

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิต Polyhydroxybutyrate (PHB) จากผลผลิตทางการเกษตรและกากของเสียจาก
อุตสาหกรรมเกษตรโดยแบคทีเรียที่ย่อย PHB ได้



นางสาวชลิตา รวิโกชนศิริ
นางสาวภัสรา เรียนชอบ
นางสาววิภา สิ้นสมุท

เลขที่.....
เลขทะเบียน 43964
วัน, เดือน, ปี 8 ต.ค. 2545

b.....
i.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of Polyhydroxybutyrate from agricultural products and agroindustry wastes
by PHB degrading bacteria



A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การผลิต Polyhydroxybutyrate (PHB) จากผลผลิตทางการเกษตรและ
กากของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร โดยแบคทีเรียที่ย่อย PHB ได้

โดย นางสาวชลิตา รวีโกชนศิริ รหัส 41053017

นางสาวภัศรา เรียนชอบ รหัส 41053052

นางสาววิภา สิ้นสมุทร รหัส 41053073

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

นางพนัสนิชา นวน

หัวหน้าภาควิชา

(รศ.ดร.นवलพรรณ นวนระนอง)

คณะกรรมการสอบโครงการพิเศษ

ดร.ดุชนันท์ ธนะบริพัตน์

ประธานกรรมการ

(รศ.ดร.ดุชนันท์ ธนะบริพัตน์)

ดร.สุชนา สุชนา

กรรมการ

(อาจารย์ลินจง สุชนา)

ดร.กุลวดี ทองภูเบศร์

กรรมการ

(อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิต Polyhydroxybutyrate (PHB) จากผลผลิตทางการเกษตรและกากของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร โดยแบคทีเรียที่ย่อย PHB ได้	
โดย	นางสาวชลิตา	รวีโกชนศิริ
	นางสาวภัศรา	เรียนชอบ
	นางสาววิภา	สินสมุทร
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์กุลวดี	ทองภูเบศร์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
ปีการศึกษา	2544	

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการผลิต PHB ในอาหาร PHB medium โดยใช้แหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล น้ำมันมะพร้าวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ PHB1 ซึ่งสามารถย่อย PHB ได้และเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดในหางนม เท่ากับ 0.5254 และในน้ำมันมะพร้าวมีค่าเท่ากับ 0.0753 ต่อชั่วโมงตามลำดับ ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA จากเชื้อ PHB1 พบว่าน้ำมันมะพร้าวให้ประสิทธิภาพการผลิตสูงสุด เท่ากับ 0.39019 กรัม PHA ต่อกรัมเซลล์ ตามด้วยน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม หางนม กากมอลต์ กากน้ำตาล กลูโคส ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.23844, 0.11731, 0.04055, 0.01745, และ 0.01226 กรัม PHA ต่อกรัมเซลล์ตามลำดับ โดยน้ำมันมะพร้าวมีความแตกต่างกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA ในเชื้อทั้ง 2 ชนิดด้วยวัตถุดิบที่ให้ประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด คือ น้ำมันมะพร้าว พบว่าเชื้อ PHB1 มีประสิทธิภาพการผลิตสูงกว่าเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนประสิทธิภาพการผลิต PHB จากเชื้อ PHB1 พบว่าหางนมให้ประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด คือ 0.08739 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ ตามด้วย กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กลูโคส กากน้ำตาล น้ำมันมะพร้าวซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.01328, 0.01139, 0.00862, 0.00433, และ 0.00186 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ตามลำดับและมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB โดยใช้หางนมแตกต่างจากแหล่งคาร์บอนอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHB ของทั้ง 2 เชื้อด้วยวัตถุดิบที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตสูงสุด คือ หางนม พบว่าเชื้อ PHB1 มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงกว่าการผลิตโดยเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) from agricultural products and agroindustry wastes by PHB degrading bacteria
Name	Miss Chalita Raweepotesiri Miss Patsara Reanchob Miss Wipa Sinsamut
Special Project Advisor	Miss Kulwadee Tongpubesra
Department	Applied Biology
Academic Year	2001

Abstract

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 (PHB1) and standard culture for PHB production (*A. eutrophus* TISTR 1403) were cultivated in PHB medium with various carbon sources for 48 hours. Maximum specific growth rate of PHB degrading PHB1 was 0.5254 hr^{-1} in whey, and maximum specific growth rate of standard *A. eutrophus* TISTR 1403 was 0.0753 hr^{-1} in coconut oil. The highest efficiency for PHA production of PHB1 by using coconut oil as carbon source, was $0.39019 \text{ g.PHA/g.cell}$, with significantly difference 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 $0.01226 \text{ g.PHA/g.cell}$, respectively. The highest efficiency for PHA production of PHB1 was significantly higher than that of *A. eutrophus* TISTR 1403. In addition, The highest efficiency for PHB production of PHB1 by using whey as carbon source was $0.0879 \text{ g.PHB/g.cell}$, with significantly difference from those of other carbon sources : spent malt, waste water from palm oil production, glucose, molass and coconut oil which were 0.01328 , 0.01139 , 0.00862 , 0.00433 , and $0.00186 \text{ g.PHB/g.cell}$, respectively. The highest efficiency for PHB production of PHB1 was significantly higher than that of *A. eutrophus* TISTR 1403 at 95 percent confidence.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงการพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงการพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	28
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย	36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	68
เอกสารอ้างอิง	70
ภาคผนวก	74

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. ดุชนิ ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการ อาจารย์ลินจง สุขคำ
ภ กรรมการ อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่กรุณาให้ความรู้และคำ
แนะนำตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขจนการทำโครงการพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาคชีววิทยาประยุกต์ ฝ่ายธุรการ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ รวมถึง
ถึงแม่บ้าน ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า
คุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำและความสะดวก และตลอดจนความช่วยเหลือทาง
ด้านอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆตลอดระยะเวลาในการทำโครงการพิเศษ

ขอกราบขอบพระคุณ

1. คุณศีกษา กล้าปราบศึก ผู้จัดการบริษัทมรกต อินดัสตรี จำกัดมหาชน
2. คุณสันต์ ผู้จัดการฝ่ายแปรรูป บริษัทอำพลฟูดส์ไพโรเซสซิง จำกัด
3. คุณภูวนัย จริยวรรณกุล ผู้จัดการแผนก Bulk Production บริษัทไทยเมจิ
4. อาจารย์วันชัย สุทธิอนุ
5. บริษัทคาลส์เบิร์ก

ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์กากของเสียและน้ำทิ้งในการนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการทำ
โครงการพิเศษครั้งนี้

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบุคลากรและผู้มีอุปการะคุณทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน และ
ให้การสนับสนุนทางการศึกษา กำลังใจ ตลอดจนความช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

คณะผู้จัดทำ

เมษายน 2545

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
2.1	คุณสมบัติทางกายภาพ เคมีของพอลิโพรพิลีนและ PHB	10
2.2	ตัวอย่างการนำ PHB ไปใช้ประโยชน์	12
2.3	ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย PHA ได้	15
2.4	ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายพลาสติก	17
2.5	ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสม PHA ไว้ภายในเซลล์ได้	19
2.6	ความสัมพันธ์ของต้นทุนราคาวัตถุดิบกับผลผลิต PHB ที่ได้จากกระบวนการผลิต	24
2.7	การผลิต PHAs โดยจุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	25
2.8	การจำกัดปริมาณสารประกอบชนิดต่างๆซึ่งนำไปสู่การผลิต PHA	26
3.1	พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี	34
4.1	ปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนในชั้นเสตรทชนิดต่างๆ	38
4.2	ความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด กับประสิทธิภาพการผลิต PHA และประสิทธิภาพการผลิต PHB	63
4.3	ค่าความแตกต่างทางสถิติของ PHA ในเชื้อ <i>A. eutrophus</i> TISTR 1403 และ PHB1	64
4.4	ค่าความแตกต่างทางสถิติของของ PHB ในเชื้อ <i>A. eutrophus</i> TISTR 1403 และ PHB1	65
ช.1	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA และ PHB ในเชื้อ <i>A. eutrophus</i> TISTR 1403 และเชื้อ PHB1	86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทั่วไปของ PHAs	4
2.2	ภาพสามมิติของกรานูล PHB ในอุดมคติขนาดเล็กที่บรรจุโมเลกุลเดี่ยวๆของ PHB	5
2.3	PHB กรานูลของ <i>Methylocystis sp.</i> โดยใช้มีเทนเป็นซับสเตรท	6
2.4	PHB กรานูลภายในเซลล์ของ <i>Azotobacter vinelandii</i> UWD หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	6
2.5	การเปรียบเทียบลักษณะของ PHB ในเซลล์ <i>Azotobacter vinelandii</i> UWD : ที่กำลังมีชีวิตอยู่และเซลล์ที่ตายแล้ว	7
2.6	การปลดปล่อย PHB ออกจากเซลล์ <i>Azotobacter vinelandii</i> UWD โดยเลี้ยงในอาหารกลูโคสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	7
2.7	การปลดปล่อย PHB ออกจากเซลล์ <i>Azotobacter vinelandii</i> UWD โดยเลี้ยงในอาหารกลูโคสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง	8
2.8	โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน PHB - Ca^{2+} -PPi และแบบจำลองแสดงโครงสร้าง ของสาย PHB ที่ล้อมรอบด้วย CaPPi	9
2.9	การจัดจำแนกชนิดของพลาสติกที่ย่อยสลายได้	14
2.10	รูปแบบจำลองการย่อยสลาย P(3HB)	18
2.11	วิธีการผลิต PHB ในจุลินทรีย์	20
2.12	วิธีการสังเคราะห์ PHB ของ <i>A.eutrophus</i>	21
2.13	วิธีการสังเคราะห์ PHB ใน <i>Ralstonia eutropha</i>	22
2.14	กระบวนการผลิต PHA และ PHB	23
4.1	รูปแบบการเจริญของ <i>Alcaligenes eutrophus</i> TISTR 1403 และ PHB 1 ในอาหาร NB	36
4.2	การแยกชั้นของคลอโรฟอร์มและน้ำขณะสกัด PHA และ PHB	37
4.3	ตะกอนของ PHA หลังจากผ่านกระบวนการสกัดแล้ว	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.17	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของ <i>A. eutrophus</i> TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอน	48
4.18	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 8 ของ <i>A. eutrophus</i> TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอน	48
4.19	การเจริญ การผลิต PHA และ PHB ของ <i>A. eutrophus</i> TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	49
4.20	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของ <i>A. eutrophus</i> TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	50
4.21	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 24 ของ <i>A. eutrophus</i> TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	50
4.22	การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	51
4.23	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของเชื้อ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	52
4.24	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 16 ของเชื้อ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	52
4.25	การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน	53
4.26	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของเชื้อ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน	54
4.27	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 12 ของเชื้อ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน	54
4.28	การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อของ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน	55
4.29	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของเชื้อของ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน	56
4.30	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 12 ของเชื้อของ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน	56

4.31	การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอน	57
4.32	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของเชื้อ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอน	58
4.33	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 8 ของเชื้อ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอน	58
4.34	การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน	59
4.35	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของเชื้อ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน	60
4.36	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 16 ของเชื้อ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน	60
4.37	การเจริญ การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	61
4.38	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของเชื้อ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	62
4.39	โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 48 ของเชื้อ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน	62
จ.1	อาหาร PHB-medium ที่บรรจุอยู่ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร	81
จ.2	อาหาร PHB-medium ที่บรรจุอยู่ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว	81
จ.3	เครื่องเซนตริฟิวจ์รุ่น HERMLE 2383 K	82
จ.4	เครื่องระเหิดแห้ง LABCONCO	82
จ.5	เข็มฉีดยา GC	83
จ.6	เครื่อง GC รุ่น SHIMASZU GC-17A	83
ด.1	โครมาโตแกรมของ methanol	84
ด.2	โครมาโตแกรมของ PHB standard	84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<p>ณ.3</p>	<p>โครามาไตแกรมของคลอโรฟอร์ม</p>	<p>85</p>
<p>ณ.4</p>	<p>โครามาไตแกรมของ Methyl ester</p>	<p>85</p>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันนี้ปัญหามลพิษนับว่ามีอิทธิพลต่อชีวิตความเป็นอยู่ของมนุษย์เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะขยะพลาสติกที่เกิดจากการอุปโภคบริโภคของมนุษย์ หรือแม้แต่ขยะพลาสติกที่เกิดจากการผลิตในกระบวนการทางอุตสาหกรรมและการเกษตร เนื่องจากปริมาณขยะพลาสติกมีจำนวนมากและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี โดยในปี ค.ศ. 1990 ปริมาณการใช้พลาสติกทั้งหมดเป็น 6.8 ล้านตันต่อปี โดยมีสัดส่วนการใช้พอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) เป็น 1.5 ล้านตันต่อปี หรือประมาณ 25% ของพลาสติกที่ใช้ในตลาดทั้งหมด (Lindsay, 1992) ทำให้ประสบปัญหาการจับเก็บและปัญหาการทำลายขยะ สาเหตุมาจากขยะพลาสติกเป็นขยะที่เกิดจากกระบวนการทางเคมีทำให้การย่อยสลายตามธรรมชาติต้องใช้เวลาหลายสิบปี ส่งผลให้พื้นที่ที่รองรับในการจับเก็บไม่เพียงพอ หรือถ้าจะทำลายโดยการเผาทิ้งก็จะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ตามมาอีก เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อฝนตกลงมาก็จะก่อให้เกิดสารตกค้างในแหล่งน้ำ ดินและต้นไม้ได้ ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้สังเกตเห็นปัญหาที่เกิดขึ้นจึงหันมาสนใจที่จะพัฒนาการผลิตพลาสติกจากพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เช่น Polyhydroxyalkanoates (PHAs) พอลิเมอร์ชีวภาพพื้นฐานที่จัดอยู่ในกลุ่มของ PHA คือ Polyhydroxybutyrate (PHB) ซึ่งสร้างจากจุลินทรีย์บางชนิดในสภาวะที่แหล่งอาหารมีจำกัด (Hocking และ Marchessault, 1994)

อย่างไรก็ตาม PHA และ PHB ยังคงมีราคาแพง เช่น เดือนพฤศจิกายน ค.ศ.1994 บริษัท Zeneca ณ เมือง Billingham ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งผลิต Bio Products ได้ทำนายราคาของ PHA ว่าจะมีราคาถึง 4400 ดอลลาร์สหรัฐต่อตัน เมื่อเทียบกับราคาพอลิเมอร์อื่นๆ เช่น พอลิโพรพิลีน พอลิเอทิลีน และพอลีสไตรีนซึ่งมีราคา 620-960 ดอลลาร์สหรัฐต่อตัน ปัญหาในการผลิต PHA และ PHB ส่วนหนึ่งมาจากต้นทุนการผลิตสูง เนื่องจากการผลิตส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับราคาวัตถุดิบ (Juliana และคณะ, 1995) ประกอบกับผลผลิตทางการเกษตรมีราคาตกต่ำ และมีกากของเสียจากกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมที่ได้จากการเกษตรเหลือทิ้งจำนวนมาก ซึ่งผลผลิตทางการเกษตรและกากของเสียเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นเราจึงนำคุณสมบัติในข้อนี้มาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่

สามารถผลิต PHB ซึ่งเป็นการช่วยเหลือเกษตรกรให้มีรายได้เพิ่มขึ้นและยังเป็นการใช้ทรัพยากรธรรมชาติให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. ศึกษาจลนศาสตร์การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการผลิต PHB ของแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PHB ได้
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการผลิต PHB โดยใช้แหล่งคาร์บอนจากผลผลิตทางการเกษตรและกากของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร

ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาคูณลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHB ได้โดยใช้วัตถุดิบทางการเกษตรและกากของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตพอลิเมอร์ที่ได้จากกระบวนการทางชีวภาพได้
2. สามารถนำกากของเสียมาใช้ประโยชน์เพื่อให้ได้พอลิเมอร์ชีวภาพที่มีคุณค่า
3. ลดปัญหามลพิษที่เกิดจากขยะพลาสติกที่ย่อยสลายยาก
4. สามารถนำวัตถุดิบทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

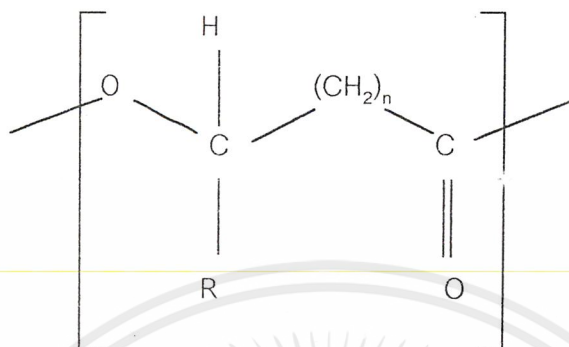
2.1 PHAs และ PHB

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) เป็นอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ที่พบได้ในธรรมชาติเป็นอนุพันธ์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม 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)

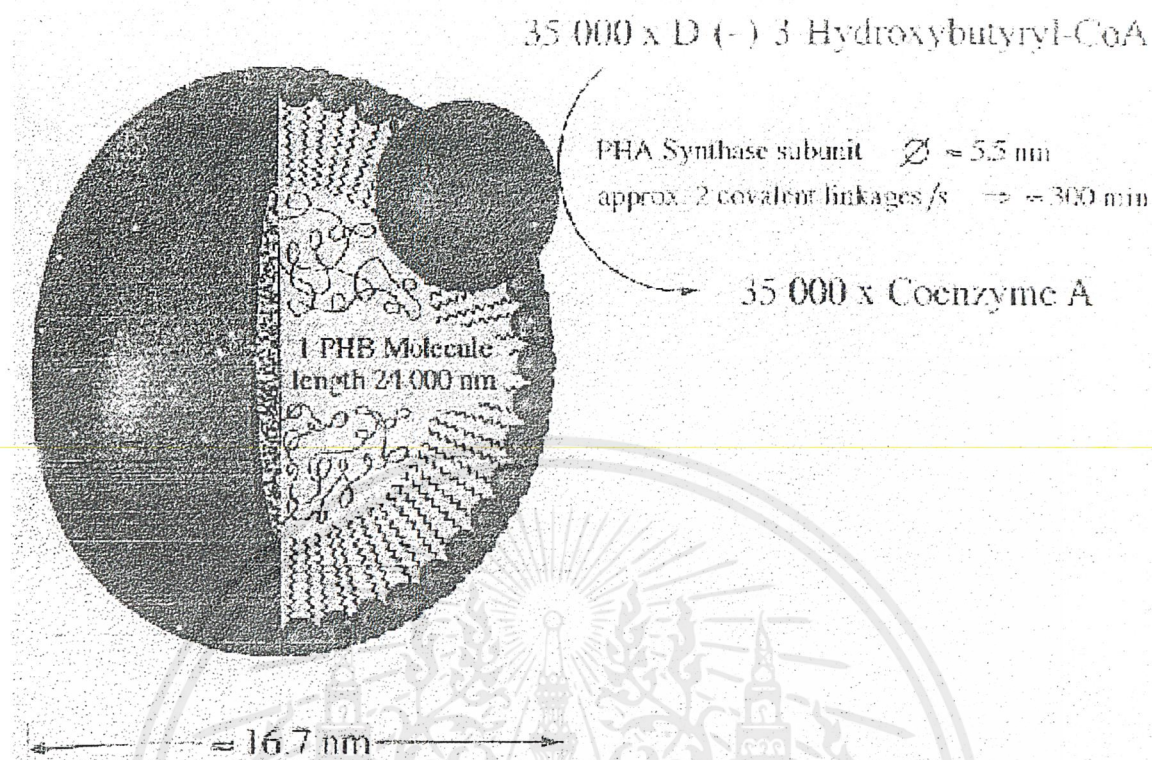


เมื่อ	n=1	R=hydrogen	Poly(3-hydroxypropionate)
		R=methyl	Poly(3-hydroxybutyrate)
		R=ethyl	Poly(3-hydroxyvalerate)
		R=propyl	Poly(3-hydroxyhexanoate)
		R=pentyl	Poly(3-hydroxyoctanoate)
		R=nonyl	Poly(3-hydroxydodecanoate)
n=2	R=hydrogen	Poly(4-hydroxybutyrate)	
	R=methyl	Poly(4-hydroxyvalerate)	
n=3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

รูปที่ 2.1 โครงสร้างทั่วไปของ PHAs

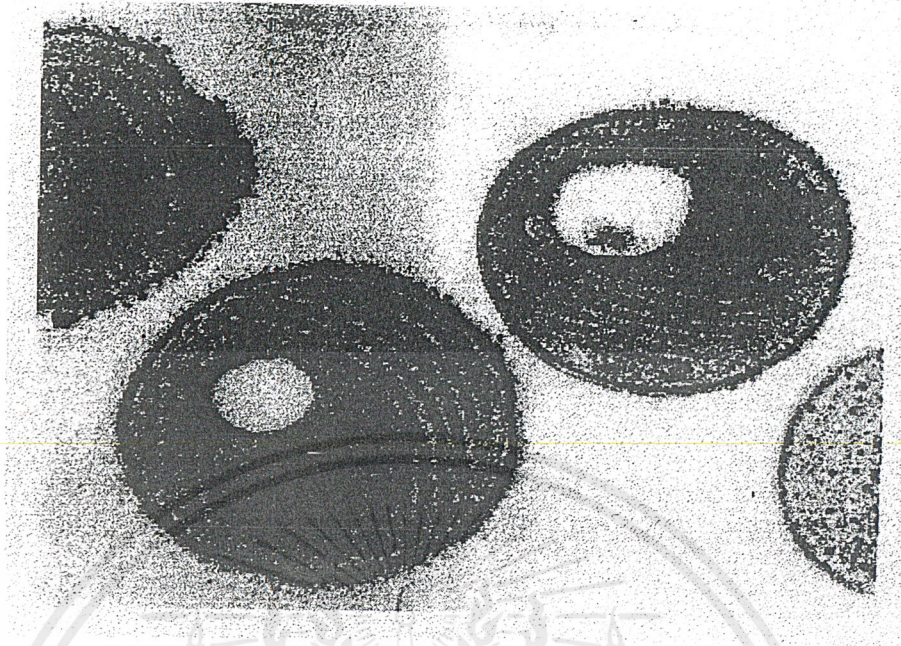
ที่มา : Lee (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

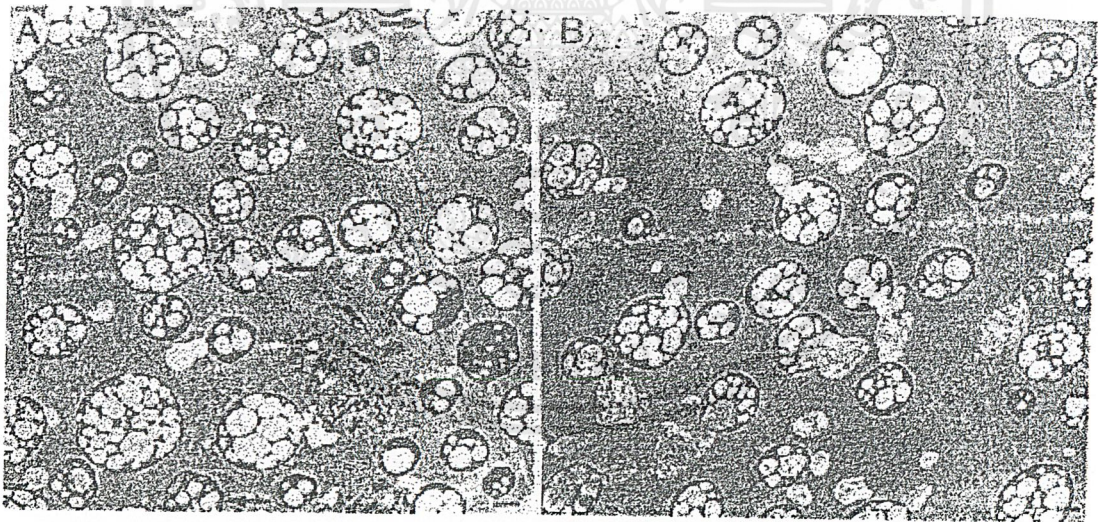


รูปที่ 2.2 ภาพสามมิติของกรานูล PHB ในอุดมคติขนาดเล็กที่บรรจุโมเลกุลเดี่ยวๆของ PHB
 ที่มา : Steinbuchel และคณะ (1995)

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.* โดยใช้มีเทนเป็นซับสเตรท
ที่มา : Wendlandt และคณะ (2001)

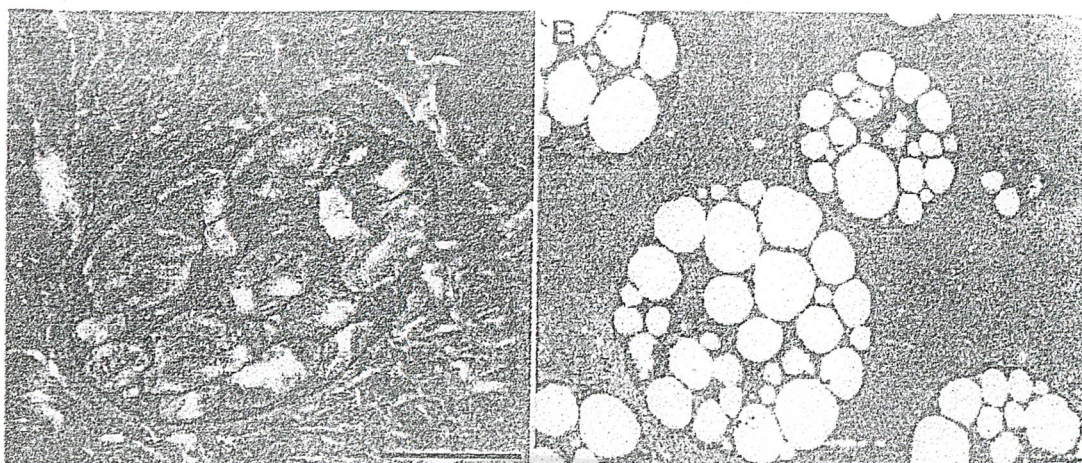


รูปที่ 2.4 PHB กราณูลภายในเซลล์ของ *Azotobacter vinelandii* UWD หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา
24 ชั่วโมง

- A) เป็นเซลล์ที่เจริญในอาหารกลูโคส
- B) เป็นเซลล์ที่เจริญในอาหารผสมกลูโคสกับเปปโตินจากปลา

ที่มา : Page และคณะ (1995)

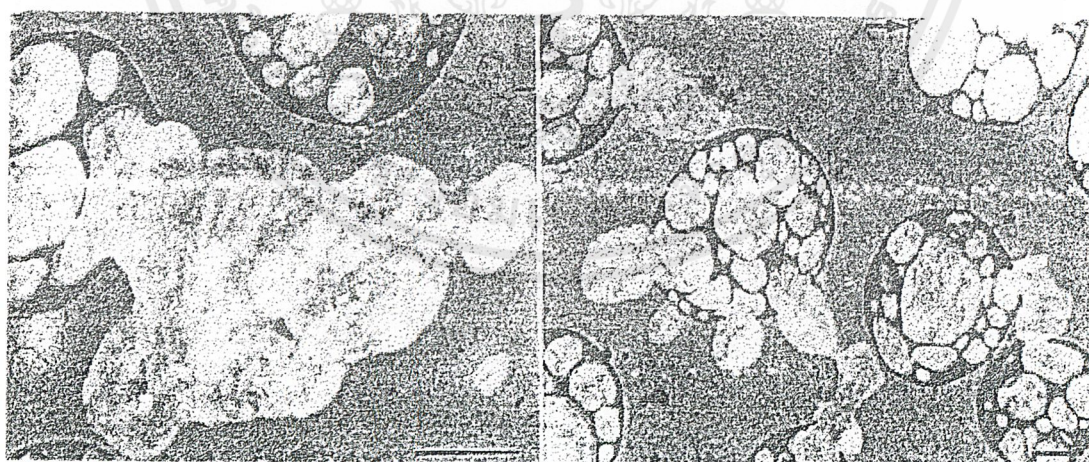
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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)

