้งหมด = 3x ปริมาณ PHB ในตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้นของ PHB (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} &= \frac{\text{น้ำหนักแห้งของ PHB (มิลลิกรัม)} \times 2}{\text{ปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร}} \\ \text{ประสิทธิภาพในการผลิต PHB ของเซลล์} &= \frac{\text{น้ำหนักแห้ง PHB (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}} \end{aligned}$$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย 3-HB และ PHB ได้

จำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้ (ไอโซเลต)	ชนิดอาหาร		
	NA	3-HB medium	PHB medium
จำนวนจุลินทรีย์ที่แยกได้	82	45	32
จำนวนจุลินทรีย์แกรมบวก	19	10	4
จำนวนจุลินทรีย์แกรมลบ	63	35	28

จุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและนำมาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย 3-hydroxybutyrate (HB) ในอาหาร HB medium แล้วนำเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ HB เป็นแหล่งอาหารได้มาคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อย PHB ในอาหาร PHB medium โดยมี PHB เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว (รูปที่ 4.1) ได้ผลดังตารางที่ 4.3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ 82 ไอโซเลต มีจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ 3-HB เป็นแหล่งอาหารได้ 45 ไอโซเลต คิดเป็น 54.88 เปอร์เซ็นต์ เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก 10 ไอโซเลต คิดเป็น 12.20 เปอร์เซ็นต์ และเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ 35 ไอโซเลต คิดเป็น 42.68 เปอร์เซ็นต์ จากจุลินทรีย์ทั้งหมดที่คัดแยกได้มี จุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PHB ได้ 32 ไอโซเลต คิดเป็น 39.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก 4 ไอโซเลต คิดเป็น 4.89 เปอร์เซ็นต์ และเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ 28 ไอโซเลต คิดเป็น 34.15 เปอร์เซ็นต์



PHB medium

HB medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารรูปที่ 4.1 วิธีการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นต้นด้วยเทคนิค replica plating ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายละเอียดของจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อย PHB ได้จากตัวอย่างแต่ละแหล่งแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างดินและน้ำ 10 ตัวอย่าง (WF, WG-1, WG-3, WK, WP, SD, SG, SS-2, ST และ C) มีจำนวนจุลินทรีย์ 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปที่สามารถย่อย HB ได้ ในขณะที่ตัวอย่างดินและน้ำ 7 ตัวอย่าง (WF, WP, SD, SA, SS-2, ST และ C) ที่มีจำนวนจุลินทรีย์ 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป สามารถย่อย PHB ได้ จะพบในตัวอย่างดินมากกว่าตัวอย่างน้ำ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย HB ได้นั้น อาจไม่สามารถย่อย PHB ได้ อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์เหล่านั้นไม่มีเอนไซม์ depolymerase (Anderson และ Dawes, 1990)

ส่วนใหญ่เชื้อที่ย่อย HB และ PHB ได้นั้นจะมีลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น และกลมจำนวนใกล้เคียงกัน และติดสีแกรมลบเป็นส่วนใหญ่ รายละเอียดดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 จุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ที่สามารถเจริญได้บนอาหาร NA, HB และ PHB medium

รหัส	จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ (ไอโซเลต)			เปอร์เซ็นต์ จุลินทรีย์บน PHB medium
	NA	HB medium	PHB medium	
WC	3	0	0	0
WF	4	2	2	50
WG1	9	6	4	44.44
WG2	5	2	0	0
WG3	7	6	2	28.57
WK	3	3	1	33.33
WM	4	0	0	0
WP	4	3	3	75
WS1	3	1	1	33.33
WS2	3	1	1	33.33
WT	4	1	1	25
SD	2	1	1	50
SG	13	10	7	53.85
SS1	3	0	0	0
SS2	6	3	3	50
ST	5	4	4	80
SP	3	1	1	33.33
C	1	1	1	100

ตาราง 4.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ท่าอากาศยาน

Code	ลักษณะโคโคไคมี				ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์				การย่อยสลาย	
	รูปร่าง	ผิวหน้า	สี	ความมันวาว	ขอบโคโคไคมี	รูปร่าง	สีแกรม	HB	PHB	
WC-1	กลม	ขุ่น	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	-	-	
WC-2	กลม	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งเว้า	กลม	ม่วง	-	-	
WC-3	กลม	ขุ่น	ครีม	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-	
WF-1	กลม	แบน	เหลือง	-	เรียบ	กลม	ม่วง	+	+	
WF-2	กลม	ขุ่น	ครีม	+	เรียบ	กลม	แดง	+	+	
WF-3	กลม	ขุ่น	ใส	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-	
WF-4	กลม	ขุ่น	ส้ม	+	หยัก	กลม	แดง	-	-	
WG-1/1	กลม	ขุ่น	แดง	+	เรียบ	แท่ง	แดง	+	+	
WG-1/2	กลม	ขุ่น	ชมพู	+	หยัก	แท่ง	แดง	+	-	
WG-1/3	กลม	แบน	เหลืองส้ม	+	เรียบ	แท่ง	แดง	+	+	
WG-1/4	กลม	ขุ่น	เหลืองใส	+	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-	
WG-1/5	กลม	ขุ่น	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+	
WG-1/6	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวอมเหลือง	+	โค้งเว้า	แท่ง	แดง	-	-	
WG-1/7	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งเว้า	ท่อนสั้น	ม่วง	-	-	

ตาราง 4.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ท่าอากาศยาน (ต่อ)

Code	ลักษณะโคโคไคนี						ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์			การย่อยสลาย	
	รูปร่าง	ผิวหน้า	สี	ความมันวาว	ขอบโคโคไคนี	รูปร่าง	สีแกรม	HB	PHB		
WG-1/8	กลม	ขน	ส้ม	-	โค้งงอ	กลม	ม่วง	-	-		
WG-1/9	กลม	ขน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	ม่วง	+	+		
WG-2/1	กลม	ขน	เหลือง	+	เรียบ	กลม	ม่วง	+	-		
WG-2/2	กลม	ขน	ขาวอมชมพู	+	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-		
WG-2/3	กลม	ขน	ใส	+	เรียบ	กลม	ม่วง	-	-		
WG-2/4	กลม	ขน	ขาวอมส้ม	+	เรียบ	กลม	ม่วง	-	-		
WG-2/5	กลม	ขน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	-		
WG-3/1	กลม	ขน	เหลืองอมส้ม	+	เรียบ	แท่ง	แดง	+	-		
WG-3/2	ไม่แน่นอน	ขน	ชมพู	-	หยัก	ท่อนสั้น	ม่วง	+	-		
WG-3/3	กลม	ขน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	-		
WG-3/4	กลม	ขน	เหลือง	+	เรียบ	กลม	แดง	+	-		
WG-3/5	กลม	ขน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	+	+		
WG-3/6	กลม	แบน	ขาวอมเหลือง	-	โค้งงอ	แท่ง	แดง	-	-		

ตาราง 4.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ท่าอากาศยาน (ต่อ)

Code	ลักษณะโคโคโคนี					ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์				การย่อยสลาย	
	รูปร่าง	ผิวหน้า	สี	ความมันวาว	ขอบโคโคโคนี	รูปร่าง	สีกรม	HB	PHB		
WG-3/7	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวอมเหลือง	+	โค้งงอ	กลม	แดง	+	+		
WK-1	กลม	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งงอ	ทอนสั้น	แดง	+	-		
WK-2	กลม	ขุ่น	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ทอนสั้น	ม่วง	+	+		
WK-3	จุดเล็กๆ	ขุ่น	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ทอนสั้น	แดง	+	-		
WM-1	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	-	โค้งงอ	แท่ง	แดง	-	-		
WM-2	กลม	ขุ่น	เหลืองใส	+	โค้งงอ	แท่ง	แดง	-	-		
WM-3	กลม	ขุ่น	ขาวอมเหลือง	+	เรียบ	ทอนสั้น	แดง	-	-		
WM-4	กลม	ขุ่น	ขาวอมส้ม	+	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-		
WP-1	กลม	ขุ่น	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-		
WP-2	กลม	ขุ่น	เหลือง	+	เรียบ	แท่ง	แดง	+	+		
WP-3	ไม่แน่นอน	ขุ่น	ส้ม	-	หยัก	ทอนสั้น	แดง	+	+		
WP-4	กลม	ขุ่น	เหลืองใส	+	เรียบ	ทอนยาว	ม่วง	+	+		
WS-1/1	กลม	ขุ่น	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	+	+		

ตาราง 4.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ท่าอากาศยาน (ต่อ)

Code	ลักษณะโคโคไคมี						ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์			การย่อยสลาย	
	รูปร่าง	ผิวหน้า	สี	ความมันวาว	ขอบโคโคไคมี	รูปร่าง	สีแกรม	HB	PHB		
WS-1/2	กลม	หูน	เหลือง	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-		
WS-1/3	กลม	หูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-		
WS-2/1	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวอมส้ม	+	โค้งเว้า	ท่อนสั้น	แดง	-	-		
WS-2/2	กลม	หูน	ขาวขุ่น	-	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	-	-		
WS-2/3	กลม	หูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+		
WT-1	กลม	หูน	ขาวอมเหลือง	+	เรียบ	กลม	แดง	+	+		
WT-2	กลม	แบน	ใส	-	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	-	-		
WT-3	กลม	หูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	-	-		
WT-4	กลม	แบน	ขาวขุ่น	-	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-		
SD-1	กลม	หูน	ใส	-	เรียบ	กลม	ม่วง	-	-		
SD-2	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งเว้า	ท่อนสั้น	แดง	+	+		
SG-1	กลม	หูน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	+	+		
SG-2	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	-	โค้งเว้า	กลม	แดง	+	+		
SG-3	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งเว้า	กลม	แดง	+	+		

ตาราง 4.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ทำมาศึกษา (ต่อ)

Code	ลักษณะโคโคไคมี				ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์			การยดโดยสลาย	
	รูปร่าง	ผิวหน้า	สี	ความมันวาว	ขอบโคโคไคมี	รูปร่าง	สีแกรม	HB	PHB
SG-4	กลม	ขุ่น	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	+	+
SG-5	กลม	ขุ่น	เหลือง	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+
SG-6	กลม	ขุ่น	ใส	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-
SG-7	กลม	ขุ่น	เหลือง	+	เรียบ	กลม	ม่วง	+	-
SG-8	กลม	ขุ่น	เหลืองข้ม	+	เรียบ	กลม	ม่วง	+	-
SG-9	กลม	ขุ่น	ชมพูอมส้ม	+	หยัก	กลม	ม่วง	-	-
SG-10	ไม่แน่นอน	แบน	ส้ม	-	โค้งเว้า	ท่อนสั้น	แดง	+	+
SG-11	ไม่แน่นอน	แบน	ชมพู	-	โค้งเว้า	กลม	ม่วง	-	-
SG-12	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งเว้า	ท่อนสั้น	แดง	+	+
SG-13	ไม่แน่นอน	แบน	ส้ม	-	หยัก	กลม	ม่วง	+	-
SP-1	กลม	ขุ่น	เหลืองใส	+	เรียบ	แท่ง	แดง	+	+
SP-2	กลม	ขุ่น	ขาวขุ่น	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-
SP-3	กลม	ขุ่น	ครีม	-	เรียบ	กลม	ม่วง	-	-
SS-1/1	กลม	ขุ่น	ขาวขุ่น	+	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-

ตาราง 4.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำที่ท่าอากาศยาน (ต่อ)

Code	ลักษณะโคโคไคมี					ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์			การย่อยสลาย	
	รูปร่าง	ผิวหน้า	สี	ความมันวาว	ขอบโคโคไคมี	รูปร่าง	สีแกรม	HB	PHB	
SS-1/2	จุดเล็ก ๆ	ฟู	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	-	-	
SS-1/3	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	-	โค้งเว้า	แท่ง	ม่วง	-	-	
SS-2/1	กลม	ฟู	ขาวขุ่น	-	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+	
SS-2/2	กลม	ฟู	ขาวขุ่น	-	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+	
SS-2/3	กลม	ฟู	ส้ม	-	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-	
SS-2/4	กลม	ฟู	เหลืองขุ่น	+	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-	
SS-2/5	กลม	ฟู	น้ำตาล	+	เรียบ	แท่ง	แดง	-	-	
SS-2/6	ไม่แน่นอน	แบน	ขาว	-	โค้งเว้า	แท่ง	แดง	+	+	
ST-1	กลม	ฟู	ขาวขุ่น	-	เรียบ	กลม	แดง	+	+	
ST-2	ไม่แน่นอน	แบน	ขาวขุ่น	+	โค้งเว้า	กลม	แดง	+	+	
ST-3	กลม	ฟู	ขาวขุ่น	-	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+	
ST-4	กลม	ฟู	ส้ม	+	เรียบ	กลม	แดง	-	-	
ST-5	กลม	แบน	ขาวขุ่น	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+	
C-1	กลม	ฟู	ชมพู	+	เรียบ	ท่อนสั้น	แดง	+	+	

