

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิต Polyhydroxyalkanoate (PHA) จากแบคทีเรียที่ย่อย
สลาย PHB ได้



นางสาว จารุณี เมืองพระ
นางสาว จีราภรณ์ ใจฉกรรจ์
นางสาว วาสนา ปิติจະ

โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

เลขหม.....
เลขทะเบียน..... 47316
วัน, เดือน, ปี..... 27 ส.ย. 2546

.b.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Media Optimization for Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production 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
Academic Year 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิต Polyhydroxyalkanoate (PHA) จากแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PHB ได้

นักศึกษา นางสาวจารุณี เมืองพระ
นางสาวจิราภรณ์ ใจฉกรรจ์
นางสาววาสนา ปิติจะ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.ดุชนี ธนะบริพัฒน์		
กรรมการ อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์		
กรรมการ ผศ.ดวงใจ ไชยกุล		

หรรษา นพ

(รศ.ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิต Polyhydroxyalkanoate (PHA) จากแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PHB ได้

โดย นางสาวจรรุณี เมืองพระ
นางสาวจีราภรณ์ ใจจกรรจ์
นางสาววาสนา ปิติจะ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2545

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการผลิต PHA ของเชื้อ *Bacillus cereus* PHB1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลาย PHB ได้ในสูตรอาหาร PHB medium ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก พบว่า ปริมาณของหางนม 3 เปอร์เซ็นต์ ผลิต PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณไนโตรเจน 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต สามารถผลิต PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0027 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถผลิต PHA ได้ดีกว่าการใช้ไนโตรเจนในรูปของยูเรียและโพแทสเซียมไนเตรท ปริมาณฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถผลิต PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0020 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโพแทสเซียม 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถผลิต PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0018 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาเปรียบเทียบการผลิต PHA ในอาหาร PHB medium ที่ยังไม่ได้ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก พบว่า ในช่วงเวลาที่ 0 ประสิทธิภาพการผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.018 มิลลิกรัม PHA ต่อมิลลิกรัมเซลล์ โดยช่วงเวลาที่ 0 ไม่มีความแตกต่างกับช่วงเวลาที่ 4 อย่างมีนัยสำคัญแต่มีความแตกต่างกับช่วงเวลาที่ 8, 12, 16 และ 20 อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในอาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก พบว่า ในช่วงเวลาที่ 4 ประสิทธิภาพการผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.0220 มิลลิกรัม PHA ต่อมิลลิกรัมเซลล์ โดยช่วงเวลาที่ 4 ไม่มีความแตกต่างกับช่วงเวลาที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญแต่มีความแตกต่างกับช่วงเวลาที่ 8, 12, 16 และ 20 อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA ในอาหาร PHB medium ทั้ง 2 ชนิด ช่วงเวลาที่มีประสิทธิภาพในการผลิต PHA สูงสุดได้แก่ ช่วงเวลาที่ 4 พบว่า ในอาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักการผลิตสูงกว่าในอาหาร PHB medium ที่ยังไม่ได้ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Media Optimization for Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production by PHB-degrading Bacteria

Name Miss Jarunee Muangpra
Miss Jeeraporn Jaichagun
Miss Wasana Piticha

Department Applied Biology

Academic Year 2002

Special Project Advisor Miss Kulwadee Tongpubesra

Abstract

Carbon, nitrogen, phosphate, and potassium sources in PHB medium were varied for polyhydroxyalkanoate (PHA) production by PHB-degrading bacterium, *Bacillus cereus* PHB1. The result showed that the optimum carbon source for PHA production was 3% whey which gave the yield of PHA at 0.0034 mg/ml. The optimum nitrogen source was 0.04 mg/ml of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and the yield of PHA was 0.0027 mg/ml. The optimum phosphate source was 0.50 mg/ml of phosphate and the yield of PHA was 0.0018 mg/ml. When compared to the non-optimized PHB medium, the highest yield was 0.0018 mg PHA/mg cell at hour 0 and the production was not significantly different from at hour 4. However, the efficiency for PHA production at hours 0 and 4 was significantly different from those at hours 8, 12, 16 and 20. In addition, the efficiency for PHA production in optimized PHB medium was also compared. The maximum PHA production was 0.0220 mg PHA/mg cell at hour 4 of cultivation. The efficiency for PHA production at hour 4 was not significantly different from that at hour 0, but was significantly different from those at hours 8, 12, 16, and 20. However, the efficiency for PHA production from non-optimized and optimized media was not significantly different at 95 percent confidence.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์กุลวดี ทองภูเบศร์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้ข้อเสนอแนะปรึกษาและตรวจแก้ไขโครงงานพิเศษและขอขอบคุณ รศ.ดร. ดุชนิ ณะบริพัฒน์ ประธานกรรมการโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล กรรมการโครงงานพิเศษ ที่ช่วยตรวจสอบแก้ไขโครงงานพิเศษให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ฝ่ายธุรกิจ และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำและความสะดวก ตลอดจนความช่วยเหลือทางด้านอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำโครงงานพิเศษ

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบุพการีและผู้มีอุปการะคุณทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน และให้การสนับสนุนทางการศึกษา กำลังใจ ตลอดจนความช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

คณะผู้จัดทำ

เมษายน 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงการพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงการพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
1.2 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 PHAs และ PHB	3
2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHAs ได้	8
2.3 การนำ PHA ไปใช้ประโยชน์	13
2.4 กระบวนการผลิต PHA	16
2.5 รายงานการศึกษาอื่นๆ	22
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	26
3.1 อุปกรณ์การทดลอง	26
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	27
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	27
3.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	28
3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ	28
3.6 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย	32
4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของหางนม	32
4.2 การศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ของเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> PHB1	32
4.3 การศึกษาปริมาณของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ของเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> PHB1	35
4.4 การศึกษาปริมาณของฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ของเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> PHB1	41
4.5 การศึกษาปริมาณของโพแทสเซียมที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ของเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> PHB1	43
4.6 การศึกษาการผลิต PHA ในอาหาร PHB medium ที่มีปริมาณของธาตุ อาหารหลักในอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิต PHA ได้สูงสุดของเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> PHB1	45
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	49
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก ก. ตารางแสดงผลการทดลอง	54
ภาคผนวก ข. การใช้เครื่อง FREEZE DRY	61
ภาคผนวก ค. การคำนวณหาความเข้มข้นของสูตรอาหาร	62
ภาคผนวก ง. การวิเคราะห์องค์ประกอบของหางนม	69
ภาคผนวก จ. การคำนวณทางสถิติ	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติของ PHAs ชนิดต่างๆ	7
2.2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสม PHA ไว้ภายในเซลล์	9
2.3 ตัวอย่างการนำ PHA ไปใช้ประโยชน์	13
2.4 ความสัมพันธ์ของต้นทุนราคาวัตถุดิบกับผลผลิต PHB ที่ได้จากกระบวนการผลิต	18
2.5 การผลิต PHAs โดยจุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	19
2.6 สารประกอบที่นำไปสู่การผลิต PHAs	20
2.7 การผลิต polyhydroxyalkanoates (PHA) โดยเชื้อ <i>Pseudomonas</i> ในสารตั้งต้นต่างๆ	21
2.8 ปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนในขั้วเสตราชชนิดต่างๆ	22
2.9 ความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด กับประสิทธิภาพการผลิต PHA และประสิทธิภาพการผลิต PHB	23
2.10 ค่าความแตกต่างทางสถิติของ PHA ในเชื้อ <i>A. eutrophus</i> TISTR 1403 และ PHB1	24
4.1 องค์ประกอบของหางนม	32
4.2 ค่าความแตกต่างทางสถิติของ PHA ในอาหาร PHB medium ที่ยังไม่ได้รับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักและอาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก	47
ก.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่ต่างกัน	54
ก.2 น้ำหนัก PHA แห้ง (cell dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่ต่างกัน	54
ก.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน	55
ก.4 น้ำหนัก PHA แห้ง (cell dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ก.5 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium ที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน	56
ก.6 น้ำหนัก PHA แห้ง (PHA dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium ที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน	56
ก.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium ที่มีโพแทสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน	57
ก.8 น้ำหนัก PHA แห้ง (cell dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium ที่มีไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน	57
ก.9 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium ที่มีแหล่งฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ และ KH_2PO_4) ในปริมาณที่ต่างกัน	58
ก.10 น้ำหนัก PHA แห้ง (cell dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium ที่มีแหล่งฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ และ KH_2PO_4) ในปริมาณที่ต่างกัน	58
ก.11 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium ที่มีโพแทสเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งโพแทสเซียมในปริมาณที่ต่างกัน	59
ก.12 น้ำหนัก PHA แห้ง (PHA dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium ที่มีโพแทสเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งโพแทสเซียมในปริมาณที่ต่างกัน	59
ก.13 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium	60
ก.14 น้ำหนัก PHA แห้ง (PHA dry weight) ของ <i>Bacillus cereus</i> ในอาหาร PHB medium	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างโดยทั่วไปของ PHAs	4
2.2 ตัวอย่างโมโนเมอร์ของ PHAs	5
2.3 ภาพ PHA ที่สะสมอยู่ในเซลล์ของเชื้อ <i>Chromatium vinosum</i>	12
2.4 ผลิตรากันท์จาก PHA	15
2.5 ตัวอย่างผลิตรากันท์จาก PHA	15
2.6 ขวดที่ผลิตมาจาก PHA ซึ่งถูกย่อยสลายในสิ่งแวดล้อมในระยะเวลา 1 เดือนขึ้นไป	16
2.7 กระบวนการผลิต PHA และ PHB	17
2.8 รูปแบบของแหล่งไนโตรเจนและอัตราของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในมวลชีวภาพ (cell dry mass; CDM), PHB และสัมประสิทธิ์ของผลผลิตที่ได้	25
2.9 การเปรียบเทียบของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ และชีวมวล พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตจะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด	25
4.1 ปริมาณ Cell dry weight (mg/ml) ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่ต่างกัน ในอาหาร PHB medium	33
4.2 ปริมาณ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณที่ต่างกัน ในอาหาร PHB medium	33
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight (mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีปริมาณของหางนม 3 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถผลิต PHA ได้สูงที่สุด	34
4.4 ปริมาณ Cell dry weight (mg/ml) ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน	35
4.5 ปริมาณ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน	36
4.6 ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight (mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีปริมาณของไนโตรเจน 0.04 mg/ml ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตที่สามารถผลิต PHA ได้สูงที่สุด	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 ปริมาณ Cell dry weight (mg/ml) ที่มีโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกันในอาหาร PHB medium	37
4.8 ปริมาณ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกันในอาหาร PHB medium	38
4.9 ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight (mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีปริมาณของไนโตรเจน 0.04 mg/ml ในรูปของโพแทสเซียมไนเตรทที่สามารถผลิต PHA ได้สูงที่สุด	38
4.10 ปริมาณ Cell dry weight (mg/ml) ที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีปริมาณต่างกันในอาหาร PHB medium	39
4.11 ปริมาณ PHA dry weight (mg/ml) ที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีปริมาณต่างกันในอาหาร PHB medium	40
4.12 ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight (mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีปริมาณของไนโตรเจน 0.04 mg/ml ในรูปของยูเรียที่สามารถผลิต PHA ได้สูงที่สุด	40
4.13 ปริมาณ Cell dry weight (mg/ml) ที่มี $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ และ KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตที่มีปริมาณที่ต่างกันในอาหาร PHB medium	41
4.14 ปริมาณ PHA dry weight (mg/ml) ที่มี $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ และ KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตที่มีปริมาณที่ต่างกันในอาหาร PHB medium	42
4.15 ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight (mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีปริมาณของฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต 0.50 mg/ml ที่สามารถผลิต PHA ได้สูงที่สุด	42
4.16 ปริมาณ Cell dry weight (mg/ml) ที่มีโพแทสเซียมซัลเฟตซัลเฟต (K_2SO_4) เป็นแหล่งโพแทสเซียมที่มีปริมาณต่างกันในอาหาร PHB medium	43
4.17 ปริมาณ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีโพแทสเซียมซัลเฟตซัลเฟต (K_2SO_4) เป็นแหล่งโพแทสเซียมที่มีปริมาณที่ต่างกันในอาหาร PHB medium	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.18	ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight (mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีปริมาณของโพแทสเซียม 0.50 mg/ml ที่สามารถผลิต PHA ได้สูงที่สุด	44
4.19	ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight (mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มีปริมาณของธาตุอาหารหลักในอัตราส่วนที่เหมาะสม	45



บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันพลาสติกได้กลายเป็นผลิตภัณฑ์สำคัญอย่างหนึ่งที่จะเข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มมากขึ้น สามารถปรุงแต่งคุณสมบัติของพลาสติกได้ง่าย โดยการเติมสารเติมแต่ง (Additives) ได้แก่ สารเสริมสภาพพลาสติก (Plasticizer) สารปรับปรุงคุณภาพ (Modifier) สารเสริม (Filler) สารคงสภาพ (Stabilizer) สารยับยั้งปฏิกิริยา (Inhibiter) สารหล่อลื่น (Lubricant) และผงสี (Pigment) (จิวรรณ, 2001) อย่างไรก็ตามถึงแม้พลาสติกจะมีประโยชน์แต่ก็มีข้อเสียคือ พลาสติกผลิตมาจากทรัพยากรธรรมชาติที่ไม่สามารถเกิดขึ้นใหม่ ได้แก่ น้ำมัน ถ่านหิน นอกจากนี้ยังย่อยสลายได้ยาก และต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง ในการนำกลับมาใช้ใหม่ จึงมีการนำพลาสติกที่ใช้แล้วเพียง 3 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนพลาสติกที่ผลิตออกมาเท่านั้นที่นำกลับเข้าสู่โรงงานเพื่อการนำกลับมาใช้ใหม่ ดังนั้นจึงยังมีพลาสติกตกค้างในสิ่งแวดล้อม และทำให้เกิดปัญหาต่อสภาพแวดล้อมได้ (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2544)