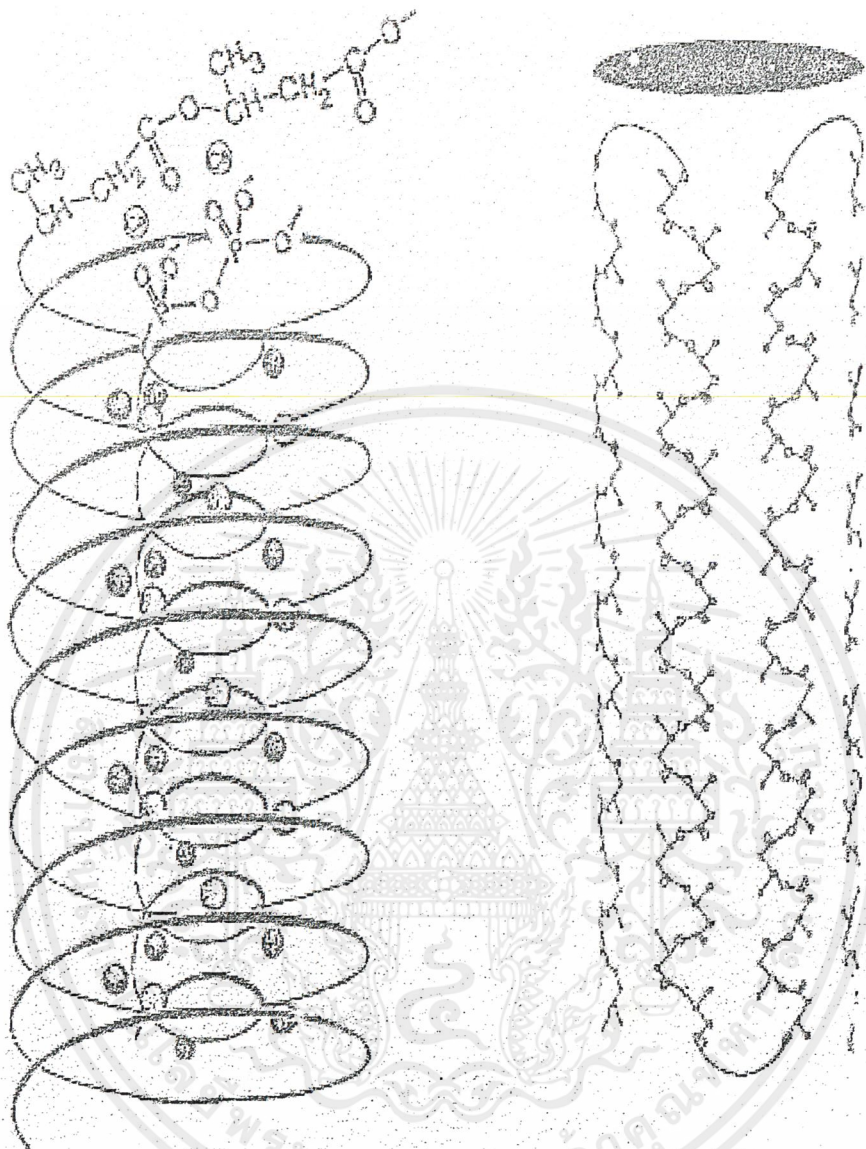


รูปที่ 2.7 การปลดปล่อย PHB ออกจากเซลล์ *Azotobacter vinelandii* UWD โดยเลี้ยงในอาหารกลูโคสเป็นเวลา 36 ชั่วโมงและตำแหน่งที่ถูกตรึงเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายปากและเลี้ยงในกากน้ำตาลจากหัวบีทเป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามลำดับ โดยขีดสเกลมีขนาดเท่ากับ 1 ไมโครเมตร

ที่มา : Page และคณะ (1995)

2.2 ลักษณะคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีของ PHA และ PHB

Marchessault และ Colleagues (1989) ได้เสนอโครงสร้างของ PHB ว่าเป็นเกลียววนขวาซ้อนกัน 2 ชั้น อยู่ห่างกัน 0.596 นาโนเมตร บิดเป็นเกลียวตามแนวนอน มีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.8 โครงสร้างของ PHB คล้ายกับโครงสร้างของพอลิโพรพิลีน คือ มีโครงสร้างเป็นเกลียวเหมือนกัน และมีจุดหลอมเหลวใกล้เคียง 180 องศาเซลเซียสแต่เปราะบางมากกว่าพอลิโพรพิลีน นอกจากนี้ PHB ยังมีค่าความเป็นผลึกเหมือนกับพอลิโพรพิลีน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ละลายได้ในตัวทำละลายหลายชนิด และยังต่อทนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ดีอีกด้วย (Holms, 1985)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อน PHB - Ca²⁺-PPi และแบบจำลองแสดงโครงสร้างของสาย PHB ที่ล้อมรอบด้วย CaPPi

ที่มา : Reusch (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพ เคมีของพอลิโพรพิลีนและ PHB

พารามิเตอร์	พอลิโพรพิลีน	PHB
Melting point T_m (°C)	171-186	171-182
Glass transition temperature T_g (°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 (x 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 (cm ³ m ⁻² atm ⁻¹ d ⁻¹)	1700	45
Biodegradability	+	-
Approx.U.S.annual Production (Mio.t)	1.8	ND

ที่มา : Agarwel และคณะ (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 รายงานการศึกษาอื่นๆ

Imperial Chemical Industries Ltd. (ICI) ได้รายงานเกี่ยวกับ PHB ว่า มีคุณสมบัติเหมือนกับ พอลิโพรพิลีนมาก PHB เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพจริง ผลิตได้ทั้งในภาวะที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพอลิเมอร์ชนิดนี้พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำ ดิน และกองขยะ 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 Poirier 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 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทางการแพทย์ 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	ศัลยกรรมเย็บแผล สารหล่อลื่นสำหรับถุงมือแพทย์
เกษตรกรรม	หลอดเลือดเทียม หลอดฉีดยา แคปซูลยา ท่อระบายน้ำ
อุตสาหกรรมยาสูบ	ฟิล์มคลุมต้นไม้
อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์	ตัวกรองบุหรี่ ขวด ถุงพลาสติก ฟิล์ม บรรจุภัณฑ์ชิ้นเล็กๆ
อุตสาหกรรมประมง	เคลือบกระดาด แหดักปลา
อุตสาหกรรมอาหาร	อิมัลซิไฟเออร์
อุตสาหกรรมเคมี	วัตถุติดการทำสี
อื่นๆ	ขาตั้งลูกกอล์ฟ กระถางดอกไม้ แอสมบี้

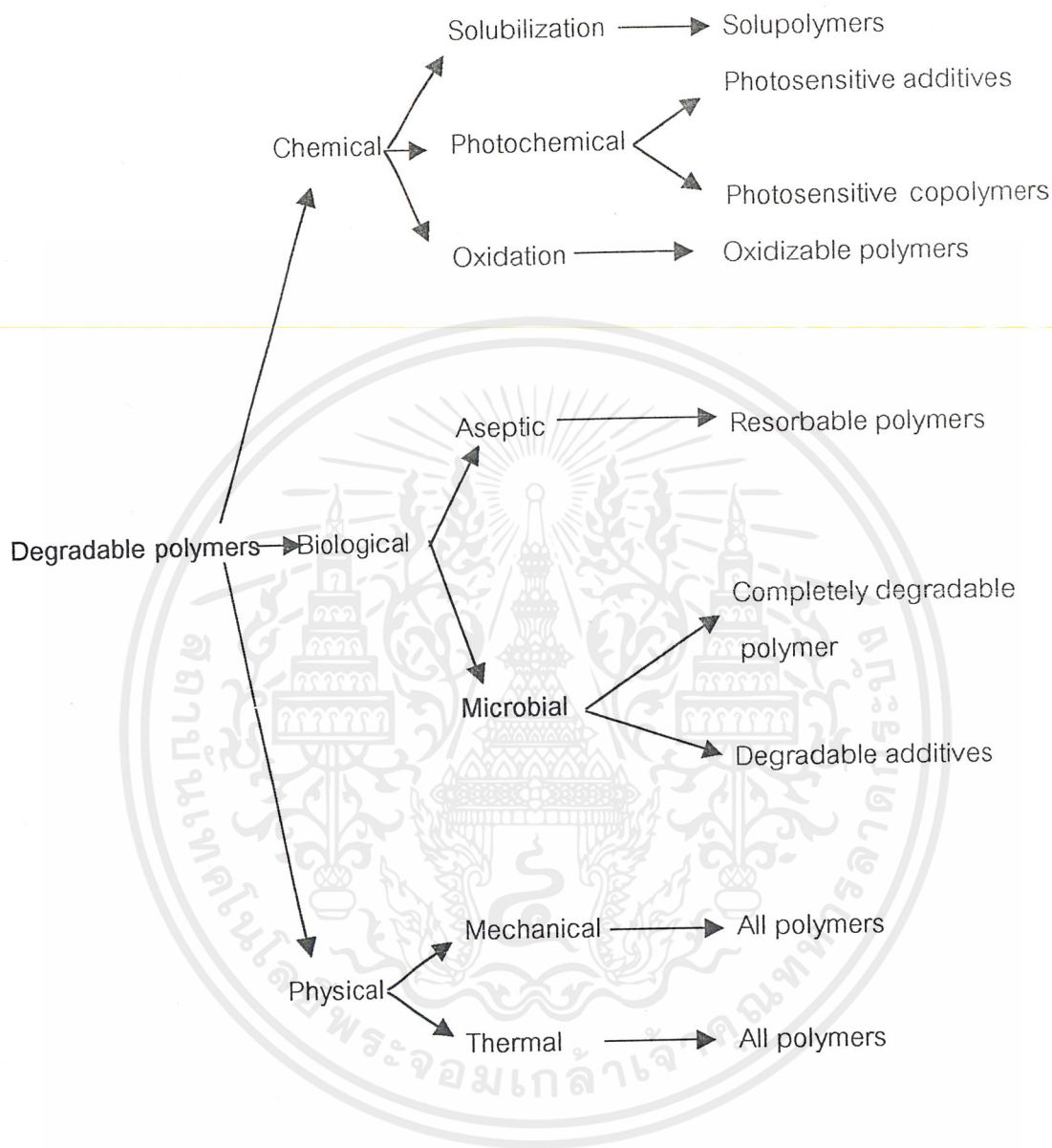
ที่มา : Renh (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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</i> sp.	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</i> sp.	ดิน	ไซโกไมซีตีส	ยูคาริโอต
<i>Penicillium chermisinum</i>	ดิน	แอสโคไมซีตีส	ยูคาริโอต
<i>P. daleae</i>	ดิน	แอสโคไมซีตีส	ยูคาริโอต
<i>Pseudomonas</i> sp.	ดิน	แกรมลบ	โพรคาริโอต
<i>P. cepacia</i>	น้ำจากทะเลสาบ	แกรมลบ	โพรคาริโอต
<i>P. fluorescens</i>	สลัดจ์	แกรมลบ	โพรคาริโอต
<i>Streptomyces</i> sp.	ดิน	แอคติโนไมซีตีส	โพรคาริโอต
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	ดิน	แกรมลบ	โพรคาริโอต

ที่มา : Brandi และคณะ (1995)

การย่อยสลายของ PHA และ PHB โดยทั่วไปแล้วจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่ออัตราการย่อยสลาย และอายุการใช้งานของพอลิเมอร์ที่ใช้ทำพลาสติกในธรรมชาติ ประกอบด้วยประเภทของสิ่งแวดล้อม จำนวนของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายพลาสติกได้ ความหนาของพลาสติก น้ำ อุณหภูมิ ลักษณะสัมผัสของพลาสติก องค์ประกอบอื่นๆในพลาสติก เช่น สี ตัวอย่างการย่อยสลายแผ่นฟิล์ม ดังตารางที่ 2.4 โดยทั่วไป PHB homopolymer ในสภาวะการย่อยสลายที่ไม่ใช้อากาศ ในสิ่งปฏิภูลจะใช้เวลาในการย่อยสลาย 6 สัปดาห์ ส่วนในสภาวะที่มีอากาศใช้เวลาในการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ในสิ่งปฏิภูลจะใช้เวลาในการย่อยสลาย 6 สัปดาห์ ส่วนในสภาวะที่มีอากาศใช้เวลาในการย่อย สลายนานถึง 60-65 สัปดาห์ตามลำดับ การย่อยสลายในน้ำทะเลเกิดขึ้นน้อยมาก ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แผ่นฟิล์มจะถูกย่อยสลายภายใน 350 สัปดาห์(Agarwel และคณะ, 1995)

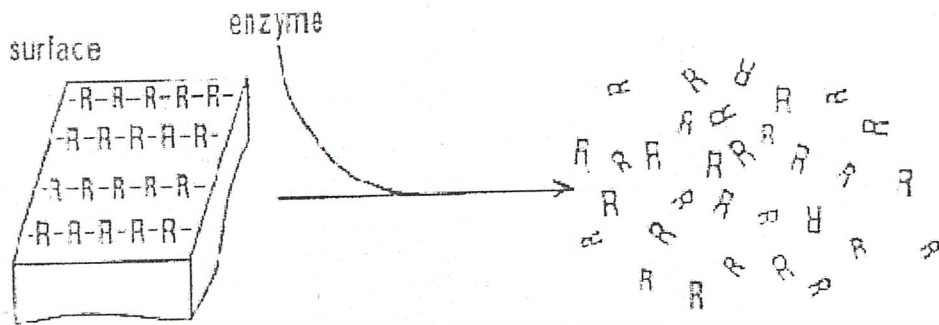
ลักษณะการย่อยสลาย PHA และ PHB ตามธรรมชาตินั้นจะถูกย่อยสลายโดยปฏิกิริยา ของเอนไซม์ depolymerase หรือ esterase โดยจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น *Alcaligenes faecalis* , *Pseudomonas lemoignei*, *Penicillium*, *Simplicissimum* ซึ่งหลังเอนไซม์เอสเทอเรสออกมาเร่ง ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพอลิเมอร์ โดย PHA และ PHB ที่มีหมู่อัลคิลยาวจะส่งผลให้ใช้เวลาในการ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

ตารางที่ 2.4 ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อการย่อยสลายพลาสติก

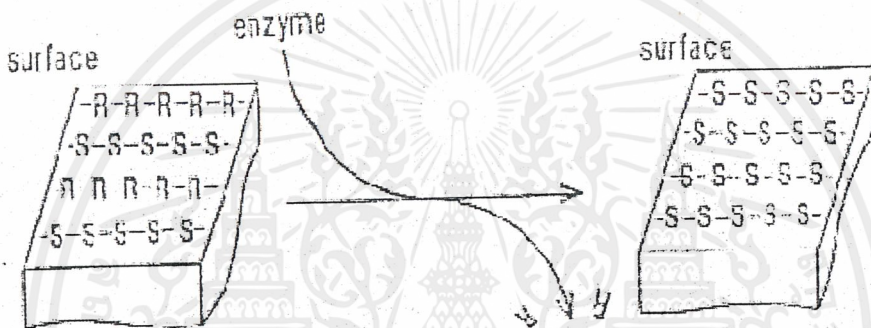
พารามิเตอร์	ปัจจัย
ลักษณะทางกายภาพของสิ่งแวดล้อม	อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณน้ำที่เป็นองค์ประกอบ ปริมาณออกซิเจน แหล่งอาหารของจุลินทรีย์
ลักษณะของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม	ความหนาแน่นของจุลินทรีย์ ความหลากหลายของจุลินทรีย์ ความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ ความสามารถในการปรับตัว
คุณสมบัติของพลาสติกที่ใช้ย่อย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

ที่มา : Brandi และคณะ(1995)

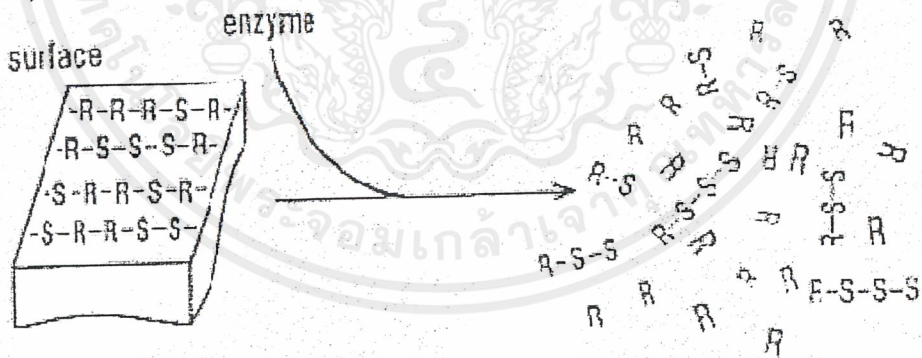
Microbial Pj(R)-HB



Isotactic P[(R,S) HB]



Atactic P(R,S)-HB]



รูปที่ 2.10 รูปแบบจำลองการย่อยสลาย P(3HB)

ที่มา : Doi และคณะ (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การผลิต PHA และ PHB

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA และ PHB ได้นั้นมีหลายประเภทซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA ได้แสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสม PHA ไว้ภายในเซลล์ได้

จีโนส	ปริมาณ PHA ที่สะสมได้มากที่สุด (%น้ำหนักแห้ง)	ข้อเสตรทที่ใช้ผลิต PHA
<i>Acinetobacter</i>	<1	กลูโคส
<i>Alcaligenes</i>	96	ฟรุคโตส
<i>Azotobacter</i>	73	กลูโคส
<i>Bacillus</i>	25	กลูโคส
<i>Beijerinckia</i>	38	กลูโคส
<i>Chlorogloea</i>	10	อะซีเตท 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	อะซีเตท
<i>Rhodospillum</i>	47	อะซีเตท
<i>Spirillum</i>	40	แลคเตท
<i>Spirulina</i>	6	คาร์บอนไดออกไซด์
<i>Streptomyces</i>	4	กลูโคส
<i>Syntrophomonas</i>	30	โครโทเนต

ที่มา : Agarwal และคณะ (1995)

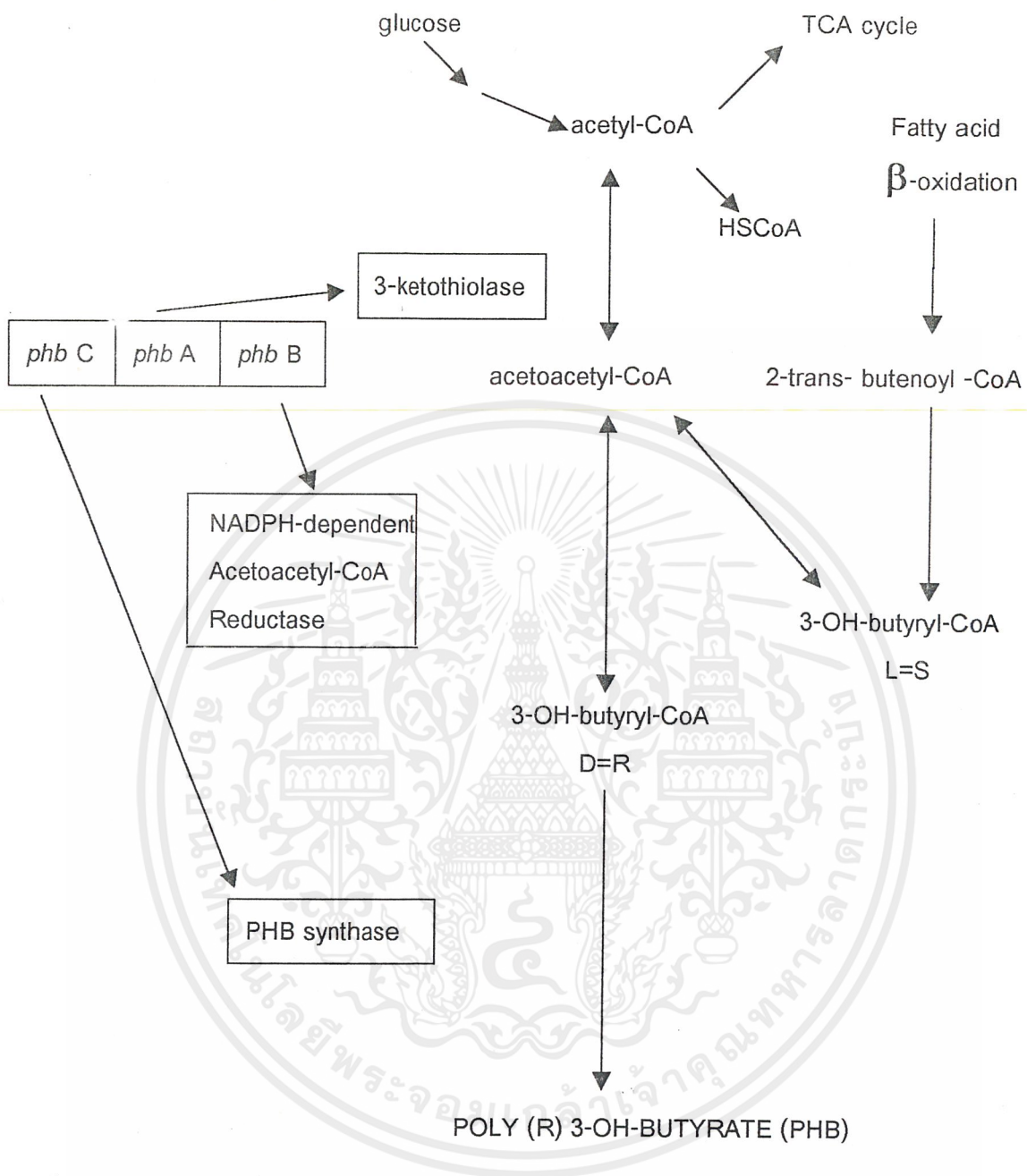
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

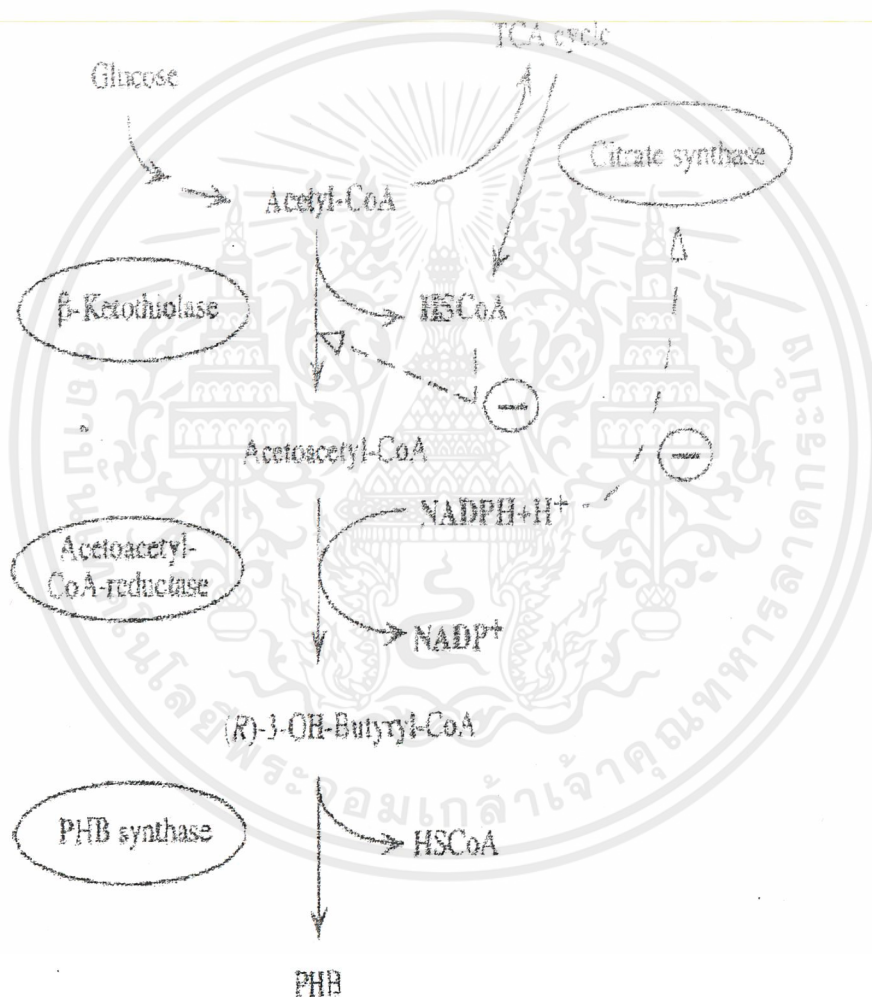
ใน *A. eutrophus* ยีน *phbC*, *A*, *B* จะควบคุมเอนไซม์ในการผลิต PHB โดยยีน *phbA* จะควบคุมการทำงานของเอนไซม์ Thiolase เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไปเป็น coenzyme A (HSCoA) ซึ่ง acetyl-CoA จะเข้าสู่ TCA cycle ไปพร้อมๆกันด้วย โดย acetyl-CoA 2 โมเลกุล จะมาเชื่อมต่อกันเป็น acetoacetyl-CoA โดยเอนไซม์ Thiolase เช่นเดียวกัน ยีน *phbB* จะควบคุมการทำงานของ NADPH-dependent 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)

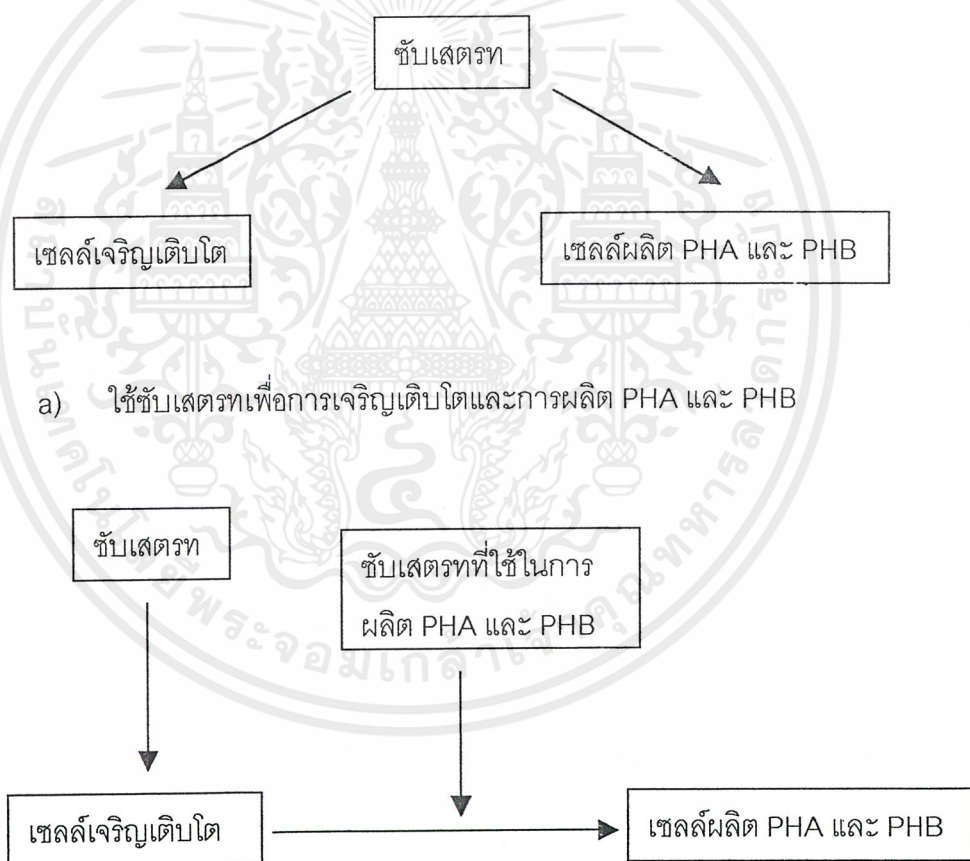
ใน *Ralstonia eutropha* วิธีการสังเคราะห์ PHB จะเกิดขึ้นใน 3 ขั้นตอนโดยเริ่มจาก acetyl-CoA 2 โมเลกุลมารวมกันเป็น acetoacetyl-CoA ในปฏิกิริยาการควบแน่น (condensation) ถูกเร่งโดย β -ketothiolase ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็น (R)-3-hydroxybutyryl-Co-A ในปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดย NADH-dependent acetoacetyl-Co-A reductase การที่มีตัวรีดิวซิงเพาเวอร์ (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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)



a) ใช้ซัลเฟอร์ทเพื่อการเจริญเติบโตและการผลิต PHA และ PHB

b) การผลิตพอลิเมอร์เมื่อมีการเติมซัลเฟอร์ทลงไปหลังการเจริญเติบโต

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 ^d	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	0.069 ^a	0.200 ^a	0.340
hydrolysate			

เมื่อ a คือ ข้อมูลที่นำมาจาก Hocking Marchessault, 1994

b คือ ข้อมูลที่ผ่านการคำนวณโดยสันนิษฐานว่าจุลินทรีย์สามารถสะสม PHB ได้ 80% ของพอลิเมอร์ทั้งหมด

c คือ การประมาณค่าของแป้งข้าวโพดที่ถูกไฮโดรไลซ์

d คือ ราคาน้ำตาลดิบในตลาดทั่วโลก

e คือ ราคาตลาดทั่วโลกจาก Chem.J. (Korea)

ที่มา : Lee (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 การผลิต PHAs โดยจุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

แบคทีเรีย	PHA ^a	แหล่งคาร์บอนที่ใช้ส่วนใหญ่	เวลาในการเพาะเลี้ยง (h)	ความเข้มข้นของเซลล์ (g ^l ⁻¹)	ความเข้มข้นของ PHA (g ^l ⁻¹)	ปริมาณ PHA ที่เป็นองค์ประกอบ (%)	อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (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</i> sp. <i>Hyphomicrobium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. K <i>Pseudomonas</i> sp. K <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Rhizobium</i> ORS571 <i>Pseudomonas</i> sp. K <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</i> sp. K <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i>
คาร์บอน	
เหล็ก	
แมกนีเซียม	
แมงกานีส	
ออกซิเจน	
ฟอสเฟต	
โพแทสเซียม	
ซัลเฟต	