4.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PHB ได้ขั้นที่สอง

เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแบบต่อเนื่อง (sequential screening) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการ cross streak บน NA จะเหลือเชื้อ 2 ชนิดคือ PHB-1 และ PHB-2 ซึ่งเชื้อทั้งสองมีลักษณะโคโลนี ดังแสดงในรูปที่ 4.2 แล้วทำการยืนยันผลของการย่อยสลาย PHB โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ไป cross streak บน PHB medium ซึ่งมีลักษณะโคโลนีดังรูปที่ 4.3 และเมื่อนำไปย้อมแกรมพบว่า PHB-1 เป็นแกรมบวก ส่วน PHB-2 เป็นแกรมลบ เมื่อตรวจสอบโดยปฏิกิริยาชีวเคมีพบว่า PHB-1 เป็น *Bacillus cereus* ส่วน PHB-2 เป็น *Escherichia coli* ลักษณะเซลล์ที่ติดสีแกรมแสดงดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการคัดเลือกอย่างต่อเนื่อง (sequential screening) บน NA

A = PHB-1

B = PHB-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

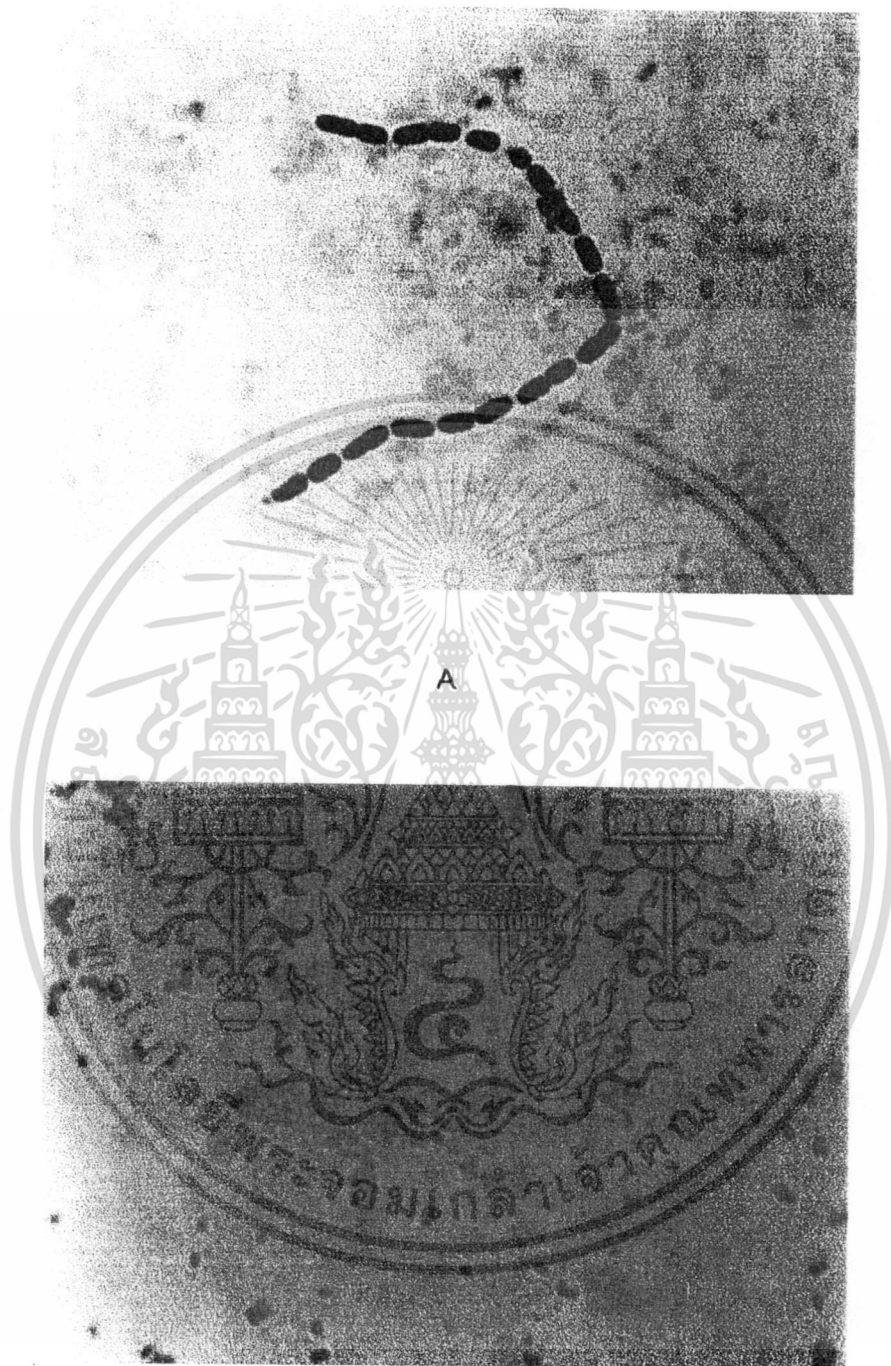


รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการคัดเลือกอย่างต่อเนื่อง
(sequential screening) บน PHB medium

A = PHB-1

B = PHB-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



B

รูปที่ 4.4 ลักษณะการติดสีแกรมของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการคัดเลือกอย่างต่อเนื่อง
(sequential screening)

A = PHB-1

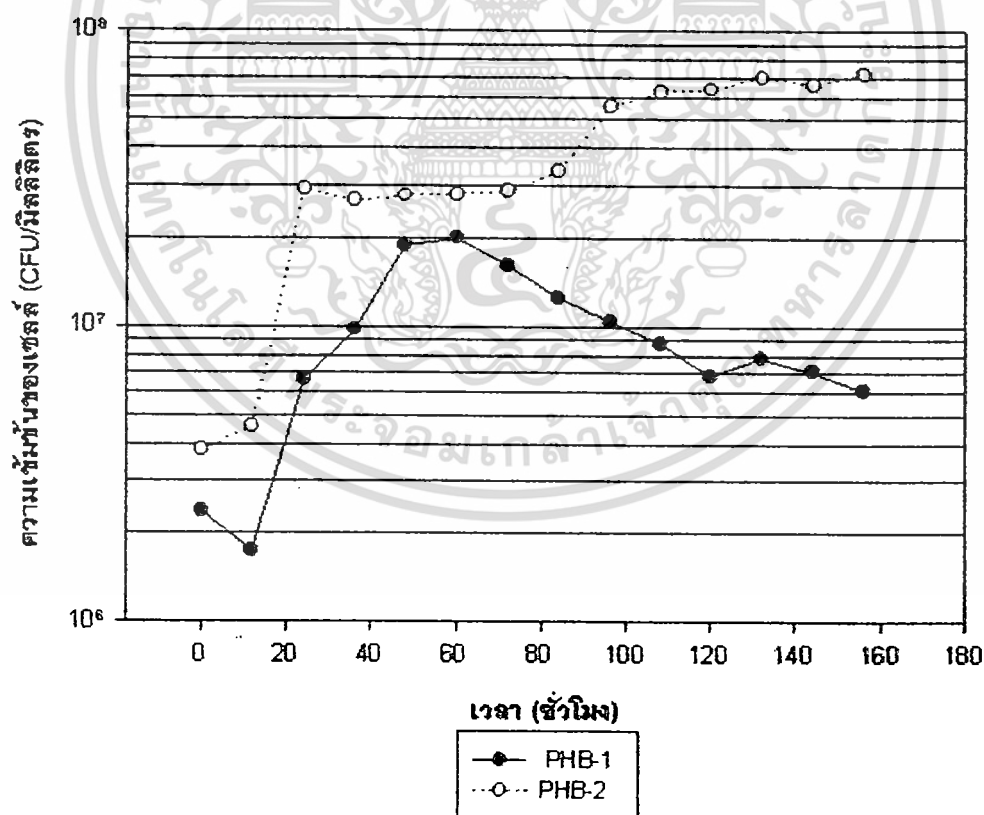
B = PHB-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PHB ได้แบบต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่า PHB-1 และ PHB-2 ที่คัดเลือกได้เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเกิดภาวะแข่งขัน (competition) กับจุลินทรีย์อื่น ๆ เพื่อแย่ง PHB เป็นแหล่งอาหาร (มาริสลา, 2540) ดังนั้นจุลินทรีย์ดังกล่าวจึงควรเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PHB ได้สูงสุด

4.3 ศึกษาการเจริญเติบโตและการย่อย PHB ของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้

เมื่อนำ PHB-1 และ PHB-2 ซึ่งมีความสามารถในการย่อย PHB เพื่อเป็นแหล่งอาหารมาเพาะเลี้ยงในอาหาร PHB medium ซึ่งมี PHB 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องและเชยที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่ามีรูปแบบการเจริญ (growth pattern) ดังรูปที่ 4.5 ซึ่งเมื่อคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ PHB-1 และ PHB-2 เท่ากับ 0.112 และ 0.153 ต่อชั่วโมงตามลำดับ



รูปที่ 4.5 กราฟการเจริญของ PHB-1 และ PHB-2 ในอาหาร PHB medium (PHB 0.5 เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่เหลือในตัวควบคุมและน้ำหมักหลังจากการบ่ม

7 วัน ของเชื้อ PHB-1 และ PHB-2

ตัวอย่าง	ซ้ำ	noemalized area	ปริมาณ PHB ที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร)
ตัวควบคุม	1	0.786	452.78
	2	0.736	423.98
	3	0.755	434.90
PHB-1	1	0.555	319.75
	2	0.433	249.43
	3	0.350	201.63
PHB-2	1	0.342	197.00
	2	0.259	149.00
	3	0.330	190.00

เมื่อนำข้อมูลปริมาณ PHB ที่เหลือมาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ PHB ที่เหลือแล้วนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติได้ผลดังตารางที่ 4.6

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ PHB-1, PHB-2 และตัวควบคุม ในการย่อยสลาย PHB โดยเปรียบเทียบจากเปอร์เซ็นต์ PHB ที่เหลือ พบว่าความสามารถในการย่อย PHB มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบ PHB-1 และ PHB-2 พบว่ามีความสามารถในการย่อยสลาย PHB มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน

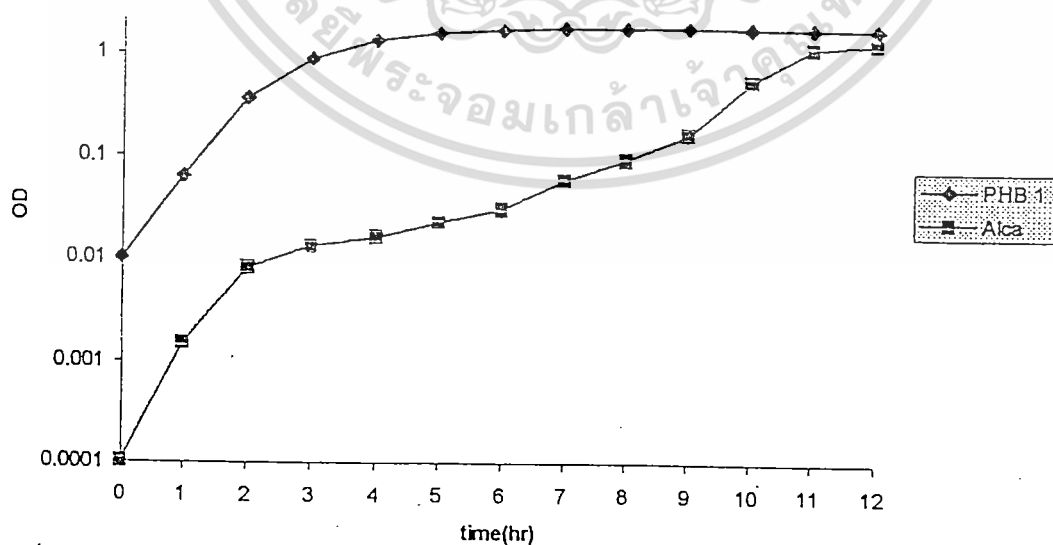
ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ PHB ที่เหลือจากการย่อยสลายโดยเชื้อ PHB-1 และ PHB-2 หลังจากการบ่ม 7 วัน

ตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์ PHB ที่เหลือจากการย่อย
ตัวควบคุม	100 ^a
PHB-1	58.5 ^b
PHB-2	40.9 ^c

ค่าเฉลี่ยใดก็ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยใช้วิธี Student-Newman-Keuls Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.4. การเจริญเติบโตของ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB-1 ในอาหาร NB