นักวิจัยด้านพอลิเมอร์หรือพลาสติก ตระหนักดีถึงปัญหาเหล่านี้ จึงมีความพยายามพัฒนาพอลิเมอร์ชีวภาพ เริ่มต้นมาตั้งแต่ทศวรรษที่ 1970 โดยพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีการพัฒนาในเชิงทางการค้า ได้แก่ พอลิเมอร์ที่ผลิตโดยบริษัท ICI ของอังกฤษ ได้ผลิตพลาสติกซึ่งย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ (Biodegradable polymer) ซึ่งเรียกทางการค้าว่า BIOPOL พลาสติกนี้ทำจากพอลิเมอร์ธรรมชาติที่เรียกว่า Polyhydroxybutyrate (PHB) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ polyhydroxyalkanoate (PHA) พอลิเมอร์เหล่านี้เมื่อย่อยสลายแล้วจะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยแบคทีเรียและราที่มีอยู่ทั่วไปจะย่อยวัสดุชนิดนี้จนหมดสิ้นไปในเวลาเพียงไม่กี่สัปดาห์เท่านั้น (จิวรรณ ธรรมมงคล, 2001)

แม้แนวคิดเรื่องพอลิเมอร์ชีวภาพจะมีมายาวนานร่วม 30 ปี แต่ความนิยมใช้ยังมีไม่มากนักเนื่องจากพอลิเมอร์ชีวภาพเหล่านี้มีราคาแพงกว่าพลาสติกที่สังเคราะห์จากกระบวนการปิโตรเคมีมาก (สุวิทย์, 2000) เนื่องจากต้นทุนการผลิตส่วนหนึ่งมาจากวัตถุดิบที่มีราคาแพง ได้แก่ น้ำมันดิบจึงมีการนำวัตถุดิบที่หาได้ง่ายและมีราคาถูกมาศึกษาหาความเป็นไปได้ในการผลิต polyhydroxyalkanoate (PHA) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เป็นการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิต polyhydroxyalkanoate (PHA) จากหางนม เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ (สุวิทย์ เทียนธรรมา, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อหาความเข้มข้นของหางนมที่เหมาะสมในการผลิต PHA จาก *Bacillus cereus* PHB1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติที่สามารถย่อยสลาย PHB ได้
2. เพื่อหาความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิต PHA จาก *Bacillus cereus* PHB1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติที่สามารถย่อยสลาย PHB ได้
3. เพื่อหาความเข้มข้นและชนิดของแหล่งฟอสฟอรัสที่เหมาะสมในการผลิต PHA จาก *Bacillus cereus* PHB1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติที่สามารถย่อยสลาย PHB ได้
4. เพื่อหาความเข้มข้นและชนิดของแหล่งโพแทสเซียมที่เหมาะสมในการผลิต PHA จาก *Bacillus cereus* PHB1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติที่สามารถย่อยสลาย PHB ได้

1.2 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาองค์ประกอบหลักที่เหมาะสมในสูตรอาหารที่สามารถนำมาผลิต PHA

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. นำไปสู่ทางเลือกในการผลิตพลาสติกชีวภาพเพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์
2. ลดต้นทุนในการผลิตพลาสติกชีวภาพ
3. สามารถควบคุมปัญหามลพิษที่เกิดจากการย่อยสลายพลาสติกที่ย่อยสลายไม่ได้ โดยการใช้พลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้

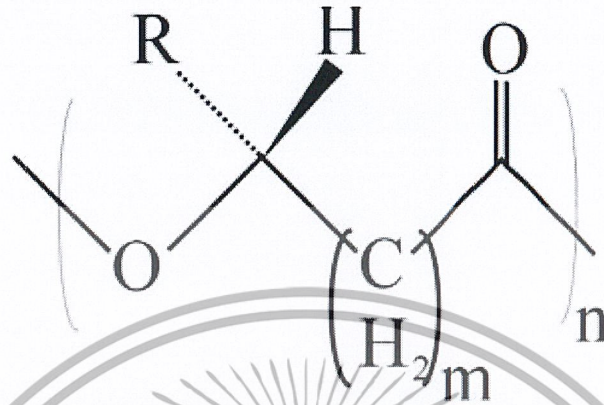
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

2.1 PHAs และ PHB

PHAs หรือ Polyhydroxyalkanoate เป็นสารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น และเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ พบในเซลล์จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ในสภาพเลี้ยงที่ไม่สมดุล ได้แก่สภาวะที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจน แม้ว่า PHAs จะถูกผลิตขึ้นในปริมาณมาก และได้มีการศึกษามานานแล้ว แต่เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นแหล่งวัสดุดิบในการทำพลาสติก จึงยังมีการวิจัยเพื่อพัฒนาการผลิต PHAs อยู่ ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของ PHAs ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของไฮดรอกซีเอซิดหลายๆ โมเลกุลมาต่อเรียงกันโดยมีความแตกต่างกันที่หมู่อัลคิล (Agarwal และคณะ, 1995) ดังรูปที่ 2.1 ส่วน PHB หรือ Poly-(β -hydroxybutyrate) เป็นอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ที่พบได้ในธรรมชาติ เป็นอนุพันธ์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Polyhydroxyalkanoate 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 Polyhydroxyalkanoate ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญจากแบคทีเรียเป็นครั้งแรก และในปี ค.ศ. 1927 Lemoigne ได้พบว่าการผลิต PHB มีความสัมพันธ์กับการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* spp. ซึ่งในปัจจุบันนี้พบว่าองค์ประกอบของไขมันชนิดนี้ถูกสะสมได้ในแบคทีเรียหลายชนิด ในช่วง Stationary phase เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานทดแทน พอลิเมอร์ชนิดนี้ จะถูกผลิตและถูกสะสมได้ดีภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมในกรณีที่มีการจำกัดแหล่งอาหารที่จำเป็น (Oeding และ Schlegel, 1973; Senior และ Dawes, 1973)

PHAs เป็นพอลิเอสเทอร์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีหน่วยโมโนเมอร์ทั้งหมดของ PHAs ได้แก่ Hydroxycarboxylic acids ประกอบด้วย (R)-hydroxy groups Hydroxycarboxylic acids จะมีมากกว่า 140 ชนิดและสามารถรวมกับพอลิเมอร์ไปเป็นหน่วยของโมโนเมอร์ (monomeric) (Park และคณะ, 2002) ดังรูปที่ 2.2



R = *n*-alkyl pendant group of variable chain length

HB, β -hydroxybutyrate where R = methyl

HV, β -hydroxyvalerate where R = ethyl

HC, β -hydroxycaproate where R = *n*-propyl

HH, β -hydroxyheptanoate where R = *n*-butyl

HO, β -hydroxyoctanoate where R = *n*-pentyl

HN, β -hydroxynonanoate where R = *n*-hexyl

HD, β -hydroxydecanoate where R = *n*-heptyl

HUD, β -hydroxyundecanoate where R = *n*-octyl

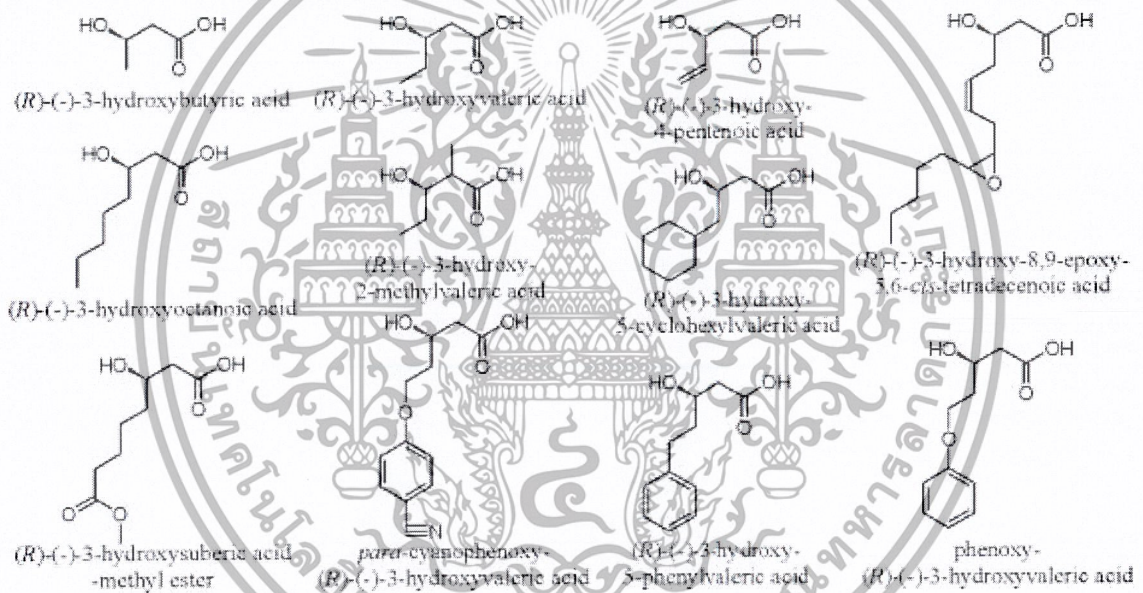
HDD, β -hydroxydodecanoate where R = *n*-nonyl

รูปที่ 2.1 โครงสร้างโดยทั่วไปของ PHAs

ที่มา : Agarwal และคณะ (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PHAs ถูกดึงเอาพอลิเมอร์ออกไปเป็นโมโนเมอร์ด้วยวิธีการทางเคมีและชีวภาพ วิธีการทางเคมีได้แก่การแอลกอฮอล์ไลซิสสกรด (Acidic alcoholysis) ของ PHAs ไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์โดยการขนส่งเอสเทอร์ (transesterification) ร่วมกับการแอลกอฮอล์ไลซิสสกรดของ PHAs และถูกตรวจสอบโดยนักเคมีมาแล้วว่ายังไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากเหตุผลทางเศรษฐกิจรวมไปถึงต้นทุนที่มีราคาสูงและจะต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีราคาสูงในปริมาณมาก (Park และคณะ, 2002)



รูปที่ 2.2 ตัวอย่างโมโนเมอร์ของ PHAs

ที่มา : Park และคณะ (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] เป็นโฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) ชนิดหนึ่งของ PHAs ส่วนมากจะนิยมนำมาศึกษาในด้านพอลิเอสเตอร์ชีวภาพ (biopolyester) คุณสมบัติของ Poly(3-hydroxybutyrate) จะคล้ายกันกับ polypropylene ซึ่งมีความเป็นผลึกสูง และมีอุณหภูมิหลอมละลายสูงถึง 170-180 °C การที่มีอุณหภูมิหลอมละลายสูงนั้นทำให้ยากต่อกระบวนการเกิด Poly(3-hydroxybutyrate) ส่วน Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] เป็นโคพอลิเมอร์ (copolymer) ที่ไม่แข็งแต่มีความเหนียว ทนทาน มีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 100-160 °C ซึ่งจุดหลอมเหลวนี้อาจขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของพอลิเมอร์ (0-25 mol% 3HV) ส่วน Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-co-3HHx)] และ Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) [P(3HB-co-3HA)] มีคุณสมบัติเหมือน polyethylene แต่จะมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่ดีกว่า มีความหนาแน่นต่ำขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของโมโนเมอร์ ดังตารางที่ 2.1 ซึ่งพวก copolymer จะได้รับความสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม ปัจจุบันมีเพียง Poly(3-hydroxybutyrate) และ Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) เท่านั้นที่ถูกนำไปผลิตในรูปกิ่งทางการค้าซึ่งผลิตขึ้นเป็นครั้งแรกโดย ZENECA Bioproducts (Billingham, UK) ตามด้วย Monsanto (St. Louis, MO, USA) ซึ่งการผลิต PHAs จะมีต้นทุนการผลิตที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ที่ผลิตจากปิโตรเคมี ดังนั้นในกระบวนการผลิตและกระบวนการเก็บเกี่ยว PHAs จะต้องมีการพัฒนาเทคนิคที่เรียวยาวพันธุ์ที่ดีที่สุด เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในกระบวนการหมักและกระบวนการเก็บเกี่ยว PHAs (Park และคณะ, 2002)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของ PHAs ชนิดต่างๆ

	Tg (°C)	Tm (°C)	Tensile Strength (Mpa)	Crystallinity (%)	Elongation To break (%)
P(3HB)	4	177	40	60	5
P(3HB-co-10mol% 3HV)	6	162	36	69	10
P(3HB-co-20mol% 3HV)	-1	145	32	53	-
P(3HB-co-10mol% 3HHx)	-1	127	21	34	400
P(3HB-co-15mol% 3HHx)	0	115	23	26	760
P(3HB-co-17mol% 3HHx)	-2	120	20	22	850
P(3HB-co-6mol% 3HA)	-8	133-146	17	-	680
Commercial plastic (Film)					
PP	-30	130-161	29.3	40	400
LDPE	-30	120	15.2	-	620

ที่มา : Park และคณะ (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHAs ได้

จากการศึกษาวิจัยพบว่า แบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศหลายชนิดสามารถสังเคราะห์ PHA หรือ PHB ไว้ภายในเซลล์ซึ่งอยู่ในรูปซับซ้อนเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดแหล่งอาหารโดยการให้แหล่งคาร์บอนที่เพียงพอ ได้แก่ ไนโตรเจน (Merrick และ Duodoroff, 1961) แบคทีเรียสามารถผลิต PHA ได้ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.2 โดยแบคทีเรียเกือบทั้งหมดสามารถเก็บสะสม PHA ได้ 30-80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้ ภายใต้สภาวะที่จำเพาะ *Alcaligenes eutrophus* N9A สามารถสะสม PHA ได้ถึง 96 เปอร์เซ็นต์ (Pedros-Alio และคณะ, 1985) นอกจากนี้ ไชยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) ได้แก่ *Aphanothece* หรือ *Microcoleus* มีการสะสม PHA ในปริมาณที่ต่ำ (Capon และคณะ, 1983) ส่วน Enterobacter จะไม่สะสมอยู่ในรูป PHA อย่างไรก็ตามได้มีการพิสูจน์ให้เห็นว่าวิถีการสังเคราะห์ PHA ทางชีวภาพจาก *A. eutrophus* สามารถที่จะนำมาทำการตัดต่อยีนใน *Escherichia coli* ได้ (Slater และคณะ, 1988; Schubert และคณะ, 1988) ซึ่งจะพบพอลิเมอร์อยู่ใน *E. coli* มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้ยังพบส่วนประกอบของ PHA ในเซลล์เมมเบรนของ *E. coli* เช่นเดียวกับในเซลล์เมมเบรนของ *Haemophilus influenzae* (Reusch และคณะ, 1986; Reusch และ Sadoff, 1983, 1988; Reusch และคณะ, 1987) ส่วนแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้แก่ *Clostridium* sp. (Emeruwa และ Hawirko, 1973) และ *Syntrophomonas* sp. (Amos และ McInerney, 1987) ซึ่งจะเป็นพวกที่ไม่ใช้อากาศพบว่ามี การสะสม PHA เช่นกัน นอกจากนี้ PHA ยังพบในพวกแบคทีเรียที่ใช้กำมะถันด้วย จากการเกิดและวิวัฒนาการของสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตเป็นที่สังเกตอย่างเห็นได้ชัดว่า PHA พบได้ทั้ง Enterobacteria และ Archaeobacteria (Fernandez-Castillo และคณะ, 1986)