ที่มา : Agarwal และคณะ(1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

1. จานเพาะเชื้อ (plate)
2. ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
3. ปีกเกอร์ (beaker)
4. ขวดรูปชมพู่ (flask) 500 มิลลิลิตร
5. ช้อนตักสาร (spatula)
6. คิวเวตต์ (cuvette)
7. ปิเปตต์ (pipette)
8. แผ่นสไลด์ (slide)
9. กระจกปิดสไลด์ (coverslip)
10. แท่งแก้ว
11. หลอดเซนตริฟิวจ์
12. rack
13. mixer
14. กระบอกลดวง
15. ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
16. กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
17. อ่างน้ำร้อน (water bath)
18. เครื่อง freeze dry
19. เครื่องเขย่า (shaker)
20. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
21. เครื่อง sonicator
22. เครื่องชั่ง
23. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

24. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
25. ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20 และ -85 °C
26. ตู้อบ (oven)
27. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
28. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อไฟฟ้า (autoclave)

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้สกัดและวิเคราะห์ปริมาณ PHB

1. หลอดฝาเกลียว
2. เข็มฉีดยาขนาด 10 ไมโครลิตร
3. เครื่องวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC) Shimadzu รุ่น GC-17A
4. Capillary column ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตรเคลือบ DB-FFAP หน้า 1 ไมโครเมตร (J&W Scientific Co.)
5. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร (volumetric flask)
6. เครื่องระเหิดแห้ง (Freeze drying)

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-3-ไฮเดรต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)
2. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
3. แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
4. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2 SO_4$)
5. กลูโคส (glucose)
6. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ (1 M NaOH)
7. น้ำกลั่น 2 ครั้ง (double distilled water)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณ PHB

1. Polyhydroxybutyrate (PHB)
2. เมทานอล (Methanol)
3. สารละลายคลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$)
4. กรดเบนโซอิก (Benzoic acid)

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric

1. สารละลายฟีนอล 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (95%v/v Phenol)
2. สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc.sulfuric acid)

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาร์

1. สารละลายกรดซัลฟิวริก 0.1นอร์มัล (0.1N sulfuric)
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 เปอร์เซ็นต์ (50% v/v NaOH)
3. สารละลายกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์ (4%v/v Boric acid)
4. ไดโพลแทสเซียมฟอสเฟต (K_2SO_4)
5. คอปเปอร์ซัลเฟต-5-ไฮเดรท ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$)
6. สารละลายเมทิลเรด (Methyl red)
7. สารละลายบรอมครีซอลกรีน (Bromcresol green)
8. สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc.sulfuric acid)

3.2.5 สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย A (สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร , เมทานอล 97 มิลลิลิตร, กรดเบนโซอิก 100 มิลลิกรัม)
2. สารละลายมาตรฐาน PHB ประกอบด้วย PHB 20 มิลลิกรัม ในคลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตร

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Nutrient Agar(NA)
2. Nutrient Broth(NB)
3. PHB medium ในปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.6	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
$(NH_4)_2 SO_4$	0.2	กรัม
Glucose	20	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1. *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1403 เป็นสายพันธุ์ที่สั่งซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
2. PHB1 เป็นสายพันธุ์ธรรมชาติที่คัดเลือกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำ

3.5 วิธีการเลี้ยงเชื้อ

3.5.1 การเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง

1. เชื้อเชื้อจากหัวเชื้อเริ่มต้น แล้วลากลงบนจานอาหารแข็ง NA ด้วยวิธี cross streak เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ
2. บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 12-24 ชั่วโมง

3.5.2 การถ่ายเชื้อลงบนหลอดอาหารแข็งเพื่อเก็บรักษา

1. เชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยวๆ จากจานอาหารแข็ง NA แล้วลากลงในหลอดอาหารแข็ง (slant) NA ปิดด้วยจุกสำลี
2. บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 12-24 ชั่วโมง

3.5.3 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (inoculum)

1. เชื้อเชื้อจากหลอดอาหารแข็ง NA 1 ไส่ลงในอาหารเหลว NB
2. นำไปบ่มในเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
3. เจือจางด้วยอาหาร NB ให้ได้ OD_{600} เท่าดับ 0.5

3.5.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. ถ่ายเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วจนได้ OD_{600} เท่าดับ 0.5 ปริมาตร 5% ลงในอาหาร PHB medium ที่ใช้กลูโคส และซีสเตรทตัวอื่นๆ เป็นแหล่งคาร์บอน (แหล่งคาร์บอน : กากน้ำตาล หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว)
3. บ่มในอุณหภูมิห้องพร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.6 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

3.6.1 วิธีการวัดการเจริญเติบโตจากค่าการดูดกลืนแสง (OD)

1. นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุกๆ 2 ชั่วโมง
2. เขียนกราฟการเจริญเติบโตแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า OD กับเวลา (ชั่วโมง)

3.6.2 วิธีการวัดค่าการเจริญเติบโตจากการทำ total viable plate count

1. นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ มาทำการเจือจางที่ความเจือจางต่างๆ
2. spread plate ลงในจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง
3. นับจำนวนโคโลนีแล้วนำไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ (CFU/มิลลิลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง)

3.6.3 วิธีการวัดการเจริญเติบโตจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight)

1. นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ทุก 4 ชั่วโมงมาทำการปั่นเหวี่ยง 100 มิลลิลิตร ที่ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
2. นำ pellet ที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้งแล้วเทใส่หลอดพลาสติก
3. นำไปแช่แข็งที่ -85 องศาเซลเซียส แล้วนำไประเหิดแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze dry) นานประมาณ 10 ชั่วโมง
4. นำมาชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งแล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง)

วิธีการคำนวณปริมาณเซลล์

$$\text{ความเข้มข้นของเซลล์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม)}}{\text{ปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร}}$$

3.6.4 วิธีการสกัดแยก PHA จากเซลล์จุลินทรีย์

1. นำเซลล์ที่ได้จากการระเหิดแห้งมาเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ freeze thaw ที่อุณหภูมิ 85 และ -20 องศาเซลเซียสสลับกันครั้งละ 10 นาที
2. เเทลงในหลอดฝาเกลียวยาว แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 4 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท

3. นำไปต้มในน้ำเดือด 3.5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมคลอโรฟอร์มให้ครบ 4 มิลลิลิตร
4. ดูดส่วนที่เป็นคลอโรฟอร์มชั้นล่างมา 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร
5. เขย่าให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนที่เป็นคลอโรฟอร์ม มา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดฝาเกลียวยาว นำไปอบในตู้ 85 องศาเซลเซียสให้แห้ง
5. ชั่งน้ำหนัก PHA แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง PHA dry weight (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง)

วิธีการคำนวณปริมาณ PHA

$$\text{ความเข้มข้นของ PHA (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้ง PHA (มิลลิกรัม)} \times 2}{\text{ปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร}}$$

$$\text{ประสิทธิภาพในการผลิต PHA ของเซลล์} = \frac{\text{ความเข้มข้น PHA (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}$$

3.6.5 วิธีการสกัด PHB จาก PHA และการทำให้บริสุทธิ์

- 3.1 นำ PHA ที่ได้มาเติมคลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตรแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 3.2 เติมสารละลาย A 3 มิลลิลิตรลงใน PHA ในคลอโรฟอร์มแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 1.5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 3.3 เติมน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดชั้นคลอโรฟอร์มนำมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB ในรูป เมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้ GC-17A โดยใช้พารามิเตอร์ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

พารามิเตอร์	ค่าที่ใช้
High presser Injector	OFF
Injection Volume	2 μ
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
Column Pressure	96 kPa
Program Temperature	1. 50 $^{\circ}$ C 1 min 2. 160 $^{\circ}$ C 5 min , 8 $^{\circ}$ C/min 3. 200 $^{\circ}$ C 4 min , 8 $^{\circ}$ C/min

วิธีการคำนวณปริมาณ PHB

Normalized area ของ PHB = $\frac{\text{Peak area ของ PHB}}{\text{Peak area ของ PHB มาตรฐาน}}$

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักของ PHB ในตัวอย่างทั้งหมด (มิลลิกรัม) = $3 \times$ ปริมาณของ PHB ในตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

ความเข้มข้นของ PHB (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) = $\frac{\text{น้ำหนักแห้ง PHB (มิลลิกรัม)} \times 2}{\text{ปริมาตรน้ำหมัก 100 มิลลิลิตร}}$

ประสิทธิภาพในการผลิต PHB ของเซลล์ = $\frac{\text{น้ำหนักแห้ง PHB (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}$

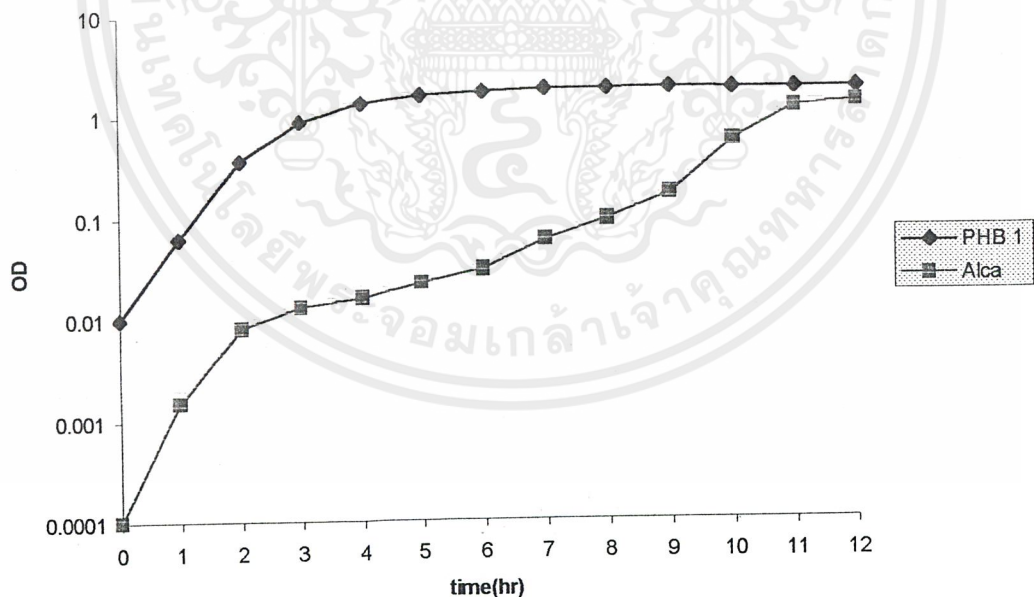


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปราย

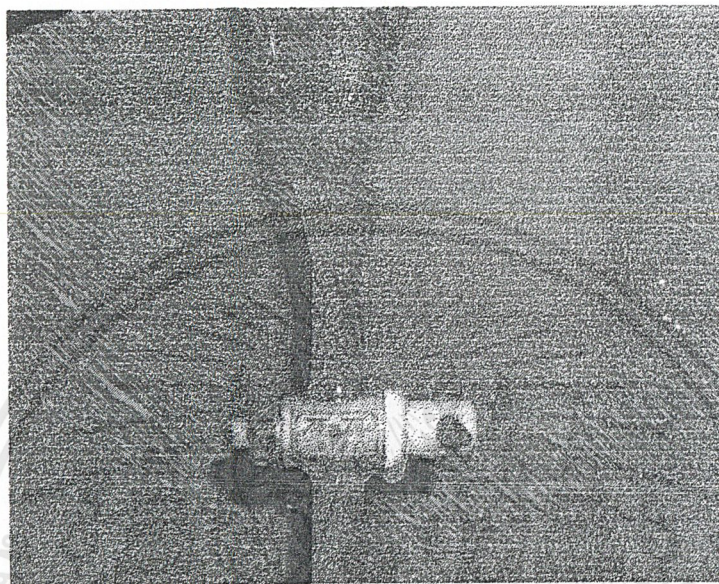
4.1 การเจริญเติบโตของ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB 1 ในอาหาร NB

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB 1 ซึ่งได้รับการตรวจสอบจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยว่าเป็นเชื้อ *Bacillus cereus* โดยทำการแยกเชื้อจากหลอดอาหารแข็ง NA 1 ลูบ ใส่ลงในอาหารเหลว NB นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้ววัดการเจริญเติบโตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากรูปที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่า *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB1 มีช่วงการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 11 และ 4 ตามลำดับซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เชื้อมีปริมาณมากและยังอยู่ในช่วงที่เชื้อมีความสามารถในการทำงานสูง ทำให้ช่วงเวลานี้มีความเหมาะสมในการนำมาทำเป็นเชื้อตั้งต้น

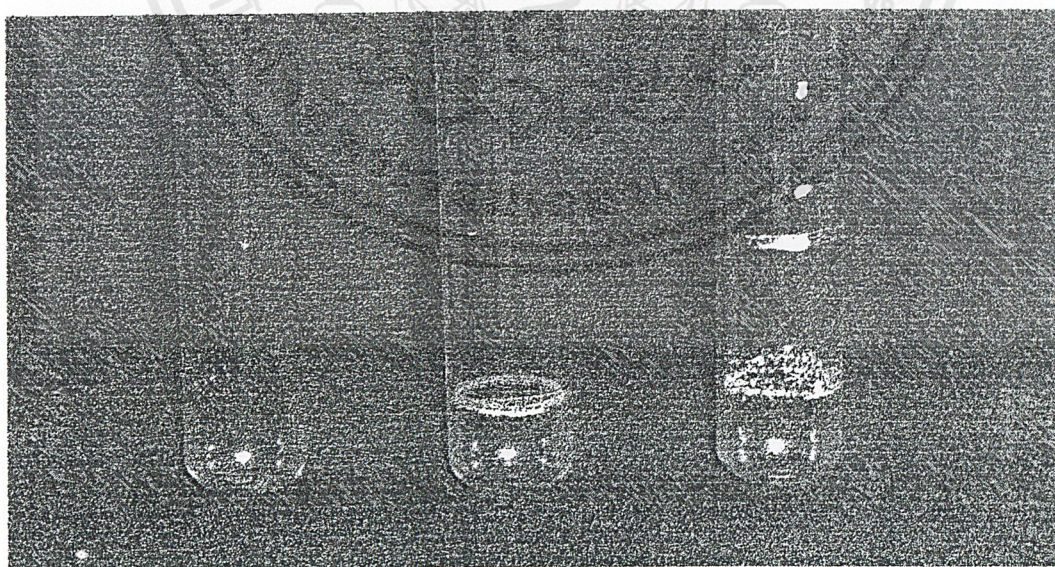


รูปที่ 4.1 รูปแบบการเจริญของ *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1403 และ PHB 1 ในอาหาร NB

หลังจากนั้นนำมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร PHB medium ในแหล่งคาร์บอนต่างๆแล้วจึงนำมาทำการสกัด PHA และ PHB ด้วยคลอโรฟอร์ม ซึ่งจะแยกชั้นกับน้ำในขณะสกัดดังแสดงในรูปที่ 4.2 เมื่อผ่านขั้นตอนในการสกัด PHA แล้วจะได้ตะกอนของ PHA ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.2 การแยกชั้นของคลอโรฟอร์มและน้ำขณะสกัด PHA และ PHB



รูปที่ 4.3 ตะกอนของ PHA หลังจากผ่านกระบวนการสกัดแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนในวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB

ในการศึกษาแหล่งคาร์บอนจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ คือ หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล และน้ำมันมะพร้าว โดยได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาร์ และคาร์บอนด้วยวิธีฟีนอลซัลฟิวริกดังแสดงใน ตารางที่ 4.1 พบว่าปริมาณไนโตรเจนในกากมอลต์มีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 0.4452 % และปริมาณไนโตรเจนในแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ คือ กากน้ำตาล หางนม น้ำมันมะพร้าว น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม มีค่าเท่ากับ 0.1680 % , 0.0560 % , 0.0060 % , 0.0042 % ตามลำดับ ส่วนปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอนจากกากน้ำตาลมีปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 4.871 % ส่วนปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอนจากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ คือ กากมอลต์ น้ำมันมะพร้าว น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม หางนม มีค่าเท่ากับ 2.3972 % , 2.2794 % , 2.2702 % , 2.2315 % ตามลำดับ

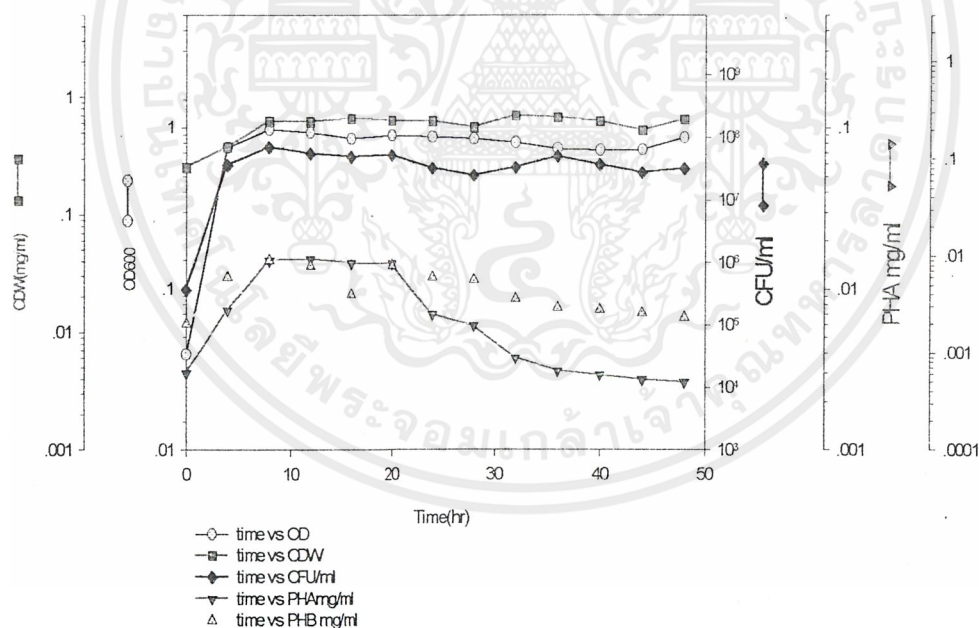
ตารางที่ 4.1 ปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนในชั้นเสตรชนิดต่างๆ

ชนิดของชั้นเสตร	ปริมาณไนโตรเจน (%)	ความเข้มข้นของคาร์บอน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
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

4.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB1

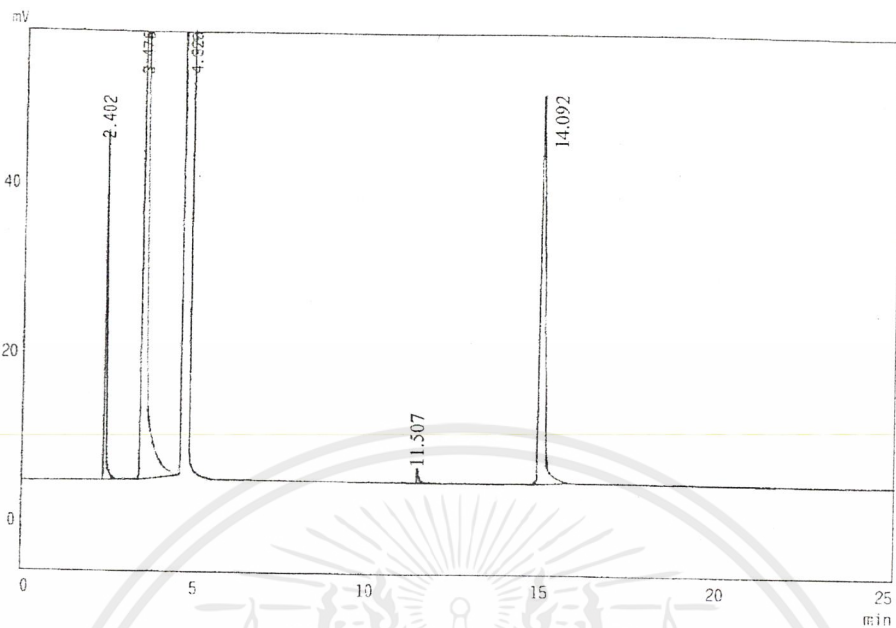
4.3.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในกลูโคส

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นของ *A. eutrophus* TISTR 1403 โดยเก็บที่เวลาปลายการเจริญแบบทวีคูณ ในช่วงเวลาที่ 11 แล้วจึงถ่ายลงในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดในช่วงเวลาที่ 8 และมีอัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดในช่วงเวลาที่ 12 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.0247 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในช่วงเวลาที่ 8 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.0144 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.4 และได้แสดงปริมาณ PHB ในช่วงเวลาที่ 0 และ 8 เป็นโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 4.5 และ 4.6

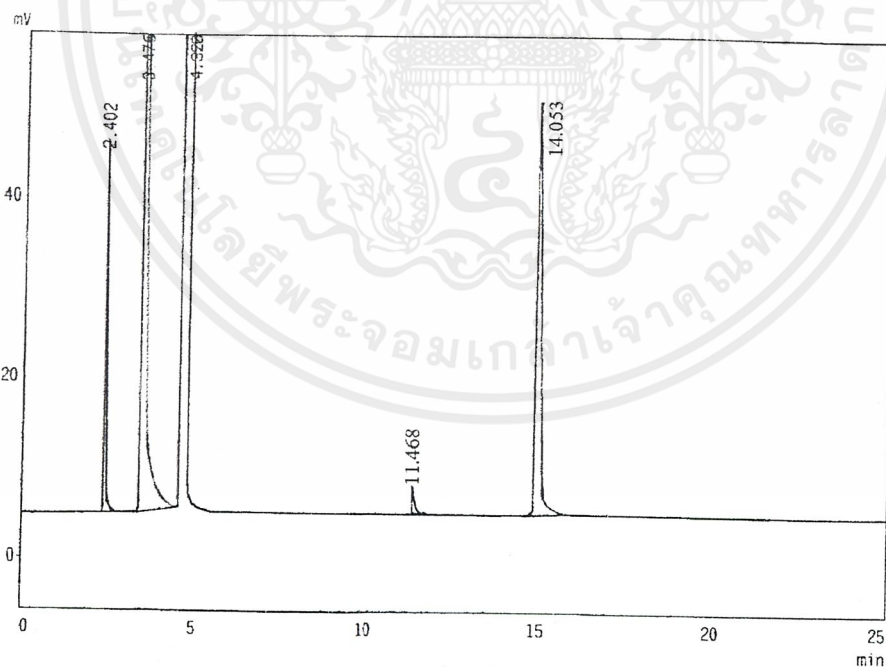


รูปที่ 4.4 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



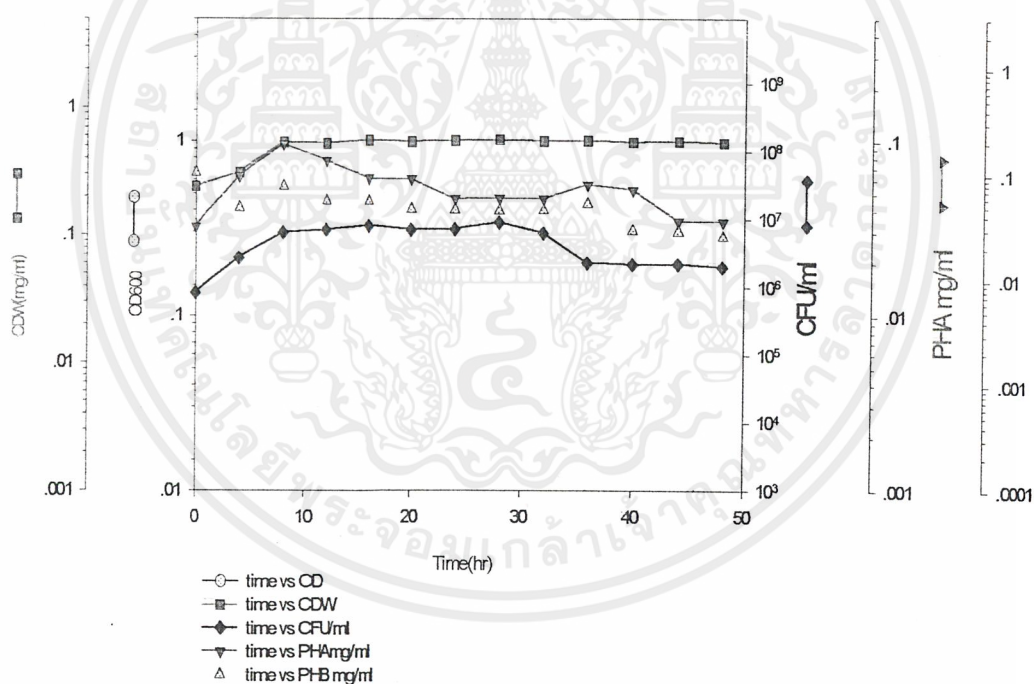
รูปที่ 4.6 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 8 ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

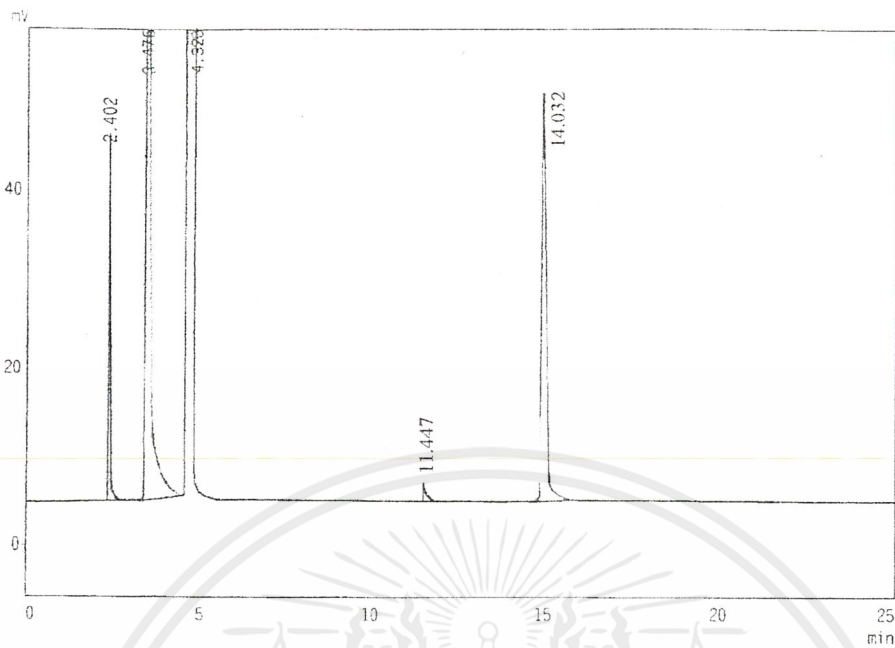
4.3.2 การศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในวัตถุดิบทางการเกษตร และกากของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร

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

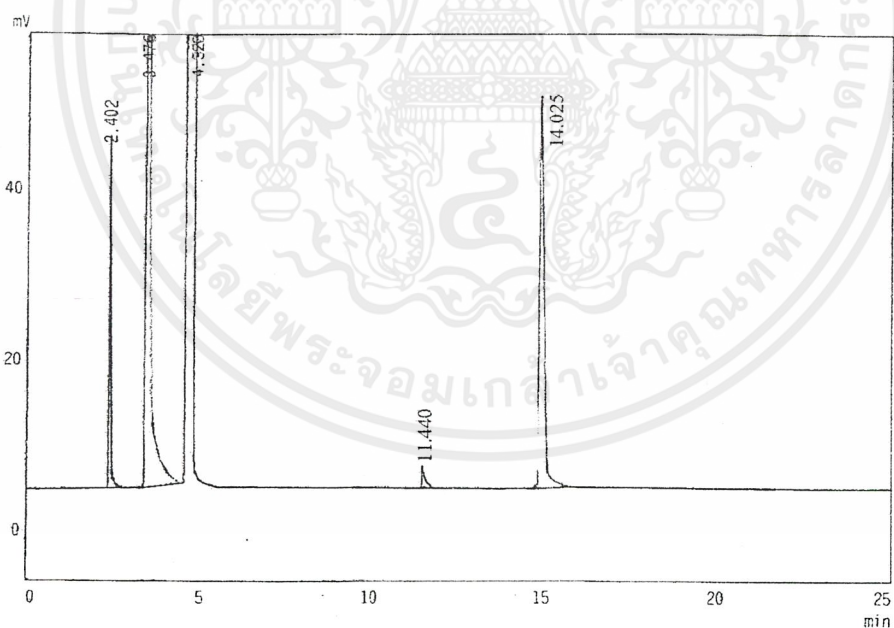
ในการศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 8 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 8 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.2589 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.1478 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.7 และได้แสดงปริมาณ PHB ในชั่วโมงที่ 0 และ 12 เป็นโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 4.8 และ 4.9



รูปที่ 4.7 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.8 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน