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB-1 โดยทำการเสี่ยเชื้อจากหลอดอาหารแข็ง NA1 รูป ใส่ลงในอาหารเหลว NB นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้ววัดการเจริญเติบโตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่า *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB-1 มีช่วงการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 11 และ 4 ตามลำดับ ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อมีปริมาณมาก และยังคงอยู่ในช่วงที่เชื้อมีความสามารถในการทำงานสูง ทำให้ช่วงเวลานี้มีความเหมาะสมในการนำมาทำเป็นเชื้อตั้งต้น



รูปที่ 4.7 รูปแบบการเจริญของ *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1403 และ PHB-1 ในอาหาร NB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนในวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB

ในการศึกษาแหล่งคาร์บอนจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ คือ หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล และน้ำมันมะพร้าวโดยได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาร์ และคาร์บอนด้วยวิธีฟีนอลซัลฟิวรีค ดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าปริมาณไนโตรเจน ในกากมอลต์มีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 0.4452 เปอร์เซ็นต์ และ ปริมาณไนโตรเจนในแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ คือ กากน้ำตาล หางนม น้ำมันมะพร้าว น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม มีค่าเท่ากับ 0.1680, 0.0560, 0.0060, และ 0.0042 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนปริมาณความเข้มข้นคาร์บอนจากกากน้ำตาลมีปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 4.871 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอนจากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ คือ กากมอลต์ น้ำมันมะพร้าว น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม หางนม มีค่าเท่ากับ 2.3972, 2.2794, 2.2702, และ 2.2315 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 ปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนในชั้นเสตรชนิดต่างๆ

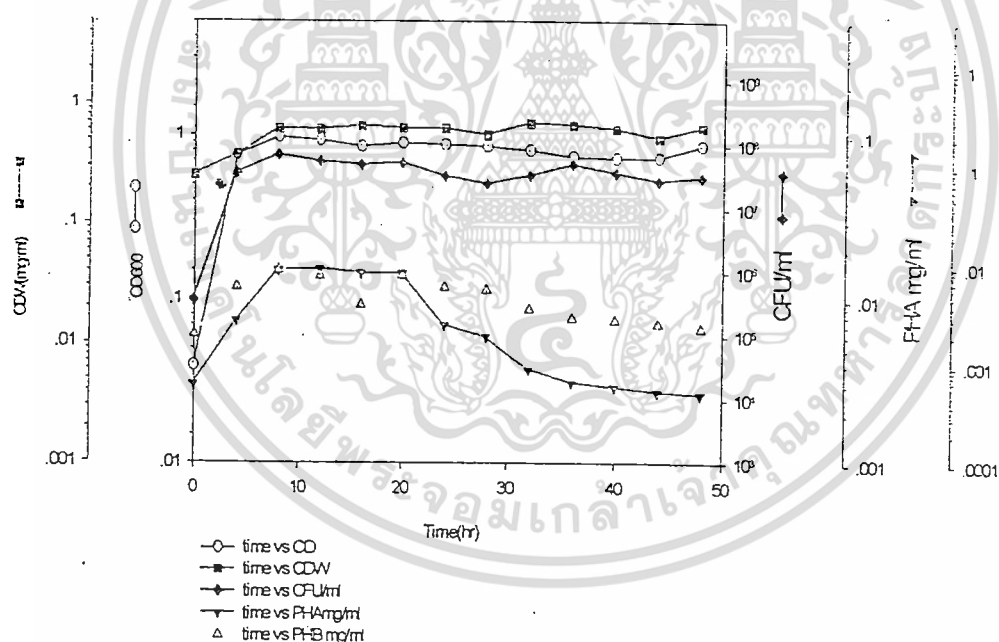
ชนิดของชั้นเสตร	ปริมาณไนโตรเจน	ความเข้มข้นของคาร์บอน (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)
กากมอลต์	0.4452	2.3972
น้ำมันมะพร้าว	0.0060	2.2794
น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม	0.0042	2.2702
กากน้ำตาล	0.1680	4.8710
หางนม	0.0560	2.2315

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB 1

4.6.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในกลูโคส

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นของ *A. eutrophus* TISTR 1403 โดยเก็บที่เวลาปลายการเจริญแบบทวีคูณ ในช่วงเวลาที่ 11 แล้วจึงถ่ายลงในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีการเจริญสูงสุดในช่วงเวลาที่ 8 และมีอัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดในช่วงเวลาที่ 12 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.0247 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในช่วงเวลาที่ 8 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.0144 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.8

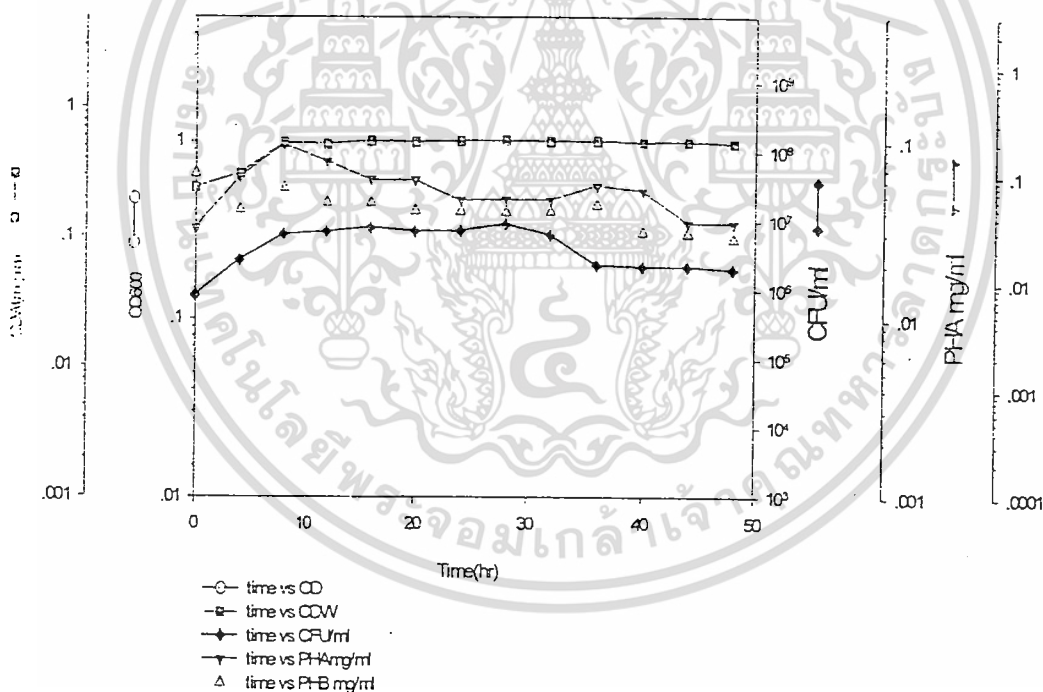


รูปที่ 4.8 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

4.6.2 การศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในวัตถุดิบทางการเกษตรและกากของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร

4.6.2.1 การศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 โดยใช้หางนมเป็นแหล่งคาร์บอน

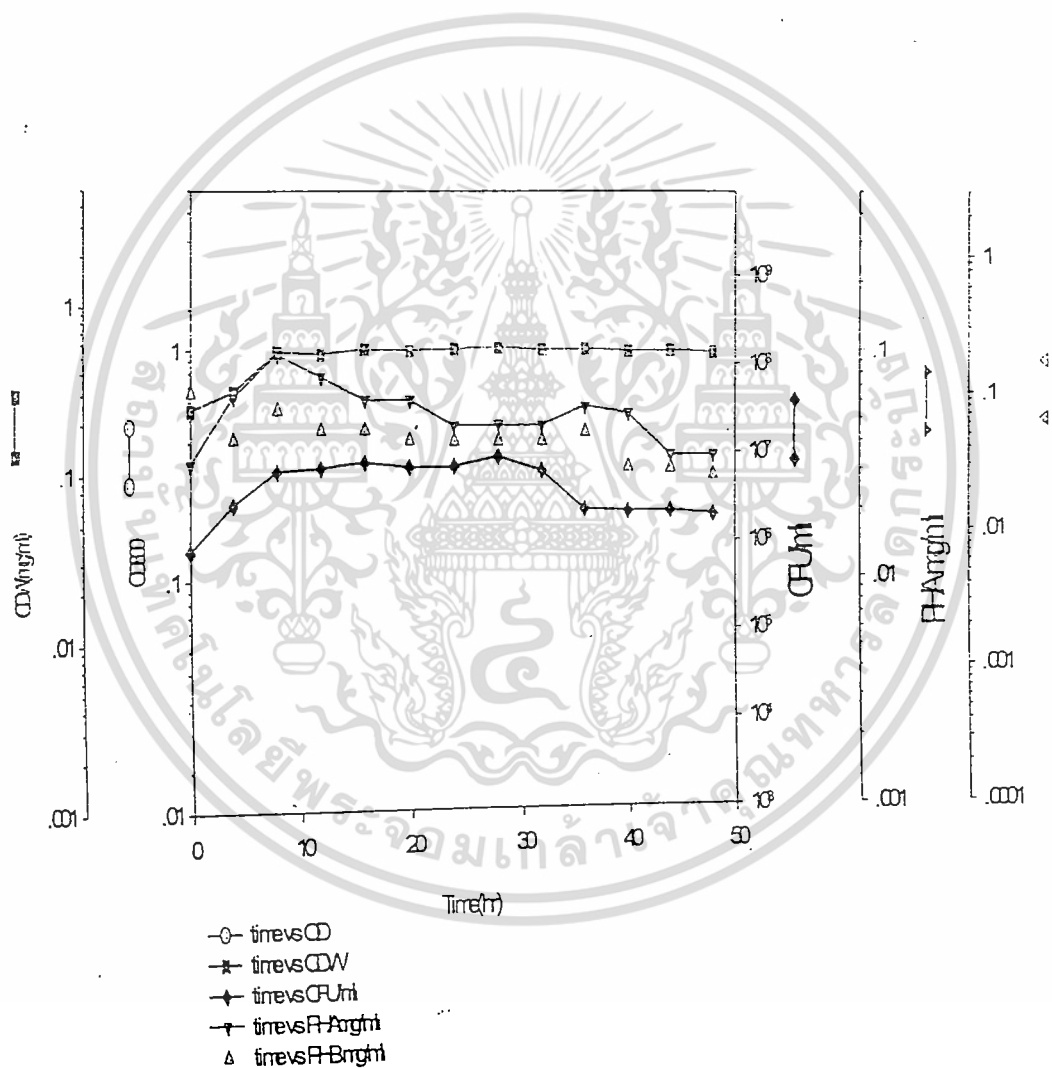
ในการศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 8 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดที่พบได้ในชั่วโมงที่ 8 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.2589 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน

4.6.2.1 การศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 โดยใช้กากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 8 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดที่พบได้ในชั่วโมงที่ 8 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.1052 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.10

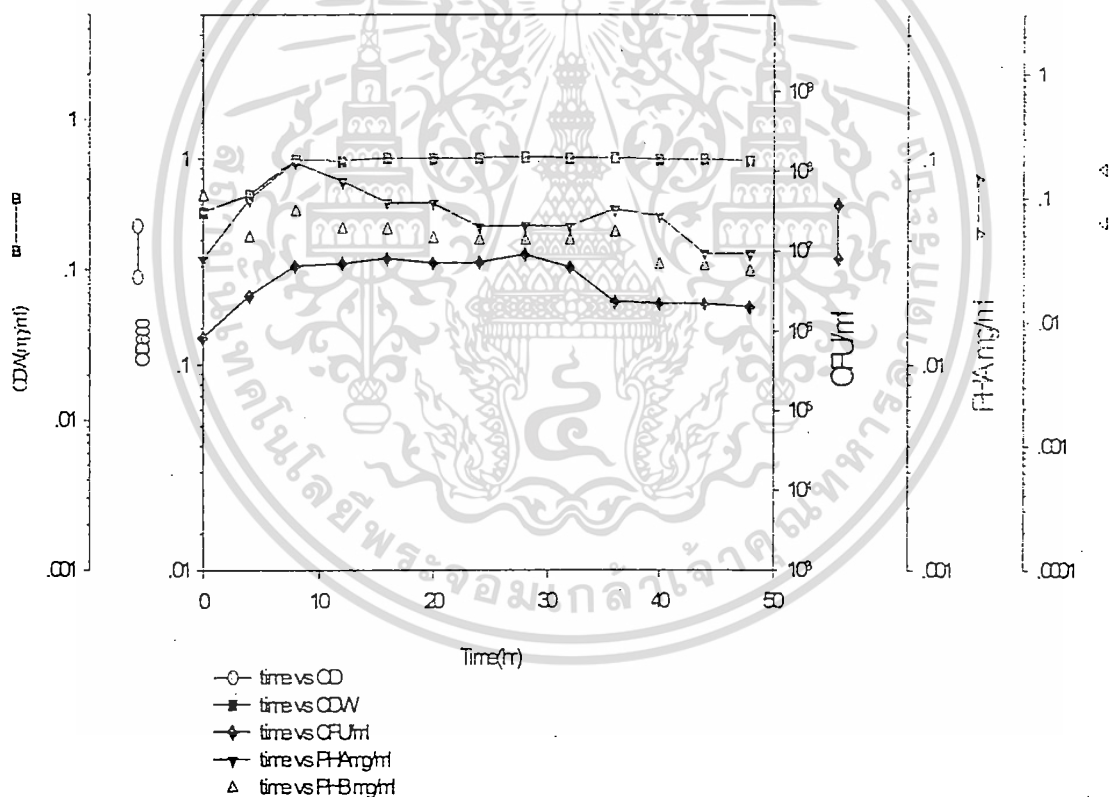


รูปที่ 4.10 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2.3 การศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 โดยใช้ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 8 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดที่พบได้ในชั่วโมงที่ 28 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.3773 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.01162 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