ตารางที่ 2.2 ชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตและสะสม PHA ไว้ภายในเซลล์

Genus	Classification after Bergey' s Manual ^a	Maximum PHA content (% dry wt)	PHA producing substrate
<i>Acinetobacter</i>	10	<1	Glucose
<i>Alkaligenes</i>	7	96	Fructose
<i>Aphanothece</i>	Cyanobacteria	<1	NS
<i>Aquaspirillum</i>	6	ND	NS
<i>Azospirillum</i>	6	75	Malate
<i>Azotobacter</i>	7	73	Glucose
<i>Bacillus</i>	15	25	Glucose
<i>Beggiatoa</i>	2	57	Acetate
<i>Beijerinckia</i>	7	38	Glucose
<i>Caulobacter</i>	4	36	Glucose/glutamate
<i>Chloroflexus</i>	1	<1	Yeast extract/ glycyglycine
<i>Chlorogloria</i>	Cyanobacteria	10	Acetate/CO ₂
<i>Chromatium</i>	1	20	Acetate
<i>Chromobacterium</i>	8	37	Glucose/peptone
<i>Clostridium</i>	15	13	Tryptone/peptone/glucose
<i>Ectothiorhodospira</i>	7	26	Glucose
<i>Escherichia^a</i>	1	ND	NS
<i>Gamphosphaeria</i>	8	ND	Tryptone/ Yeast extract /glucose
<i>Haemophilus^a</i>	Cyanobacteria	ND	ND
<i>Halobacterium</i>	8	ND	Brain-heart-infusion
<i>Hyphomicrobium</i>	13	38	Glucose
<i>Lamprocystis</i>	4	ND	Methanol, glucose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Genus	Classification after Bergey' s Manual ^a	Maximum PHA content (% dry wt)	PHA producing substrate
<i>Lampropedia</i>	1	ND	NS
<i>Leptothrix</i>	10	ND	NS
<i>Methylobacterium</i>	3	67	Pyruvate
<i>Methylocystis</i>	7	47	Methanol
<i>Methylosinus</i>	ND	70	Methane
<i>Micrococcus</i>	7	25	Methane
<i>Microcoleus</i>	14	28	Peptone/tryptone
<i>Methylocystis</i>	Cyanobacteria	<1	NS
<i>Moraxella</i>	Cyanobacteria	ND	ND
<i>Microplana</i>	10	ND	NS
<i>Nitrobacter</i>	17	ND	Methanol
<i>Nitrococcus</i>	12	ND	NS
<i>Nocardia</i>	12	ND	NS
<i>Oceanospirillum</i>	17	14	Butane
<i>Paracoccus</i>	6	ND	NS
<i>Photobacterium</i>	10	ND	NS
<i>Pseudomonas</i>	8	ND	NS
<i>Rhizobium</i>	7	67	Methanol
<i>Rhodobacter</i>	7	57	Mannitol
<i>Rhodospirillum</i>	1	80	Acetate
<i>Sphaerotilus</i>	1	47	Acetate
<i>Spirillum</i>	3	45	Glucose/peptone
<i>Spirulina</i>	Cyanobacteria	40	Lactose
<i>Streptomyces</i>	17	6	CO ₂

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Genus	Classification after Bergey' s Manual ^a	Maximum PHA content (% dry wt)	PHA producing substrate
<i>Syntrophomonas</i>	9	4	Glucose
<i>Thiobacillus</i>	12	30	Crotonate
<i>Thiocapsa</i>	1	ND	Glucose
<i>Thiocystis</i>	1	ND	NS
<i>Thiodictyon</i>	1	ND	NS
<i>Thiopedia</i>	1	ND	NS
<i>Thiosphaera</i>	8	ND	Acetone, CO ₂
<i>Vibrio</i>	7	ND	NS
<i>Xanthobacter</i>	7	ND	NS
<i>Zoogloea</i>		ND	Yeast extract /casamino acids

Group 1 : Phototrophic bacteria;

Group 2 : Gliding bacteria;

Group 3 : Sheathed bacteria;

Group 4 : Budding and/or appendage bacteria;

Group 6 : Spiral and curved bacteria;

Group 7 : Gram-negative aerobic rods and cocci;

Group 8 : Gram-negative facultative anaerobic bacteria;

Group 9 : Gram-negative anaerobic bacteria;

Group 10 : Gram-negative cocci and coccibacilli;

Group 12 : Gram-negative chemolithotrophic;

Group 13 : Archaeobacteria;

Group 14 : Gram-positive cocci;

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Group 15 : Endospore-forming rods and cocci;

Group 17 : Actinomycetes.

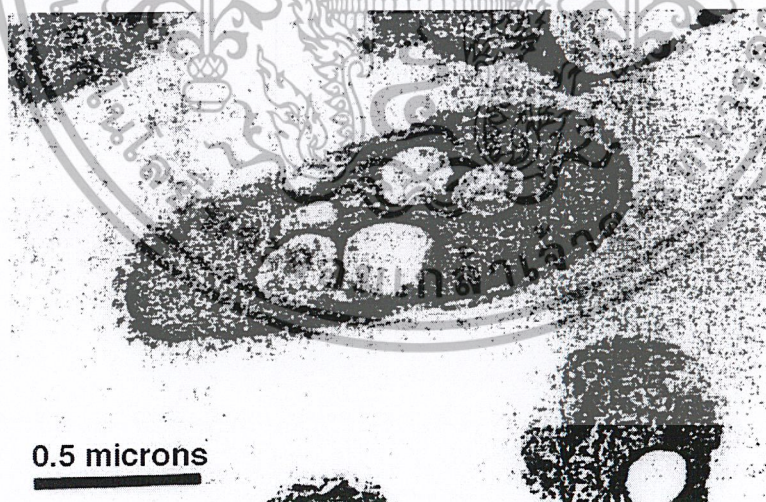
^a PHB found in cell membranes, not as intracellular inclusions;

ND : Maximum PHA content not determined;

NS : Substrate not specified.

ที่มา : Agarwal และคณะ (1995).

ในการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดในการดูเซลล์ของแบคทีเรียจะเห็น PHA อยู่ในรูปกรานูล (Anderson และ Dawes, 1990) รูปร่างทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 ไมครอนเมตร ดังรูปที่ 2.3 ปริมาณของ PHA ในเซลล์แบคทีเรียจะอยู่ประมาณ 1-30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามภายใต้การควบคุมในสภาวะการหมัก โดยการกำจัดไนโตรเจนหรือออกซิเจน *Azotobacter* และ *Alcaligenes* sp. บางชนิดสามารถสะสมพอลิเมอร์ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง และมีเชื้อบางชนิดที่สามารถเลี้ยงในสารพิษได้ ได้แก่ *Ralstonia eutropha* และ *Variovorax paradoxus* (Maskow และ Babel, 1999)



รูปที่ 2.3 ภาพ PHA ที่สะสมอยู่ในเซลล์ของเชื้อ *Chromatium vinosum*

ที่มา : Jia และคณะ (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PHA ที่สะสมอยู่ในเซลล์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยไขมัน โปรตีน หรือเกลือของพอลิเมอร์ิกแอนไอออนสามารถแยกออกมาเป็นพอลิเมอร์ที่เป็นโซ่สั้นๆ (130-200 หน่วย) จากเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย พืชและเนื้อเยื่อของสัตว์ ส่วนใหญ่จะพบ PHA น้อยมาก (ต่ำกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง) สารประกอบเชิงซ้อนของ PHA ที่ประกอบด้วย Serum albumin มีความหนาแน่นของไลโปโปรตีนต่ำมาก (Maskow และ Babel, 1999)

2.3 การนำ PHA ไปใช้ประโยชน์

คุณสมบัติที่มีมากมายของ PHA สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ได้แก่ บรรจุภัณฑ์ กาว สี เคลือบกระดาษ เครื่องใช้ไฟฟ้า อุปกรณ์ไฟฟ้าและอิเล็กทรอนิกส์ สารเคมี รถยนต์ เกษตรกรรม ดังตารางที่ 2.3 และ รูปที่ 2.4-2.6

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างการนำ PHA ไปใช้ประโยชน์

ประเภท	การนำไปใช้ประโยชน์
พอลิเมอร์	PLA
เส้นใย	แป้ง พอลิเอสเทอร์ เซลลูโลส สังทอ พรม
แผ่นยาง	ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสุขอนามัยส่วนบุคคล ผ้าเช็ดหน้า ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการกรอง ฟิล์มคลุมต้นไม้ ถุงใส่ขยะ ถุงช้อปปิ้ง บรรจุภัณฑ์ต่างๆ แผ่นกัน

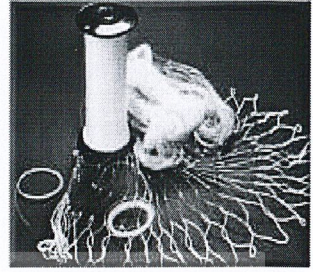
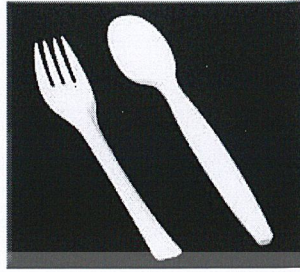
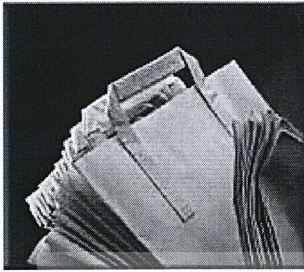
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

ประเภท	การนำไปใช้ประโยชน์
แบบจำลองเรซิน	บรรจุภัณฑ์ เครื่องใช้ไฟฟ้า ของเล่นเด็ก รถยนต์ เครื่องใช้สอย แผ่นกัน
แผ่นเคลือบ	บรรจุภัณฑ์ เครื่องใช้ไฟฟ้า ของเล่นเด็ก รถยนต์ เครื่องใช้สอย
การแพทย์	กระดาดำกันน้ำ ผลิตภัณฑ์จากไม้ ศัลยกรรมเย็บแผล หลอดเลือดเทียม กระดูกเทียม
อื่นๆ	สารละลายเคมี ตัวประสาน

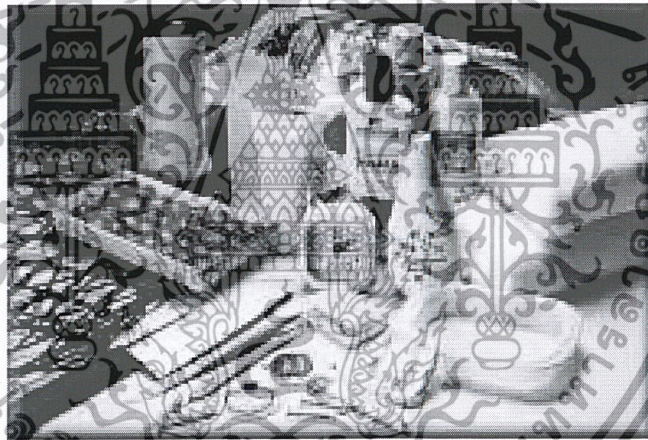
ที่มา : Rehm และคณะ (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 ผลิตภัณฑ์จาก PHA

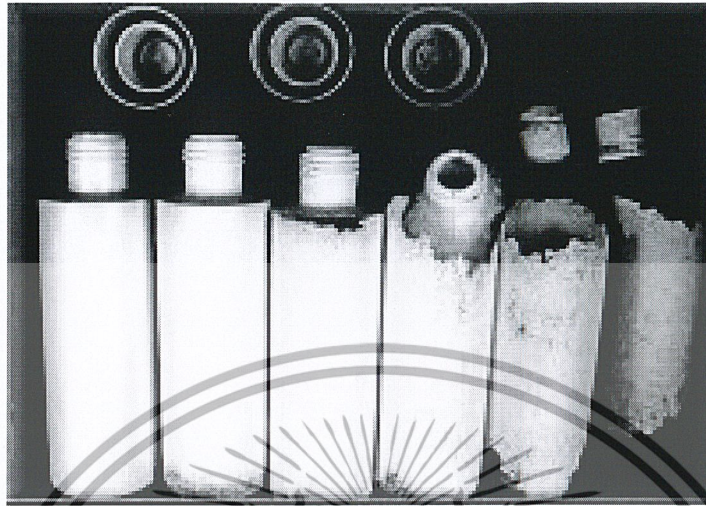
ที่มา : <http://www.metabolix.com/natures%20plastic/markets.html>



รูปที่ 2.5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จาก PHA

ที่มา : <http://www.metabolix.com/natures%20plastic/markets.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