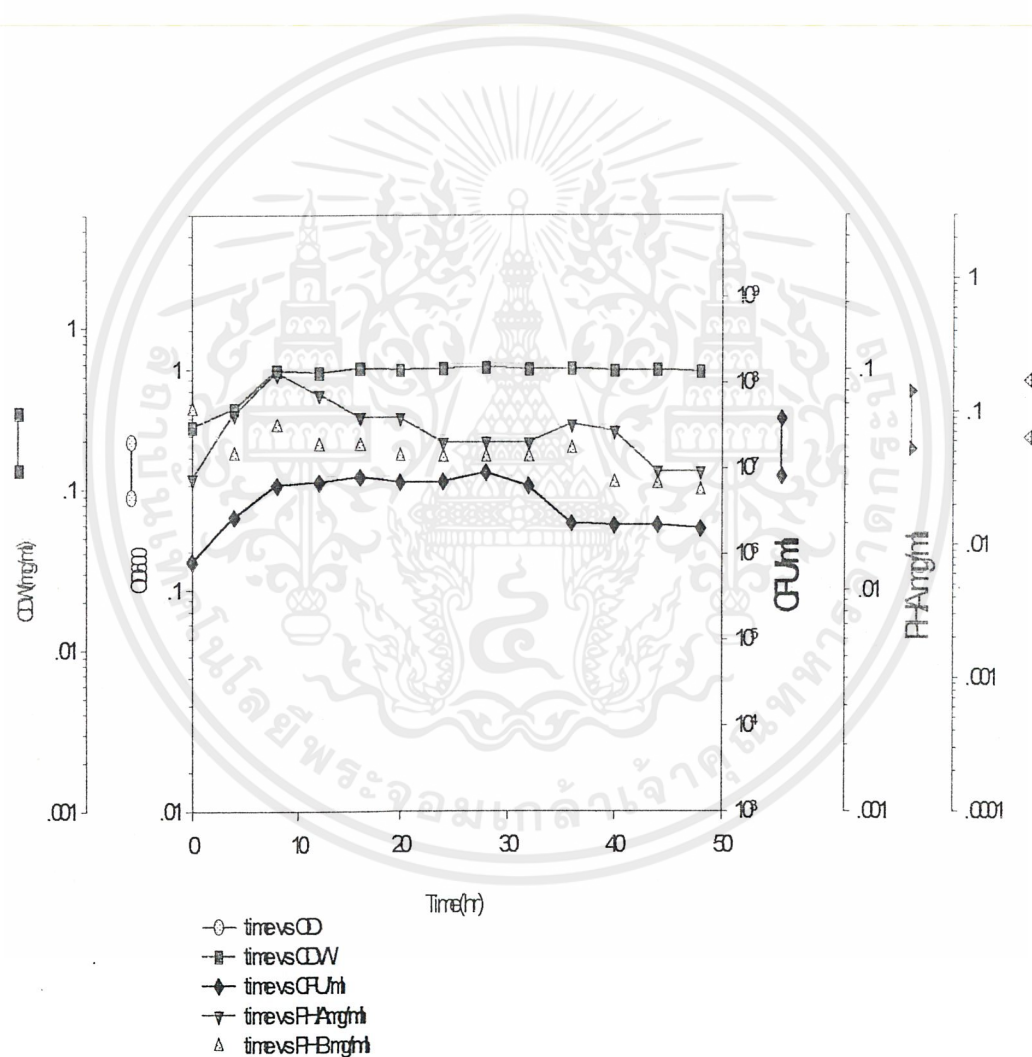


รูปที่ 4.9 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 12 ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

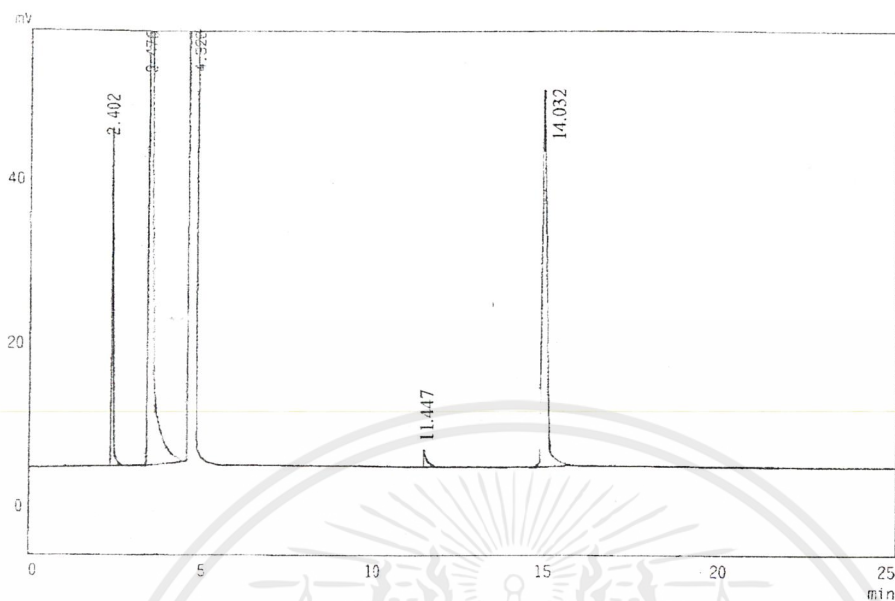
4.3.2.2 ในการศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 โดยใช้กากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 8 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 8 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.1052 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 8 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.0262 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรดังรูปที่ 4.10 และได้แสดงปริมาณ PHB ในชั่วโมงที่ 0 และ 8 เป็นโครมาโตแกรมดังรูปที่ 4.11 และ 4.12

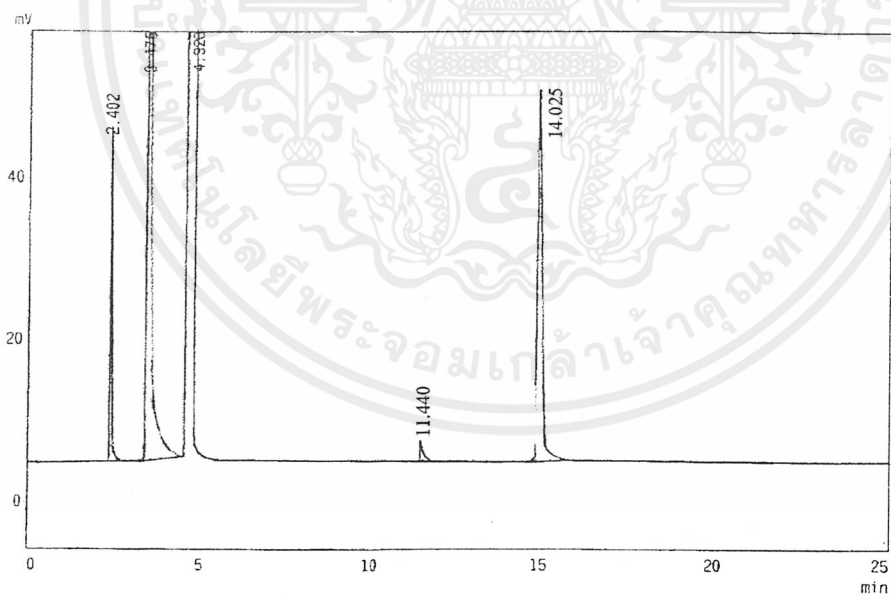


รูปที่ 4.10 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน

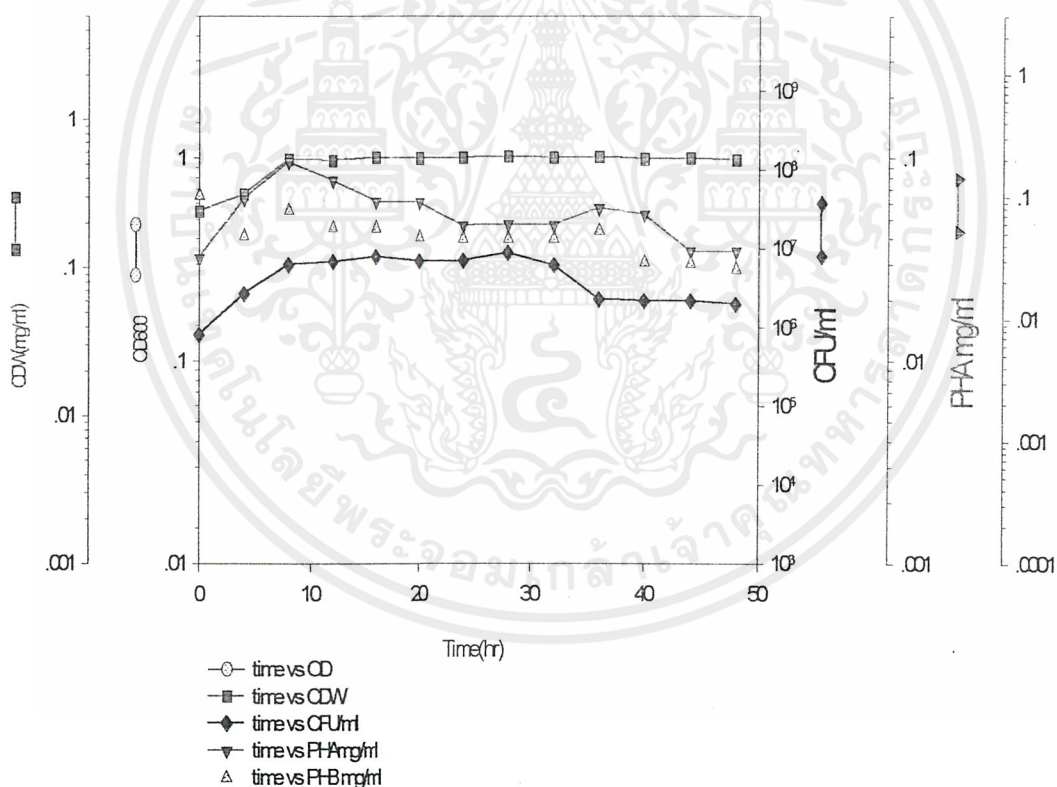


รูปที่ 4.12 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 8 ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน

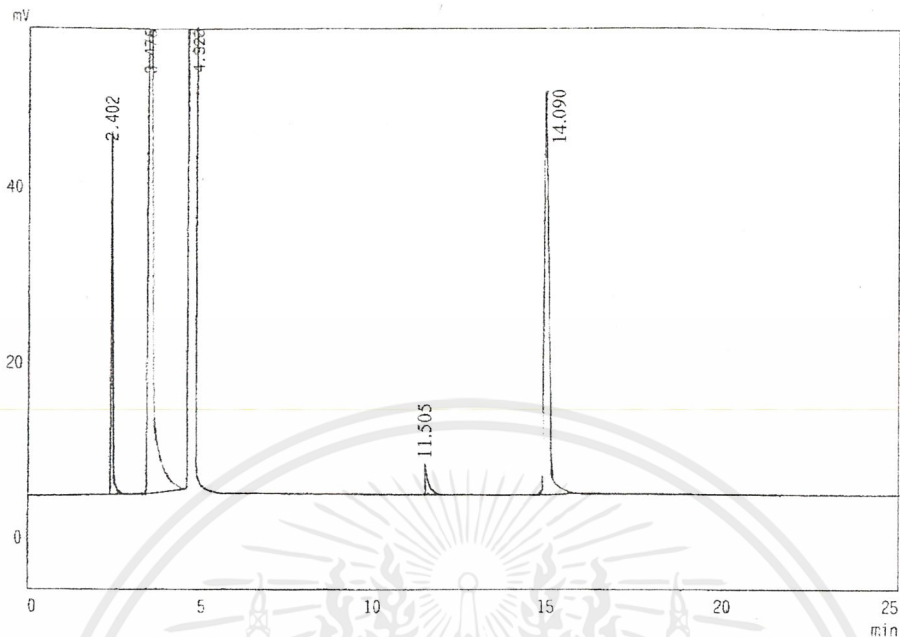
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

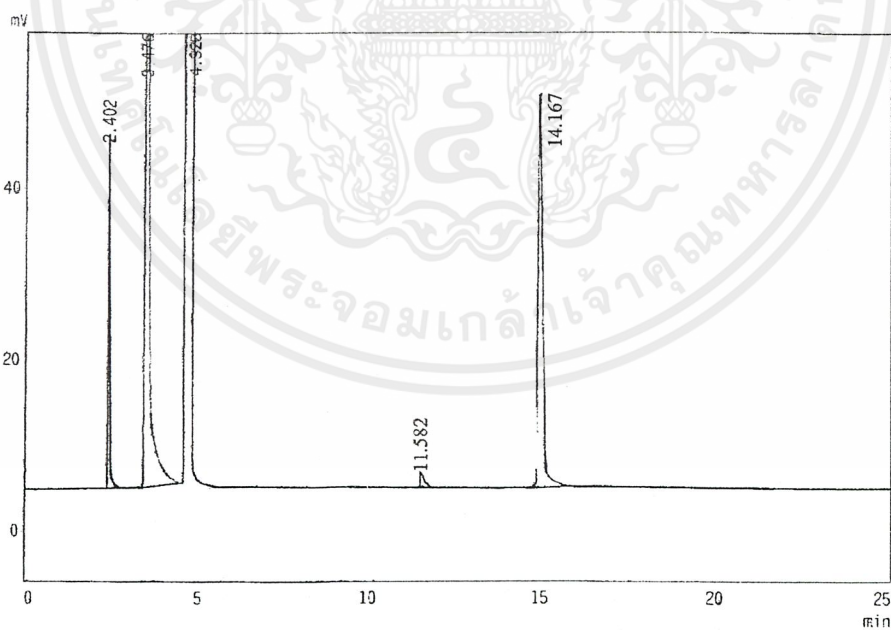
ในการศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 8 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 28 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.3773 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.01162 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้แสดงปริมาณ PHB ในชั่วโมงที่ 0 และ 24 เป็นโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 4.14 และ 4.15



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



รูปที่ 4.14 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอน

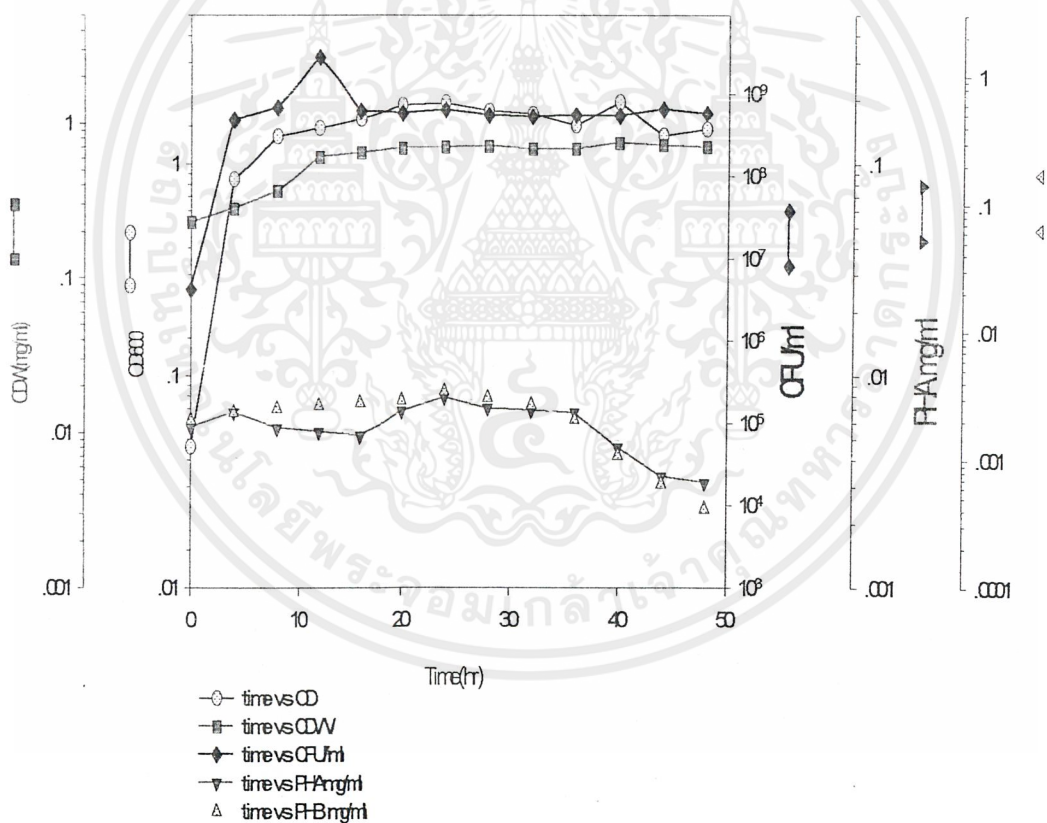


รูปที่ 4.15 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 24 ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

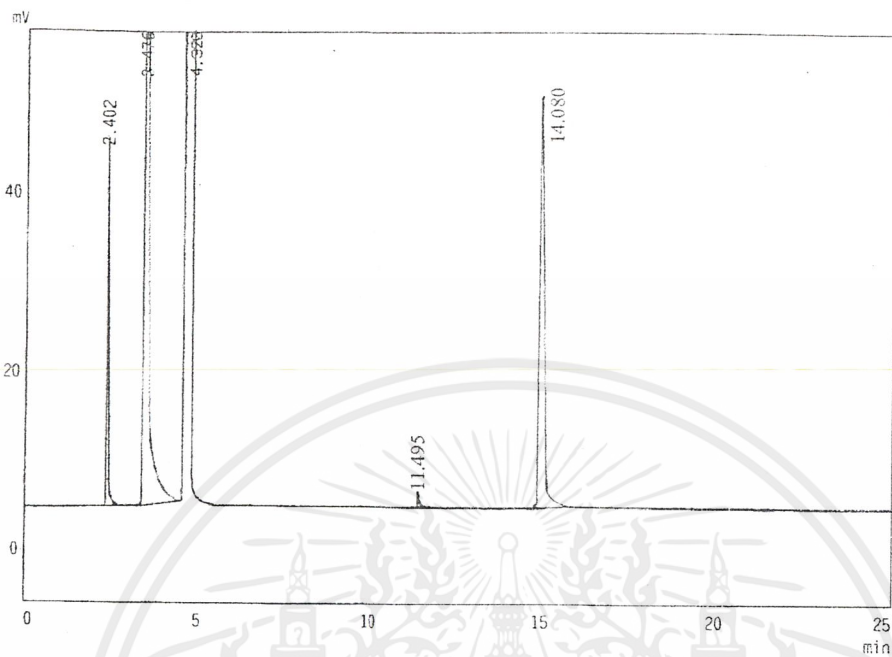
4.3.2.1 การศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.16 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดในชั่วโมงที่ 8 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.038391 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและในชั่วโมงที่ 4 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.0069 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้แสดงปริมาณ PHB ในชั่วโมงที่ 0 และ 8 เป็นโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 4.17 และ 4.18

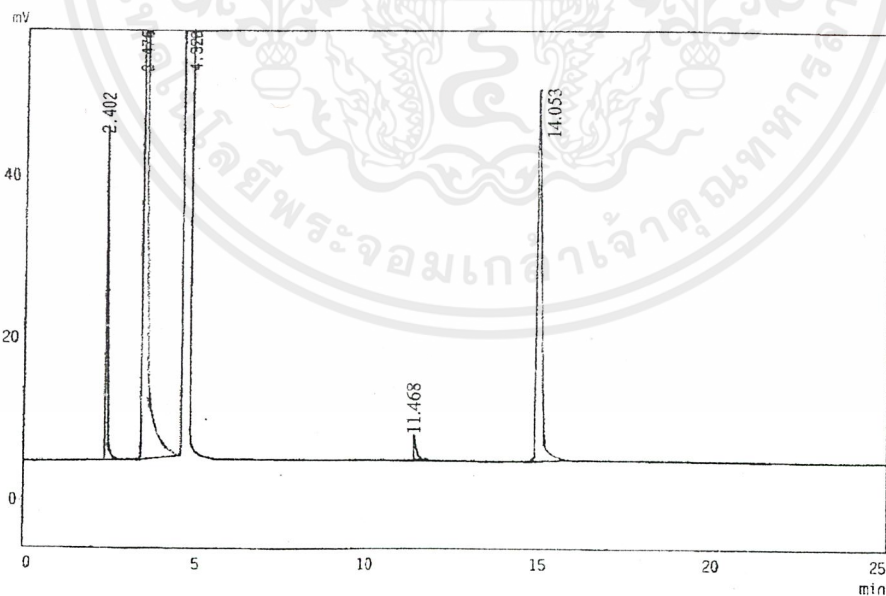


รูปที่ 4.16 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอน

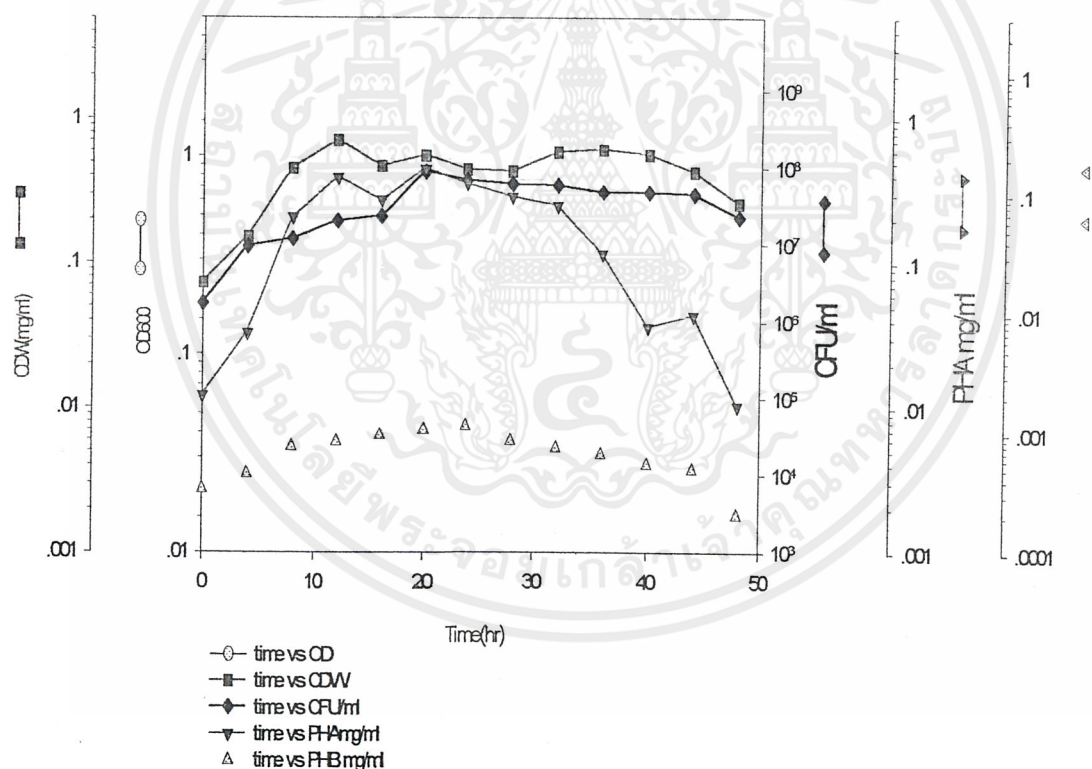


รูปที่ 4.18 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 8 ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอน

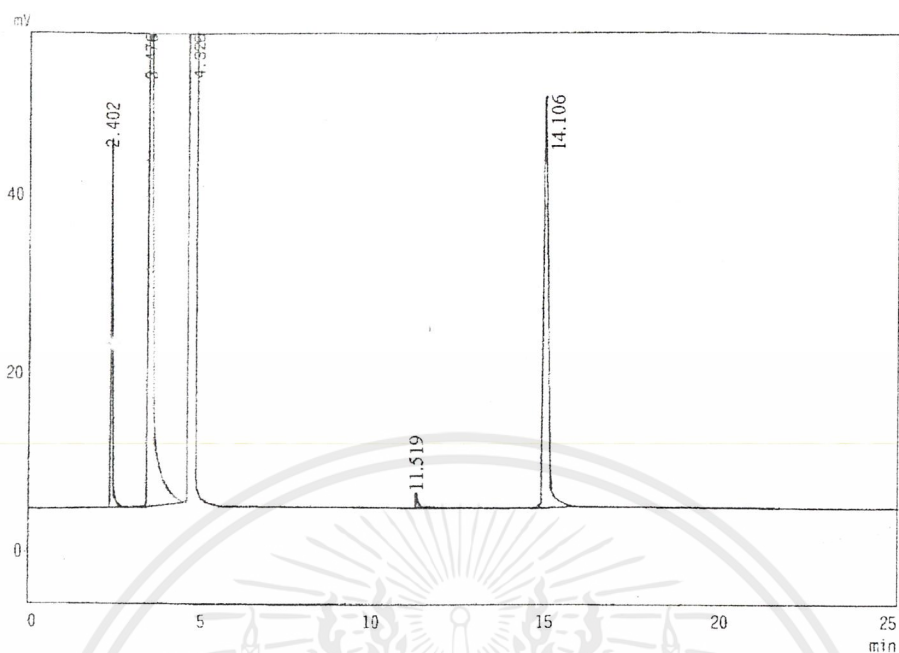
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

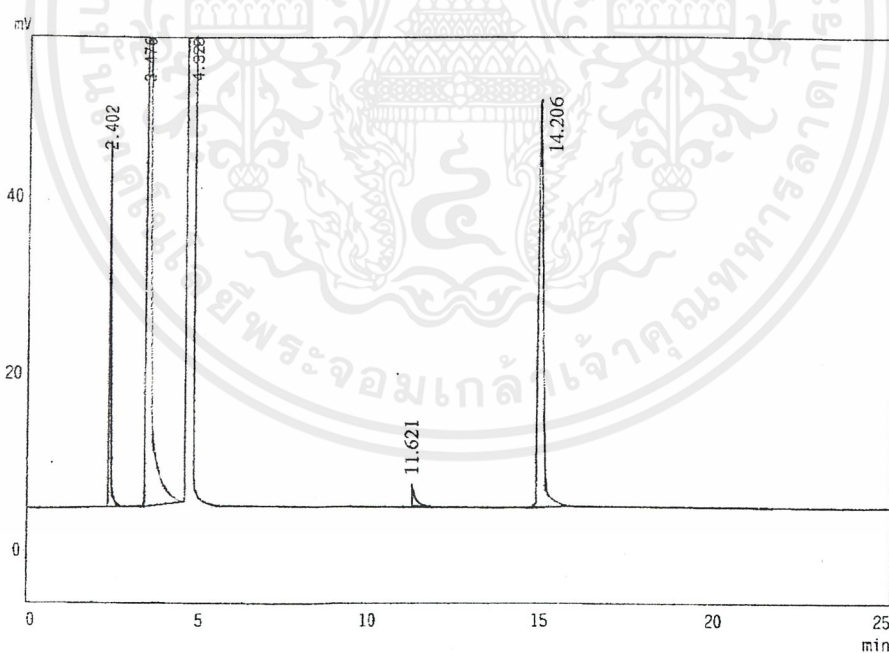
ในการศึกษาการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีไขมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.19 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 20 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 20 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.8099 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.0025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้แสดงปริมาณ PHB ในชั่วโมงที่ 0 และ 24 เป็นโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 4.20 และ 4.21



รูปที่ 4.19 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีไขมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.20 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน



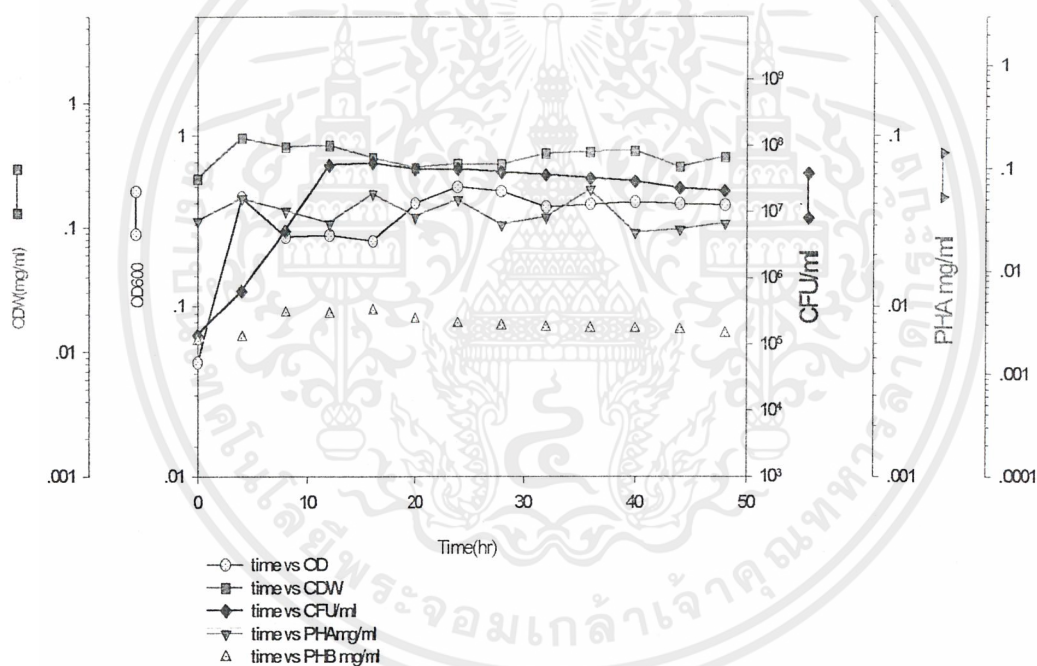
รูปที่ 4.21 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 24 ของ *A. eutrophus* TISTR 1403 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