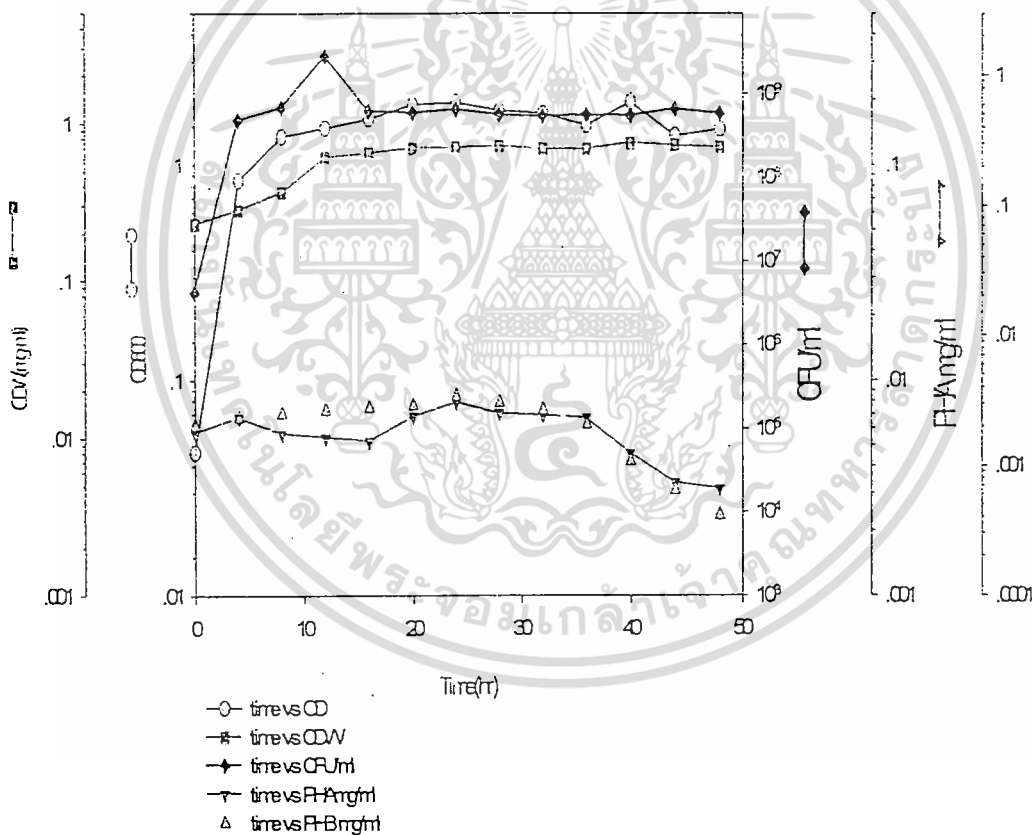


รูปที่ 4.11 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2.4 การศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 โดยใช้กากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.12 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดในชั่วโมงที่ 8 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.038391 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 4 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.0069 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

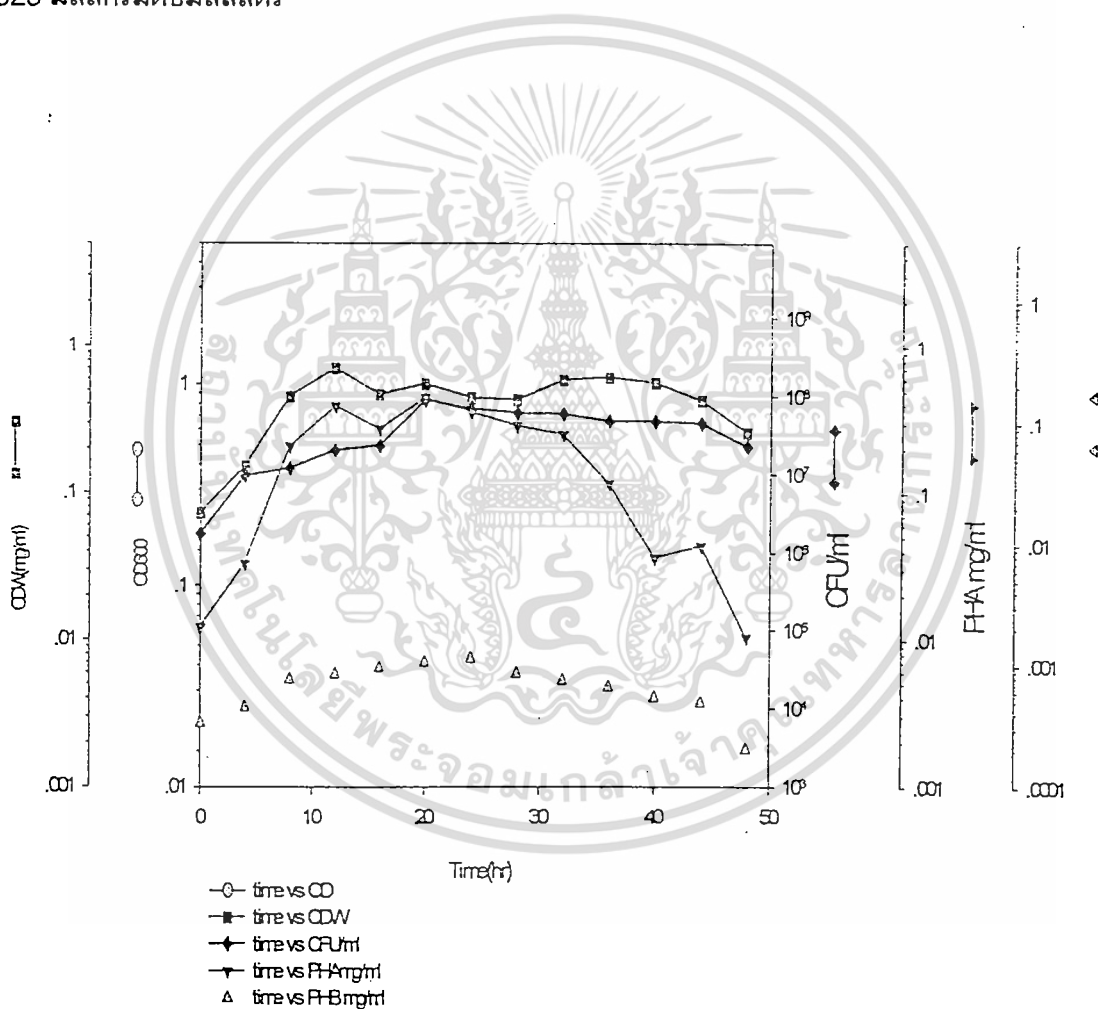


รูปที่ 4.12 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2.5 การศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 โดยใช้ไขมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีไขมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 20 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 20 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.0899 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.0025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



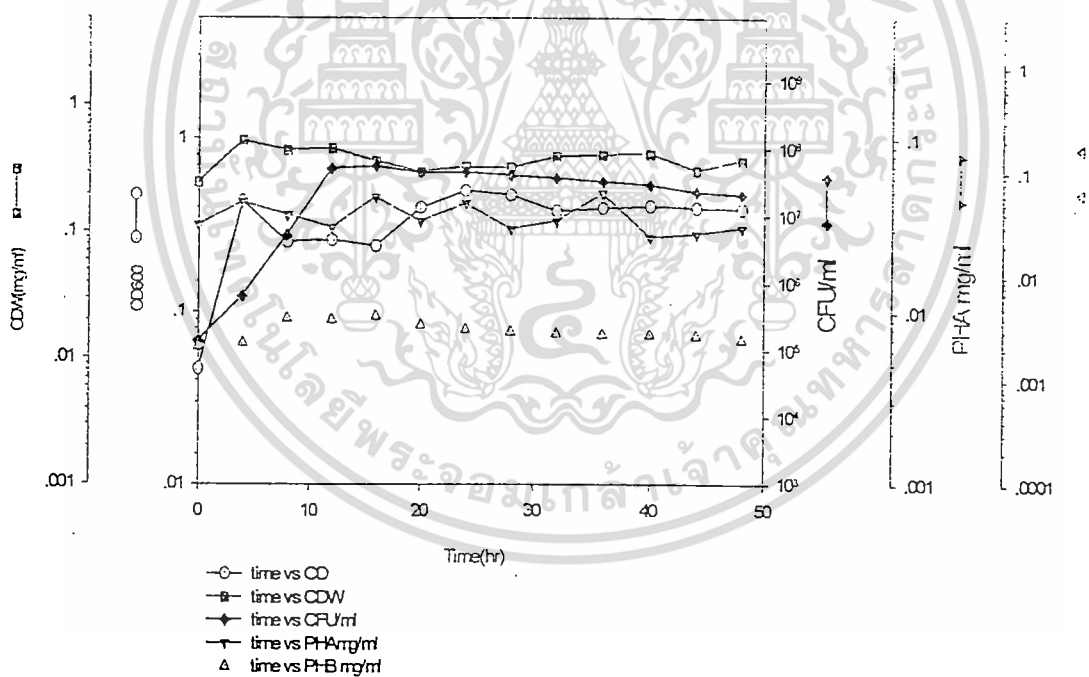
รูปที่ 4.13 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีไขมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.3 การศึกษาการผลิต PHB ของเชื้อ PHB 1 ในกลูโคส

4.6.3.1 การศึกษาการผลิต PHB ของเชื้อ PHB 1 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาการผลิต PHB ของ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.14 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 4 ชั่วโมงและมีอัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 24 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.1287 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 16 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.01137 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



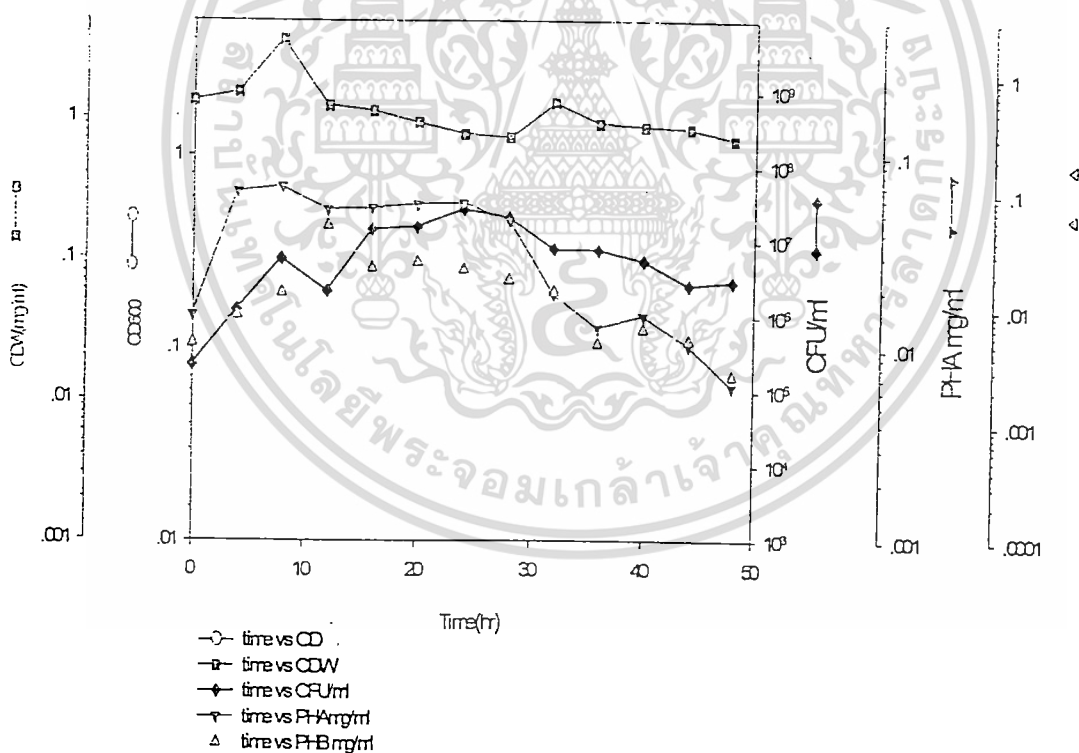
รูปที่ 4.14 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB-1 ในอาหาร PHB medium