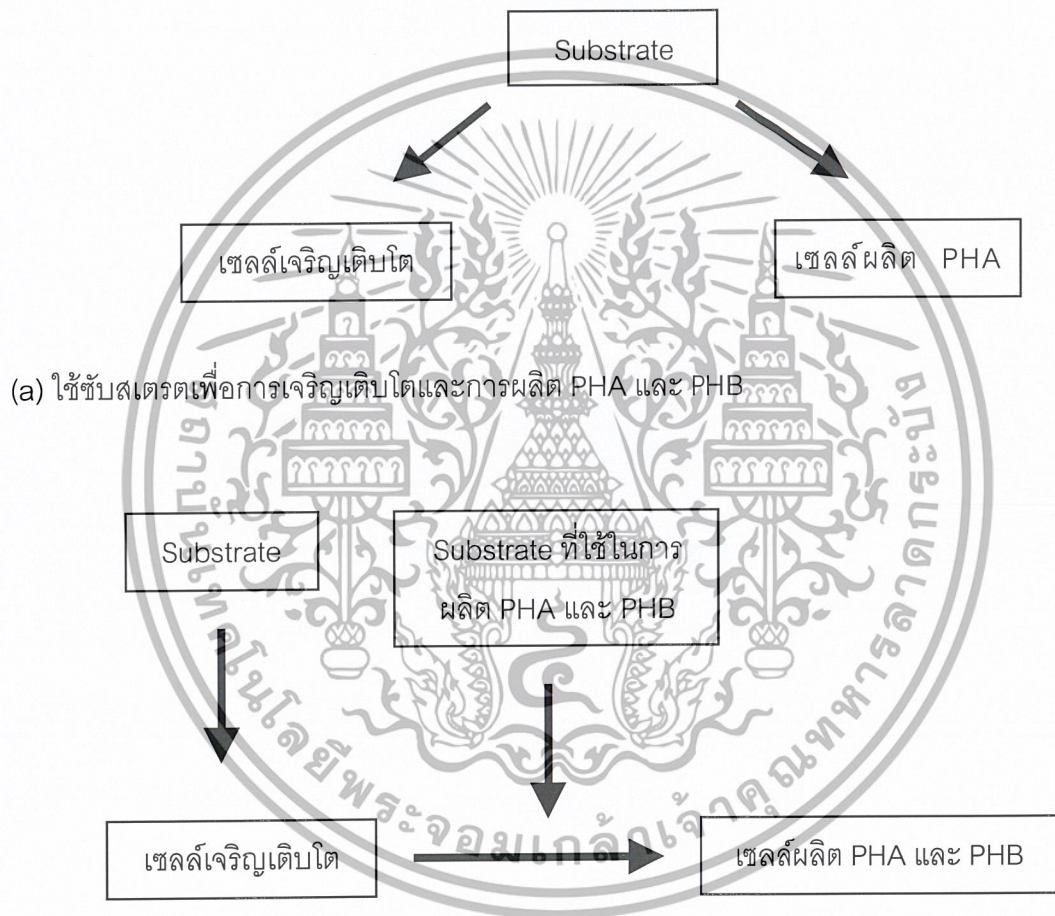
รูปที่ 2.6 ขวดที่ผลิตมาจาก PHA ซึ่งถูกย่อยสลายในสิ่งแวดล้อมในระยะเวลา 1 เดือนขึ้นไป
ที่มา : <http://www.metabolix.com/natures%20plastic/markets.html>

2.4 กระบวนการผลิต PHA

กระบวนการผลิต PHA และ PHB มี 2 กระบวนการที่สำคัญ โดยกระบวนการแรกคือการเติมสารตั้งต้นลงไปเพียงครั้งเดียวเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHA อีกกระบวนการหนึ่งคือการเติมสารตั้งต้นลงไป 2 ครั้งเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHA ดังรูปที่ 2.7 สารตั้งต้นเพื่อการเจริญหรือแหล่งคาร์บอนจะถูกผลิตให้อยู่ในรูปของชีวมวลและเกิดการสะสมพอลิเมอร์ไปพร้อมๆกัน โดยแสดงให้เห็นในรูปแบบของการผลิต PHA ที่เป็นโคพอลิเอสเตอร์หลายรูปแบบใน *R. rubrum* และ *P. oleovorans* ในระหว่างที่เซลล์เจริญ (Brandl และคณะ, 1988,1989; Gross และคณะ, 1989) สารตั้งต้นจะนำส่วนที่อยู่ในรูปของพอลิเมอร์ไปใช้ในกระบวนการการทำงานของเซลล์ ส่วนวิธีทางอุตสาหกรรมการผลิตพอลิเมอร์เป็นลำดับขั้นของกระบวนการซึ่งจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตเป็นอันดับแรกในแหล่งคาร์บอนเพื่อให้ได้ชีวมวลในปริมาณที่มาก ต่อจากนั้นอาหารที่จำเป็นจะถูกใช้หมดไปและจะถูกสร้างให้อยู่ในรูปของพอลิเมอร์เมื่อมีการเติมสารตั้งต้นเข้าไปอีกครั้ง สุดท้ายจะถูกเปลี่ยนกลับให้เป็นพอลิเมอร์และจะเติมอาหารอีกเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโต (Doi และคณะ, 1986,1987; David, 1964; Kunioka และคณะ, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิต PHA ในอุตสาหกรรมนิยมเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ที่มีความจำเพาะในสภาวะการเลี้ยงที่แน่นอน ได้แก่ Photosynthetic bacteria เพราะจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถใช้พลังงานจากแสงมาเป็นแหล่งพลังงานในการผลิตพอลิเอสเทอร์เหล่านี้ได้ (Agarwal และคณะ, 1995)



(b) การผลิตพอลิเมอร์เมื่อมีการเติมซับสเตรตลงไปหลังการเจริญเติบโต

รูปที่ 2.7 กระบวนการผลิต PHA และ PHB

ที่มา : Agarwal และคณะ (1995)

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต PHA และ PHB นั้นต้องมีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHA และ PHB จากจุลินทรีย์มีหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.4 และ 2.5 (Lee, 1996)

ตารางที่ 2.4 ความสัมพันธ์ของต้นทุนราคาวัตถุดิบกับผลผลิต PHB ที่ได้จากกระบวนการผลิต

วัตถุดิบ	ราคา ประมาณ (US\$ kg ⁻¹)	ผลผลิต PHB [g(PHB)(g substrate) ⁻¹]	ราคาผลผลิต {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 เปอร์เซ็นต์ของพอลิเมอร์ทั้งหมด

c คือ การประมาณค่าของแป้งข้าวโพดที่ถูกไฮโดรไลซ์

d คือ ราคาน้ำตาลดิบในตลาดทั่วโลก

e คือ ราคาตลาดทั่วโลกจาก Chem.J. (Korea)

ที่มา : Lee(1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 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)	Glucose	50	164	121	76	2.42
<i>Al. Eutrophus</i>	P(3HB)	CO ₂	40	91.3	61.9	67.8	1.55
<i>Al. Latus</i>	P(3HB)	Sucrose	18	143	71.4	50	3.97
<i>Methylbacterium Organophilum</i>	P(3HB)	Methanol	70	250	130	52	1.86
<i>Protomonas Exorquens</i>	P(3HB)	Methanol	170	233	149	64	0.88

เมื่อ a คือ ตัวย่อของ P(3HB), Poly(3-hydroxybutyrate)
ที่มา : Lee (1996)

นอกจากแหล่งคาร์บอนจะมีผลต่อการผลิต PHA แล้วยังมีสารอาหารบางชนิดยังมีผลต่อการผลิต PHA ด้วย พบว่าการขาดแคลนสารอาหารขณะเจริญเติบโตจะเป็นผลชักนำให้เกิดการผลิต PHA ได้ ได้แก่ แอมโมเนีย คาร์บอน เหล็ก ดังตารางที่ 2.6 (Agarwal และคณะ, 1995)

ตารางที่ 2.6 สารประกอบที่นำไปสู่การผลิต PHAs

สารประกอบ	จุลินทรีย์
Ammonia	<i>Alcaligenes eutrophus</i> <i>Alcaligenes latus</i> <i>Azospirillum brasiliense</i> Cd <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Pseudomonas</i> sp. K <i>Methylocystis parvus</i> <i>Thiosphaera pantotropha</i> <i>Rhizobium</i> ORS571
Carbon	<i>Spirillum</i> sp. <i>Hyphomicrobium</i> sp. <i>Azospirillum brasiliense</i> Cd
Iron	<i>Pseudomonas</i> sp. K
Magnesium	<i>Pseudomonas</i> sp. K <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Rhizobium</i> ORS571
Manganese	<i>Pseudomonas</i> sp. K
Oxygen	<i>Azospirillum brasiliense</i> Cd <i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Azotobacter beijerinckii</i> <i>Rhizobium</i> ORS571
Phosphate	<i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Caulobacter crescentus</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i>
Potassium	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Sulfate	<i>Pseudomonas</i> sp. K <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i>

ที่มา : Agarwal และคณะ (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขณะที่เดียวกันพบว่าสารตั้งต้นต่างๆจะมีผลต่อการผลิต PHA ในเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ได้ PHA ในปริมาณที่แตกต่างกันตามชนิดของสารตั้งต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Kui และคณะ, 1999) ดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 การผลิต polyhydroxyalkanoates (PHA) โดยเชื้อ *Pseudomonas* ในสารตั้งต้นต่างๆ

แหล่งคาร์บอน	HB (C4)	ส่วนประกอบของ PHA(mole) HO (C8)	HD (C10)
Glucose	--	--	--
Raw sugar	100	--	--
Molass	100	--	--
Butyrate	100	--	--
Hexanoate	100	--	--
Ctanoate	72	27	1
Decanoate	--	--	--
Myristic acid	42	26	32
Glucose + ocynoate	96	4	--

-- ไม่สามารถตรวจสอบได้ ; HB (C4) hydroxybutyrate ; HO (C8) hydroxyoctanoate ;

HD (C10) hydroxydecanoate

ที่มา : Kui และคณะ (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตาม ในโรงงานอุตสาหกรรม ต้องการความก้าวหน้าในการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีประสิทธิภาพใน ICI PROCESS ใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหาร และใช้ *A. eutrophus* ผลิต PHB copolymer แต่ผลิตภัณฑ์ของ ICI ก็ยังคงมีราคาสูงอยู่ จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าวิจัยการใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก ได้แก่ กรดแลกติกในหางนม ไฮโดรลิกจากโรงงานไม้ หรือน้ำตาลดิบจากกากหัวบีท (Page, 1992) ซึ่งจะต้องมีการออกแบบถังหมัก การเฝ้าระวังติดตามผล และการควบคุมกระบวนการผลิตที่ดีควบคู่ไปด้วย

2.5 รายงานการศึกษาอื่นๆ

ในการศึกษาแหล่งคาร์บอนจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ ได้แก่ หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล และน้ำมันมะพร้าว โดยได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl และคาร์บอนด้วยวิธี Phenolsulfuric ดังตารางที่ 2.8 พบว่าปริมาณไนโตรเจนในกากมอลต์มีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 0.4452 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณความเข้มข้นของคาร์บอนจากการนำตาลมีปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 4.871 เปอร์เซ็นต์ (ชลิตา และคณะ, 2544)

ตารางที่ 2.8 ปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนในซัพเสตรชนิดต่างๆ

ชนิดของซัพเสตร	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

ที่มา : ชลิตา และคณะ (2544)

เมื่อนำปริมาณ PHA และ PHB จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆมาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ประสิทธิภาพการผลิต PHA และประสิทธิภาพการผลิต PHB ดังตารางที่ 2.9 พารามิเตอร์ที่แสดงจลนศาสตร์การเจริญเติบโตของกลูโคส หางนม การมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล และน้ำมันมะพร้าว ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA และ PHB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 2.9 และ 2.10 พบว่า จากแหล่งคาร์บอนทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ กลูโคส หางนม กากมอลต์ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม กากน้ำตาล และน้ำมันมะพร้าว พบว่า น้ำมันมะพร้าวให้ประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุด และ หางนมให้ประสิทธิภาพการผลิต PHB สูงสุด (ชลิตา และคณะ, 2544)

ตารางที่ 2.9 ความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด กับประสิทธิภาพการผลิต PHA และประสิทธิภาพการผลิต PHB

ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	ชั่วโมงที่ผลิตสูงสุด		อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (ชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการผลิต PHA (กรัม PHA ต่อกรัมเซลล์)	ประสิทธิภาพการผลิต PHB (กรัม PHA ต่อกรัมเซลล์)
		PHA	PHB			
<i>A. europus</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>	กลูโคส	24	16	0.0691	0.1287
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

ที่มา : ชลิตา และคณะ (2544)

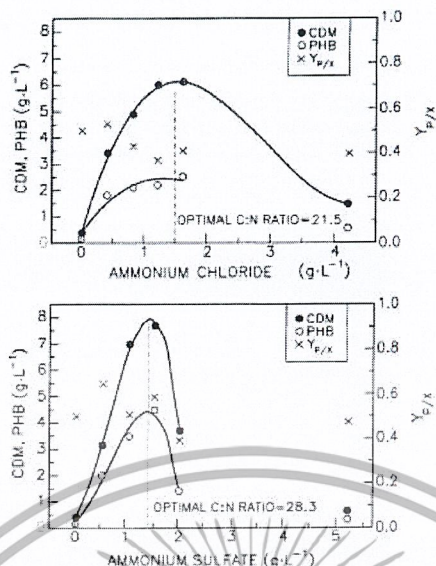
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.10 ค่าความแตกต่างทางสถิติของ PHA ในเชื้อ *A. eutrophus* TISTR 1403 และ PHB1

แหล่งคาร์บอน	ประสิทธิภาพการผลิต PHA	
	<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
น้ำที่จากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม	0.04048 de	0.23844 b
กากน้ำตาล	0.04587 cde	0.01745 e
น้ำมันมะพร้าว	0.10436 cd	0.39019 a

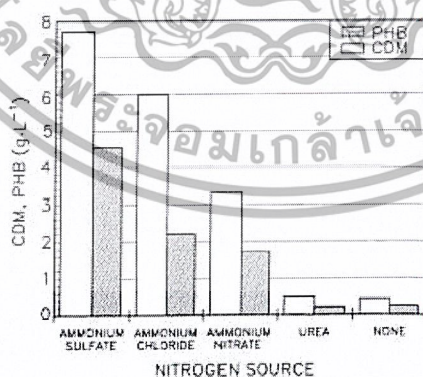
ที่มา : ซลิตา และคณะ (2544)

จากความสัมพันธ์ของปริมาณไนโตรเจน ปริมาณคาร์บอน และประสิทธิภาพการผลิต PHA และ PHB พบว่าแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณไนโตรเจนและคาร์บอนเป็นองค์ประกอบในปริมาณน้อย ได้แก่ น้ำมันมะพร้าว หางนม จะมีความสามารถในการผลิต PHA และ PHB ตามลำดับได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงกว่า (ซลิตา และคณะ, 2544) แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในหลายๆ ความเข้มข้นในการทดลอง ดังรูปที่ 2.8 ทั้งชีวมวลและ PHB แสดงให้เห็นถึงผลผลิตสูงสุดที่ 1.5 กรัมต่อลิตร ของแอมโมเนียมคลอไรด์ และ 1.0 กรัมต่อลิตรของแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งข้อมูลจะแสดงให้เห็นถึงส่วนที่สูงสุดและต่ำสุดไปในทางเดียวกัน แต่ในเกลือทั้งสองจะมีความเข้มข้นแตกต่างกัน ซึ่งผลผลิตที่ได้จะค่อนข้างไวต่อการเปลี่ยนแปลงในความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต สัมประสิทธิ์ของผลผลิตที่จำเพาะ $Y_{p/x}$ ค่อนข้างที่จะไม่ไวต่ออัตราของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ถึงแม้ว่า ค่าของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสำหรับผลิต PHB ดีที่สุดแต่ค่า $Y_{p/x}$ จะไม่สูงที่สุดตามไปด้วย ชีวมวลที่สูงที่สุดและความเข้มข้นของ PHB จะได้มาจากแอมโมเนียมซัลเฟต (ซลิตา และคณะ, 2544)