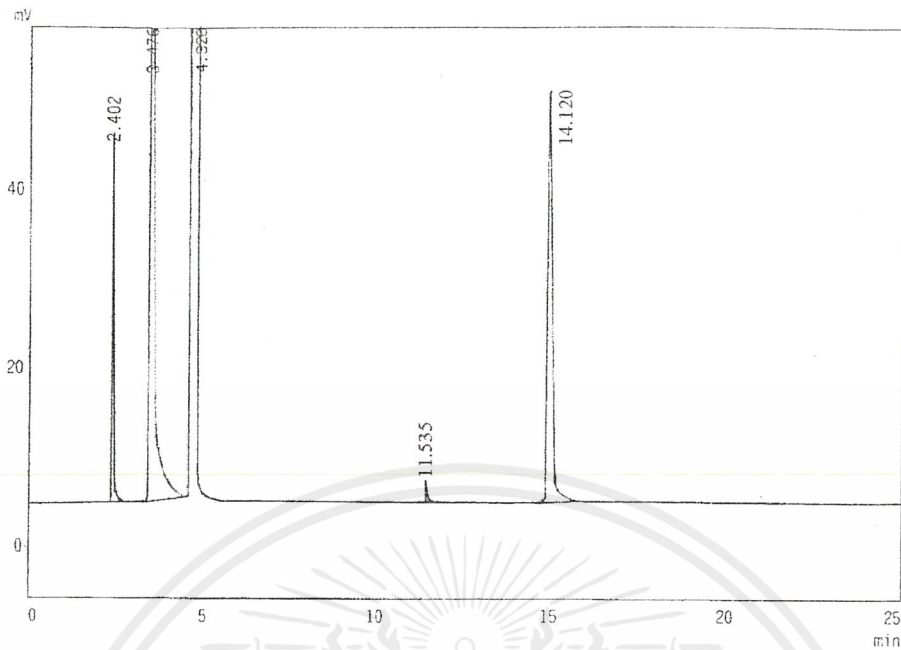
4.3.3 การศึกษาการผลิต PHB ของเชื้อ PHB 1 ในกลูโคส

4.3.2.3 การศึกษาการผลิต PHB ของเชื้อ PHB 1 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

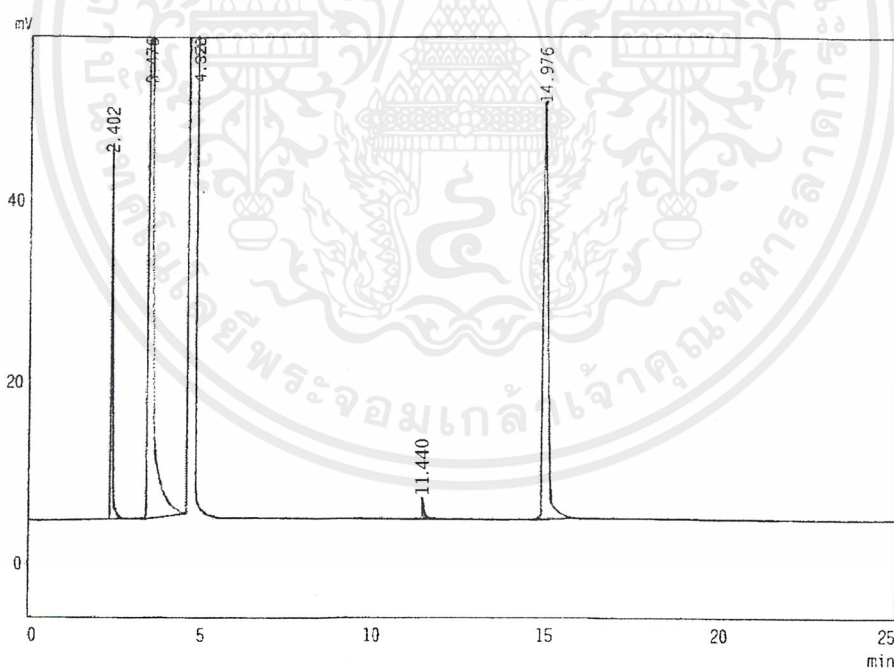
ในการศึกษาการผลิต PHB ของ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.22 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 4 ชั่วโมงและมีอัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 24 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.1287 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และในชั่วโมงที่ 16 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.01137 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และได้แสดงปริมาณ PHB ในชั่วโมงที่ 0 และ 16 เป็นโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 4.23 และ 4.24



รูปที่ 4.22 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.23 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



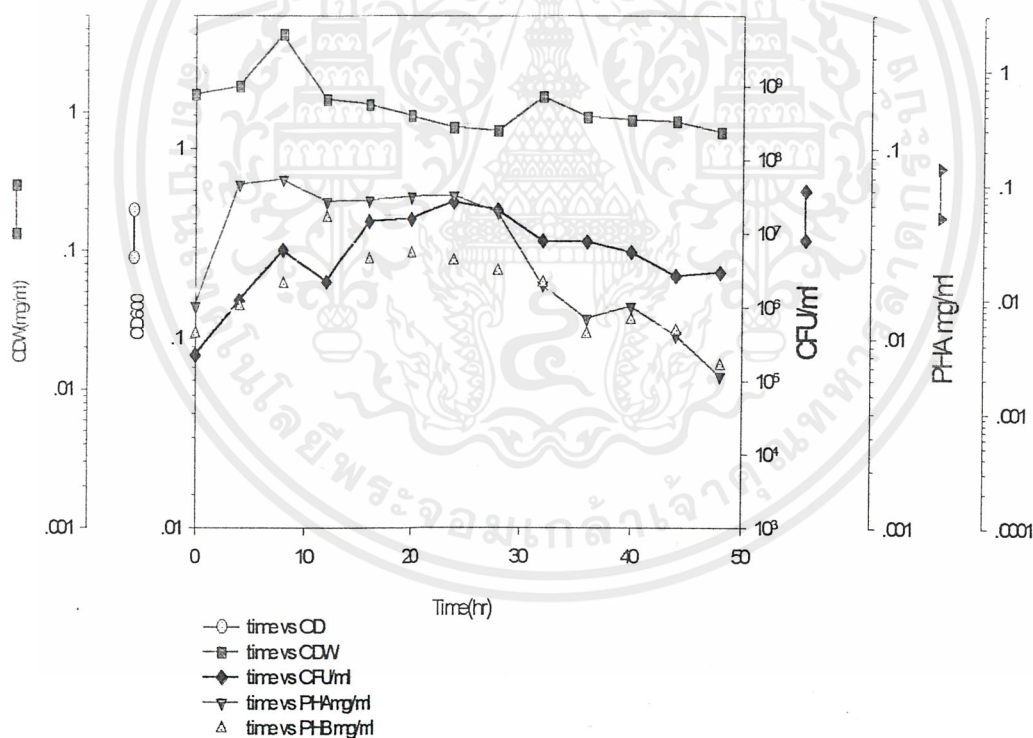
รูปที่ 4.24 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 16 ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

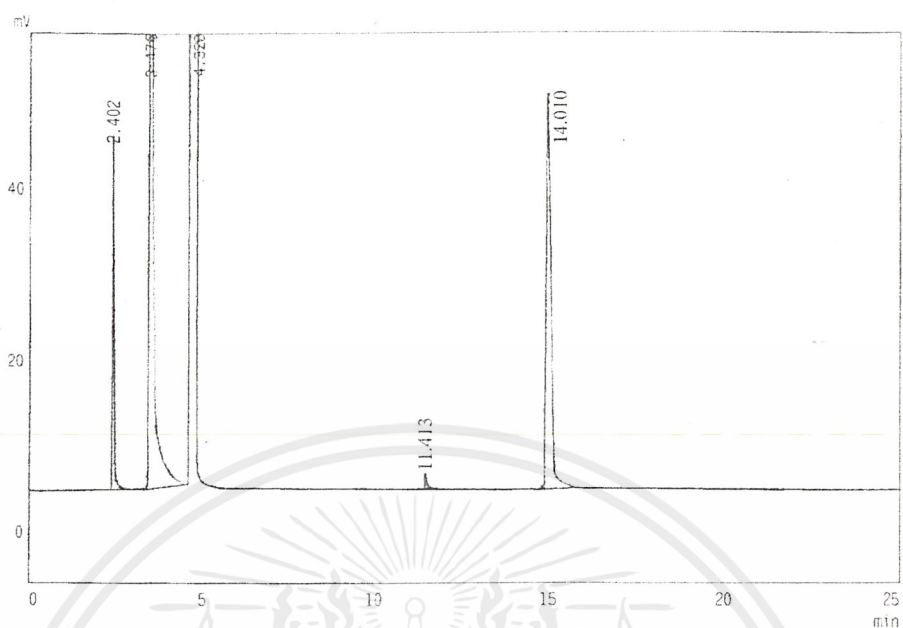
4.3.4 การศึกษาการผลิต PHB ของ PHB1 ในวัตถุดิบทางการเกษตรและกากของเสีย จากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร

4.3.2.4 การศึกษาการผลิต PHB ของ PHB1 โดยใช้หางนมเป็นแหล่งคาร์บอน

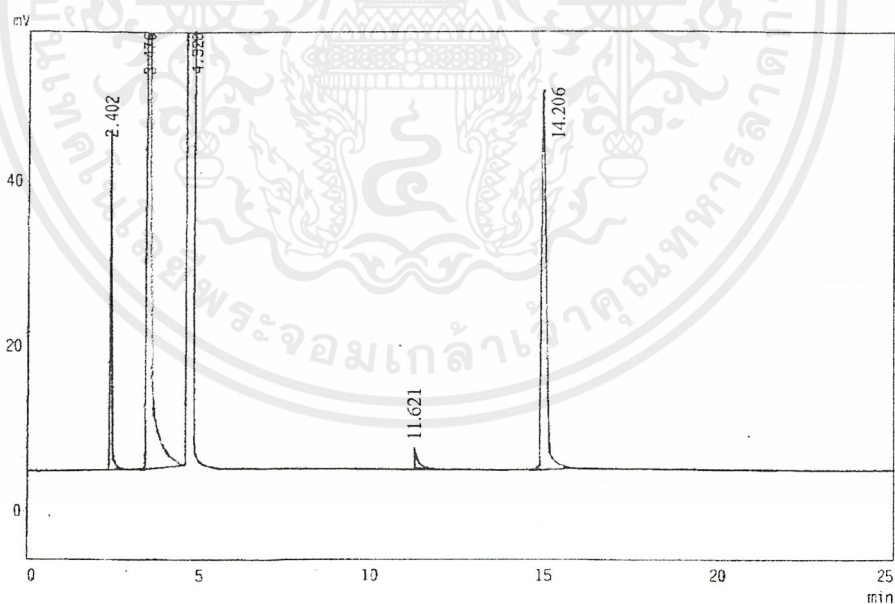
ในการศึกษาการผลิต PHB ของ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.25 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 8 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 24 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.0721 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมง 12 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.0422 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้แสดงปริมาณ PHB ในชั่วโมงที่ 0 และ 12 เป็นโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 4.26 และ 4.27



รูปที่ 4.25 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.26 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน

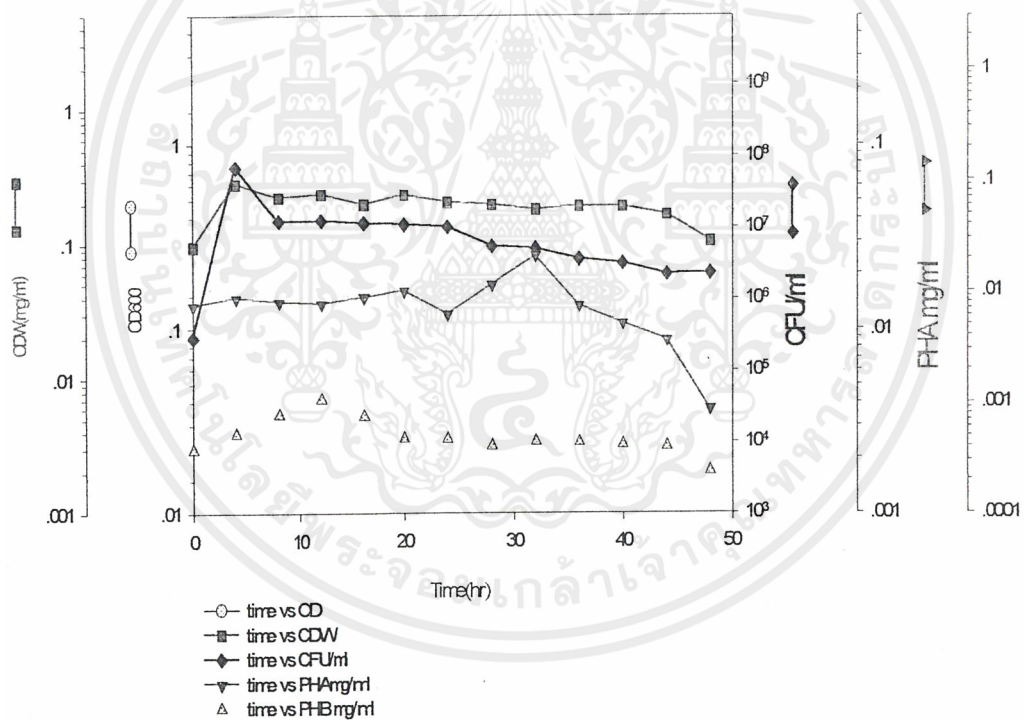


รูปที่ 4.27 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 12 ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน

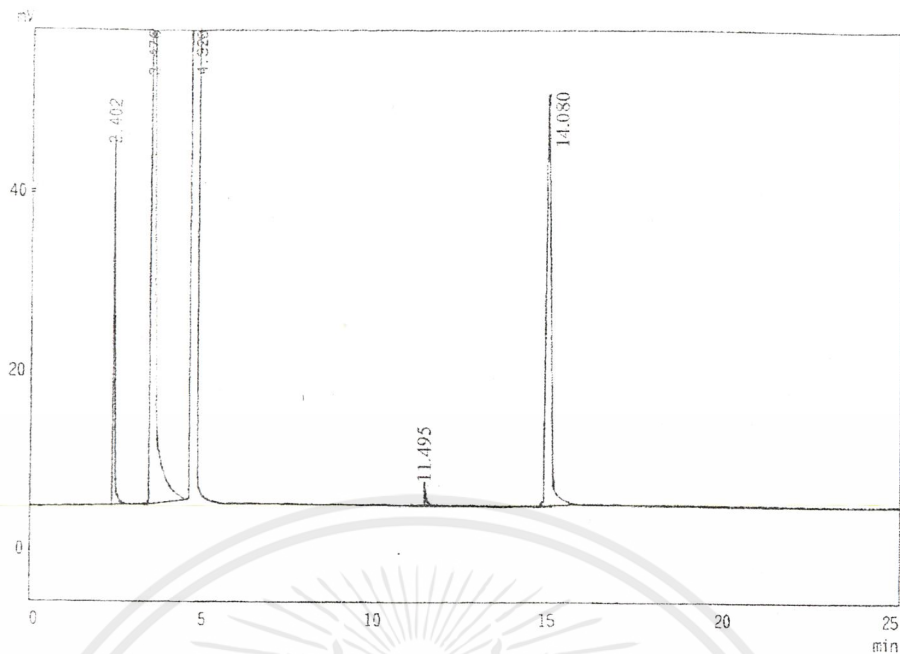
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4.2 การศึกษาการผลิต PHB ของ PHB1 โดยใช้กากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน

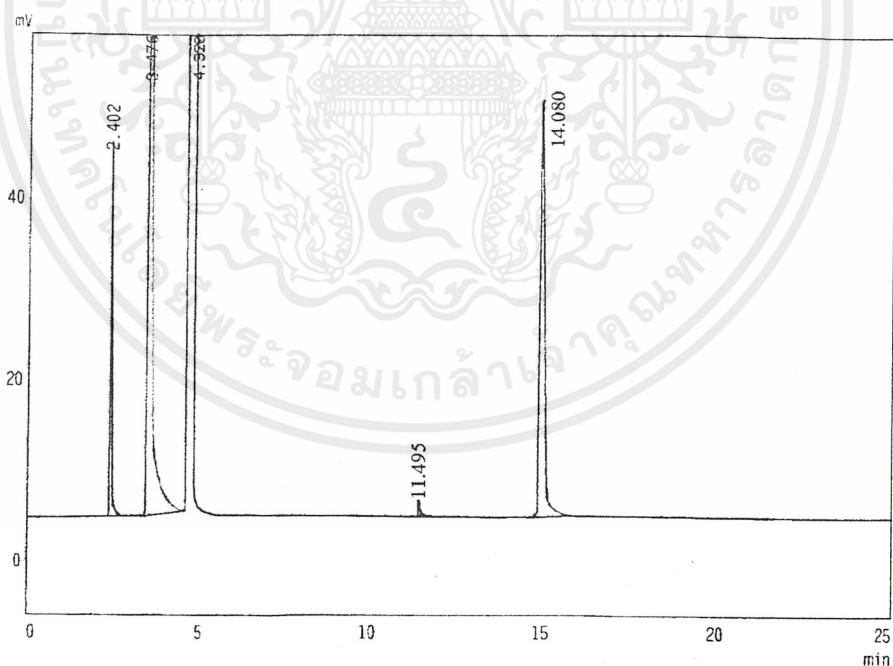
ในการศึกษาการผลิต PHB ของ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.28 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 4 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 32 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.1381 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.0045 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้แสดงปริมาณ PHB ในชั่วโมงที่ 0 และ 12 เป็นโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 4.29 และ 4.30



รูปที่ 4.28 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อของ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.29 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของเชื้อของ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน

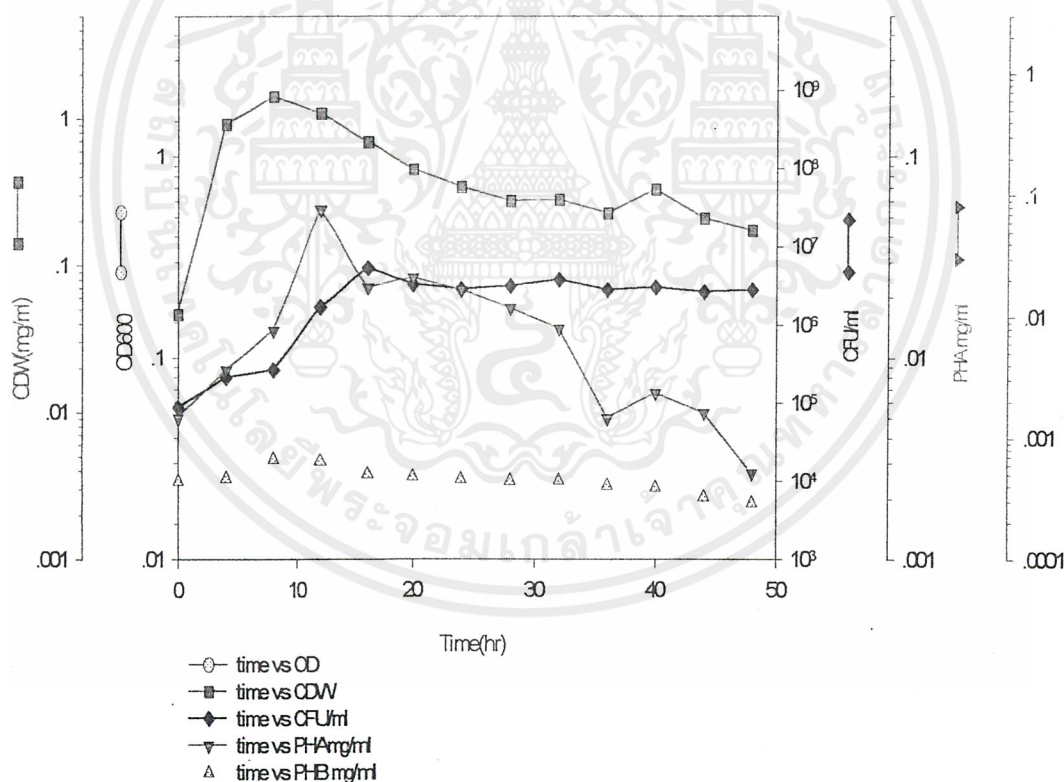


รูปที่ 4.30 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 12 ของเชื้อของ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากมอลต์เป็นแหล่งคาร์บอน

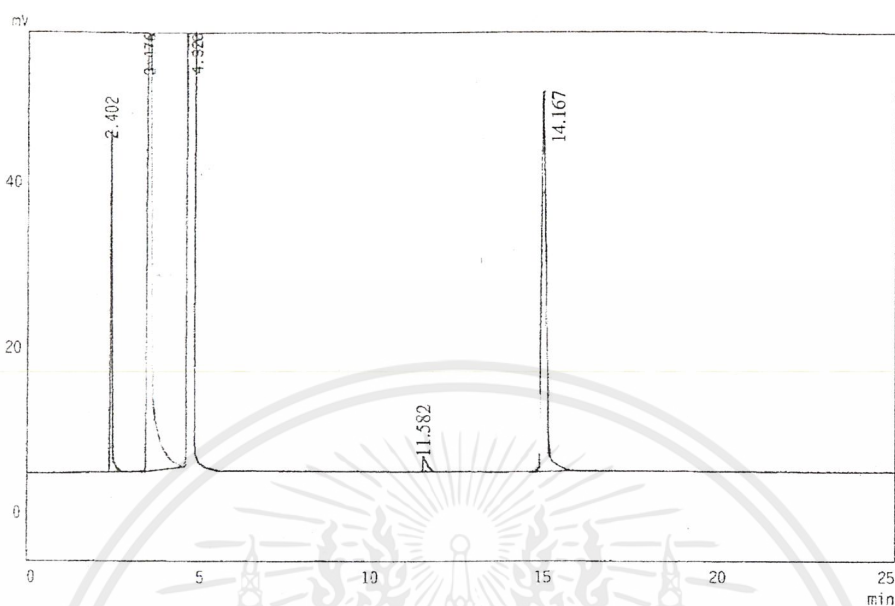
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4.3 การศึกษาการผลิต PHB ของ PHB1 โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอน

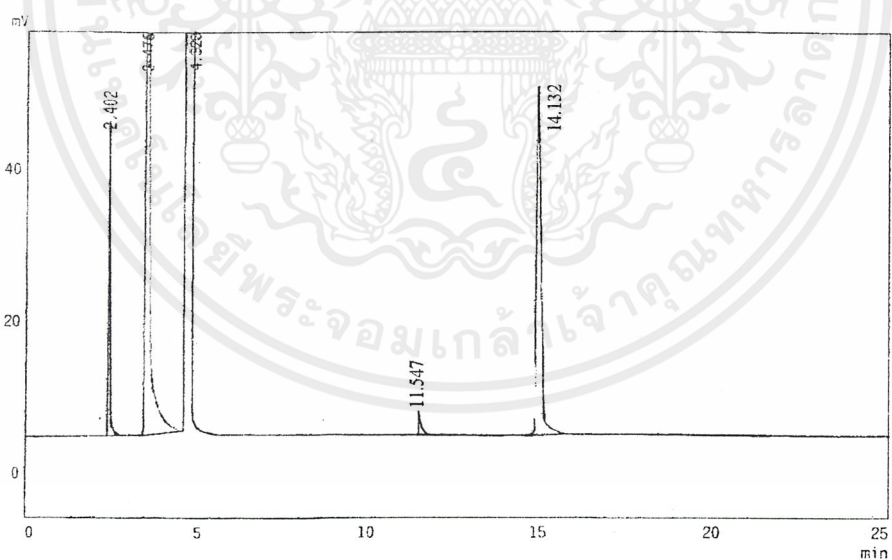
ในการศึกษาการผลิต PHB ของ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.31 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 8 ชั่วโมงอัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 40 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.22993 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.002159 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้แสดงปริมาณ PHB ในชั่วโมงที่ 0 และ 8 เป็นโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 4.32 และ 4.33



รูปที่ 4.31 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.32 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอน

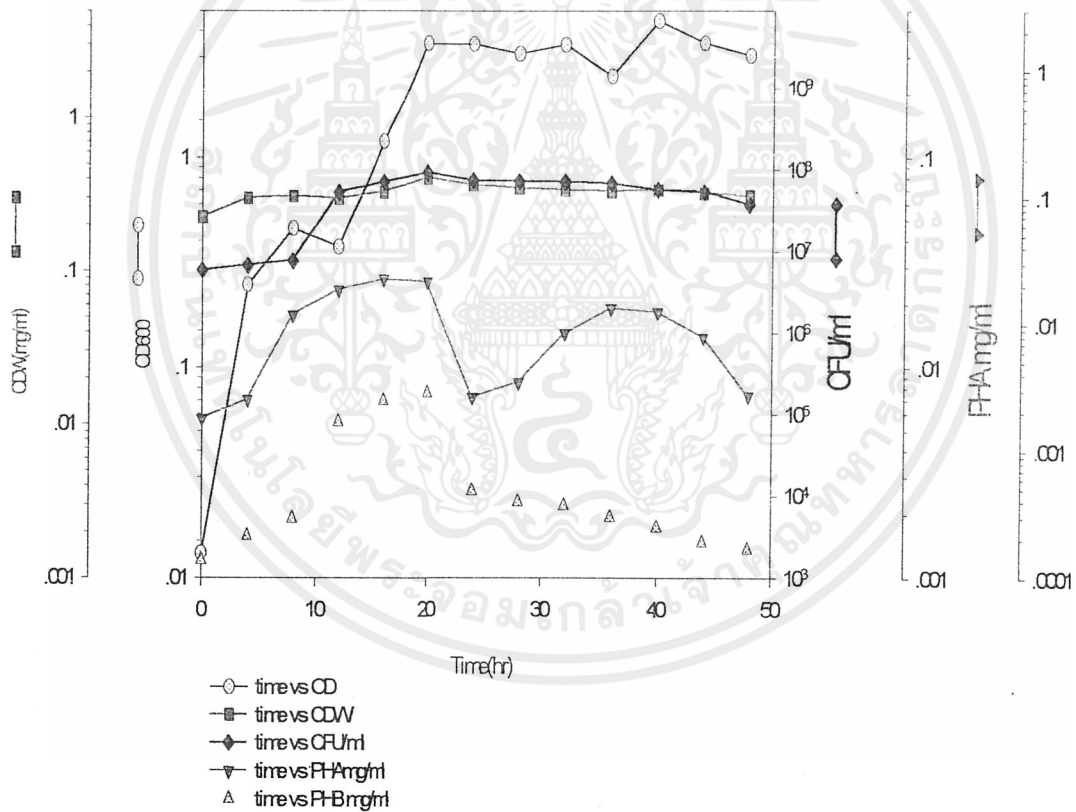


รูปที่ 4.33 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 8 ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอน

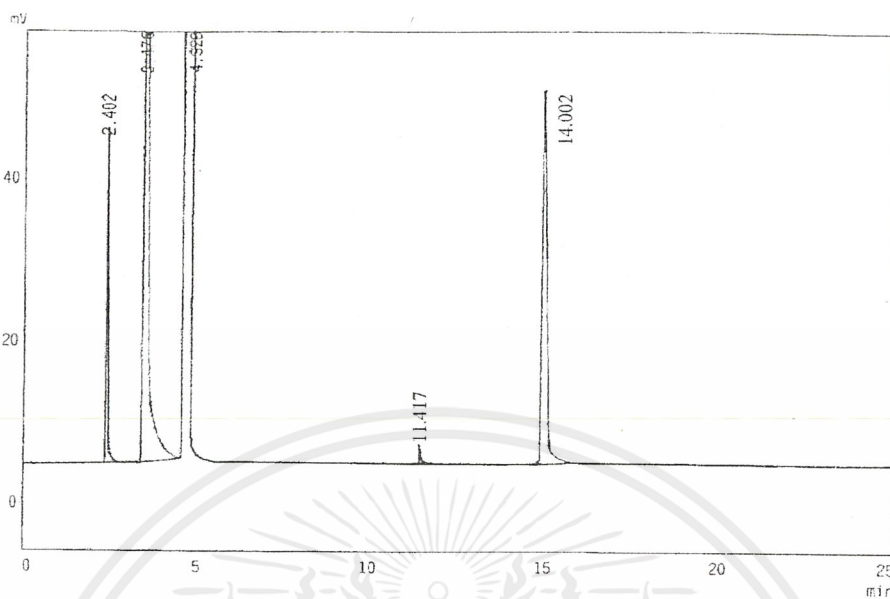
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4.4 การศึกษาการผลิต PHB ของ PHB1 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