เอกสารนี้เป็นที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.4 การศึกษาการผลิต PHB ของเชื้อ PHB 1 ในวัตถุดิบทางการเกษตรและกากของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร

4.6.4.1 การศึกษาการผลิต PHB ของเชื้อ PHB 1 โดยใช้หางนมเป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาการผลิต PHB ของ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.15 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 8 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 24 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.0721 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.0422 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

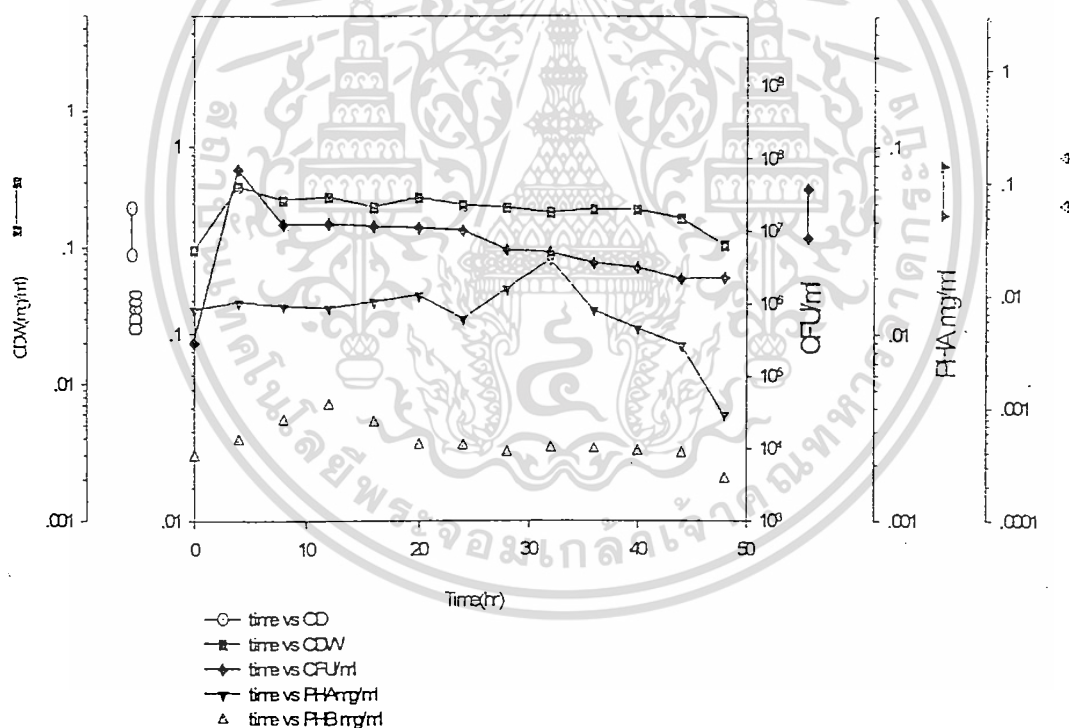


รูปที่ 4.15 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB-1 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.4.2 การศึกษาการผลิต PHB ของเชื้อ PHB 1 โดยใช้กากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาการผลิต PHB ของ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.16 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 4 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 32 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.1381 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.0045 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

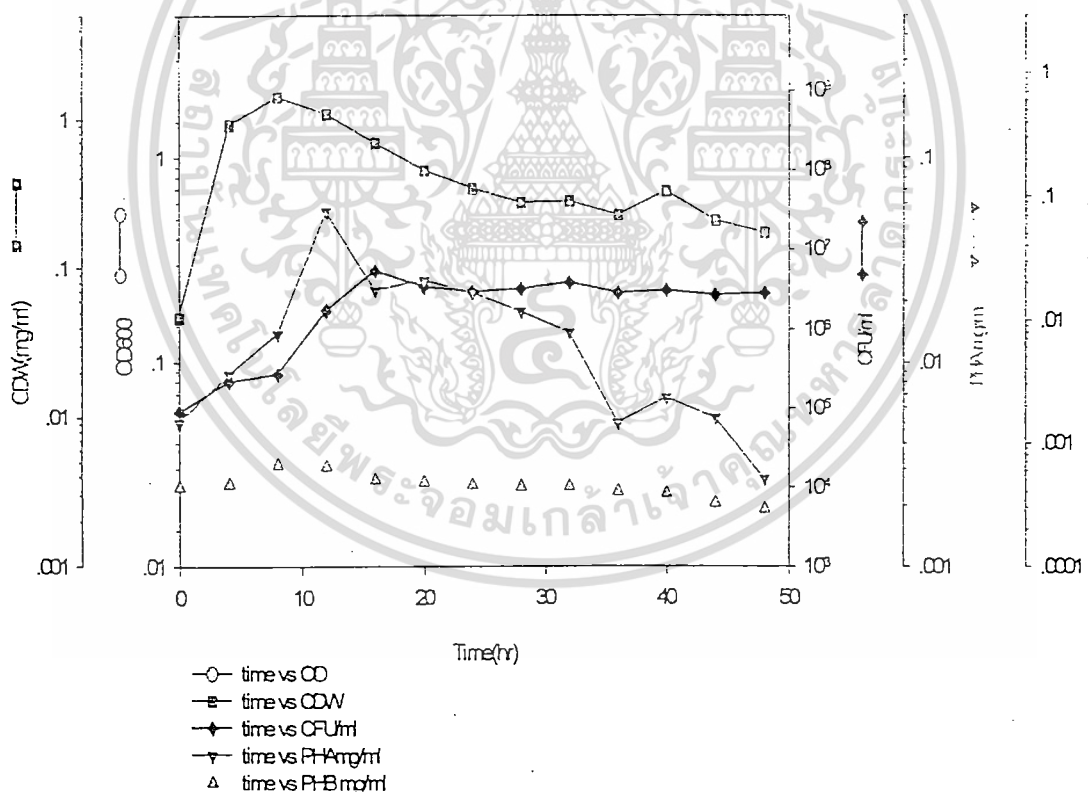


รูปที่ 4.16 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB-1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.4.3 การศึกษาการผลิต PHB ของเชื้อ PHB 1 โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาการผลิต PHB ของ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.17 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 8 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 40 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.22993 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.002159 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

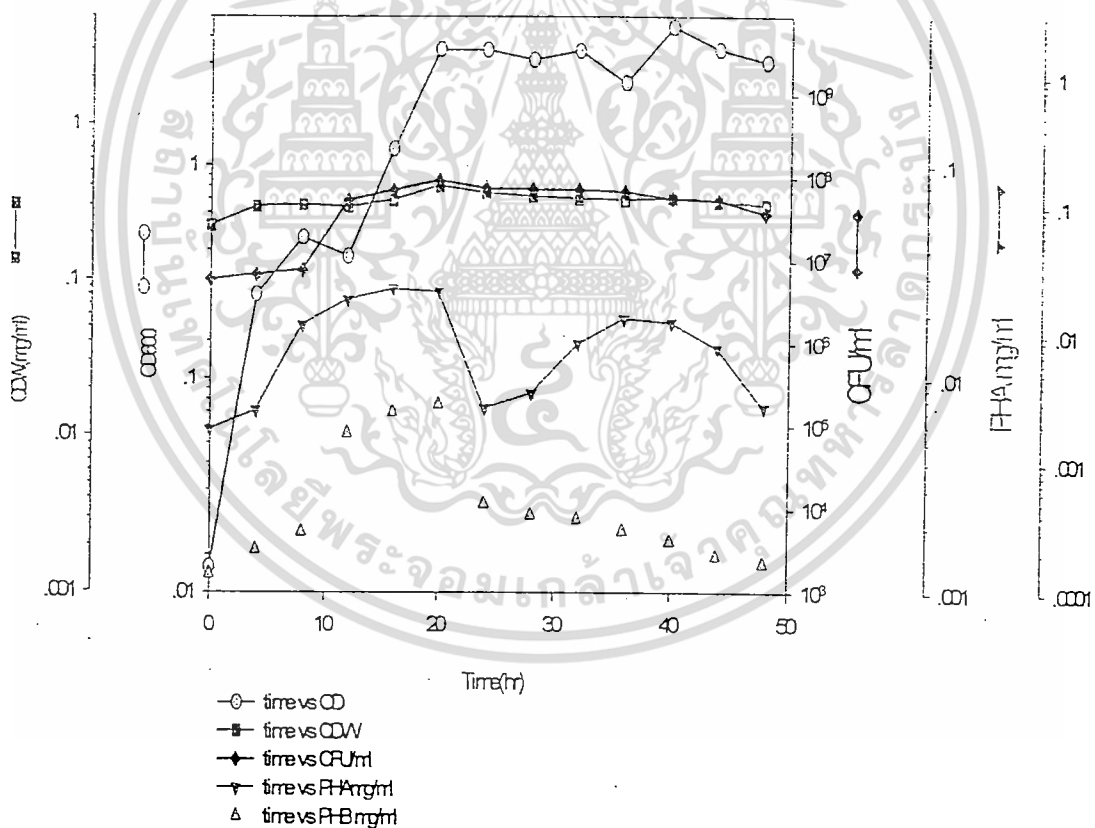


รูปที่ 4.17 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB-1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.4.4 การศึกษาการผลิต PHB ของเชื้อ PHB 1 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาการผลิต PHB ของ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.18 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 20 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 16 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.0803 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 16 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.007658 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

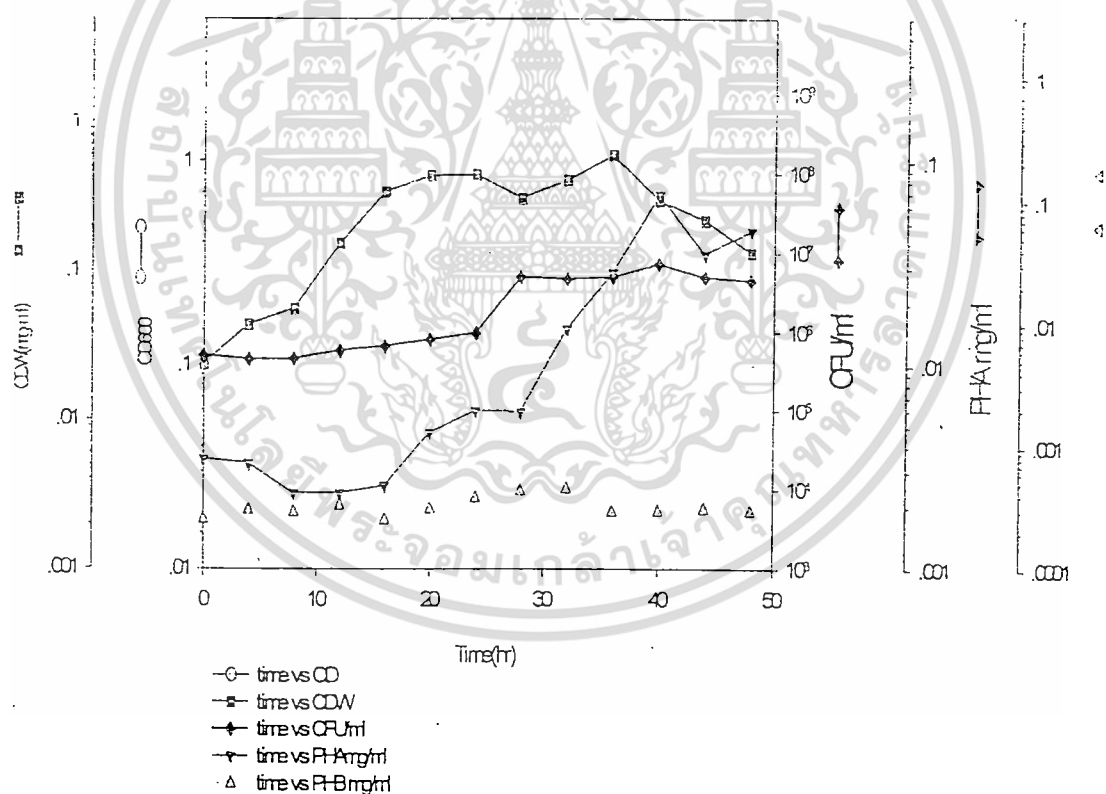


รูปที่ 4.18 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB-1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.4.5 การศึกษาการผลิต PHB ของเชื้อ PHB 1 โดยใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาการผลิต PHB ของ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.19 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 40 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.2299 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.00219 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.19 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB-1 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำปริมาณ PHA และ PHB ในเชื้อ *A. eutrophus* และ PHB 1 จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆมาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ประสิทธิภาพการผลิต PHA และประสิทธิภาพการผลิต PHB ได้ค่าต่างๆดังแสดงในตารางที่ 4.8 เมื่อศึกษาพารามิเตอร์ที่แสดงจลนศาสตร์ การเจริญเติบโตของกลูโคส หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล และน้ำมันมะพร้าว ในเชื้อ *A. eutrophus* และ PHB-1 โดยศึกษาจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและค่าการผลิตผลิตภัณฑ์ ซึ่งได้แก่ PHA และ PHB พบว่าลักษณะการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความสัมพันธ์กันแบบไม่ควบคู่กับการเจริญเติบโต (non growth associate pattern) หลังจากนั้นได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA และ PHB ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลดังตารางที่ 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ ตารางที่ 4.8 ความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดกับประสิทธิภาพการผลิต PHA และประสิทธิภาพการผลิต PHB

ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	ชั่วโมงที่ผลิตสูงสุด		อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด(ชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการผลิต PHA(กรัม PHAต่อกรัม เซลล์)	ประสิทธิภาพการผลิต PHB(กรัม PHAต่อกรัม เซลล์)
		PHA	PHB			
<i>A. eutrophus</i> TISTR 1403	กลูโคส	12	8	0.0628	0.0247	0.0144
	หางนม	8	12	0.0567	0.2589	0.1478
	กากมอลต์	8	8	0.0551	0.1052	0.0262
	น้ำทิ้ง	28	24	0.0051	0.3772	0.0116
	กากน้ำตาล	8	8	0.0608	0.0394	0.0069
	น้ำมันมะพร้าว	20	24	0.0753	0.8099	0.0025
<i>Bacillus cereus</i> (PHB-1)	กลูโคส	24	16	0.0691	0.1287	0.0114
	หางนม	24	12	0.5254	0.0721	0.0422
	กากมอลต์	32	12	0.0461	0.1381	0.0045
	น้ำทิ้ง	24	20	0.2169	0.0636	0.0017
	กากน้ำตาล	16	16	0.0191	0.0803	0.0077
	น้ำมันมะพร้าว	40	48	0.0466	0.2299	0.0022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในวงจำกัดเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้ประโยชน์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ค่าความแตกต่างทางสถิติของ PHA ในเชื้อ *A.eutrophus* TISTR 1403 และ PHB-1

ประสิทธิภาพการผลิต PHA		
แหล่งคาร์บอน	<i>A.eutrophus</i> TISTR 1403	PHB-1
กลูโคส	0.09657 cd	0.01226 e
หางนม	0.03228 cd	0.11731 c
กากมอลต์	0.07352 cde	0.04055 de
น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม	0.04048 de	0.23844 b
กากน้ำตาล	0.04587 cde	0.01745 e
น้ำมันมะพร้าว	0.10436 cd	0.39019 a

ค่าเฉลี่ยใดก็ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยใช้วิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA (ตารางที่ 4.9) ในแหล่งคาร์บอนทั้ง 6 ชนิด คือ กลูโคส หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล และน้ำมันมะพร้าว โดยเชื้อ *A.eutrophus* TISTR 1403 พบว่าน้ำมันมะพร้าวให้ประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุด คือ 0.10436 กรัม PHAต่อกรัมเซลล์ ตามด้วย กลูโคส กากมอลต์ กากน้ำตาล น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม หางนม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.09657, 0.07352, 0.04587, 0.04048, และ 0.03228 กรัม PHAต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่า น้ำมันมะพร้าวมีประสิทธิภาพการผลิต PHA ไม่แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ คือ กลูโคส หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประสิทธิภาพการผลิต PHA จากเชื้อ PHB-1 พบว่าน้ำมันมะพร้าวให้ประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุดเช่นเดียวกัน เท่ากับ 0.39019 กรัม PHAต่อกรัมเซลล์ ตามด้วยน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม หางนม กากมอลต์ กากน้ำตาล กลูโคส ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.23844, 0.11731, 0.04055, 0.01745, และ 0.01226 กรัม PHAต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า น้ำมันมะพร้าว แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนอื่นๆ คือ กลูโคส หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA ของเชื้อ *A.eutrophus* TISTR 1403 และ PHB-1 ด้วยวัตถุดิบที่ให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHA สูงสุด คือ น้ำมันมะพร้าว พบว่าประสิทธิภาพการผลิต PHA ของเชื้อ *A.eutrophus* TISTR 1403 จากน้ำมันมะพร้าวมีประสิทธิภาพในการผลิตต่ำกว่าการผลิตด้วยเชื้อ PHB-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนการผลิตโดยใช้แหล่งคาร์บอนแหล่งอื่นๆพบว่าการผลิต PHA โดยใช้กลูโคส หางนม น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มจากเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่การผลิต PHA โดยใช้กากมอลต์และกากน้ำตาล โดยเชื้อทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.10 ค่าความแตกต่างทางสถิติของ PHB ในเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB-1

ประสิทธิภาพการผลิต PHB		
แหล่งคาร์บอน	<i>A. eutrophus</i> TISTR 1403	PHB-1
กลูโคส	0.00823 bcd	0.00862 bcd
หางนม	0.01585 b	0.08739 a
กากมอลต์	0.00273 d	0.01328 b
น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม	0.00182 d	0.01139 bc
กากน้ำตาล	0.00224 d	0.00433 cd
น้ำมันมะพร้าว	0.00271 d	0.00186 d

ค่าเฉลี่ยใดก็ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยใช้วิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHB (ตารางที่ 4.10) ในแหล่งคาร์บอนทั้ง 6 ชนิด ในเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 พบว่า หางนม ให้ประสิทธิภาพการผลิต PHB สูงสุด คือ 0.01585 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ ตามด้วย กลูโคส กากมอลต์ น้ำมันมะพร้าว กากน้ำตาล น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.00823, 0.00273, 0.00271, 0.00224, และ 0.00182 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่า หางนมมีประสิทธิภาพการผลิต PHA ไม่แตกต่างจากกลูโคส แต่มีประสิทธิภาพการผลิต PHB ต่างจากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ คือ กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล น้ำมันมะพร้าว อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประสิทธิภาพการผลิต PHB จากเชื้อ PHB-1 พบว่าหางนมให้ประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุดเช่นเดียวกัน เท่ากับ 0.087399 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ ตามด้วยกากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กลูโคส กากน้ำตาล น้ำมันมะพร้าว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.01328, 0.01139, 0.00862, 0.00433, และ 0.00186 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า หางนม ให้ประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุดเช่นเดียวกัน เท่ากับ 0.087399 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ ตามด้วยกากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กลูโคส กากน้ำตาล น้ำมันมะพร้าว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.01328, 0.01139, 0.00862, 0.00433, และ 0.00186 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า หางนม ให้ประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุดเช่นเดียวกัน เท่ากับ 0.087399 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ ตามด้วยกากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กลูโคส กากน้ำตาล น้ำมันมะพร้าว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.01328, 0.01139, 0.00862, 0.00433, และ 0.00186 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลัทธิภาพการผลิต PHB แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนอื่นๆ คือ กลูโคส กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล น้ำมันมะพร้าว อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHB ของเชื้อ *A.eutrophus* TISTR 1403 และ PHB-1 ด้วยวัตถุดิบที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดคือหางนม พบว่า ประสิทธิภาพการผลิต PHB ของเชื้อ *A.eutrophus* TISTR 14039 ให้ประสิทธิภาพการผลิต PHB ต่ำกว่า PHB-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนการผลิตโดยใช้แหล่งคาร์บอนอื่นๆ พบว่า การผลิต PHB โดยใช้กากมอลต์ และน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม โดยเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่การผลิต PHB โดยใช้กลูโคส กากน้ำตาล และน้ำมันมะพร้าวโดยเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากความสัมพันธ์ของปริมาณไนโตรเจนปริมาณคาร์บอน(ตารางที่ 4.8)และประสิทธิภาพการผลิต PHA และ PHB พบว่าแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนเป็นองค์ประกอบในปริมาณน้อย คือ น้ำมันมะพร้าว หางนม จะมีความสามารถในการผลิต PHA และ PHB ตามลำดับได้ดีกว่า แหล่งคาร์บอนที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงกว่า ซึ่งข้อจำกัดของ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA และ PHB ได้ก็คือ สามารถผลิต PHA และ PHB ได้ในสภาวะที่มีการจำกัดแหล่งอาหาร เช่น การกำจัดแหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน แหล่งฟอสเฟต เป็นต้น ในปริมาณที่เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ (Kessler และ Witholt, 2001) นอกจากนี้ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีปริมาณของไนโตรเจนและคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่น้อยเช่นกัน แต่มีความสามารถในการผลิต PHA และ PHB ได้ต่ำกว่าในน้ำมันมะพร้าว และ หางนมซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพในการผลิต PHA และ PHB สูงสุด ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มมีสารเคมีจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มปะปนอยู่ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการผลิต PHA และ PHB ได้ และยังพบอีกว่าในเชื้อ PHB-1 นั้นมีประสิทธิภาพในการผลิต PHA และ PHB ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มสูงกว่าการผลิต PHA และ PHB จากเชื้อ *A.eutrophus* TISTR 1403 โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งวัตถุดิบเช่นเดียวกันอาจเป็นเพราะเชื้อ PHB-1 มีการปรับตัวให้มีความสามารถทนต่อสารเคมีได้ดีกว่าเชื้อ *A.eutrophus* TISTR 1403 ทำให้มีประสิทธิภาพในการผลิต PHA และ PHB ได้ดีกว่านั่นเอง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PHB ได้ พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ 82 ไอโซเลต เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก 19 ไอโซเลต (23.17 เปอร์เซ็นต์) เป็นจุลินทรีย์แกรมลบ 68 ไอโซเลต (76.83 เปอร์เซ็นต์) จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถย่อย HB ได้ 45 ไอโซเลต (54.88 เปอร์เซ็นต์) เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก 10 ไอโซเลต (12.20 เปอร์เซ็นต์) จุลินทรีย์แกรมลบ 35 ไอโซเลต (42.68 เปอร์เซ็นต์) และสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อย PHB ได้ 32 ไอโซเลต (39.02 เปอร์เซ็นต์) เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก 4 ไอโซเลต (4.89 เปอร์เซ็นต์) และเป็นจุลินทรีย์แกรมลบ 28 ไอโซเลต (34.15 เปอร์เซ็นต์) เมื่อนำกลุ่มเชื้อดังกล่าวมาคัดเลือกแบบต่อเนื่องสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PHB ได้สูงสุดคือ PHB-1 และ PHB-2 โดยอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ PHB2 เท่ากับ 0.153 ต่อชั่วโมง มากกว่า PHB-1 ซึ่งเท่ากับ 0.112 ต่อชั่วโมง เมื่อนำเชื้อทั้งสองชนิดมาหาประสิทธิภาพของการย่อยสลาย PHB พบว่า PHB-2 ย่อยสลายได้เหลือ 40.9 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ กับ PHB-1 ซึ่งย่อยสลายได้เหลือ 58.5 เปอร์เซ็นต์ เชื้อทั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย PHB ได้ โดยสังเกตจากเปอร์เซ็นต์ PHB ที่เหลือ ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติกับตัวควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาพารามิเตอร์ที่แสดงจลนศาสตร์การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB1 ในแหล่งคาร์บอนทั้ง 6 ชนิด คือ กลูโคส หางนม กากมอลต์ น้ำมันมะพร้าว กากน้ำตาล และน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม พบว่ามีลักษณะการเจริญเป็นแบบไม่คู่ควม โดยพบว่าเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำมันมะพร้าวซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0753 ต่อชั่วโมง ส่วนเชื้อ PHB1 พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดในแหล่งคาร์บอนที่เป็นหางนม มีค่าเท่ากับ 0.5254 ต่อชั่วโมง

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA ในแหล่งคาร์บอนทั้ง 6 ชนิด กลูโคส หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล และ น้ำมันมะพร้าว โดยเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 พบว่าน้ำมันมะพร้าวให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHA สูงสุด คือ 0.10436 กรัม PHA ต่อกรัมเซลล์ ตามด้วย กลูโคส กากมอลต์ กากน้ำตาล น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม หางนม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.09657, 0.07352, 0.04587, 0.04048, และ 0.03228 กรัม