รูปที่ 2.8 รูปแบบของแหล่งไนโตรเจนและอัตราของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในมวลชีวภาพ (cell dry mass; CDM), PHB และสัมประสิทธิ์ของผลผลิตที่ได้
ที่มา : Grothe และคณะ (1999)

ส่วนรูปที่ 2.9 แสดงการเปรียบเทียบของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ และชีวมวล พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตจะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด รองลงมาคือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย ตามลำดับ (Grothe และคณะ, 1999)



รูปที่ 2.9 แหล่งไนโตรเจนในชีวมวล (Cell dry mass; CDM) และผลผลิต PHB ที่อัตราของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม
ที่มา : Grothe และคณะ (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อ

1. ตะเกียงแอลกอฮอล์
2. ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
3. เครื่องชั่ง
4. ช้อนตักสาร (spatular)
5. คิวเวตต์ (cuvette)
6. ปิเปตต์ (pipette)
7. rack
8. mixer
9. กระจบกดดวง
10. หลอดเซนตริฟิวจ์
11. อ่างน้ำร้อน (water bath)
12. เครื่องเขย่า (shaker)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
14. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) shimadzu รุ่น uv-1601
15. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
16. ตู้บ่มเชื้อ (hot air oven)
17. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อไฟฟ้า (autoclave)
18. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
19. ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ -20 และ -85 องศาเซลเซียส
20. เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dry)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณ PHA

1. หลอดทดลองฝาเกลียว
2. หลอด viole ขนาดเล็ก
3. ปิเปตต์
4. เต้าแก๊ส
5. rack

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-3-ไฮเดรต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)
2. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
3. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)
4. แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
5. โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)
6. ยูเรีย (NH_2CONH_2)
7. หางนม (whey)
8. น้ำกลั่น 2 ครั้ง (double distilled water)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด PHA

1. Polyhydroxyalkanoate (PHA)
2. สารละลายคลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$)

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 ·7H ₂ O	0.2 กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2 กรัม
หางนม	20 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนหางนมนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* PHB1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ธรรมชาติที่คัดเลือกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำโดยสายพันธุ์นี้สามารถย่อยสลาย PHB (เดชา และคณะ, 2543) และยังสามารถผลิต PHB ได้ (ชลิตา และคณะ, 2544)

3.5 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.5.1 การถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็งเพื่อทำการเก็บรักษา

1. เชื้อเชื้อเริ่มต้นลงบนอาหารแข็ง NA slant แล้วปิดจุกด้วยสำลี
2. บ่มที่อุณหภูมิห้อง 12-24 ชั่วโมง
3. เก็บเชื้อไว้ในตู้เย็นเพื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (inoculum)

1. เชื้อเชื้อจากหลอดอาหารแข็ง NA slant 2-3 loop ลงในอาหารเหลว NB
2. นำไปบ่มในเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

3.5.3 การเตรียมธาตุอาหารหลักที่ความเข้มข้นต่างๆ

1. เตรียมอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้หางนม 10, 20, 30 และ 40 กรัมต่อปริมาตรอาหาร 1 ลิตร ตามลำดับ เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม
2. เตรียมอาหาร PHB medium ที่มีความเข้มข้นของหางนมที่เหมาะสมโดยใช้ (NH₄)₂SO₄, KNO₃ และ urea ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนต่างๆ เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-ซั่ง $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

-ซั่ง KNO_3 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

-ซั่ง Urea 0.04, 0.08, 0.12 และ 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

3. การเตรียมอาหาร PHB medium ที่มีความเข้มข้นของหางนมที่เหมาะสม โดยใช้ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ และ KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสเฟตที่มีความเข้มข้น 0.40, 0.45, 0.50 และ 0.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการซั่ง $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.28, 0.32, 0.36 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ KH_2PO_4 0.48, 0.54, 0.60 และ 0.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับผสมในสูตรอาหาร เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งฟอสเฟตที่เหมาะสม
4. การเตรียมอาหาร PHB medium ที่มีความเข้มข้นของหางนมที่เหมาะสม โดยใช้ K_2SO_4 0.22, 0.67, 1.11 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ที่มีความเข้มข้นของโพแทสเซียมเท่ากับ 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งโพแทสเซียมที่เหมาะสม โดยใช้ Na_2HPO_4 และ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ แทน $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ และ KH_2PO_4 ในอาหาร

3.5.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. ถ่ายเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วจนได้ OD_{600} เท่ากับ 0.5 ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร PHB medium ที่มีธาตุอาหารหลักที่ความเข้มข้นต่างๆตามที่ได้เตรียมไว้
2. บ่มในอุณหภูมิห้องแล้วเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

3.6 วิธีการวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

3.6.1 วิธีการวัดการเจริญเติบโตจากค่าการดูดกลืนแสง (OD)

1. นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรทุก 4 ชั่วโมง
2. เขียนกราฟการเจริญเติบโตแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{600} กับเวลา(ชั่วโมง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2 วิธีการวัดการเจริญเติบโตจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight)

1. นำน้ำหนักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ทุก 4 ชั่วโมง มาทำการปั่นเหวี่ยง 150 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 5,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
2. นำ pellet ที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง แล้วเทใส่หลอดพลาสติก
3. นำไปแช่แข็งที่ -85 องศาเซลเซียส แล้วนำไปประเหิดแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze dry) เป็นเวลาประมาณ 10 ชั่วโมง
4. นำไปชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งแล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง)

วิธีการคำนวณปริมาณเซลล์

$$\text{ความเข้มข้นของเซลล์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม)}}{\text{ปริมาตรน้ำหนัก 150 มิลลิลิตร}}$$

3.6.3 วิธีการสกัดแยก PHA จากจุลินทรีย์

1. นำเซลล์ที่ได้จากการระเหิดแห้งมาเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจากนั้นจึงทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการ Freeze thaw ที่อุณหภูมิ 85 และอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สลับกันครั้งละ 10 นาที
2. เทลงในหลอดฝาเกลียวแล้วเติมคลอโรฟอร์ม 4 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท
3. นำไปต้มในน้ำเดือด 3.5 ชั่วโมง ที่ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมคลอโรฟอร์มให้ครบ 4 มิลลิลิตร
4. ดูดส่วนที่เป็นคลอโรฟอร์มชั้นล่างมา 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร
5. เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดส่วนที่เป็นคลอโรฟอร์มมา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด viloe ขนาดเล็กนำไปอบในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสให้แห้ง
6. ชั่งน้ำหนักแห้ง PHA แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ PHA dry weight (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการคำนวณปริมาณ PHA

$$\text{ความเข้มข้นของ PHA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้ง PHA (มิลลิกรัม)} \times 2}{\text{ปริมาตรน้ำหมัก 150 มิลลิลิตร}}$$

$$\text{ประสิทธิภาพในการผลิต PHA ของเซลล์} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ PHA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย

4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของหางนม

เมื่อนำหางนมมาทดสอบเพื่อหาองค์ประกอบต่างๆที่มีในหางนมเช่น ไนโตรเจน ฟอสเฟต โปแทสเซียม เป็นต้น พบว่า องค์ประกอบของหางนมมีปริมาณดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของหางนม

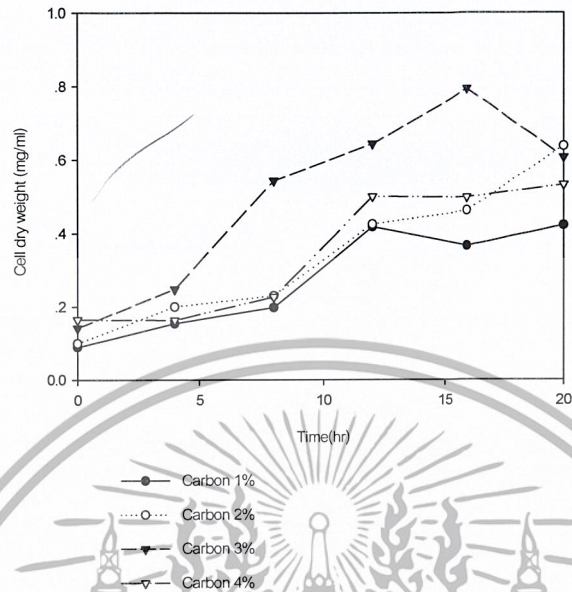
องค์ประกอบ	วิธีการทดสอบ	ปริมาณสาร
ไนโตรเจน	Kjeldahl	5.22 เปอร์เซ็นต์
ฟอสเฟต	AOAC(1995)965.17	967.40 มิลลิกรัมฟอสเฟตต่อ 100กรัม
โปแทสเซียม	Based on AOAC(2000)985.35	1.21 เปอร์เซ็นต์

ที่มา : SGS (Thailand) Limited-Laboratory Services (2003)

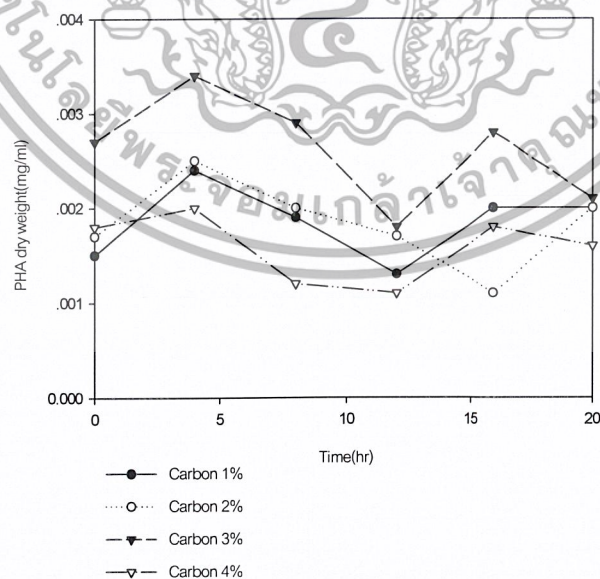
4.2 การศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ของเชื้อ *Bacillus cereus* PHB1

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นของ *Bacillus cereus* PHB1 ในอาหาร Nutrient Broth เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายลงในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีปริมาณของหางนมเท่ากับ 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วทำการเก็บเซลล์ทุกๆ 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าเซลล์จะมีอัตราการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 4-8 และมีอัตราการผลิต PHA สูงสุดในชั่วโมงที่ 4 ดังรูปที่ 4.1 และ 4.2 เซลล์ที่เจริญเติบโตในสูตรอาหารที่มีปริมาณของหางนม 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตปริมาณ PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีประสิทธิภาพการผลิต PHA เท่ากับ 0.0170 มิลลิกรัม PHA ต่อมิลลิกรัมเซลล์ ความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตและการผลิต PHA ดังแสดงในรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

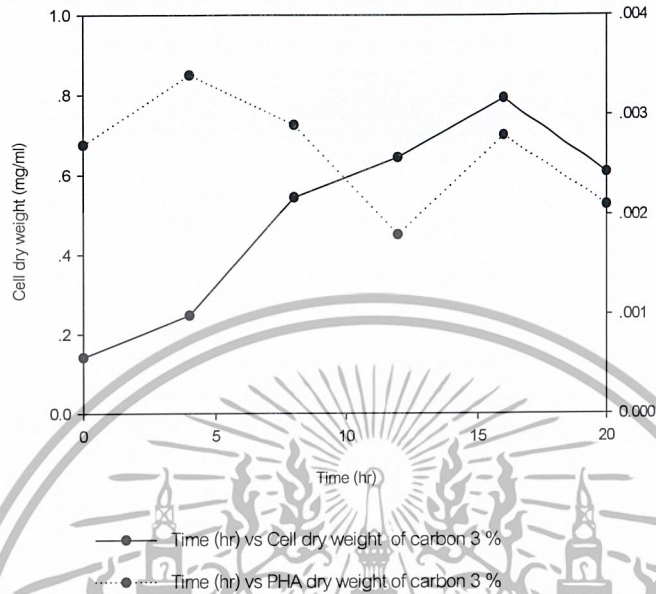


รูปที่ 4.1 ปริมาณ Cell dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่ต่างกัน



รูปที่ 4.2 ปริมาณ PHA dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

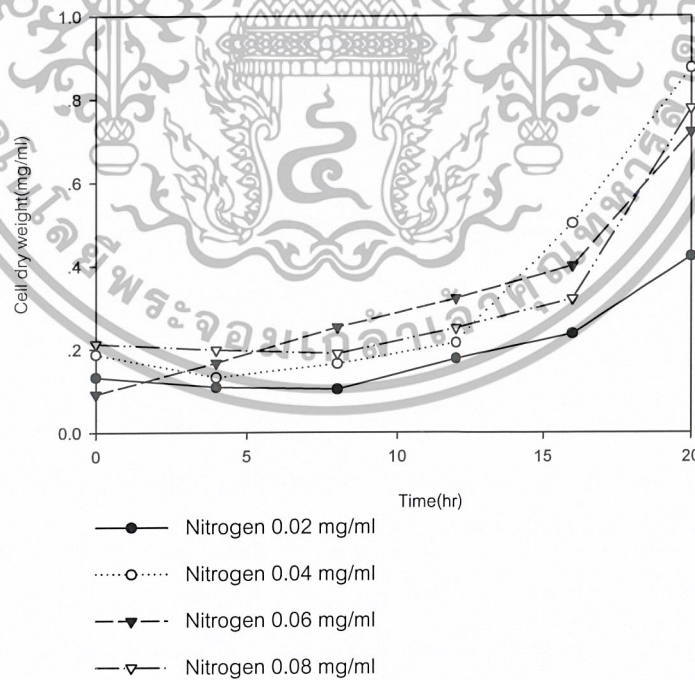


รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight (mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีปริมาณของหางนม 3 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถผลิต PHA ได้สูงสุด