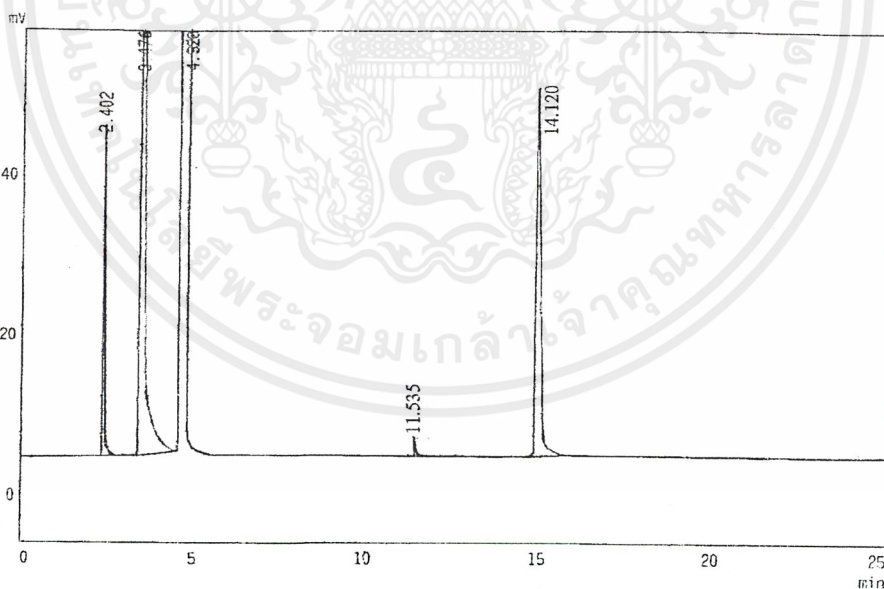
ในการศึกษาการผลิต PHB ของ PHB1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ดังรูปที่ 4.34 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 20 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 16 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.0803 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 16 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.007658 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้แสดงปริมาณ PHB ในชั่วโมงที่ 0 และ 16 เป็นโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 4.35 และ 4.36



รูปที่ 4.34 การเจริญเติบโต การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.35 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

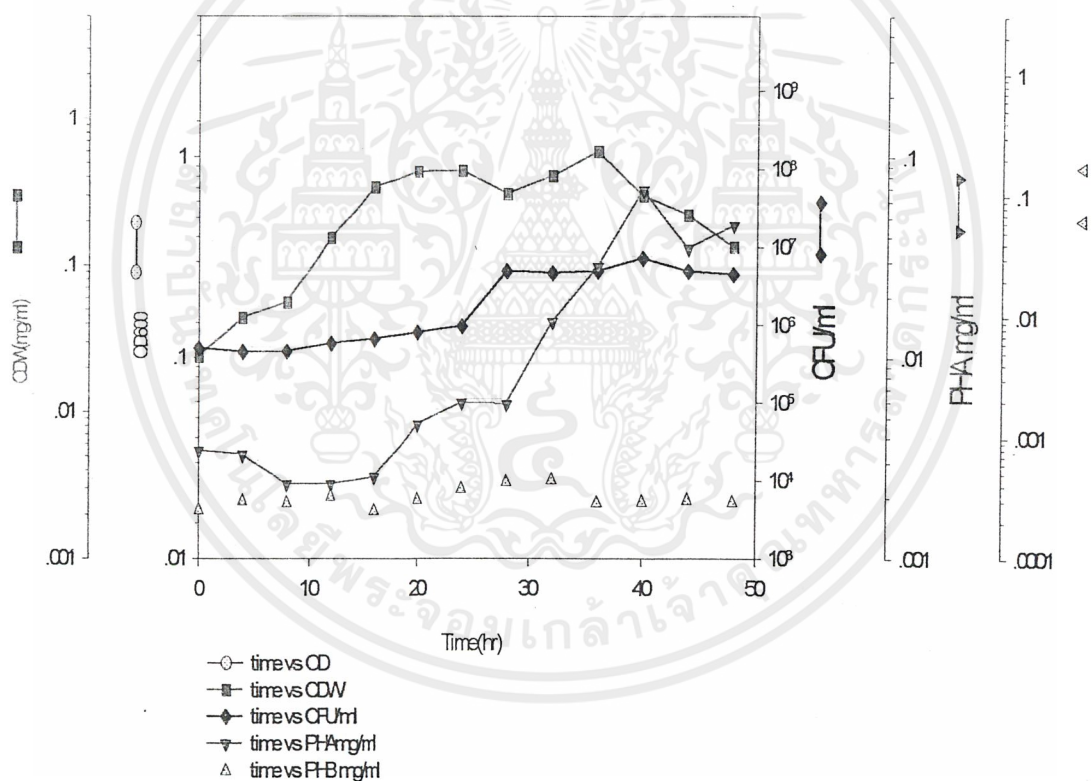


รูปที่ 4.36 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 16 ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

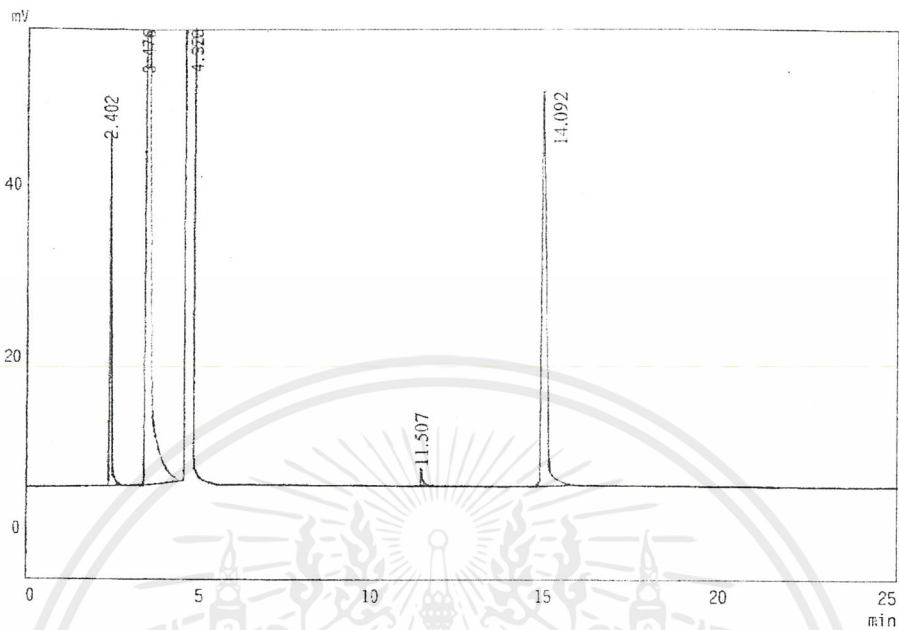
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4.5 การศึกษาการผลิต PHB ของ PHB1 โดยใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

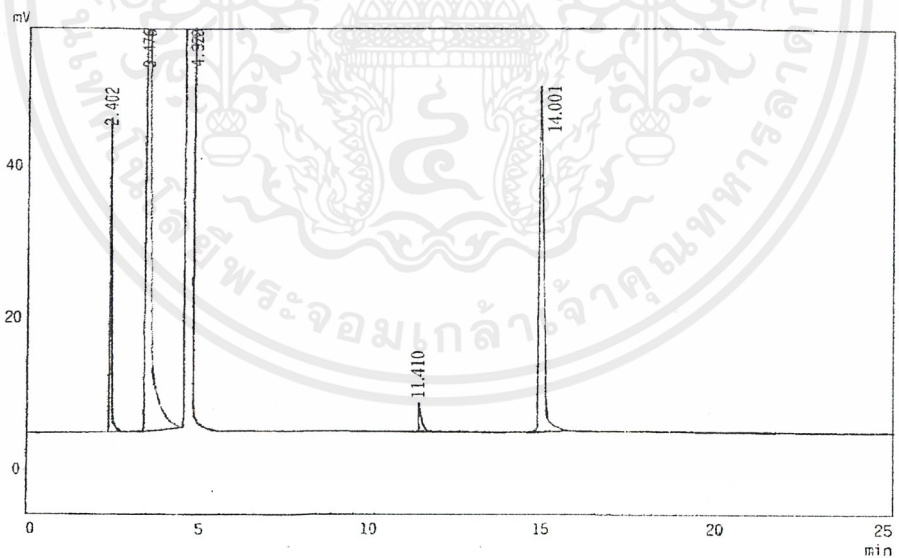
ในการศึกษาการผลิต PHB ของ PHB1 มาเลี้ยงในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.37 พบว่ามีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง อัตราการผลิต PHA และ PHB สูงสุดพบได้ในชั่วโมงที่ 40 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.2299 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 0.00219 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้แสดงปริมาณ PHB เป็นโครมาโตแกรมในชั่วโมงที่ 0 และ 8 ดังรูปที่ 4.38 และ 4.39



รูปที่ 4.37 การเจริญ การผลิต PHA และ PHB ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.38 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 0 ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.39 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 48 ของเชื้อ PHB 1 ในอาหาร PHB medium ที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำปริมาณ PHA และ PHB ในเชื้อ *A. eutrophus* และ PHB1 จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ มาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ประสิทธิภาพการผลิต PHA และประสิทธิภาพการผลิต PHB ได้ค่าต่างๆดังแสดงในตารางที่ 4.2 เมื่อศึกษาพารามิเตอร์ที่แสดงจลนศาสตร์การเจริญเติบโตของกลูโคส หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล และน้ำมันมะพร้าว ในเชื้อ *A. eutrophus* และ PHB 1 โดยศึกษาจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและค่าการผลิตผลิตภัณฑ์ ซึ่งได้แก่ PHA และ PHB พบว่าลักษณะการผลิตผลิตภัณฑ์มีความสัมพันธ์กันแบบไม่ควบคู่กับการเจริญเติบโต (non growth associate pattern) หลังจากนั้นได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA และ PHB ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ได้ผลดังตารางที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด กับประสิทธิภาพการผลิต PHA และประสิทธิภาพการผลิต PHB

ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	ชั่วโมงที่ผลิตสูงสุด		อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (ชั่วโมง ⁻¹)	ประสิทธิภาพการผลิต PHA (กรัม PHA ต่อกรัมเซลล์)	ประสิทธิภาพการผลิต PHB (กรัม PHA ต่อกรัมเซลล์)
		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> (PHB1)	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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ค่าความแตกต่างทางสถิติของ PHA ในเชื้อ *A.eutrophus* TISTR 1403 และ PHB1

ประสิทธิภาพการผลิต PHA		
แหล่งคาร์บอน	<i>A.eutrophus</i> TISTR 1403	PHB1
กลูโคส	0.09657 cd	0.01226 e
หางนม	0.03228 de	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 %

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA (ตารางที่ 4.3) ในแหล่งคาร์บอนทั้ง 6 ชนิด คือ กลูโคส หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล และน้ำมันมะพร้าว โดยเชื้อ *A.eutrophus* TISTR 1403 พบว่า น้ำมันมะพร้าวให้ประสิทธิภาพการผลิต 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 คือ กลูโคส หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ส่วนประสิทธิภาพการผลิต PHA จากเชื้อ PHB1 พบว่าน้ำมันมะพร้าวให้ประสิทธิภาพการผลิต 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 และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าน้ำมันมะพร้าว แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนอื่นๆ คือ กลูโคส หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ส่วนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA ของเชื้อ *A.eutrophus* TISTR 1403 และ PHB1 ด้วยวัตถุดิบที่ให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHA สูงสุด คือ น้ำมันมะพร้าว พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประสิทธิภาพการผลิต PHA ของเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 จากน้ำมันมะพร้าวมี ประสิทธิภาพในการผลิตต่ำกว่าการผลิตด้วยเชื้อ PHB1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการผลิต โดยใช้แหล่งคาร์บอนแหล่งอื่นๆ พบว่า การผลิต PHA โดยใช้กลูโคส หางนม น้ำทิ้งจากโรงงานผลิต น้ำมันปาล์ม จากเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่การผลิต PHA โดยใช้กาก มอลต์ และกากน้ำตาล โดยเชื้อทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ตารางที่ 4.4 ค่าความแตกต่างทางสถิติของ PHB ในเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB1

ประสิทธิภาพการผลิต PHB		
แหล่งคาร์บอน	<i>A. eutrophus</i> TISTR 1403	PHB1
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 ที่ระดับความเชื่อ มั่น 95 %

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHB (ตารางที่ 4.4) ในแหล่งคาร์บอนทั้ง 6 ชนิด ในเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 พบว่า หางนม ให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHB สูง สุดคือ 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 และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่า หางนม มีประสิทธิภาพในการผลิต PHB ไม่แตกต่างจากกลูโคส แต่มีประสิทธิภาพการผลิต PHB แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนอื่นๆ คือ กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล น้ำมันมะพร้าว อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ส่วนประสิทธิภาพการผลิต PHB จากเชื้อ PHB1 พบว่าหางนมให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHB สูงสุดเช่นเดียวกัน คือ 0.08739 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ ตามด้วย กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กลูโคส กากน้ำตาล น้ำมัน มะพร้าว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.01328, 0.01139, 0.00862, 0.00433, และ 0.00186 กรัม PHB ต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่าหางนมมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนอื่นๆ คือ กลูโคส กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล น้ำมันมะพร้าว อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ส่วนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิต PHB ของเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB1 ด้วยวัตถุดิบที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตสูงสุด คือ หางนม พบว่าประสิทธิภาพในการผลิต PHB ของเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 จากหางนมมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB ต่ำกว่าการผลิต PHB โดยเชื้อ PHB1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการผลิตโดยใช้แหล่งคาร์บอนอื่นๆ พบว่าการผลิต PHB โดยใช้กากมอลต์ และน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่การผลิต PHB โดยใช้กลูโคส กากน้ำตาล และน้ำมันมะพร้าว โดยเชื้อทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

จากความสัมพันธ์ของปริมาณไนโตรเจน ปริมาณคาร์บอน (ตารางที่ 4.2) และประสิทธิภาพการผลิต PHA และ PHB พบว่าแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนเป็นองค์ประกอบในปริมาณน้อย คือ น้ำมันมะพร้าว หางนม จะมีความสามารถในการผลิต PHA และ PHB ตามลำดับได้ดีกว่า แหล่งคาร์บอนที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงกว่าซึ่งข้อจำกัดของ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA และ PHB ได้ก็คือ สามารถผลิต PHA และ PHB ได้ในสภาวะที่มีการจำกัดแหล่งอาหาร เช่น การจำกัดแหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน แหล่งฟอสเฟต เป็นต้น ในปริมาณที่เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ (Kessler และ Witholt, 2001) นอกจากนี้ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มซึ่งมีปริมาณของไนโตรเจนและคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่น้อยเช่นกัน แต่มีความสามารถในการผลิต PHA และ PHB ได้ต่ำกว่าในน้ำมันมะพร้าว และหางนม ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพในการผลิต PHA และ PHB สูงสุด ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มมีสารเคมีจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มปะปนอยู่ซึ่งอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการผลิต PHA และ PHB ได้ และยังพบอีกว่าในเชื้อ PHB1 นั้นมีประสิทธิภาพการผลิต PHA และ PHB ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มสูงกว่าการผลิต PHA และ PHB จากเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งวัตถุดิบเช่นเดียวกันอาจเป็นเพราะเชื้อ PHB1 มีการปรับตัวให้มีความสามารถทนต่อสารเคมีได้ดีกว่าเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 ทำให้มีประสิทธิภาพในการผลิต PHA และ PHB ได้ดีกว่านั่นเอง

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย

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

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA ในแหล่งคาร์บอนทั้ง 6 ชนิด คือ กลูโคส หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล และน้ำมันมะพร้าว โดยเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 พบว่า น้ำมันมะพร้าวให้ประสิทธิภาพการผลิต 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 95 % ส่วนประสิทธิภาพการผลิต PHA จากเชื้อ PHB1 พบว่าน้ำมันมะพร้าวให้ประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุดเช่นเดียวกัน เท่ากับ 0.39019 กรัม PHA ต่อกรัมเซลล์ ตามด้วยน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม หางนม กากมอลต์ กากน้ำตาล กลูโคส ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.23844, 0.11731, 0.04055, 0.01745, และ 0.01226 กรัม PHA ต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าน้ำมันมะพร้าว แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ส่วนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA ของเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB1 ด้วยวัตถุดิบที่ให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHA สูงสุด คือ น้ำมันมะพร้าว พบว่าประสิทธิภาพการผลิต PHA ของเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 จากน้ำมันมะพร้าวมีประสิทธิภาพในการผลิตต่ำกว่าการผลิตด้วยเชื้อ PHB1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการผลิตโดยใช้แหล่งคาร์บอนแหล่งอื่นๆ พบว่า การผลิต PHA โดยใช้กลูโคส หางนม น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม จากเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่การผลิต PHA โดยใช้กากมอลต์ และกากน้ำตาล โดยเชื้อทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHB ในแหล่งคาร์บอนทั้ง 6 ชนิด ในเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 พบว่า หางนม ให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHB สูงสุดคือ 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 และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่าหางนมมี ประสิทธิภาพในการผลิต PHB ไม่แตกต่างจากกลูโคส แต่มีประสิทธิภาพการผลิต PHB แตกต่าง จากแหล่งคาร์บอนอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ส่วนประสิทธิภาพการผลิต PHB จากเชื้อ PHB1 พบว่าหางนมให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHB สูงสุดเช่นเดียวกัน คือ 0.08739 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ ตามด้วย กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กลูโคส กากน้ำตาล น้ำมันมะพร้าว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.01328, 0.01139, 0.00862, 0.00433, และ 0.00186 กรัม PHB ต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่า หางนมมี ประสิทธิภาพในการผลิต PHB แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ส่วนการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิต PHB ของเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB1 ด้วยวัตถุดิบที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตสูงสุด คือ หางนม พบว่าประสิทธิภาพในการ ผลิต PHB ของเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 จากหางนมมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB ต่ำ กว่าการผลิต PHB โดยเชื้อ PHB1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการผลิตโดยใช้แหล่งคาร์บอน อื่นๆ พบว่าการผลิต PHB โดยใช้กากมอลต์ และน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มจากเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่การผลิต PHB โดยใช้กลูโคส กากน้ำตาล และน้ำมัน มะพร้าว โดยเชื้อทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA และ PHB ได้นั้นจะสามารถผลิต PHA และ PHB ได้ในสภาวะที่มีการจำกัดแหล่งอาหาร เช่น การจำกัดแหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน แหล่ง ฟอสเฟต เป็นต้น ในปริมาณที่เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงควรศึกษาปริมาณความ ต้องการไนโตรเจน คาร์บอนและธาตุอาหารอื่นๆที่เหมาะสมในการผลิต PHA และ PHB เพื่อนำไป สู่อการผลิตพลาสติกชีวภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Agarwal, G.P., de Boer, L., Brandl, H., Dijkhuizen, L., Fuller, R.C., Gross, R.A., Hoke, H., Laufer, A, Lenz, R. W., Muller, R., Syldatk. Ch.Microbiol. Biopolym. p76-92,1995
- Anderson, A.J. and Dawes, E.A. "Occurrence, Metabolism Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates" Microbiol rev. 54:450-472, 1990
- 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
- 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., Bachofen, R., Mayer, J. and Wintermayer, E. "Degradation and application of Polyhydroxyalkanoates" Can. J. Microbiol. 41:143-153, 1995
- Byrom, D. "Polymer synthesis by microorganism:technology and economics" Trends Biotech. 5:246-250, 1987
- Comibert, J., and Marchessault, R.H. "Physical properties of poly- β -Hydroxybutyrate. IV. Conformational analysis and crystalline structure" J. Mol. Biol. 71:735-756, 1972
- David, A.M., Alistair, J.A. and Linda, A.N. "Regulation of PHB metabolism in *Alcaligenes Eutrophus*" Can. J. Microbiol. 41:44-49, 1995

- 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 durinf growth on octane" J. Bacteriol. 154:870-878, 1983
- Doi, Y.(Ed.), Microbial Polyester. VCH Publishers, New York, 1990
- Doi, Y., Kumagai, Y., Tanahashi, N., Mukai, K. "Structural Effects on Biodragation of Microbial and Synthetic Poly(hydroxyalkanoates)" Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology, Nagatsuta, Midori-Ku, Yokohama 227, Japan., 1990
- Dunlop, W.F., and Pobards, A.W. "Ultrastructuralai study of poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*" J. Bacteriol. 114:1271-1280, 1973
- Ellar, D., Lundgren D.G., Okamura K.and Marchessault, R.H. "Morphology of poly- β -hydroxybutyrate granules" J. Mol. Bio. 135:489-502, 1968
- Feike R., Van der Leij and witholt, B. "Strategies for the sustainable production of new biodegradable polyesters in plants:a review " 41:222-238, 1995
- Findlay, R.H., White, D.C. "Polymeric betahydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*" Appl. Environ. Microbiol. 45:71-78, 1983
- 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
- Griffin, G.J.L., ed, Chapman & Hall. 48-96, 1994
- Holm, P.J. "Applications of PHB-a microbially produced biodegradable Thermoplastic" Phys. Technol. 16:32-36, 1985
- Juliana A.R., Marie-Claire A.R.and Bruce A.R. "Hemicellulose as a potential substrate for production of poly(β -hydroxyalkamoates)" Can. J. Microbiol. 41:262-266, 1995

- Kessler, B. and Witholt B. "Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism" J. Biotechnol. 86:97-104, 2001
- Lee, S.Y., "Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria" Trend. Biotechnol. 14:431-438, 1996
- Lee, S.Y., "Bacterial polyhydroxyalkanoates" Biotechnol. Bioeng. 49:1-14, 1996
- Legmoigne, M. "Production d'acide β -oxybutyrique par certaines bacteries du groupe du *Bacillus subtilis*" C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. 176:1761, 1923
- Legmoigne, M. "Products of dehydration and polymerization poly(β -hydroxybutyric acids)" Bull. soc. chem. Biol. 8:770-782, 1926
- Lundgren, D.G., Pfister, R.M. and Merrick, J.M. "Structure of poly(β -hydroxybutyric acids) granules" J. Gen. Microbiol. 34:441-446, 1964
- Mass, J., Pedros-Alio, C., and Guerrero, R. "Mathematical model for determining the effects of intracytoplasmic inclusions on volume and density of microorganisms" J. Bacteriol 164:749-756, 1985
- 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 W. Babel. "Calorimetrically recognized maximum yield of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) continuously synthesized from toxic substrates" Biotechnol. 77:247-153, 2000
- Reusch, R.N. "Low molecular weight complexed poly(3-hydroxybutyrate): a dynamic and versatile molecule in vivo" Can. J. Microbiol. 41:50-54, 1995
- Senior, P.J., Beech, G.A. Ritchie, A.F. and Dawes, E.A. "The Role of Oxygen Limitation in the Formation of Poly- β -hydroxybutyrate during Batch and Continuous Culture of *Azotobacter beijerinckii*" J. Biochem. 128: 193-1201, 1972
- Steinbuchel, A., Aerts, K., Babel, W., Follener, C., Liebergesell, M., Madkour, M.H., Mayer, F., Pries, A., Valentin, H.E., Wieczorek, R. "Considerations on the

- structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions”
Can. J. Microbiol. 41:94-105, 1995
- Stockdale, H., Ribbons, D.W. and Daws, E.A. J.Bacteriol. 95:1798-1803, 1968
- Tokiwa, Y., Ando, T., Suzuki, T., Takeda, T. “Biodegradation of synthetic polymers containing ester bonds” Polym. Master. Sci. Eng. 62:988-992, 1990
- Tokiwa, Y. and Suzuki, T. “Hydrolysis of polyesters by lipases” Nature,270:76-78, 1977
- Wallen, L.L., and Rohwedder, W.K. “poly- β -hydroxyalkanoate from alkanoate from activated sludge” Environ. Sci. Technol. 8:576-579, 1974
- Wendlandt, K-D., Jechorek M., Helm J., Stottmeister U. “Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane” J.Biotechnol., 86:127-133, 2001
- Wilkinson, J.F. Exp. Cell Res. Suppl. 7:111-130, 1959
- Witt, U., Muller, R.-J., Augusta, J., Widdecke, H., Deckwer, W.-D. “Synthesis and biodegradability of polyesters based on 1,3-propandiol” Macromol. Chem. Phys. 195:793-802, 1994

ภาคผนวก ก
การย้อมสีแบคทีเรีย

1. การย้อมดูลักษณะรูปร่างเซลล์ด้วยสีแกรม (gram strain)

สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสี

1. สีย้อมคริสตัลไวโอเลต (crystalviolet)
2. สารละลายไอโอดีน (iodine)
3. แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95%ethanol)
4. สีย้อมซัลฟรานิน (sulfranin)

วิธีการ

1. นำเชื้อมาเสียบนแผ่นสไลด์ fixed ติดด้วยความร้อน ผ่านเปลวไฟ
2. ย้อมด้วยสี crystalviolet 1 นาที
3. ล้างด้วยน้ำ
4. ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน 1 นาที
5. ล้างด้วยน้ำ
6. ล้างสีออกโดยใช้แอลกอฮอล์ 95% ทำให้แห้ง
7. ย้อมทับด้วยสีซัลฟรานิน 20 วินาที
8. ล้างด้วยน้ำ ชັบให้แห้ง
9. ส่งดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. การย้อม PHA ในเซลล์ด้วย Nile Blue A ตามวิธีของ Ostle และ Holt ปี ค.ศ.1982

สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสี

1. สีย้อม ไนล์ บลู เอ (Nile Blue A)
2. สารละลายกรดอะซิติก 8 เปอร์เซ็นต์ (8%Acetic acid)

วิธีการ

1. นำน้ำหมักมาเสมีร์ลงบนแผ่นสไลด์ fixed ด้วยความร้อน นำแผ่นสไลด์ไปแช่ในสี 1% Nile Blue A ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วยสารละลายกรดอะซิติก 8% แล้วล้างน้ำตามอีกครั้ง ทิ้งให้แห้ง
2. นำแผ่นสไลด์ที่ได้มาหยดน้ำกลั่น ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า เม็ด PHA จะเรืองแสงสีส้มเห็นเป็นจุดอยู่ภายในเซลล์

3. การย้อม PHB ในเซลล์ด้วย Sudan Black B

สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสี

1. สีย้อม ซูดานแบลค (Sudan black B)
2. สารละลายสีย้อมซัลฟรานิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ (0.5% wt/v Safranin)
3. ไชลีน (Xylene)

วิธีการ

1. เตรียมเซลล์ตัวอย่างโดยนำไป fixed บนสไลด์
2. จุ่มลงในสารละลาย Sudan Black B 0.3%(wt/vol) ซึ่งละลายได้ใน ethylene glycol ทิ้งไว้ 5-15 นาที
3. ล้าง Sudan Black B ออก จุ่มลงใน xylene ขึ้นๆลงๆหลายครั้ง แล้วใช้กระดาษซับให้แห้ง
4. ย้อมทับอีกทีด้วยสารละลาย Safranin 0.5%(wt/vol) 5-10 วินาที
5. ล้างด้วยน้ำก็อกแล้วทิ้งให้แห้ง
6. ส่องกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ oil immersion จะสังเกตเห็นหยด PHA เป็นสีน้ำเงินดำ ส่วนอื่นๆจะเห็นเป็นสีชมพู

ผนวกภาค ข
วิธีการใช้เครื่อง GC

1. วิธีการเปิดเครื่อง GC

1. เปิดเครื่อง Power Supply
2. เปิดวาล์วแก๊สทุกถัง
3. เปิดเครื่อง GC
4. เปิด CBM
5. เปิด computer
6. รวจนหน้าจอขึ้นโปรแกรม เลือก Class-GC 10
7. เลือก Real Time Analysis หน้าจอจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
8. เข้า Method file เลือก Load แล้วคลิกที่ PHB-FFMET คลิก Load
9. หน้าจอจะเปลี่ยนเป็นของ PHB-FFMET
10. กดปุ่ม System On เพื่อให้เครื่องขึ้น START TIME
11. ทำการรูดเฟลมโดยปรับ ก๊าซไฮโดรเจนเป็น 80 และก๊าซออกซิเจนเป็น 20 โดยใช้ไฟแช็คจุดที่ด้านบน detector ถ้าไฟติดแล้วจะสังเกตได้จากการใช้แผ่นสไลด์ซึ่งแล้วจะเกิดไอน้ำขึ้น
12. ปรับปริมาณก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซออกซิเจนเป็น 50 เท่าเดิม
13. คลิกดูที่ GC-Monitor รวจนอุณหภูมิสูงขึ้นโดยแถบสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า
14. ไปที่ Test Zero เลือก Slope Test รวจนถึง 100% จะได้ค่า Slope ออกมา ถ้าไม่เกิน 1000 ถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้ กด Enter
15. เลือก Zero ch 1
16. เครื่องพร้อมจะทำงานเมื่อมุมบนซ้ายของจอ ขึ้นคำว่า READY 2 ค่า

หมายเหตุ ต้องเปิดเรียงตามลำดับ เครื่องจึงจะทำงานเชื่อมโยงกัน

2. วิธีการปิดเครื่อง GC

1. ไปที่ Method file เลือก Load
2. เลือก Close คลิก Load รอให้ขึ้น Ready ทั้ง2ค่า
3. เลือก System Off รอ 30 นาที
4. รอจน อุณหภูมิเย็นลง สังเกตที่ GC- Monitor
5. ถ้ายกสวิตช์เปลี่ยนเป็นสวิตช์ไฟทั้งหมดแล้วเลือก Method file คลิกที่ Exit
6. ทำการ Shut down
7. ปิด Computer
8. ปิด CBM
9. ปิด GC
10. ปิด Power Supply
11. ปิดวาล์วถึงแก๊สทุกถัง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจน

1. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนด้วยวิธีฟินอลซัลฟิวริก

1. นำส่วนใส (supernatant) ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้วมาทำการเจือจางที่อัตราการเจือจางต่างๆ
2. ดูดสารละลายที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง โดยใช้สารละลายกลูโคสที่อัตราการเจือจางต่างๆในการทำกราฟมาตรฐานและใช้น้ำกลั่นเป็นแบลนด์
3. หยดสารละลายฟินอล 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. หยดกรดซัลฟิวริก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 488 นาโนเมตร
6. นำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD กับความเข้มข้นของกลูโคส ($\mu\text{l/ml}$)

2. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาร์

1. ชั่งตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 2 กรัม ในกรณีที่เป็นของเหลวใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร
2. ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 100 มิลลิลิตรแล้วใส่ antibumping beads ลงไป 2-3 เม็ด
3. เติมคตะดิสต์ 1 กรัม (โพแทสเซียมซัลเฟต 10 กรัม + คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม ผสมกัน) และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 4 มิลลิลิตร
4. นำไปย่อยด้วยเครื่อง Kjeldatherm ซึ่งควบคุมอุณหภูมิในการย่อยเป็นช่วงที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที
ช่วงที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 380 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-45 นาที
ช่วงที่ 3 ใช้อุณหภูมิ 380 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-30 นาที เพิ่มจากช่วงที่ 2 การเพิ่มอุณหภูมิในการย่อยต้องค่อยๆเพิ่ม ย่อยตัวอย่างจนใสเป็นสีฟ้าอ่อน

5. ทิ้งให้เย็น แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรต่อ Kjeldahl flask เข้ากับเครื่อง Vapodest
6. รวบรวมสารที่กลั่นด้วยสารละลายกรดบอริกที่มีความเข้มข้น 4% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งเติมเมทธิลโบรโมครีซอลกรีน อินดิเคเตอร์ (สารละลายเมทธิลเรดและสารละลายโบรโมครีซอลกรีนในแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 1% ในอัตราส่วน 1:5) 3-4 หยด
7. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดกลั่น กลั่นจนในขวดรองรับมีสารละลายปริมาตร 250 มิลลิลิตร
8. หยดกลั่นนำสารละลายในขวดรองรับมาไทเทรตด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีแดง
9. คำนวณหาปริมาณไนโตรเจน จากสูตร

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{\text{ปริมาณกรดซัลฟิวริกที่ไทเทรต (ml)} \times \text{ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก} \times 14}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)} \times 10}$$

ภาคผนวก ง
การเปิดเครื่อง FREEZE DRY

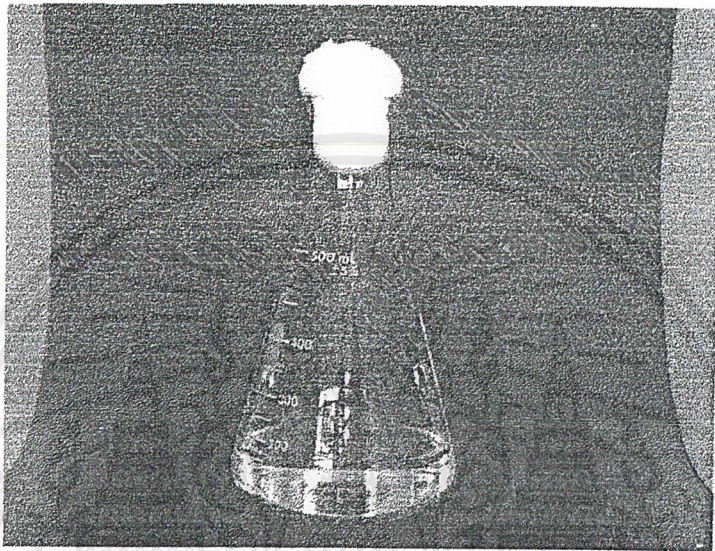
1. การเปิดเครื่อง FREEZE DRY

1. เปิดปุ่มอุณหภูมิ รอจนอุณหภูมิถึง -50 องศาเซลเซียส
2. ใส่หลอดพลาสติกที่บรรจุสารละลายเซลล์แช่แข็งลงในเครื่อง
3. ปิดฝาและท่ออากาศให้สนิท
4. เปิดปุ่มดูดอากาศ
5. รอให้เข็มหน้าปัดแสดงอัตราการดูดอากาศเคลื่อนเข้าสู่แถบสีเขียว
6. หมั่นคอยดูน้ำในหลอดพลาสติกให้ระเหิดจนหมด
7. ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง

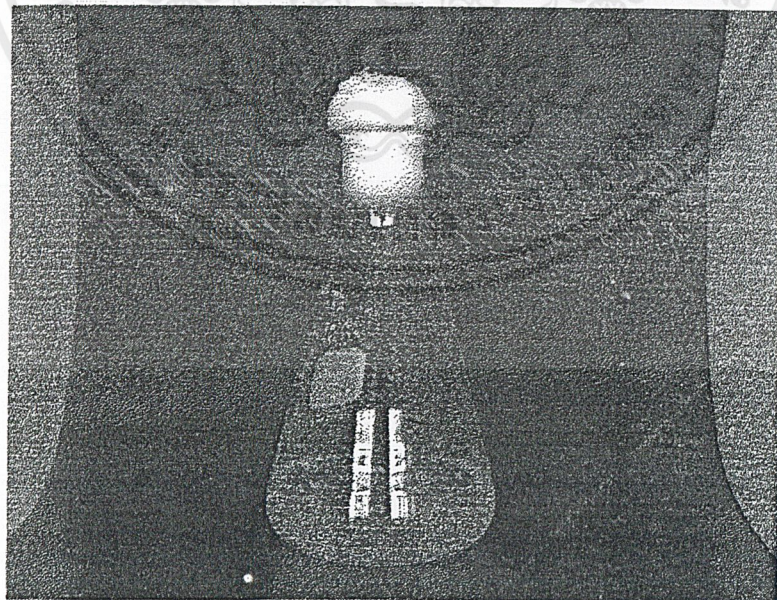
2. การปิดเครื่อง FREEZE DRY

1. ปิดปุ่มดูดอากาศและปุ่มอุณหภูมิ
2. เปิดท่ออากาศให้ความดันอากาศภายในเท่ากับความดันอากาศภายนอกเครื่อง
3. เปิดฝาเครื่อง และนำหลอดพลาสติกที่บรรจุเซลล์แห้งออกจากเครื่อง
4. เปิดปุ่มละลายน้ำแข็ง
5. เปิดท่อน้ำเพื่อระบายน้ำทิ้ง

ภาคผนวก จ
ภาพเครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

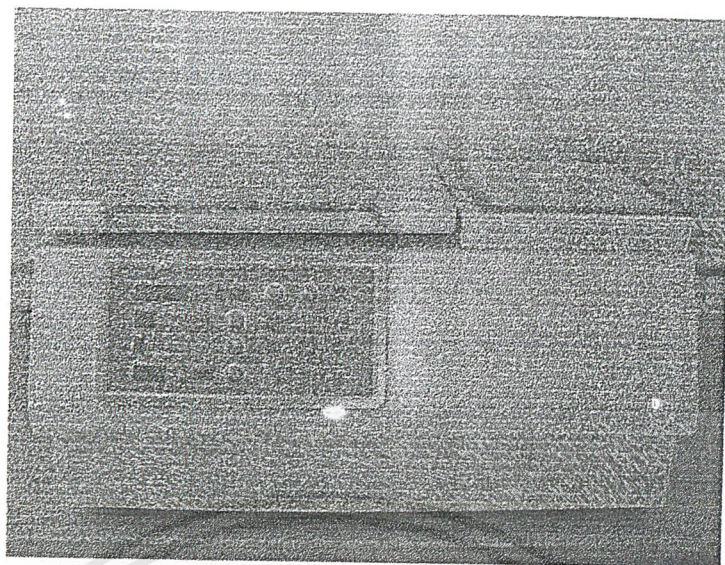


รูปที่ จ.1 อาหาร PHB-medium ที่บรรจุอยู่ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร

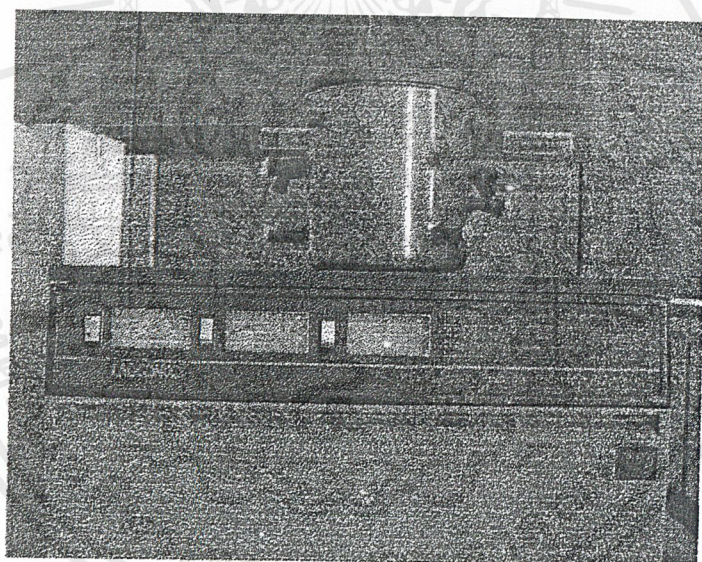


รูปที่ จ.2 อาหาร PHB-medium ที่บรรจุอยู่ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตรที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

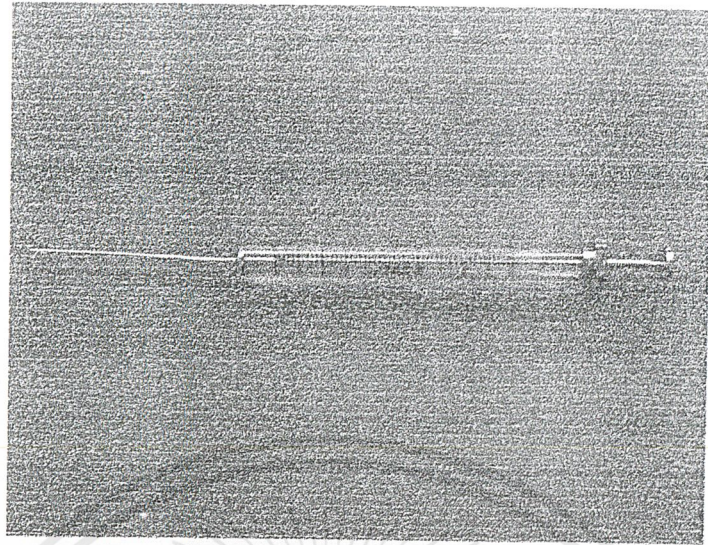


รูปที่ ๑.3 เครื่องเซนตริฟิวเจอร์รุ่น HERMLE 2383 K

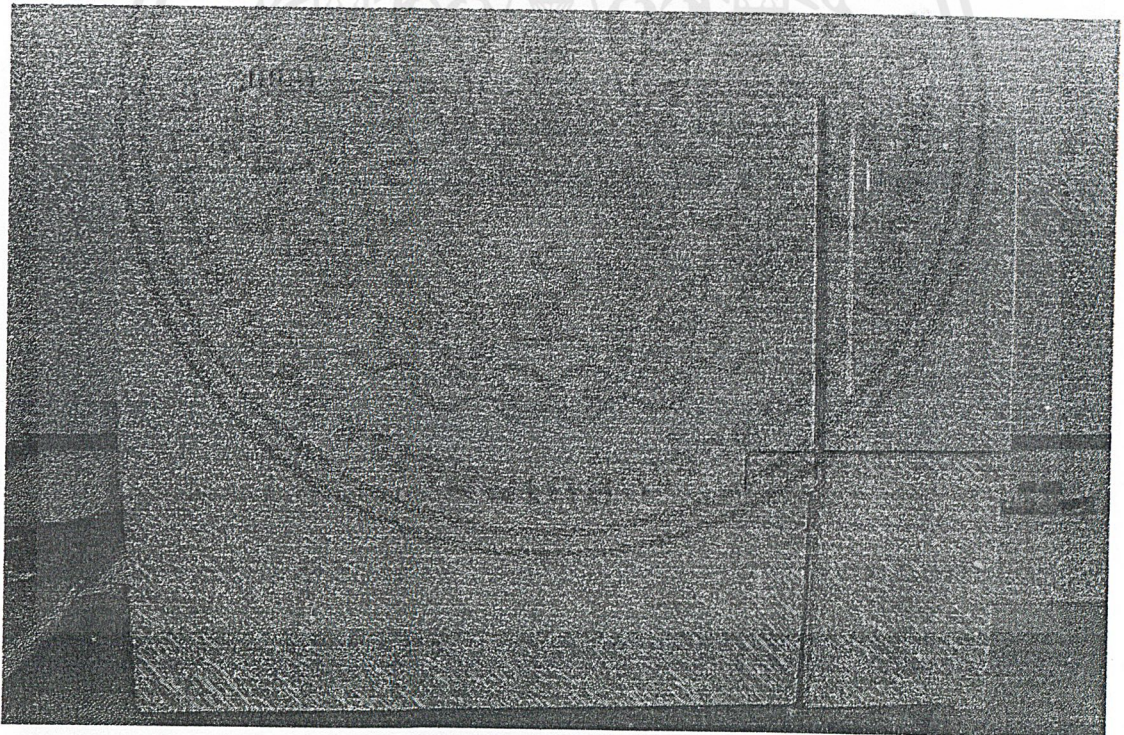


รูปที่ ๑.4 เครื่องระเหิดแห้ง LABCONCO

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑.5 เข็มฉีด GC

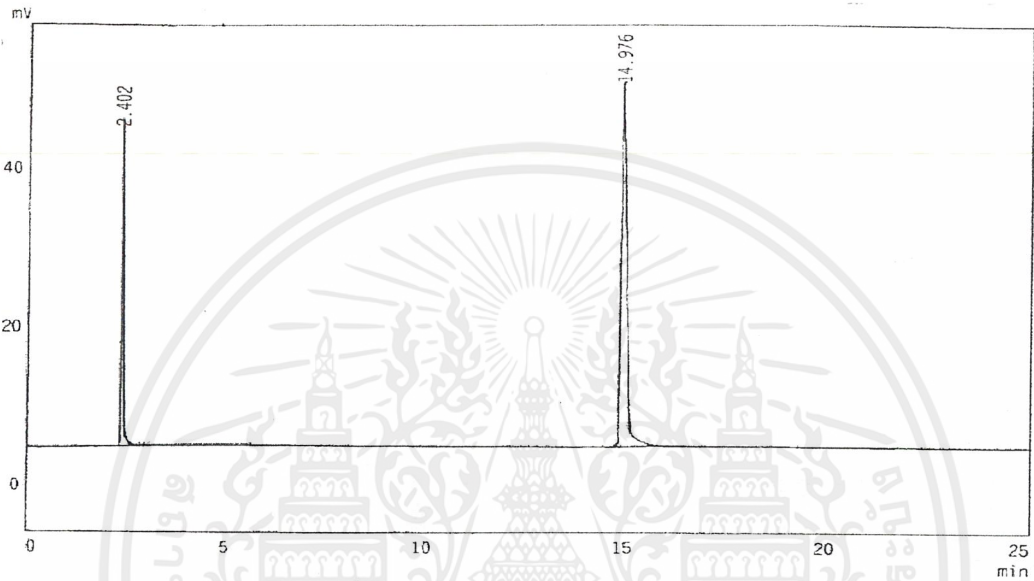


รูปที่ ๑.6 เครื่อง GC รุ่น SHIMASZU GC-17A

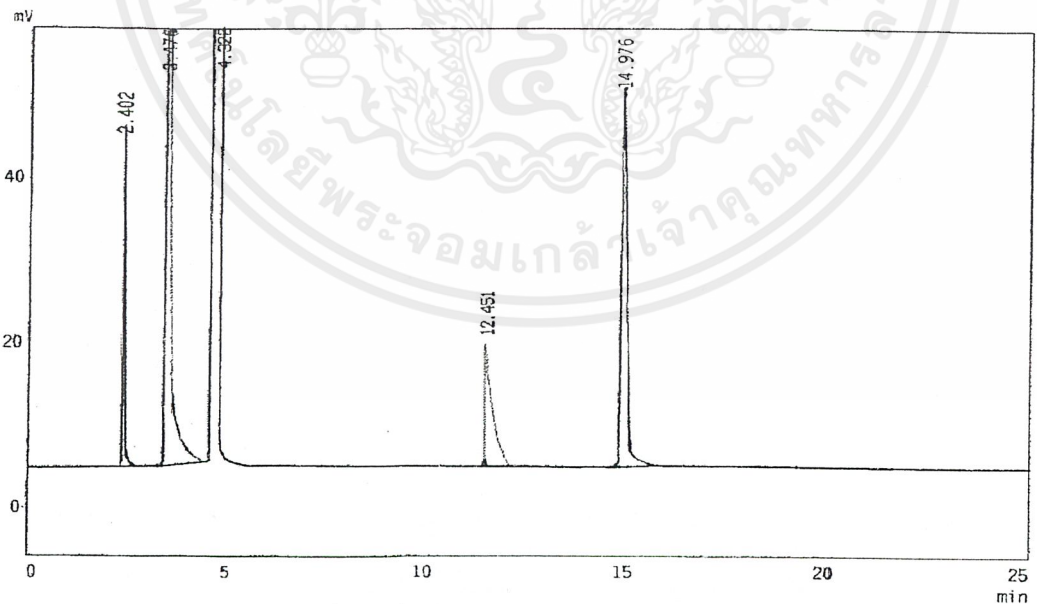
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

โครมาโตแกรมแสดง retention time ของสารที่ใช้ในการวิเคราะห์

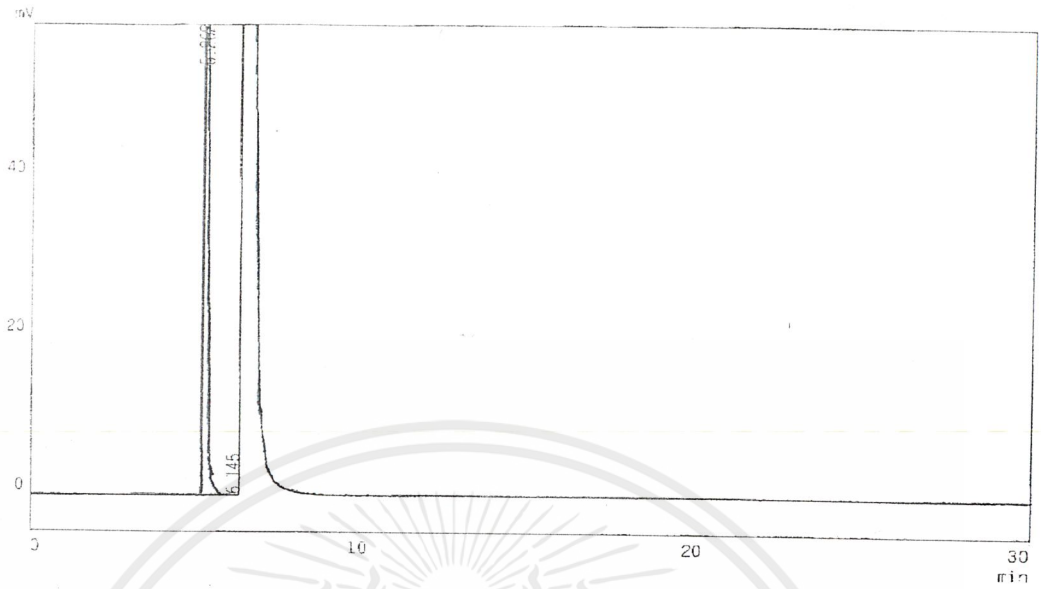


รูปที่ จ.1 โครมาโตแกรมของ methanol

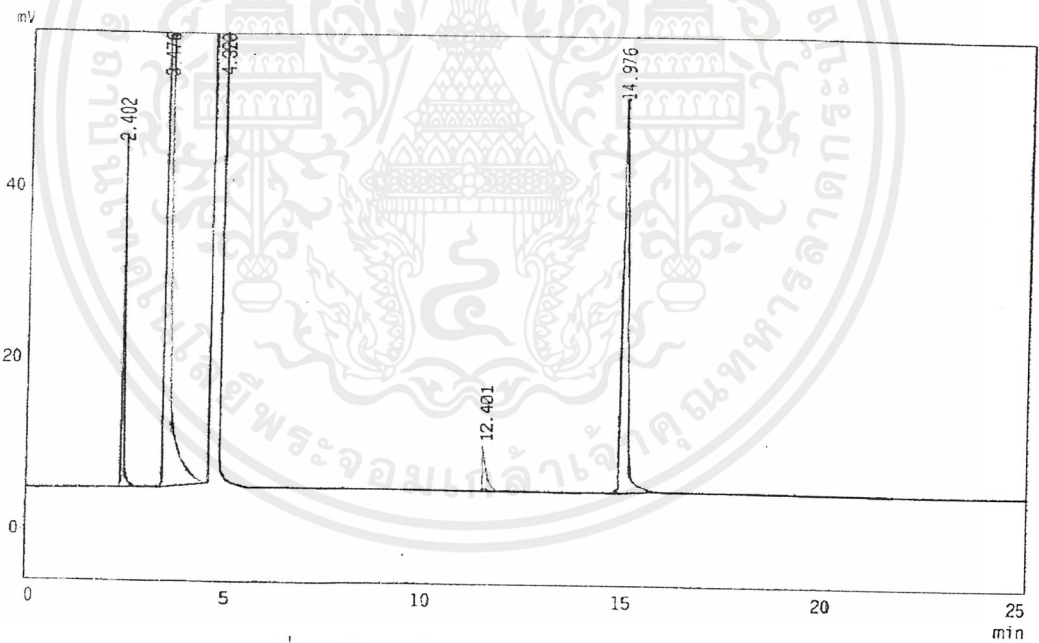


รูปที่ จ.2 โครมาโตแกรมของ PHB standard

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๓.3 โครมาโตแกรมของคลอโรฟอร์ม



รูปที่ ๓.4 โครมาโตแกรมของ Methyl ester

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช
การคำนวณทางสถิติ

ตาราง ข.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA และ PHB ในเชื้อ *A. eutrophus* และเชื้อ

PHB1

Oneway

Post Hoc Tests

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
PHA	A/GLUCOSE	13	9.657194E-02	2.286823E-02	6.342506E-03	8.275280E-02	.1103911	.06484	.12870
	A/MOLLASE	13	4.587025E-02	2.142501E-02	5.942230E-03	3.292324E-02	5.881725E-02	.01969	.08027
	A/MALT	13	7.351520E-02	3.180815E-02	8.821993E-03	5.429373E-02	9.273668E-02	.03492	.14035
	A/WASTE	13	4.048811E-02	2.835179E-02	7.863373E-03	2.335529E-02	5.762093E-02	.00948	.10799
	A/OIL	13	.1043626	.1040373	2.885476E-02	4.149348E-02	.1672317	.00745	.34080
	A/WHEY	13	3.227889E-02	2.246341E-02	6.230230E-03	1.870439E-02	4.585340E-02	.00885	.07204
	I/GLUCOSE	13	1.225490E-02	8.074659E-03	2.239507E-03	7.375430E-03	1.713437E-02	.00405	.02472
	I/MOLLASE	13	1.744894E-02	1.107183E-02	3.070772E-03	1.075831E-02	2.413958E-02	.00460	.03839
	I/MALT	13	4.055400E-02	2.383782E-02	6.611422E-03	2.614895E-02	5.495905E-02	.01438	.10512
	I/WASTE	13	.2384431	9.803552E-02	2.719016E-02	.1792009	.2976854	.02521	.37725
	I/OIL	13	.3901897	.2773565	7.692486E-02	.2225849	.5577946	.03990	.80996
	I/WHEY	13	.1173049	7.706315E-02	2.137347E-02	7.073614E-02	.1638737	.04292	.30000
	Total	156	.1007736	.1396744	1.118290E-02	7.868299E-02	.1228641	.00405	.80996
PHB	A/GLUCOSE	13	8.227412E-03	1.933234E-03	5.361826E-04	7.059170E-03	9.395653E-03	.00433	.01137
	A/MOLLASE	13	2.239780E-03	2.656531E-03	7.367892E-04	6.344544E-04	3.845106E-03	.00055	.00766
	A/MALT	13	2.730769E-03	8.683170E-04	2.408278E-04	2.206051E-03	3.255488E-03	.00190	.00450
	A/WASTE	13	1.820510E-03	2.358535E-03	6.541399E-04	3.952616E-04	3.245758E-03	.00048	.00951
	A/OIL	13	2.710377E-03	3.031726E-03	8.408496E-04	8.783229E-04	4.542431E-03	.00048	.01056
	A/WHEY	13	1.585253E-02	1.201997E-02	3.333739E-03	8.588941E-03	2.311613E-02	.00413	.04220
	I/GLUCOSE	13	8.623077E-03	4.250912E-03	1.178991E-03	6.054276E-03	1.119188E-02	.00360	.01600
	I/MOLLASE	13	4.334479E-03	2.596260E-03	7.200730E-04	2.765575E-03	5.903383E-03	.00059	.00896
	I/MALT	13	1.327944E-02	7.158645E-03	1.985451E-03	8.953515E-03	1.760537E-02	.00255	.02614
	I/WASTE	13	1.139040E-02	4.135651E-03	1.147023E-03	8.891252E-03	1.388955E-02	.00457	.02088
	I/OIL	13	1.861068E-03	1.050281E-03	2.912956E-04	1.226389E-03	2.495746E-03	.00078	.00461
	I/WHEY	13	8.739181E-02	3.155372E-02	8.751426E-03	6.832409E-02	.1064595	.01483	.14780
	Total	156	1.337181E-02	2.491308E-02	1.994643E-03	9.431614E-03	1.731200E-02	.00048	.14780

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
PHA	Between Groups	1.736	11	.158	17.636	.000
	Within Groups	1.288	144	8.947E-03		
	Total	3.024	155			
PHB	Between Groups	8.107E-02	11	7.370E-03	70.156	.000
	Within Groups	1.513E-02	144	1.051E-04		
	Total	9.620E-02	155			