PHA ต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่า น้ำมันมะพร้าวมีประสิทธิภาพในการผลิต PHA ไม่แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ ส่วนประสิทธิภาพการผลิต PHA จากเชื้อ PHA1 พบว่า น้ำมันมะพร้าวให้ประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุดเช่นเดียวกัน เท่ากับ 0.39019 กรัม PHA ต่อกรัมเซลล์ ตามด้วย น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม หางนม กากมอลต์ กากน้ำตาล กลูโคส ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.23844, 0.11731, 0.04055, 0.01745, และ 0.01226 กรัม PHA ต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า น้ำมันมะพร้าวแตกต่างจากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA ของเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB1 ด้วยวัตถุดิบที่ให้ประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุด คือ น้ำมันมะพร้าว พบว่าประสิทธิภาพการผลิต PHA ของเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 จากน้ำมันมะพร้าว มีประสิทธิภาพการผลิตต่ำกว่าการผลิตด้วยเชื้อ PHB1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการผลิตโดยใช้แหล่งคาร์บอนอื่นๆ พบว่า การผลิต PHA โดยใช้กลูโคส หางนม น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่การผลิต PHA โดยใช้กากมอลต์ กากน้ำตาล จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์

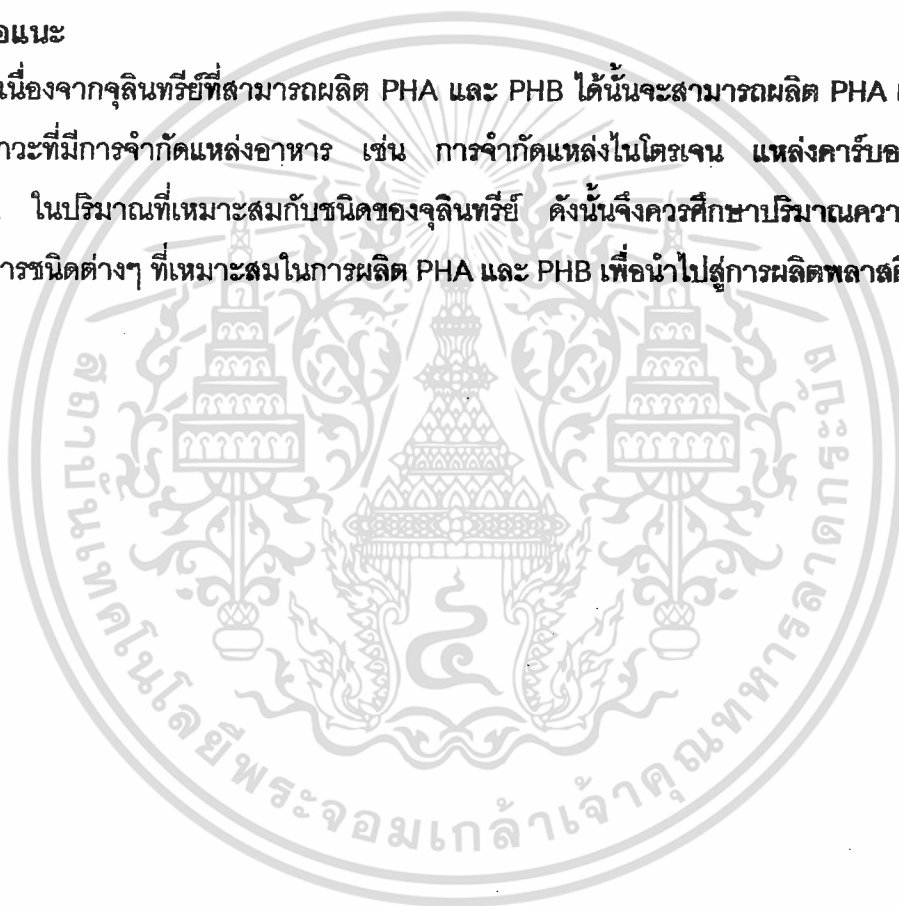
ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHB ในแหล่งคาร์บอนทั้ง 6 ชนิด โดยเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 พบว่า หางนมให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHB สูงสุด คือ 0.01585 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ ตามด้วย กลูโคส กากมอลต์ น้ำมันมะพร้าว กากน้ำตาล น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.00823, 0.00273, 0.00271, 0.00224, และ 0.00182 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่าหางนมมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB ไม่แตกต่างจากกลูโคส แต่มีประสิทธิภาพในการผลิต PHB แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนประสิทธิภาพการผลิต PHB โดยเชื้อ PHB1 พบว่า หางนมให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHB สูงสุดเช่นเดียวกัน คือ 0.08739 กรัม PHBต่อกรัมเซลล์ ตามด้วย กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กลูโคส กากน้ำตาล น้ำมันมะพร้าว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.01328, 0.01139, 0.00862, 0.00433, และ 0.00186 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่า หางนมให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHB แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิต PHB โดยเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB1 ด้วยวัตถุดิบที่ให้ประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุด คือหางนม พบว่าประสิทธิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพการผลิต PHB ของเชื้อ *A.eutrophus* TISTR 1403 จากหางนม มีประสิทธิภาพการผลิตต่ำกว่าการผลิตด้วยเชื้อ PHB1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการผลิตโดยใช้แหล่งคาร์บอนอื่นๆ พบว่า การผลิต PHB โดยใช้กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่การผลิต PHB โดยใช้กลูโคส กากน้ำตาล น้ำมันมะพร้าว จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA และ PHB ได้นั้นจะสามารถผลิต PHA และ PHB ได้ในสภาวะที่มีการจำกัดแหล่งอาหาร เช่น การจำกัดแหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน แหล่งฟอสเฟต ในปริมาณที่เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงควรศึกษาปริมาณความต้องการธาตุอาหารชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมในการผลิต PHA และ PHB เพื่อนำไปสู่การผลิตพลาสติกชีวภาพต่อไป



เอกสารอ้างอิง

มาริสสา จาตุพรพิพัฒน์ "Microbial interference" เอกสารประกอบการสอนวิชาจุลชีววิทยาถึง
แวดล้อม, 2540

Agarwal, G.P., L. de Boer, H. Brandl, L. Dijkhuizen, R. C. Fuller, and R. A. Gross, In
Microbial Bioproducts, pp.77-93, Springer-Verlag, New York, 1998.

Amass, W., Amass, A., and Tighe, B. "A review of Biodegradable polymer: use, current
development in synthesis and characterization of biodegradable polyester,
blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation
studies" Polym. Int. 47: 89-144, 1998.

Anderson, A.J. and E.A. Dawes. Occurrence, Metabolism, Metabolic role, and Industrial
Use of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Microbial Rev. 54:450-472, 1990.

Atlas, M.R. Handbook of Microbiological Media, pp. 718-719, CRC press, Inc., Florida,
1993.

Ballard, D.G.H., Holms, P.A., and Senior, P.J. " Formation of polymers of β -
Hydroxybutyric acid in bacterial cells and a comparison of the morphology of
growth with the formation of polyethylene in the solid state" Recent advances in
mechanistic and synthetic aspects of polymerization. Reidel(Kluwer) Publishing
Co., Lancaster, U.K. 215: 293-314, 1987

Bastioli, C. Properties and application of Mater-Bi starch based materials. Polym.
Degrad. Stab. 59:263-272, 1988

Brandl, H., G.A. Richard, R.W. Lenz, and R. C. Fuller. Plastics from Bacteria and for
Bacteria: Poly(β -Hydroxyalkanoates) as Natural, Biocompatible and
Biodegradable Polyesters In Microbial Bioproducts. (Agarwal, G.P., L. de Boer,
H. Brandl, L. Dijkhuizen, R.C. Fuller, R.A. Gross, H. Hoke, A.Laufer, R.W. Lenz,
R. Muller, and Ch. Sydatk eds.) pp. 77-93, Springer-Verlag Berlin,
Heidelberg, 1990.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Braunegg, G., B. Sonnleitner, and R.M. Lafferty. A rapid gas chromatographic Method for The determination of Poly- β -Hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass. Eur. J. Appl. Microbiol. 6:29-37, 1978.
- Byrom, D. Polymer synthesis by microorganism: technology and economics. Trends Biotechnol. 5: 246-250, 1987
- Cromwick, A.M., Foglia T., and Lenz, R.W. The microbial production of poly (hydroxyalkanoates) from tallow. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 464-469, 1996
- Comibert, J., and Marchessault, R.H. Physical properties of Poly- β -hydroxybutyrate IV. Confirmational analysis and crystalline structure. J. Mol. Biol. 71:735-736, 1972
- Comeau, Y, K.J. Hall, and W.K. Oldham. Determination of Poly- β -hydroxybutyrate and Poly- β -Hydroxybutyrate in Activated Sludge by Gas-Liquid Chromatography. Appl. Environ. Microbiol. 54:2325-2327, 1988.
- David, A.M., Alistair, J.A., and Linda, A.N. Regulation of PHB metabolism in *Alcaligenes Eutrophus*. Can. J. Microbiol. 41: 44-49, 1995.
- Dawes, E.A. Novel Biodegradable Microbial Polymers. NATO ASI series, series E Applied science, Vol. 186, pp. 17-448, Klumer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1990.
- De Koning, G.J.M., Kellerhals., M.B., van Meurs, C., Witholt, B. Polyhydroxyalkanoate from fluorescent *Pseudomonas* in retrospect and prospect. J. Environ. Polym. Degrad. 4: 243-252, 1996
- De Smet, M.J., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J., and Wynberg. Characterization of intracellular inclusions forms by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. J. Bacteriol. 154: 870-878, 1983
- Doi, Y.(Ed). Microbial Polyester. VCH Publishers, New York, 1990.
- Dunlop, W.F.,and Pobards, A.W. Ultrastructure study of poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*. J.Bacteriol. 114: 1271-1280, 1973.

- Ellar, D., Lundren, D.G., Okamura, K., and Marchessault, R.H. Morphology of poly- β -hydroxybutyrate granules. J. Mol. Biol. 135: 489-502, 1968.
- Findlay, R.H. and White, D.C. Polymeric betahydroxyalkanoates from environmental samples and Bacillus megaterium. Appl. Environ. Microbiol. 45: 71-78, 1983.
- Fukui, T. and Doi, Y. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis gene of Aeromonas caviae. J. Bacteriol. 179:4821-4830, 1997
- Fukui, T., Yoshimoto, A., Mastsumoto, M., Hosokawa, S., Saito, T., Nishikawa, H., and Tomika, K. Enzymatic synthesis of poly- β -hydroxybutyrate in Zoogloea ramigera. Arch. Microbiol. 110:149-156, 1976.
- Hocking P.J. and Marchessault, R.H. Chem. Technol. Biodegrad. Polym., 1995.
- Gerald, S. Degradable Polymers, principles and application, pp.88-111, Chapman and Hall, New York, 1995.
- Glazer, A.N. and H. Nikaido Microbial : Endamental of applied microbiology, pp.283-295, W. It. Freeman Company, New York, 1994.
- Hamid, S.H., M.B. Amin, and A. Maadhah. Handbook of Polymer Degradation, pp.335-364, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992.
- Hocking, J. and R.H. Marchessault. Biopolyester. In Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers. (Griffin, Q.F.L. ed.) pp. 48-96, Chapman and Hall, London, 1994.
- Holm, P.J. Applications of PHB- a microbially produced biodegradable Thermoplastic. Phys. Technol. 16: 32-36. 1985.
- Jendrossek, D., A. Schirmer, and H. G. Schlegel. biodegradation of polyhydroxyalkanoic acid. Appl. Microbial. Biotechnol. 46:451-463, 1996.
- Juliana, A.R., Marie-Clarie, A.R., and Bruce, A.R. Hemicellulose as potential substrate for production of polyhydroxyalkanoate. Can. J. Microbiol. 41: 262-266, 1995.
- Kepes, A. and C. P. Lenoel. Bull. Soc. Chim. Bio., No.34, pp. 563-57, 1952.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kessler, B., and Witholt, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. J. Biotechnol. 86: 97-104, 2001.
- Law, J.H. and R.A. Slepecky. Assay of Poly- β -hydroxybutyric acid. J. Bacteriol. 82:33-36, 1961.
- Lee, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Biotechnol. Bioeng. 49:1-14, 1996.
- Lee, S. Y. and J. I. Choi. Polyhydroxyalkanoates : Biodegradable Polymer. In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. (Pernain, A.L. and J.E. Davies eds.) pp. 616-627, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1999 .
- Lemoigne, M. Ann. Inst. Pasteur, 39:144, 1925.
- Lemoigne, M. Production of dehydration and polymerization of polyhydroxybutyric acid. Bull. Soc. Chem. Biol. 8:770-782, 1926
- Maskow, T. and W. Babel. Calorimetrically recognized maximum yield of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) continuously synthesized from toxic substrates. Biotechnol. 77: 247-153, 2000.
- Muller, R.J., Kleeberg, I., and Deckwer, W.D. Biodegradable of polyester containing aromatic constituents. J. Biotechnol. 86: 87-95, 2001.
- Page, W.J. Sherburne, R., Elia, L., Graham, L.L. poly(β -hydroxybutyrate) extrusion from pleomorphic cells of Azotobacter vinelandii UWD. Can. J. Microbiol. 41: 22-31, 1995
- Rehn, H. J. and G. Reead. Products of Primary Metabolism. Biotechnol, Vol. 6 pp.403-464, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, 1998.
- Reusch, R.N. Low molecular weight complexed poly(3-hydroxybutyrate): a dynamic and versatile molecule in vivo. Can. J. Microbiol. 41: 50-54. 1995.
- Stockdale, H., Ribbons, D.W., and Daws, E.A. J. Bacteriol. 95:1798-1803, 1968.
- Thayer A.M. Degradable plastics generate controversy in solid waste. Chem Eng News., 68:7-14, 1990.