4.3 การศึกษาปริมาณของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ของเชื้อ *Bacillus cereus* PHB1

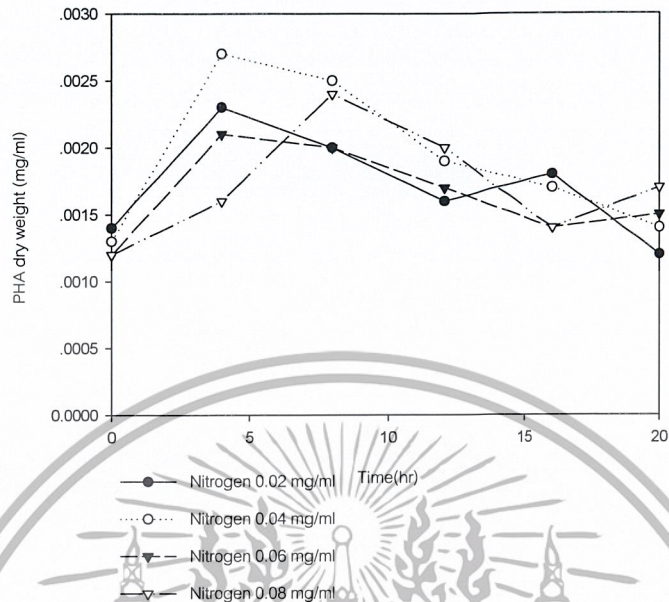
4.3.1 การศึกษาปริมาณของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ของเชื้อ *Bacillus cereus* PHB1 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นของ *Bacillus cereus* PHB1 ในอาหาร Nutrient Broth เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายลงในอาหาร PHB medium ที่มีปริมาณไนโตรเจนอยู่ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (โดยที่มีปริมาณของไนโตรเจน 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) แล้วทำการเก็บเซลล์ทุกๆ 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าเซลล์จะมีอัตราการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 12-16 และมีอัตราการผลิต PHA สูงสุดในชั่วโมงที่ 4 ดังรูปที่ 4.4 และ 4.5 เซลล์ที่เจริญเติบโตในสูตรอาหารที่มีปริมาณของไนโตรเจน 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถผลิตปริมาณ PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0027 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และประสิทธิภาพการผลิต PHA เท่ากับ 0.0204 มิลลิกรัม PHA ต่อมิลลิกรัมเซลล์ ความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHA ดังแสดงในรูปที่ 4.6

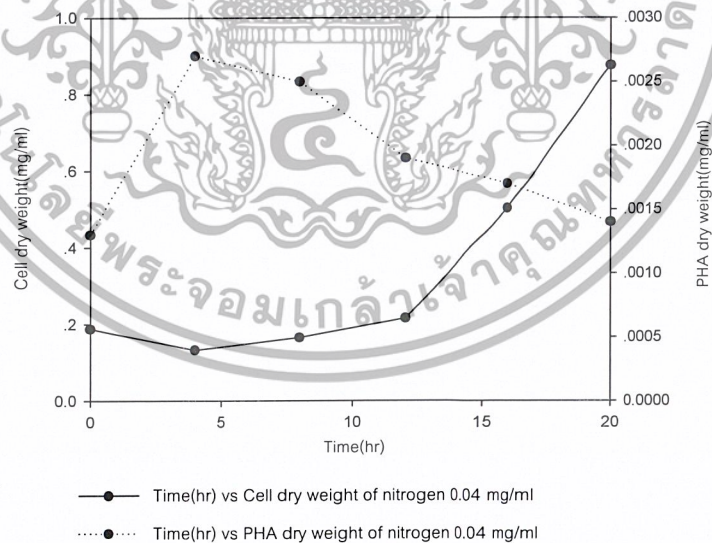


รูปที่ 4.4 ปริมาณ Cell dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ปริมาณ PHA dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน

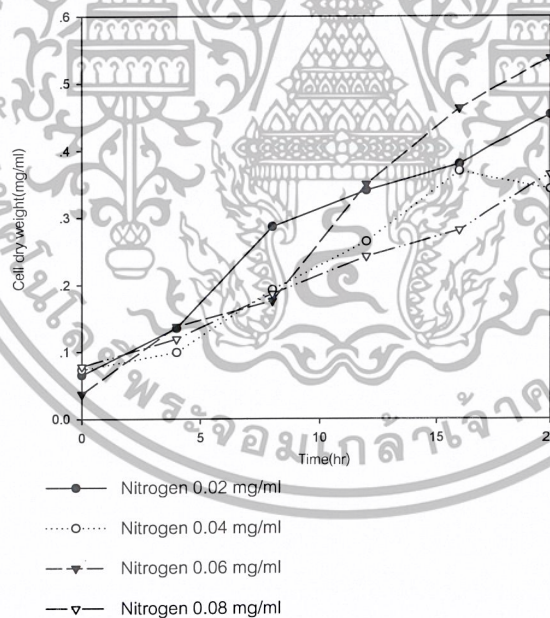


รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight (mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีปริมาณของไนโตรเจน 0.04 mg/ml ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตที่สามารถผลิต PHA ได้สูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

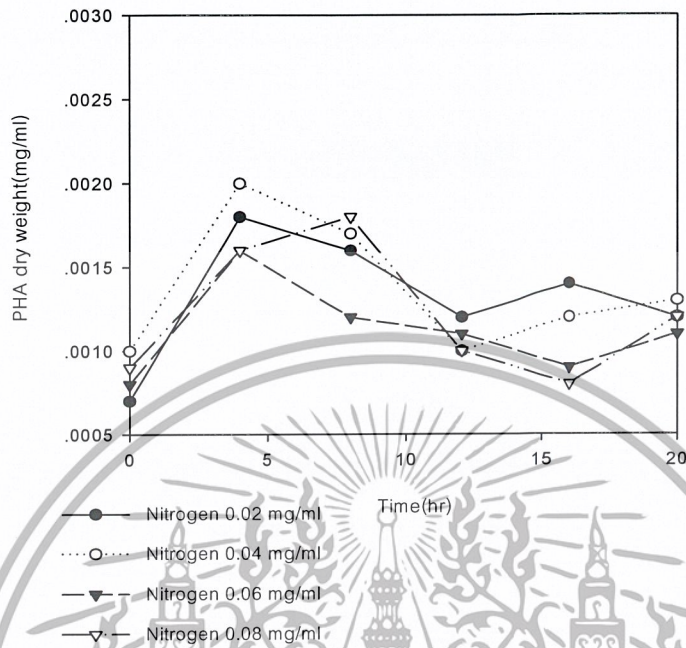
4.3.2 การศึกษาปริมาณของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ของเชื้อ *Bacillus cereus* PHB1 โดยใช้โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) เป็นแหล่งไนโตรเจน

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นของ *Bacillus cereus* PHB1 ในอาหาร Nutrient Broth เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายลงในอาหาร PHB medium ที่มีปริมาณไนโตรเจนอยู่ในรูปของโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) 0.20, 0.30, 0.40 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (โดยที่มีปริมาณของไนโตรเจน 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) แล้วทำการเก็บเซลล์ทุกๆ 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าเซลล์จะมีอัตราการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 4-8 และ 8-12 ซึ่งมีอัตราการผลิต PHA สูงสุดในชั่วโมงที่ 4 ดังรูปที่ 4.7 และ 4.8 เซลล์ที่มีการเจริญเติบโตในสูตรอาหารที่มีปริมาณของไนโตรเจน 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถผลิตปริมาณ PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0020 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและประสิทธิภาพของการผลิต PHA เท่ากับ 0.0126 มิลลิกรัม PHA ต่อมิลลิกรัมเซลล์ ความสัมพันธ์ของการการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHA ดังแสดงในรูปที่ 4.9

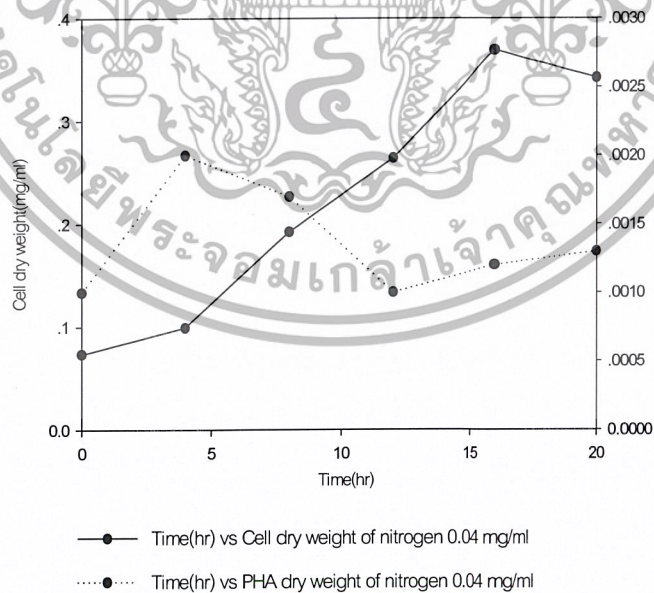


รูปที่ 4.7 ปริมาณ Cell dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มีโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ปริมาณ PHA dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มีโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน



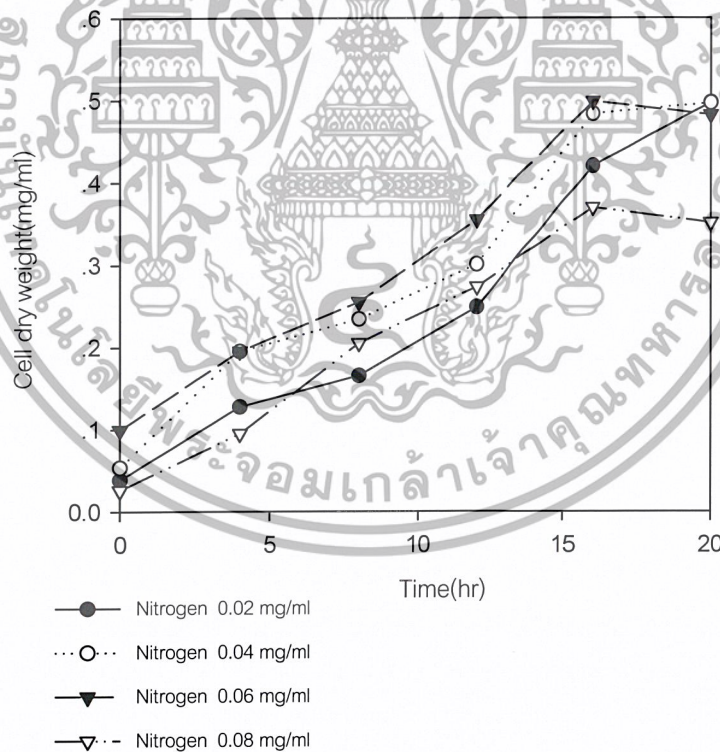
รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight (mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีปริมาณของไนโตรเจน 0.04 mg/ml ในรูปของโพแทสเซียมไนเตรทที่สามารถผลิต PHA

ได้สูงที่สุด

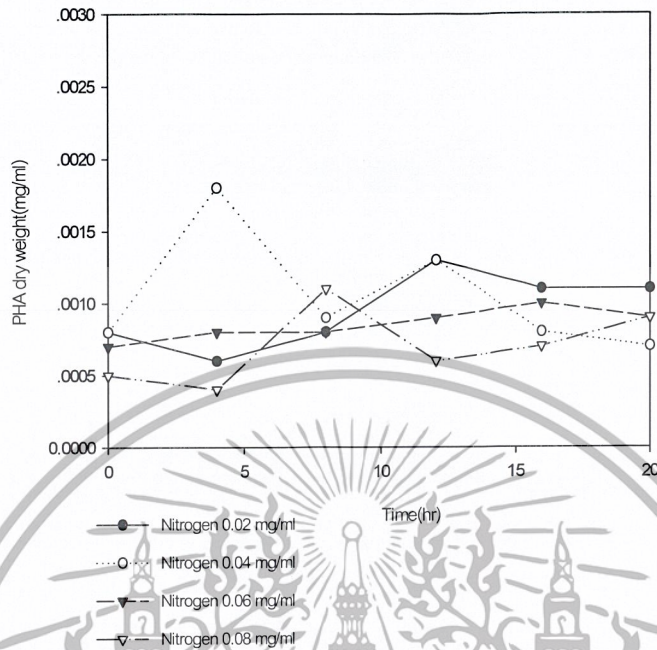
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 การศึกษาปริมาณของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ของเชื้อ *Bacillus cereus* PHB1 โดยให้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

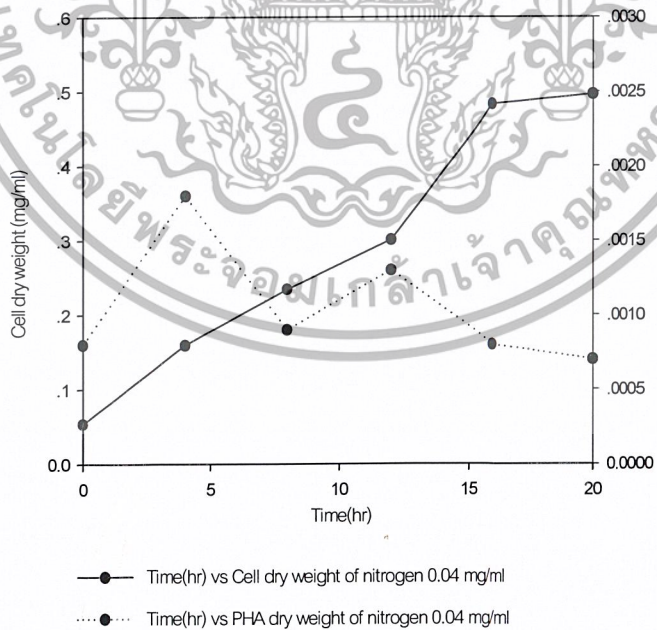
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นของ *Bacillus cereus* PHB1 ในอาหาร Nutrient Broth เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายลงในอาหาร PHB medium ที่มีปริมาณไนโตรเจนอยู่ในรูปของยูเรีย (NH_2CONH_2) 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (โดยที่มีปริมาณของไนโตรเจน 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) แล้วทำการเก็บเซลล์ทุกๆ 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าเซลล์จะมีอัตราการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 12-16 และมีอัตราการผลิต PHA สูงสุดในชั่วโมงที่ 4 ดังรูปที่ 4.10 และ 4.11 เซลล์ที่เจริญเติบโตในสูตรอาหารที่มีปริมาณของไนโตรเจน 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถผลิตปริมาณ PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0018 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และประสิทธิภาพการผลิต PHA เท่ากับ 0.0182 มิลลิกรัม PHA ต่อมิลลิกรัม เซลล์ ความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHA ดังแสดงในรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.10 ปริมาณ Cell dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีปริมาณต่างกัน