Post Hoc Tests

multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) MO/SUB	(J) MO/SUB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PHA	A/GLUCOSE	A/MOLLASE	5.070169E-02	3.709971E-02	.174	-2.2628670E-02	.1240320
		A/MALT	2.305673E-02	3.709971E-02	.535	-5.0273625E-02	9.638709E-02
		A/WASTE	5.608382E-02	3.709971E-02	.133	-1.7246534E-02	.1294142
		A/OIL	-7.7906706E-03	3.709971E-02	.834	-8.1121029E-02	6.553969E-02
		A/WHEY	6.429304E-02	3.709971E-02	.085	-9.0373154E-03	.1376234
		I/GLUCOSE	8.431704E-02*	3.709971E-02	.025	1.098668E-02	.1576474
		I/MOLLASE	7.912299E-02*	3.709971E-02	.035	5.792634E-03	.1524534
		I/MALT	5.601793E-02	3.709971E-02	.133	-1.7312425E-02	.1293483
		I/WASTE	-.1418712*	3.709971E-02	.000	-.2152016	-6.8540842E-02
		I/OIL	-.2936178*	3.709971E-02	.000	-.3669481	-.2202874
PHA	A/MOLLASE	A/GLUCOSE	-5.0701689E-02	3.709971E-02	.174	-.1240320	2.262867E-02
		A/MALT	-2.7644955E-02	3.709971E-02	.457	-.1009753	4.568540E-02
		A/WASTE	5.382136E-03	3.709971E-02	.885	-6.7948223E-02	7.871249E-02
		A/OIL	-5.8492359E-02	3.709971E-02	.117	-.1318227	1.483800E-02
		A/WHEY	1.359135E-02	3.709971E-02	.715	-5.9739004E-02	8.692171E-02
		I/GLUCOSE	3.361535E-02	3.709971E-02	.366	-3.9715009E-02	.1069457
		I/MOLLASE	2.842130E-02	3.709971E-02	.445	-4.4909055E-02	.1017517
		I/MALT	5.316245E-03	3.709971E-02	.886	-6.8014114E-02	7.864660E-02
		I/WASTE	-.1925729*	3.709971E-02	.000	-.2659032	-.1192425
		I/OIL	-.3443195*	3.709971E-02	.000	-.4176498	-.2709891
PHA	A/MALT	A/GLUCOSE	-2.3056733E-02	3.709971E-02	.535	-9.6387092E-02	5.027363E-02
		A/MOLLASE	2.764496E-02	3.709971E-02	.457	-4.5685403E-02	.1009753
		A/WASTE	3.302709E-02	3.709971E-02	.375	-4.0303268E-02	.1063574
		A/OIL	-3.0847404E-02	3.709971E-02	.407	-.1041778	4.248295E-02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		A/WHEY	4.123631E-02	3.709971E-02	.268	-3.2094049E-02	.1145667
		I/GLUCOSE	6.126031E-02	3.709971E-02	.101	-1.2070053E-02	.1345907
		I/MOLLASE	5.606626E-02	3.709971E-02	.133	-1.7264099E-02	.1293966
		I/MALT	3.296120E-02	3.709971E-02	.376	-4.0369158E-02	.1062916
		I/WASTE	-.1649279*	3.709971E-02	.000	-.2382583	-9.1597575E-02
		I/OIL	-.3166745*	3.709971E-02	.000	-.3900049	-.2433442
		I/WHEY	-4.3789730E-02	3.709971E-02	.240	-.1171201	2.954063E-02
PHA	A/WASTE	A/GLUCOSE	-5.6083825E-02	3.709971E-02	.133	-.1294142	1.724653E-02
		A/MOLLASE	-5.3821357E-03	3.709971E-02	.885	-7.8712494E-02	6.794822E-02
		A/MALT	-3.3027091E-02	3.709971E-02	.375	-.1063574	4.030327E-02
		A/OIL	-6.3874495E-02	3.709971E-02	.087	-.1372049	9.455864E-03
		A/WHEY	8.209219E-03	3.709971E-02	.825	-6.5121140E-02	8.153958E-02
		I/GLUCOSE	2.823321E-02	3.709971E-02	.448	-4.5097145E-02	.1015636
		I/MOLLASE	2.303917E-02	3.709971E-02	.536	-5.0291190E-02	9.636953E-02
		I/MALT	-6.5890923E-05	3.709971E-02	.999	-7.3396250E-02	7.326447E-02
		I/WASTE	-.1979550*	3.709971E-02	.000	-.2712854	-.1246247
		I/OIL	-.3497016*	3.709971E-02	.000	-.4230320	-.2763713
		I/WHEY	-7.6816822E-02*	3.709971E-02	.040	-.1501472	-3.4864629E-03
PHA	A/OIL	A/GLUCOSE	7.790671E-03	3.709971E-02	.834	-6.5539688E-02	8.112103E-02
		A/MOLLASE	5.849236E-02	3.709971E-02	.117	-1.4837999E-02	.1318227
		A/MALT	3.084740E-02	3.709971E-02	.407	-4.2482955E-02	.1041778
		A/WASTE	6.387450E-02	3.709971E-02	.087	-9.4558635E-03	.1372049
		A/WHEY	7.208371E-02	3.709971E-02	.054	-1.2466448E-03	.1454141
		I/GLUCOSE	9.210771E-02*	3.709971E-02	.014	1.877735E-02	.1654381
		I/MOLLASE	8.691366E-02*	3.709971E-02	.021	1.358330E-02	.1602440
		I/MALT	6.380860E-02	3.709971E-02	.088	-9.5217545E-03	.1371390
		I/WASTE	-.1340805*	3.709971E-02	.000	-.2074109	-6.0750171E-02
		I/OIL	-.2858271*	3.709971E-02	.000	-.3591575	-.2124968
		I/WHEY	-1.2942326E-02	3.709971E-02	.728	-8.6272685E-02	6.038803E-02
PHA	AWHEY	A/GLUCOSE	-6.4293043E-02	3.709971E-02	.085	-.1376234	9.037315E-03
		A/MOLLASE	-1.3591354E-02	3.709971E-02	.715	-8.6921713E-02	5.973900E-02
		A/MALT	-4.1236310E-02	3.709971E-02	.268	-.1145667	3.209405E-02
		A/WASTE	-8.2092188E-03	3.709971E-02	.825	-8.1539577E-02	6.512114E-02
		A/OIL	-7.2083714E-02	3.709971E-02	.054	-.1454141	1.246645E-03
		I/GLUCOSE	2.002406E-02	3.709971E-02	.590	-5.3306363E-02	9.335435E-02
		I/MOLLASE	1.482995E-02	3.709971E-02	.690	-5.8500409E-02	8.816031E-02
		I/MALT	-8.2751097E-03	3.709971E-02	.824	-8.1605468E-02	6.505525E-02
		I/WASTE	-.2061642*	3.709971E-02	.000	-.2794946	-.1328339
		I/OIL	-.3579108*	3.709971E-02	.000	-.4312412	-.2845805
		I/WHEY	-8.5026040E-02*	3.709971E-02	.023	-.1583564	-1.1695682E-02
PHA	I/GLUCOSE	A/GLUCOSE	-8.4317039E-02*	3.709971E-02	.025	-.1576474	-1.0986680E-02
		A/MOLLASE	-3.3615350E-02	3.709971E-02	.366	-.1069457	3.971501E-02
		A/MALT	-6.1260305E-02	3.709971E-02	.101	-.1345907	1.207005E-02
		A/WASTE	-2.8233214E-02	3.709971E-02	.448	-.1015636	4.509714E-02
		A/OIL	-9.2107709E-02*	3.709971E-02	.014	-.1654381	-1.8777351E-02
		AWHEY	-2.0023995E-02	3.709971E-02	.590	-9.3354354E-02	5.330636E-02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		I/MOLLASE	-5.1940458E-03	3.709971E-02	.889	-7.8524404E-02	6.813631E-02
		I/MALT	-2.8299105E-02	3.709971E-02	.447	-.1016295	4.503125E-02
		I/WASTE	-.2261882*	3.709971E-02	.000	-.2995186	-.1528579
		I/OIL	-.3779348*	3.709971E-02	.000	-.4512652	-.3046045
		I/WHEY	-.1050500*	3.709971E-02	.005	-.1783804	-3.1719677E-02
PHA	I/MOLLASE	A/GLUCOSE	-7.9122993E-02*	3.709971E-02	.035	-.1524534	-5.7926342E-03
		A/MOLLASE	-2.8421304E-02	3.709971E-02	.445	-.1017517	4.490905E-02
		A/MALT	-5.6066260E-02	3.709971E-02	.133	-.1293966	1.726410E-02
		A/WASTE	-2.3039168E-02	3.709971E-02	.536	-9.6369527E-02	5.029119E-02
		A/OIL	-8.6913664E-02*	3.709971E-02	.021	-.1602440	-1.3583305E-02
		A/WHEY	-1.4829950E-02	3.709971E-02	.690	-8.8160308E-02	5.850041E-02
		I/GLUCOSE	5.194046E-03	3.709971E-02	.889	-6.8136313E-02	7.852440E-02
		I/MALT	-2.3105059E-02	3.709971E-02	.534	-9.6435418E-02	5.022530E-02
		I/WASTE	-.2209942*	3.709971E-02	.000	-.2943246	-.1476638
		I/OIL	-.3727408*	3.709971E-02	.000	-.4460711	-.2994104
		I/WHEY	-9.9855990E-02*	3.709971E-02	.008	-.1731863	-2.6525631E-02
		PHA	I/MALT	A/GLUCOSE	-5.6017934E-02	3.709971E-02	.133
A/MOLLASE	-5.3162448E-03			3.709971E-02	.886	-7.8646803E-02	6.801411E-02
A/MALT	-3.2961200E-02			3.709971E-02	.376	-.1062916	4.036916E-02
A/WASTE	6.589092E-05			3.709971E-02	.999	-7.3264468E-02	7.339625E-02
A/OIL	-6.3808604E-02			3.709971E-02	.088	-.1371390	9.521754E-03
A/WHEY	8.275110E-03			3.709971E-02	.824	-6.5055249E-02	8.160547E-02
I/GLUCOSE	2.829911E-02			3.709971E-02	.447	-4.5031254E-02	.1016295
I/MOLLASE	2.310506E-02			3.709971E-02	.534	-5.0225299E-02	9.643542E-02
I/WASTE	-.1978891*			3.709971E-02	.000	-.2712195	-.1245588
I/OIL	-.3496357*			3.709971E-02	.000	-.4229661	-.2763054
I/WHEY	-7.6750931E-02*			3.709971E-02	.040	-.1500813	-3.4205720E-03
PHA	I/WASTE			A/GLUCOSE	.1418712*	3.709971E-02	.000
		A/MOLLASE	.1925729*	3.709971E-02	.000	.1192425	.2659032
		A/MALT	.1649279*	3.709971E-02	.000	9.159757E-02	.2382583
		A/WASTE	.1979550*	3.709971E-02	.000	.1246247	.2712854
		A/OIL	.1340805*	3.709971E-02	.000	6.075017E-02	.2074109
		A/WHEY	.2061642*	3.709971E-02	.000	.1328339	.2794946
		I/GLUCOSE	.2261882*	3.709971E-02	.000	.1528579	.2995186
		I/MOLLASE	.2209942*	3.709971E-02	.000	.1476638	.2943246
		I/MALT	.1978891*	3.709971E-02	.000	.1245588	.2712195
		I/OIL	-.1517466*	3.709971E-02	.000	-.2250769	-7.8416225E-02
		I/WHEY	.1211382*	3.709971E-02	.001	4.780784E-02	.1944686
		PHA	I/OIL	A/GLUCOSE	.2936178*	3.709971E-02	.000
A/MOLLASE	.3443195*			3.709971E-02	.000	.2709891	.4176498
A/MALT	.3166745*			3.709971E-02	.000	.2433442	.3900049
A/WASTE	.3497016*			3.709971E-02	.000	.2763713	.4230320
A/OIL	.2858271*			3.709971E-02	.000	.2124968	.3591575
A/WHEY	.3579108*			3.709971E-02	.000	.2845805	.4312412
I/GLUCOSE	.3779348*			3.709971E-02	.000	.3046045	.4512652
I/MOLLASE	.3727408*			3.709971E-02	.000	.2994104	.4460711

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		I/MALT	.3496357*	3.709971E-02	.000	.2763054	.4229661
		I/WASTE	.1517466*	3.709971E-02	.000	7.841623E-02	.2250769
		I/WHEY	.2728848*	3.709971E-02	.000	.1995544	.3462151
PHA	I/WHEY	A/GLUCOSE	2.073300E-02	3.709971E-02	.577	-5.2597362E-02	9.406336E-02
		A/MOLLASE	7.143469E-02	3.709971E-02	.056	-1.8956728E-03	.1447650
		A/MALT	4.378973E-02	3.709971E-02	.240	-2.9540628E-02	.1171201
		A/WASTE	7.681682E-02*	3.709971E-02	.040	3.486463E-03	.1501472
		A/OIL	1.294233E-02	3.709971E-02	.728	-6.0388032E-02	8.627269E-02
		A/WHEY	8.502604E-02*	3.709971E-02	.023	1.169568E-02	.1583564
		I/GLUCOSE	.1050500*	3.709971E-02	.005	3.171968E-02	.1783804
		I/MOLLASE	9.985599E-02*	3.709971E-02	.008	2.652563E-02	.1731863
		I/MALT	7.675093E-02*	3.709971E-02	.040	3.420572E-03	.1500813
		I/WASTE	-.1211382*	3.709971E-02	.001	-.1944686	-4.7807845E-02
		I/OIL	-.2728848*	3.709971E-02	.000	-.3462151	-.1995544
		PHB	A/GLUCOSE	A/MOLLASE	5.987632E-03	4.020274E-03	.139
A/MALT	5.496643E-03			4.020274E-03	.174	-2.4497302E-03	1.344302E-02
A/WASTE	6.406902E-03			4.020274E-03	.113	-1.5394710E-03	1.435327E-02
A/OIL	5.517035E-03			4.020274E-03	.172	-2.4293377E-03	1.346341E-02
A/WHEY	-7.6251222E-03			4.020274E-03	.060	-1.5571495E-02	3.212506E-04
I/GLUCOSE	-3.9566500E-04			4.020274E-03	.922	-8.3420379E-03	7.550708E-03
I/MOLLASE	3.892933E-03			4.020274E-03	.335	-4.0534400E-03	1.183931E-02
I/MALT	-5.0520285E-03			4.020274E-03	.211	-1.2998401E-02	2.894344E-03
I/WASTE	-3.1629891E-03			4.020274E-03	.433	-1.1109362E-02	4.783384E-03
I/OIL	6.366344E-03			4.020274E-03	.115	-1.5800285E-03	1.431272E-02
I/WHEY	-7.9164402E-02*			4.020274E-03	.000	-8.7110775E-02	-7.1218029E-02
PHB	A/MOLLASE			A/GLUCOSE	-5.9876318E-03	4.020274E-03	.139
		A/MALT	-4.9098915E-04	4.020274E-03	.903	-8.4373620E-03	7.455384E-03
		A/WASTE	4.192701E-04	4.020274E-03	.917	-7.5271028E-03	8.365643E-03
		A/OIL	-4.7059669E-04	4.020274E-03	.907	-8.4169696E-03	7.475776E-03
		A/WHEY	-1.3612754E-02*	4.020274E-03	.001	-2.1559127E-02	-5.6663812E-03
		I/GLUCOSE	-6.3832968E-03	4.020274E-03	.115	-1.4329670E-02	1.563076E-03
		I/MOLLASE	-2.0946989E-03	4.020274E-03	.603	-1.0041072E-02	5.851674E-03
		I/MALT	-1.1039660E-02*	4.020274E-03	.007	-1.8986033E-02	-3.0932874E-03
		I/WASTE	-9.1506209E-03*	4.020274E-03	.024	-1.7096994E-02	-1.2042480E-03
		I/OIL	3.787125E-04	4.020274E-03	.925	-7.5676603E-03	8.325085E-03
		I/WHEY	-8.5152034E-02*	4.020274E-03	.000	-9.3098407E-02	-7.7205661E-02
		PHB	A/MALT	A/GLUCOSE	-5.4966427E-03	4.020274E-03	.174
A/MOLLASE	4.909892E-04			4.020274E-03	.903	-7.4553837E-03	8.437362E-03
A/WASTE	9.102592E-04			4.020274E-03	.821	-7.0361136E-03	8.856632E-03
A/OIL	2.039246E-05			4.020274E-03	.996	-7.9259804E-03	7.966765E-03
A/WHEY	-1.3121765E-02*			4.020274E-03	.001	-2.1068138E-02	-5.1753920E-03
I/GLUCOSE	-5.8923077E-03			4.020274E-03	.145	-1.3838681E-02	2.054065E-03
I/MOLLASE	-1.6037098E-03			4.020274E-03	.691	-9.5500826E-03	6.342663E-03
I/MALT	-1.0548671E-02*			4.020274E-03	.010	-1.8495044E-02	-2.6022983E-03
I/WASTE	-8.6596318E-03*			4.020274E-03	.033	-1.6606005E-02	-7.1325889E-04
I/OIL	8.697017E-04			4.020274E-03	.829	-7.0766712E-03	8.816075E-03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		I/WHEY	-8.4661045E-02*	4.020274E-03	.000	-9.2607418E-02	-7.6714672E-02
PHB	A/WASTE	A/GLUCOSE	-6.4069019E-03	4.020274E-03	.113	-1.4353275E-02	1.539471E-03
		A/MOLLASE	-4.1927008E-04	4.020274E-03	.917	-8.3656430E-03	7.527103E-03
		A/MALT	-9.1025923E-04	4.020274E-03	.821	-8.8566321E-03	7.036114E-03
		A/OIL	-8.8986677E-04	4.020274E-03	.825	-8.8362396E-03	7.056506E-03
		AWHEY	-1.4032024E-02*	4.020274E-03	.001	-2.1978397E-02	-6.0856513E-03
		I/GLUCOSE	-6.8025669E-03	4.020274E-03	.093	-1.4748940E-02	1.143806E-03
		I/MOLLASE	-2.5139690E-03	4.020274E-03	.533	-1.0460342E-02	5.432404E-03
		I/MALT	-1.1458930E-02*	4.020274E-03	.005	-1.9405303E-02	-3.5125575E-03
		I/WASTE	-9.5698910E-03	4.020274E-03	.019	-1.7516264E-02	-1.6235181E-03
		I/OIL	-4.0557538E-05	4.020274E-03	.992	-7.9869304E-03	7.905815E-03
		I/WHEY	-8.5571304E-02*	4.020274E-03	.000	-9.3517677E-02	-7.7624931E-02
PHB	A/OIL	A/GLUCOSE	-5.5170352E-03	4.020274E-03	.172	-1.3463408E-02	2.429338E-03
		A/MOLLASE	4.705967E-04	4.020274E-03	.907	-7.4757762E-03	8.416970E-03
		A/MALT	-2.0392462E-05	4.020274E-03	.996	-7.9667653E-03	7.925980E-03
		AWASTE	8.898668E-04	4.020274E-03	.825	-7.0565061E-03	8.836240E-03
		AWHEY	-1.3142157E-02*	4.020274E-03	.001	-2.1088530E-02	-5.1957845E-03
		I/GLUCOSE	-5.9127002E-03	4.020274E-03	.144	-1.3859073E-02	2.033673E-03
		I/MOLLASE	-1.6241022E-03	4.020274E-03	.687	-9.5704751E-03	6.322271E-03
		I/MALT	-1.0569064E-02*	4.020274E-03	.009	-1.8515436E-02	-2.6226907E-03
		I/WASTE	-8.6800242E-03*	4.020274E-03	.033	-1.6626397E-02	-7.3365135E-04
		I/OIL	8.493092E-04	4.020274E-03	.833	-7.0970636E-03	8.795682E-03
		I/WHEY	-8.4681437E-02*	4.020274E-03	.000	-9.2627810E-02	-7.6735064E-02
PHB	A/WHEY	A/GLUCOSE	7.625122E-03	4.020274E-03	.060	-3.2125065E-04	1.557150E-02
		A/MOLLASE	1.361275E-02*	4.020274E-03	.001	5.666381E-03	2.155913E-02
		A/MALT	1.312176E-02*	4.020274E-03	.001	5.175392E-03	2.106814E-02
		AWASTE	1.403202E-02*	4.020274E-03	.001	6.085651E-03	2.197840E-02
		A/OIL	1.314216E-02*	4.020274E-03	.001	5.195785E-03	2.108853E-02
		I/GLUCOSE	7.229457E-03	4.020274E-03	.074	-7.1691565E-04	1.517583E-02
		I/MOLLASE*	1.151806E-02	4.020274E-03	.005	3.571682E-03	1.946443E-02
		I/MALT	2.573094E-03	4.020274E-03	.523	-5.3732791E-03	1.051947E-02
		I/WASTE	4.462133E-03	4.020274E-03	.269	-3.4842397E-03	1.240851E-02
		I/OIL	1.399147E-02*	4.020274E-03	.001	6.045094E-03	2.193784E-02
		I/WHEY	-7.1539280E-02*	4.020274E-03	.000	-7.9485653E-02	-6.3592907E-02
PHB	I/GLUCOSE	A/GLUCOSE	3.956650E-04	4.020274E-03	.922	-7.5507079E-03	8.342038E-03
		A/MOLLASE	6.383297E-03	4.020274E-03	.115	-1.5630760E-03	1.432967E-02
		A/MALT	5.892308E-03	4.020274E-03	.145	-2.0540652E-03	1.383868E-02
		AWASTE	6.802567E-03	4.020274E-03	.093	-1.1438060E-03	1.474894E-02
		A/OIL	5.912700E-03	4.020274E-03	.144	-2.0336727E-03	1.385907E-02
		AWHEY	-7.2294572E-03	4.020274E-03	.074	-1.5175830E-02	7.169156E-04
		I/MOLLASE	4.288598E-03	4.020274E-03	.288	-3.6577750E-03	1.223497E-02
		I/MALT	-4.6563635E-03	4.020274E-03	.249	-1.2602736E-02	3.290009E-03
		I/WASTE	-2.7673241E-03	4.020274E-03	.492	-1.0713697E-02	5.179049E-03
		I/OIL	6.762009E-03	4.020274E-03	.095	-1.1843635E-03	1.470838E-02
		I/WHEY	-7.8768737E-02*	4.020274E-03	.000	-8.6715110E-02	-7.0822364E-02
PHB	I/MOLLASE	A/GLUCOSE	-3.8929329E-03	4.020274E-03	.335	-1.1839306E-02	4.053440E-03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

		A/MOLLASE	2.094699E-03	4.020274E-03	.603	-5.8516740E-03	1.004107E-02
		A/MALT	1.603710E-03	4.020274E-03	.691	-6.3426631E-03	9.550083E-03
		AWASTE	2.513969E-03	4.020274E-03	.533	-5.4324039E-03	1.046034E-02
		A/OIL	1.624102E-03	4.020274E-03	.687	-6.3222706E-03	9.570475E-03
		AWHEY	-1.1518055E-02*	4.020274E-03	.005	-1.9464428E-02	-3.5716823E-03
		I/GLUCOSE	-4.2885979E-03	4.020274E-03	.288	-1.2234971E-02	3.657775E-03
		I/MALT	-8.9449614E-03*	4.020274E-03	.028	-1.6891334E-02	-9.9858851E-04
		I/WASTE	-7.0559220E-03	4.020274E-03	.081	-1.5002295E-02	8.904509E-04
		I/OIL	2.473411E-03	4.020274E-03	.539	-5.4729614E-03	1.041978E-02
		I/WHEY	-8.3057335E-02*	4.020274E-03	.000	-9.1003708E-02	-7.5110962E-02
PHB	I/MALT	A/GLUCOSE	5.052028E-03	4.020274E-03	.211	-2.8943444E-03	1.299840E-02
		A/MOLLASE	1.103966E-02*	4.020274E-03	.007	3.093287E-03	1.898603E-02
		A/MALT	1.054867E-02*	4.020274E-03	.010	2.602298E-03	-1.849504E-02
		AWASTE	1.145893E-02*	4.020274E-03	.005	3.512558E-03	1.940530E-02
		A/OIL	1.056906E-02*	4.020274E-03	.009	2.622691E-03	1.851544E-02
		AWHEY	-2.5730938E-03	4.020274E-03	.523	-1.0519467E-02	5.373279E-03
		I/GLUCOSE	4.656363E-03	4.020274E-03	.249	-3.2900094E-03	1.260274E-02
		I/MOLLASE	8.944961E-03*	4.020274E-03	.028	9.985885E-04	1.689133E-02
		I/WASTE	1.889039E-03	4.020274E-03	.639	-6.0573335E-03	9.835412E-03
		I/OIL	1.141837E-02*	4.020274E-03	.005	3.472000E-03	1.936475E-02
		I/WHEY	-7.4112374E-02*	4.020274E-03	.000	-8.2058746E-02	-6.6166001E-02
PHB	I/WASTE	A/GLUCOSE	3.162989E-03	4.020274E-03	.433	-4.7833838E-03	1.110936E-02
		A/MOLLASE	9.150621E-03*	4.020274E-03	.024	1.204248E-03	1.709699E-02
		A/MALT	8.659632E-03*	4.020274E-03	.033	7.132589E-04	1.660600E-02
		AWASTE	9.569891E-03*	4.020274E-03	.019	1.623518E-03	1.751626E-02
		A/OIL	8.680024E-03*	4.020274E-03	.033	7.336514E-04	1.662640E-02
		AWHEY	-4.4621332E-03	4.020274E-03	.269	-1.2408506E-02	3.484240E-03
		I/GLUCOSE	2.767324E-03	4.020274E-03	.492	-5.1790488E-03	1.071370E-02
		I/MOLLASE	7.055922E-03	4.020274E-03	.081	-8.9045088E-04	1.500229E-02
		I/MALT	-1.8890394E-03	4.020274E-03	.639	-9.8354123E-03	6.057333E-03
		I/OIL	9.529333E-03*	4.020274E-03	.019	1.582961E-03	1.747571E-02
		I/WHEY	-7.6001413E-02*	4.020274E-03	.000	-8.3947786E-02	-6.8055040E-02
PHB	I/OIL	A/GLUCOSE	-6.3663444E-03	4.020274E-03	.115	-1.4312717E-02	1.580028E-03
		A/MOLLASE	-3.7871254E-04	4.020274E-03	.925	-8.3250854E-03	7.567660E-03
		A/MALT	-8.6970169E-04	4.020274E-03	.829	-8.8160746E-03	7.076671E-03
		AWASTE	4.055754E-05	4.020274E-03	.992	-7.9058153E-03	7.986930E-03
		A/OIL	-8.4930923E-04	4.020274E-03	.833	-8.7956821E-03	7.097064E-03
		AWHEY	-1.3991467E-02*	4.020274E-03	.001	-2.1937839E-02	-6.0450937E-03
		I/GLUCOSE	-6.7620094E-03	4.020274E-03	.095	-1.4708382E-02	1.184363E-03
		I/MOLLASE	-2.4734115E-03	4.020274E-03	.539	-1.0419784E-02	5.472961E-03
		I/MALT	-1.1418373E-02*	4.020274E-03	.005	-1.9364746E-02	-3.4720000E-03
		I/WASTE	-9.5293335E-03*	4.020274E-03	.019	-1.7475706E-02	-1.5829606E-03
		I/WHEY	-8.5530746E-02*	4.020274E-03	.000	-9.3477119E-02	-7.7584374E-02
PHB	I/WHEY	A/GLUCOSE	7.916440E-02*	4.020274E-03	.000	7.121803E-02	8.711077E-02
		A/MOLLASE	8.515203E-02*	4.020274E-03	.000	7.720566E-02	9.309841E-02
		A/MALT	8.466104E-02*	4.020274E-03	.000	7.671467E-02	9.260742E-02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

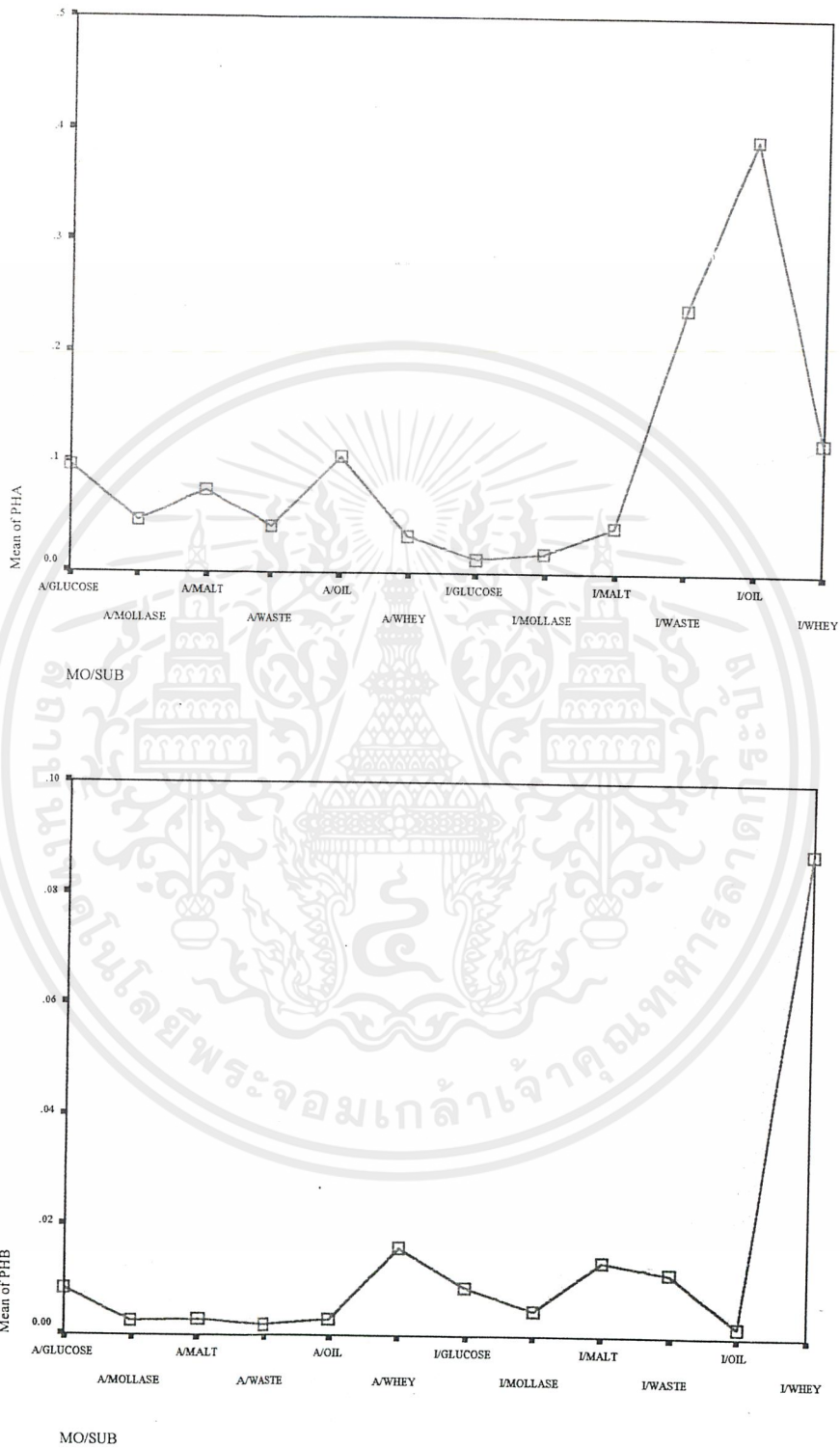
	A/WASTE	8.557130E-02*	4.020274E-03	.000	7.762493E-02	9.351768E-02
	A/OIL	8.468144E-02*	4.020274E-03	.000	7.673506E-02	9.262781E-02
	A/WHEY	7.153928E-02*	4.020274E-03	.000	6.359291E-02	7.948565E-02
	I/GLUCOSE	7.876874E-02*	4.020274E-03	.000	7.082236E-02	8.671511E-02
	I/MOLLASE	8.305733E-02*	4.020274E-03	.000	7.511096E-02	9.100371E-02
	I/MALT	7.411237E-02*	4.020274E-03	.000	6.616600E-02	8.205875E-02
	I/WASTE	7.600141E-02*	4.020274E-03	.000	6.805504E-02	8.394779E-02
	I/OIL	8.553075E-02*	4.020274E-03	.000	7.758437E-02	9.347712E-02

- The mean difference is significant at the .05 level.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Means Plots



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้