Wendlandt, K.D., Jechoreck, M. Helm, J., and Stottmeister, u. Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *J. Biotechnol.* 86: 127-133, 2001.

Vert, M., J. Feijen, A. Albertsson, G. Scott, and E. Cjellini. In Biodegradable Polymers and Plastics, pp.95-296, Royal Society of Chemistry, 1987.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารย้อมแกรมแบคทีเรีย

1. Gram's crystal violet

สารละลาย A

crystal violet	2.0	กรัม
เอทิลอัลกอฮอล์ (95 เปอร์เซ็นต์)	20.0	กรัม

สารละลาย B

ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

นำสารละลาย A และ B ผสมกัน นำไปกรองเพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนออก ก่อนนำไปใช้

2. Gram's iodine

Iodine	1.0	กรัม
KI	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร
(เติมไอโอดีน หลังจาก KI ละลายน้ำหมดแล้ว)		

3. Gram's alcohol

เอทิลอัลกอฮอล์ (95 เปอร์เซ็นต์)	98	มิลลิลิตร
acetone	2	มิลลิลิตร

4. Gram's safranin

Safranin O (2.5 เปอร์เซ็นต์ safranin ใน 95 เปอร์เซ็นต์ เอทิลอัลกอฮอล์)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
วิธีการย้อมสีแกรมแบคทีเรีย

1. เกลี่ย (smear) เชื้อที่ต้องการย้อมบนสไลด์ที่ล้างสะอาดทิ้งให้แห้งแล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง การ fix เพื่อให้เซลล์แห้งยึดติดแน่นกับสไลด์
2. หยดสี crystal violet บนเชื้อที่เกลี่ยนาน 1-2 นาที แล้วเทสีทิ้ง
3. หยดสารละลายไอโอดีนบนเชื้อที่เกลี่ยนาน 2 นาที แล้วเททิ้ง สารละลายไอโอดีนจะช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดียิ่งขึ้น
4. นำแบคทีเรียมาล้างสี (decolorized) ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งไม่มีสีของ crystal violet ละลายปนออกมา จึงล้างด้วยน้ำ
5. หยดสี safranin บนเชื้อที่เกลี่ย นาน 15-20 นาที ล้างน้ำ ซับให้แห้งแล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

จากการย้อมสีแกรมนี้จะพบว่า แบคทีเรียแกรมบวกติดสีม่วงของ crystal violet และแบคทีเรียแกรมลบติดสีแดงของ safranin ซึ่งผลการเปลี่ยนแปลงในการย้อมสีดังสรุปในตาราง ข.1

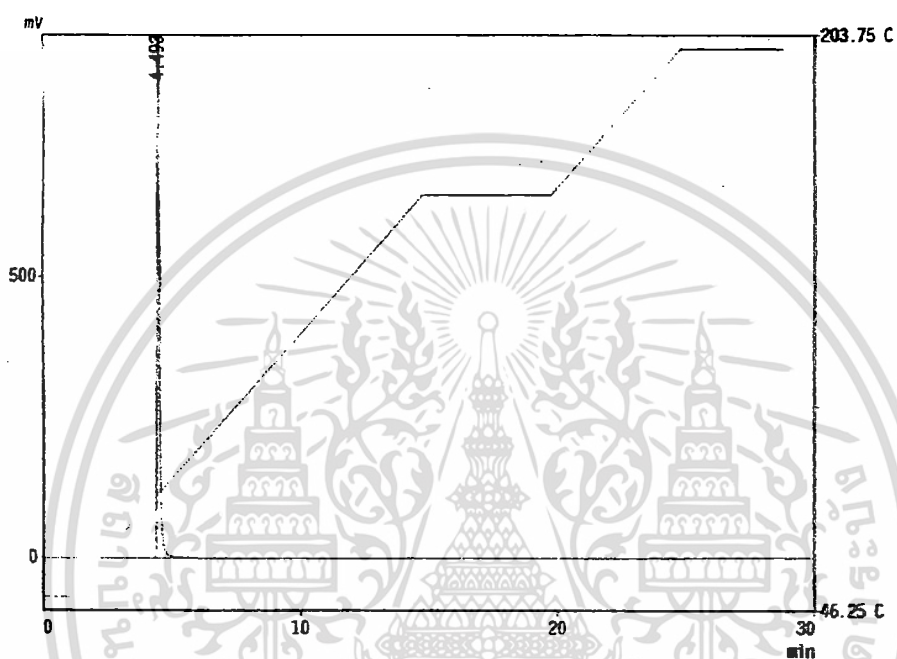
ตาราง ข.1 ปฏิบัติการที่เกิดขึ้นระหว่างการย้อมสีแกรม

สีและสารละลายที่ใช้	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น	
	แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ
1. crystal violet	เซลล์ติดสีม่วง	เซลล์ติดสีม่วง
2. สารละลายไอโอดีน	สารละลายไอโอดีนจะรวมกับ crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ภายในเซลล์ เซลล์ยังติดสีม่วง	สารละลายไอโอดีนจะรวมกับ crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ภายในเซลล์ยังติดสีม่วง
3. เอทิลแอลกอฮอล์	ไซโตพลาสซึมและผนังเซลล์มีขนาดเล็กสารประกอบของสีซึ่งโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถละลายออกได้ เซลล์จึงติดสีม่วง	สารพวกไขมันที่ผนังเซลล์ถูกละลายออกไป ทำให้รูของผนังเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น สารประกอบของสีจึงสามารถละลายออกจากเซลล์ได้ เซลล์ไม่ติดสี
4. safranin	เซลล์ไม่ทำปฏิกิริยากับสีน้ำ เซลล์ติดสีม่วงตามเดิม	เซลล์ติดสีแดงของ safranin

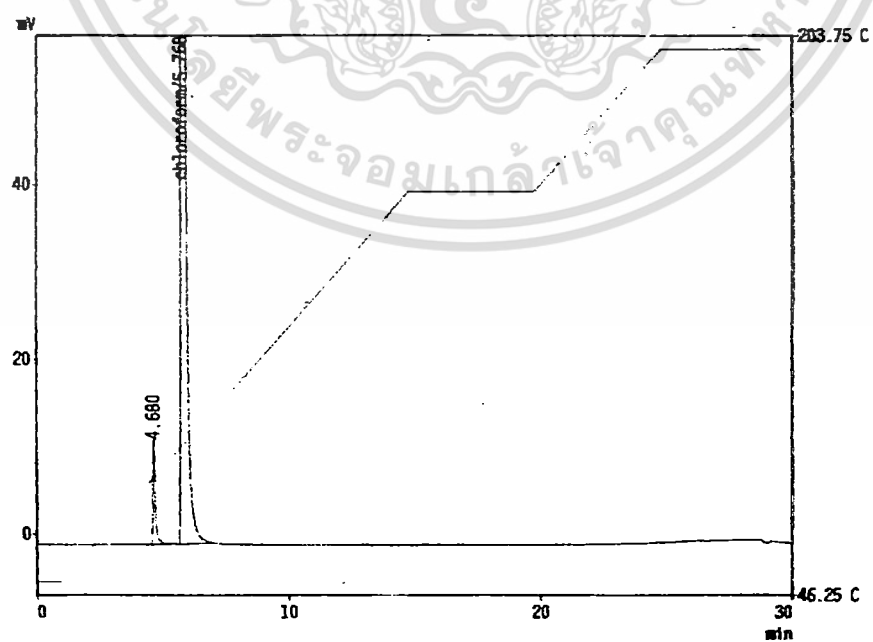
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

โครมาโตแกรมแสดง retention time ของสารที่ใช้ในการวิเคราะห์

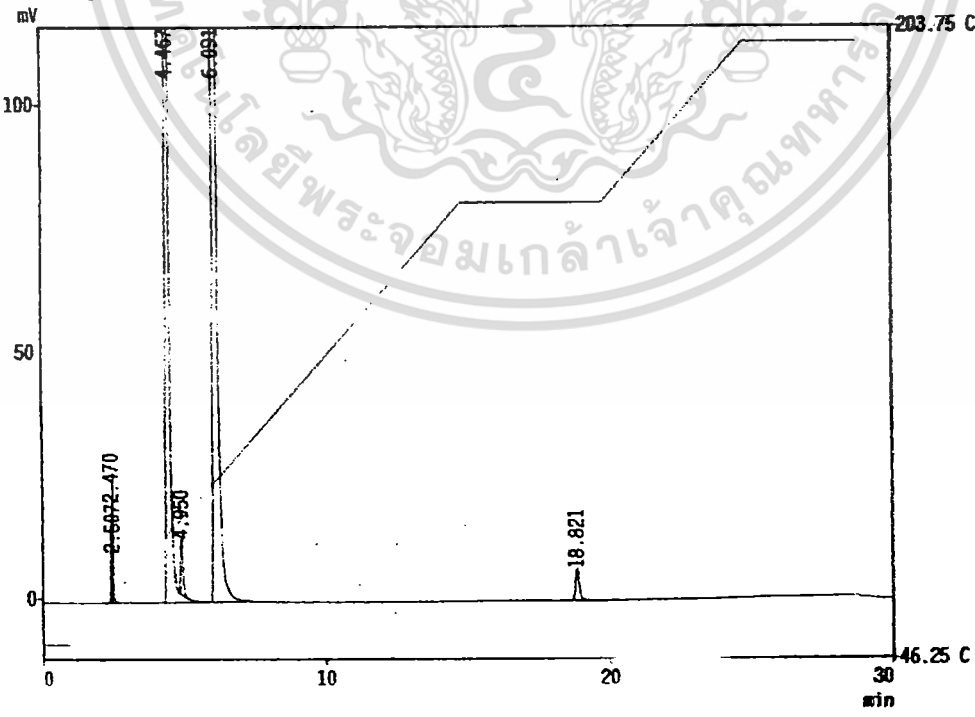
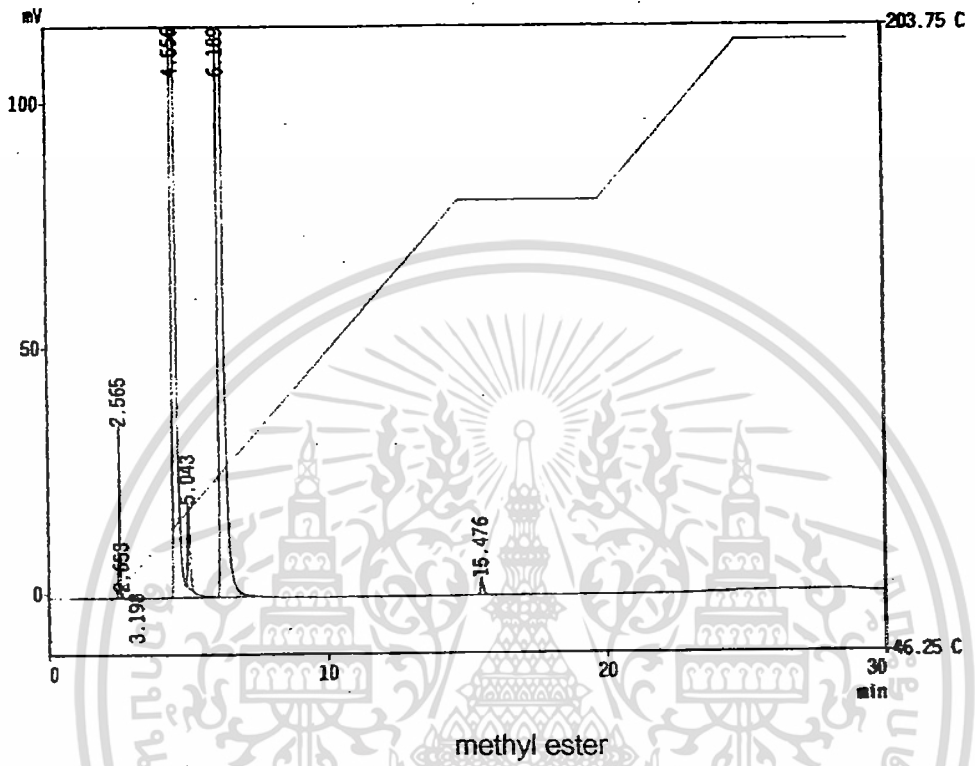


methanol



chloroform

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



benzoic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้