รูปที่ 4.11 ปริมาณ PHA dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีปริมาณต่างกัน

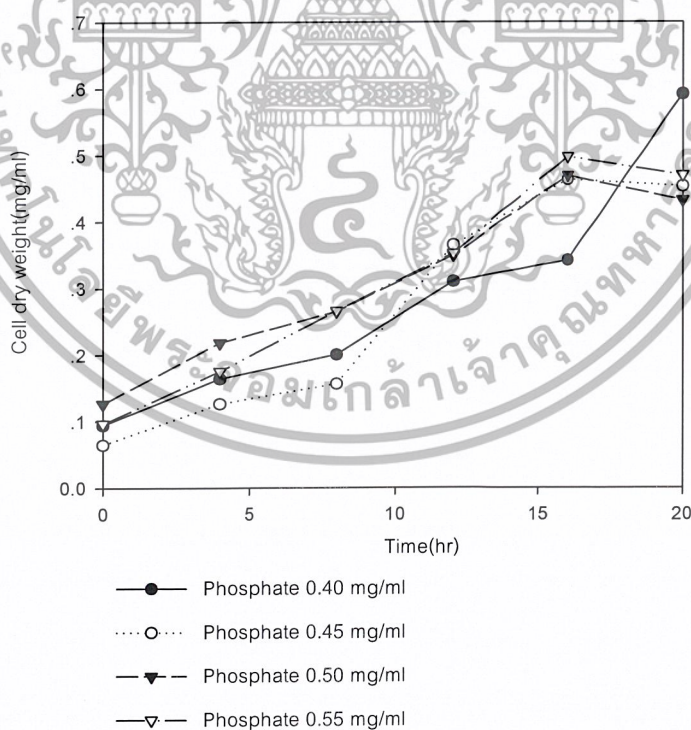


รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight(mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีปริมาณของไนโตรเจน 0.04 mg/ml ในรูปของยูเรียที่สามารถผลิต PHA ได้สูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

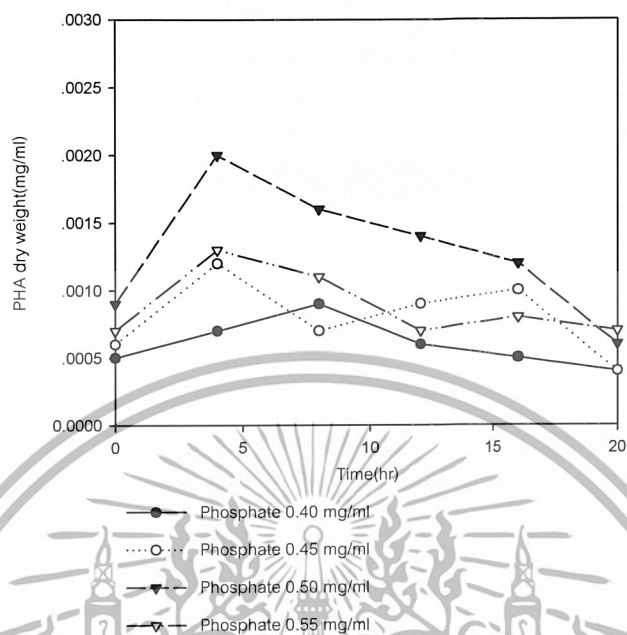
4.4 การศึกษาปริมาณของฟอสฟอรัสที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ของเชื้อ *Bacillus cereus* PHB1

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นของ *Bacillus cereus* PHB1 ในอาหาร Nutrient Broth เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายลงในอาหาร PHB medium ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสอยู่ในรูปของ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) 0.28, 0.32, 0.36 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.48, 0.54, 0.60 และ 0.66 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร เป็นแหล่งของฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต (โดยที่มีปริมาณของฟอสเฟตทั้งหมด 0.40, 0.45, 0.50 และ 0.55 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ) แล้วทำการเก็บเซลล์ทุกๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าเซลล์จะมีอัตราการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 8-12 และมีอัตราการผลิต PHA สูงสุดในชั่วโมงที่ 4 ดังรูปที่ 4.13 และ 4.14 เซลล์ที่เจริญเติบโตในสูตรอาหารที่มีปริมาณของ ฟอสเฟต 0.50 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร สามารถผลิตปริมาณ PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0020 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร และประสิทธิภาพการผลิต PHA เท่ากับ 0.0158 มิลลิกรัม PHA ต่อ มิลลิกรัมเซลล์ ความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHA ดังแสดงในรูปที่ 4.15

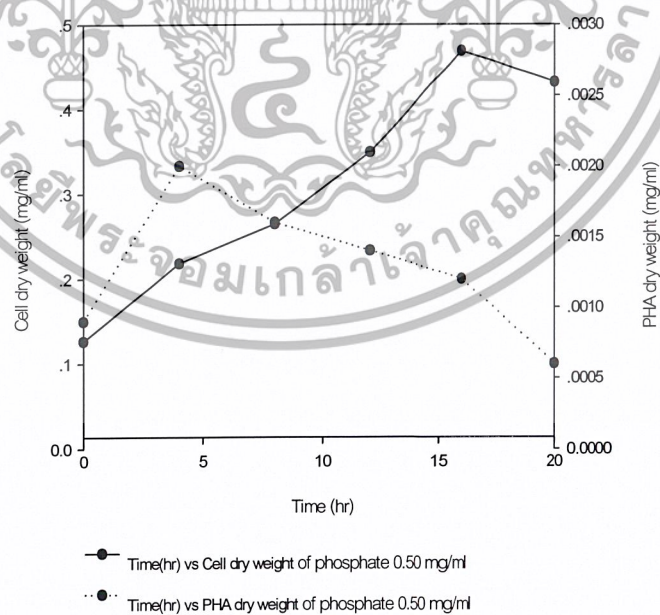


รูปที่ 4.13 ปริมาณ Cell dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มี $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ และ KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตที่มีปริมาณที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 ปริมาณ PHA dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มี $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ และ KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตที่มีปริมาณที่ต่างกัน

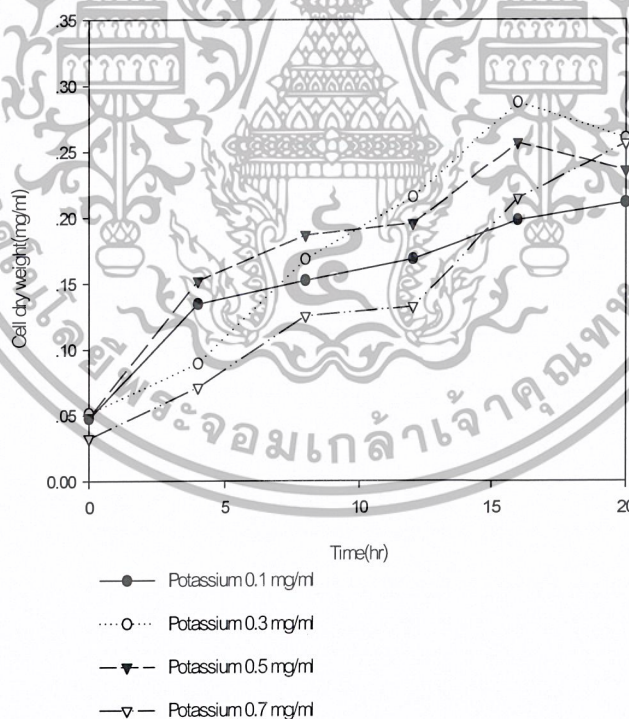


รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight (mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีปริมาณของฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต 0.50 mg/ml ที่สามารถผลิต PHA ได้สูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

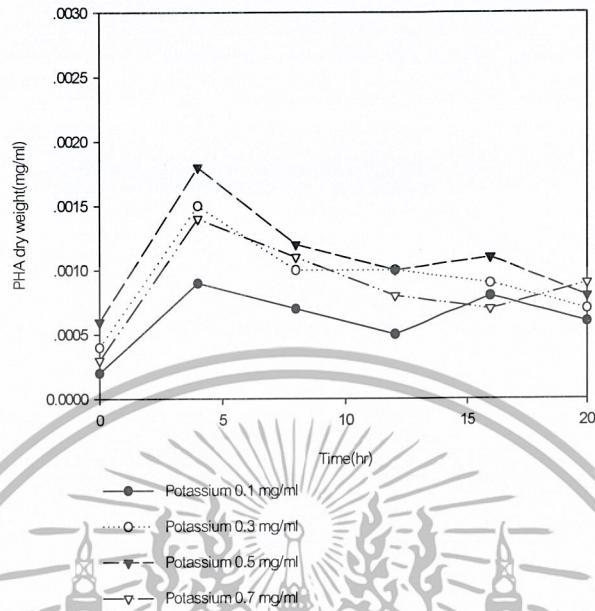
4.5 การศึกษาปริมาณของโพแทสเซียมที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ของเชื้อ *Bacillus cereus* PHB1

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นของ *Bacillus cereus* PHB1 ในอาหาร Nutrient Broth เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายลงในอาหาร PHB medium ที่มีปริมาณโพแทสเซียมอยู่ในรูปของโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 0.22, 0.67, 1.11 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (โดยที่มีปริมาณของฟอสเฟตทั้งหมด 0.10, 0.30, 0.50 และ 0.70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) แล้วทำการเก็บเซลล์ทุกๆ 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าเซลล์จะมีอัตราการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 4-8 และมีอัตราการผลิต PHA สูงสุดในชั่วโมงที่ 4 ดังรูปที่ 4.16 และ 4.17 เซลล์ที่เจริญเติบโตในสูตรอาหารที่มีปริมาณของโพแทสเซียม 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถผลิตปริมาณ PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0018 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และประสิทธิภาพการผลิต PHA เท่ากับ 0.0118 มิลลิกรัม PHA ต่อมิลลิกรัมเซลล์ ความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHA ดังแสดงในรูปที่ 4.18

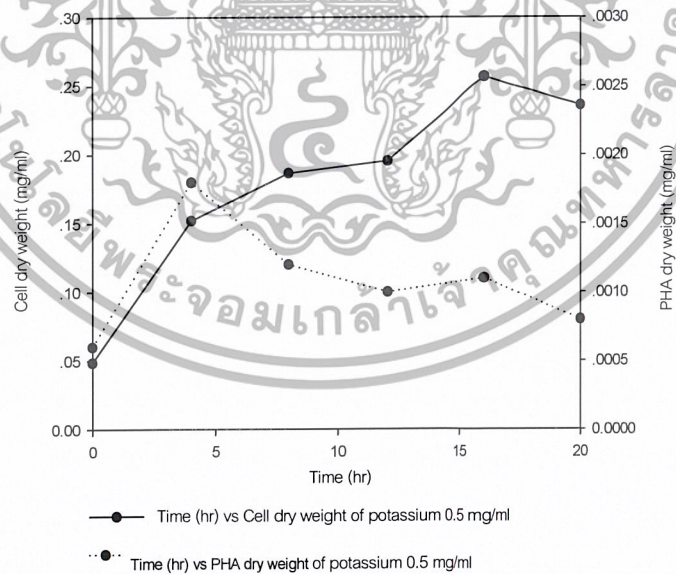


รูปที่ 4.16 ปริมาณ Cell dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มีโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) เป็นแหล่งโพแทสเซียมที่มีปริมาณต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 ปริมาณ PHA dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มีโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) เป็นแหล่งโพแทสเซียมที่มีปริมาณที่ต่างกัน



รูปที่ 4.18 ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight (mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ที่มีปริมาณของโพแทสเซียม 0.50 mg/ml ที่สามารถผลิต PHA ได้สูงที่สุด

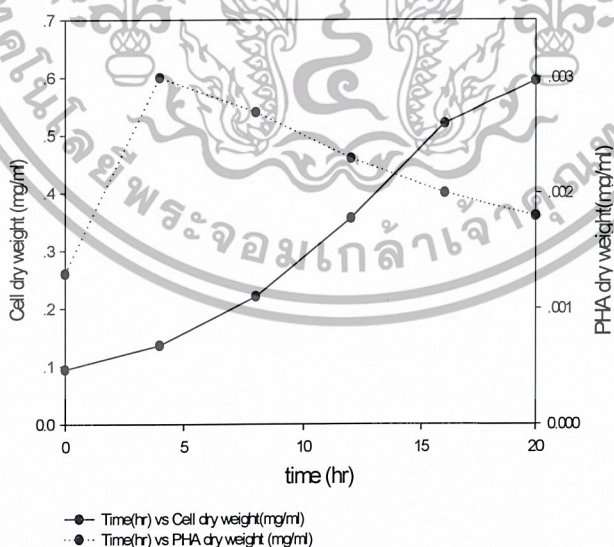
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การศึกษาการผลิต PHA ในอาหาร PHB medium ที่มีปริมาณของธาตุอาหารหลักในอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิต PHA ได้สูงสุดของเชื้อ *Bacillus cereus* PHB1

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อตั้งต้นของ *Bacillus cereus* PHB1 ในอาหาร Nutrient Broth เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายลงในอาหาร PHB medium ที่มีปริมาณของธาตุอาหารหลักในอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิต PHA จากการทดลองที่ผ่านมา ดังนี้

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.17	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
NaH_2PO_4	0.57	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.20	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
K_2SO_4	1.10	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
หางนม	30	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

แล้วทำการเก็บเซลล์ทุกๆ 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าเซลล์จะมีอัตราการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 8-12 และมีอัตราการผลิต PHA สูงสุดในชั่วโมงที่ 4 โดยได้ปริมาณ PHA เท่ากับ 0.0030 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีประสิทธิภาพการผลิต PHA เท่ากับ 0.0220 มิลลิกรัม PHA ต่อมิลลิกรัมเซลล์ ความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHA ดังรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 ความสัมพันธ์ระหว่าง Cell dry weight (mg/ml) และ PHA dry weight (mg/ml) ในอาหาร PHB medium ที่มีปริมาณของธาตุอาหารหลักในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สามารถผลิต PHA ได้สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักในอาหาร PHB medium เพื่อใช้ในการผลิต PHA ของเชื้อ *Bacillus cereus* เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่า หางนม 3 เปอร์เซ็นต์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณการผลิต PHA สูงสุด การหาความเข้มข้นของไนโตรเจนจะใช้แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไนเตรท และยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน และพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นของไนโตรเจน 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีปริมาณการผลิต PHA สูงสุด ผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Grothe และคณะ (1999) ซึ่งพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตจะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด รองลงมาคือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย ตามลำดับ ดังรูปที่ 2.12 ส่วนการหาความเข้มข้นของฟอสฟอรัสจะใช้ในรูปของฟอสเฟตซึ่งได้มาจาก ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟตรวมกัน 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้มีปริมาณการผลิต PHA สูงสุด และการหาความเข้มข้นของโพแทสเซียมจะใช้ไดโพแทสเซียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสเฟต จะมีปริมาณการผลิต PHA สูงที่สุด

เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA ที่ผลิตได้จาก PHB medium ที่ยังไม่ได้ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักและอาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก โดยเชื้อ *Bacillus cereus* PHB1 ดังตารางที่ 4.2 พบว่าในชั่วโมงที่ 0-4 เซลล์สามารถผลิต PHA ได้ในปริมาณที่มากแต่ในชั่วโมงที่ 4 เซลล์จะสามารถผลิตได้มากที่สุด เนื่องจากในชั่วโมงที่ 0 เซลล์กำลังปรับสภาวะภายในเซลล์จึงยังไม่สามารถผลิต PHA ได้เต็มที่ ส่วนในชั่วโมงที่ 4 เซลล์กำลังเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนมากขึ้นทำให้มีปริมาณการผลิต PHA สูงตามไปด้วย ส่วนชั่วโมงที่ 8-20 เซลล์เติบโตเต็มที่และเริ่มคงที่ทำให้มีปริมาณการผลิต PHA คงที่ และเริ่มลดลงในช่วงสุดท้ายเนื่องจากอาหารได้ถูกใช้ไปในการเจริญเติบโตในช่วงแรก ทำให้เซลล์เหลืออาหารไม่เพียงพอที่จะนำไปผลิต PHA ในช่วงสุดท้ายส่งผลให้การผลิต PHA ลดลงตามไปด้วย

ตารางที่ 4.2 ค่าความแตกต่างทางสถิติของ PHA ในอาหาร PHB medium ที่ยังไม่ได้ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักและอาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก

ชั่วโมงที่	ประสิทธิภาพของการผลิต PHA (mg/ml)	
	อาหาร PHB medium ที่ยังไม่ได้ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก	อาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก
0	0.0180 ^{ab}	0.0147 ^{ab}
4	0.0125 ^{ab}	0.0220 ^a
8	0.0089 ^b	0.0124 ^b
12	0.0040 ^b	0.0065 ^b
16	0.0023 ^c	0.0039 ^{bc}
20	0.0034 ^{bc}	0.0031 ^{bc}

ค่าเฉลี่ยใดที่ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยใช้วิธี Student-Newman-Keuls Method ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ในการเปรียบเทียบการผลิต PHA ในอาหาร PHB medium ที่ยังไม่ได้ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ในชั่วโมงที่ 0, 4, 8, 12, 16 และ 20 พบว่า ในชั่วโมงที่ 0 มีประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุด เท่ากับ 0.0180 มิลลิกรัม PHA ต่อ มิลลิกรัม เซลล์ ตามด้วยชั่วโมงที่ 4, 8, 12, 20 และ 16 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0125, 0.0089, 0.0040, 0.0034 และ 0.0023 มิลลิกรัม PHA ต่อ มิลลิกรัม เซลล์ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่า ในชั่วโมงที่ 0 มีประสิทธิภาพการผลิต PHA ไม่แตกต่างจากชั่วโมงที่ 4, 8, 12, 20 แต่จะแตกต่างจากชั่วโมงที่ 16 อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในอาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักแล้ว พบว่าชั่วโมงที่ 4 มีประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุด เท่ากับ 0.0220 มิลลิกรัม PHA ต่อ มิลลิกรัม เซลล์ ตามด้วยชั่วโมงที่ 0, 8, 12, 16 และ 20 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0147, 0.0124, 0.0065, 0.0039 และ 0.0031 มิลลิกรัม PHA ต่อ มิลลิกรัม เซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่าในชั่วโมงที่ 4 ไม่แตกต่างจากชั่วโมงที่ 0 แต่แตกต่างจากชั่วโมงที่ 8, 12, 16 และ 20 อย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA ในอาหารทั้ง 2 ประเภท พบว่าอาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักในชั่วโมงที่ 0-4 ไม่แตกต่างจากอาหาร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PHB medium ที่ยังไม่ได้ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อ
มั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่อาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักมีประสิทธิ
ภาพการผลิตโดยส่วนใหญ่สูงกว่าการเลี้ยงในอาหาร PHB medium ที่ยังไม่ได้ปรับความเข้มข้น
ของธาตุอาหารหลัก อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบทั้งอาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้น
ของธาตุอาหารหลักและอาหาร PHB medium ที่ยังไม่ได้ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักใน
แต่ละชั่วโมงพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95
เปอร์เซ็นต์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการผลิต PHA ของเชื้อ *Bacillus cereus* PHB1 ในสูตรอาหาร PHB medium ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก พบว่า ปริมาณของหางนม 3 เปอร์เซ็นต์ ผลิต PHA ได้เท่ากับ 0.0034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณไนโตรเจน 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต สามารถผลิต PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0027 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถผลิต PHA ได้ดีกว่าการใช้ไนโตรเจนในรูปของยูเรีย และโพแทสเซียมไนเตรท ปริมาณฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถผลิต PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0020 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโพแทสเซียม 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถผลิต PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0018 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นสูตรอาหาร PHB medium ที่เหมาะสมที่จะสามารถทำให้ผลิต PHA ได้สูงที่สุดคือ

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.17	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
NaH_2PO_4	0.57	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.20	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
K_2SO_4	1.10	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
หางนม	30	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการเปรียบเทียบการผลิต PHA ในอาหาร PHB medium ที่ยังไม่ได้ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก พบว่า ในชั่วโมงที่ 0 มีประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุด เท่ากับ 0.0180 มิลลิกรัม PHA ต่อมิลลิกรัมเซลล์ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่า ในชั่วโมงที่ 0 มีประสิทธิภาพการผลิต PHA ไม่แตกต่างจากชั่วโมงที่ 4, 8, 12, 20 แต่จะแตกต่างจากชั่วโมงที่ 16 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักแล้ว พบว่าชั่วโมงที่ 4 มีประสิทธิภาพการผลิต PHA สูงสุด เท่ากับ 0.0220 มิลลิกรัม PHA ต่อมิลลิกรัมเซลล์ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่าในชั่วโมงที่ 4 ไม่แตกต่างจากชั่วโมงที่ 0 แต่แตกต่างจากชั่วโมงที่ 8, 12, 16 และ 20 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

อาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักในชั่วโมงที่ 0-4 ไม่แตกต่าง

จากอาหาร PHB medium ที่ยังไม่ได้ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักอย่างมีนัยสำคัญที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่อาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักมีประสิทธิภาพการผลิตโดยส่วนใหญ่สูงกว่าการเลี้ยงในอาหาร PHB medium ที่ยังไม่ได้ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHA ทั้งในอาหาร PHB medium ที่ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักและอาหาร PHB medium ที่ยังไม่ได้ปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

ประสิทธิภาพการผลิต PHA โดยจุลินทรีย์ นอกจากจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักที่เหมาะสมแล้ว ความเข้มข้นของธาตุอาหารรอง ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส แมกนีเซียม และสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ pH อุณหภูมิ แสง ความดัน ยังมีความสำคัญต่อการผลิต PHA ด้วย ดังนั้นจึงควรศึกษาปริมาณความเข้มข้นของธาตุอาหารรองและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการผลิต PHA และควรศึกษาถึงสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ fed bath และ continuous เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการผลิต PHA มากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

วิวรรณ ธรรมมงคล, <http://kanchanapisek.or.th/amf/article/2.th>, ศูนย์วิจัยและพัฒนาปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย. 2001.

สุวิทย์ เทียมธำรา, <http://web.ku.achoolnet/topic8/topic8113.html>, สถาบันส่งเสริมการสอนและเทคโนโลยี (สสวท), 2000.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, <http://16.brinkster.com/doawebboard/Question.asp?GID=240,2544>.

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

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. and Syldatk, Ch. Polyhydroxyalkanoates degradation. Microbial Bioproducts, 76-92, 1995.

Amos, D.A. and McInerney, M.J. Abstract of the annual meeting of the American Society for Microbiology. 78. In 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. and Syldatk, Ch. (eds.) Polyhydroxyalkanoates degradation. Microbial Bioproducts. 76-92, 1995.

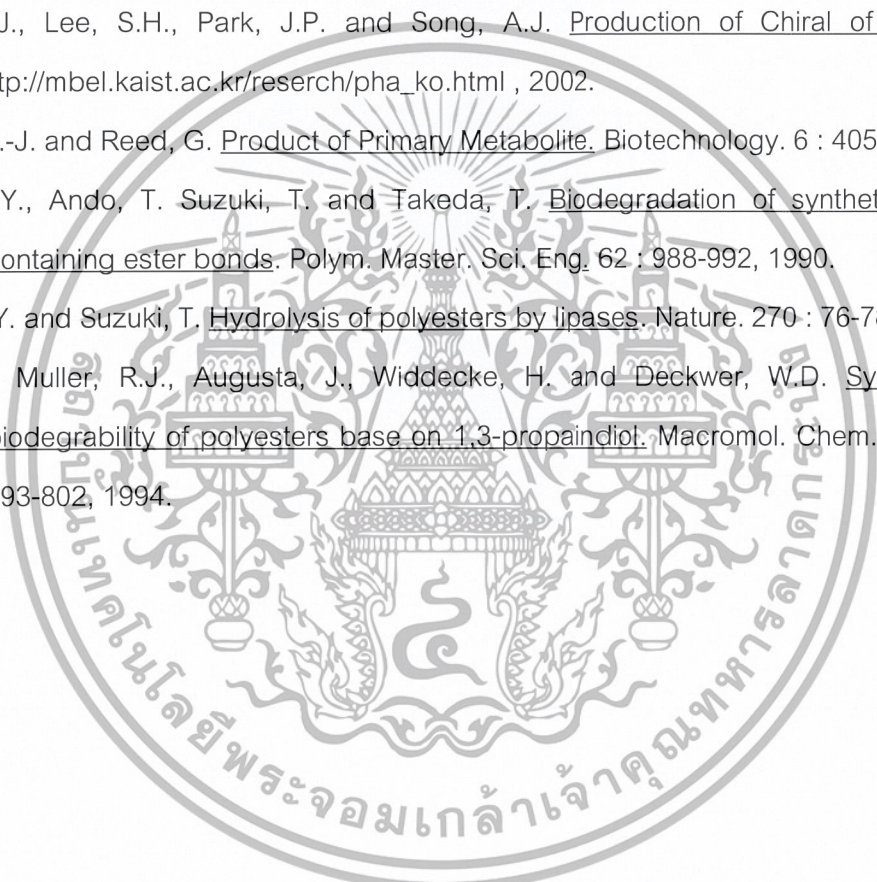
Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W. and Fuller, R.C. Abstract of the annual meeting of the American Society for Microbiology. 86. In Agarwal, G.P., de Boer, L., Brandl, H., Dijkhuizen, L., Fuller, R.C., Gross, R. A., Hoke, H., Laufer, A., Lenz, R.W., Muller, R. and Syldatk, Ch. (eds.) Polyhydroxyalkanoates degradation. Microbial Bioproducts, 76-92, 1995.

Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K. Macromolecules. 86. In 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. and Syldatk, Ch. (eds.) Polyhydroxyalkanoates degradation. Microbial Bioproducts. 76-92, 1995.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K. Macromolecules. 86. In 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. and Syldatk, Ch. (eds.) Polyhydroxyalkanoates degradation. Microbial Bioproducts. 76-92, 1995.
- Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M. and Soga, K. Macromolecule. 86. In 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. and Syldatk, Ch. (eds.) Polyhydroxyalkanoates degradation. Microbial Bioproducts. 76-92, 1995.
- Jendrossek, D., Schirmer, A. and Schlegel, H.G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acid. Appl. Microbiol Biotechnol. 46 : 451-463, 1996.
- Jia, Y., Kappock, T.J., Frick, T., Sinskey and Stubbe, J.A. Characterization of the functional residues in Chromatium vinosum PHB synthase. Biochemistry. 39 : 3927-3936, 2000.
- Kunioka, M., Tamaki, A. and Doi, Y. Macromolacule. Microbial Biotechnol. 22 : 694, 1989.
- Lee, H.O., Choi, M.H., Kim, T.U. and Yoon, S.C. Accumulation of Polyhydroxyalkanoic acid Containing Large Amounts of Unsaturated Monomer in Pseudomonas fluorescens BM07 Utilizing Saccharides and Its Inhibition by 2-Bromooctanoic acid. Appl. Environ. Microbiol. 67(11) : 4963-4974, 2001.
- Lee, S.Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Biotechnology and Bioengineering. 49 : 1-14, 1996.
- Lee, S.Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Trend. Biotechnol. 14 : 431-438, 1996.
- Lee, S.Y. and Choi., J.I. Polyhydroxyalkanoates : Biodegradable Polymer. Recombinant DNA Application. 616 - 627, 1997.
- Maskow, T. and Babel, W. Calorimetrically recognised maximum yield of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) continuously synthesized from toxic substrates. Biotechnol. 77 : 247-253, 2000.

- Page, W.J., Sherburne, R., Elia, L. and Graham, L.L. poly-(β -hydroxybutyrate) extrusion from pleomorphic cells of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Can. J. Microbiol.* 41 : 22-31, 1995.
- Park, S.J., Lee, S.H., Park, J.P. and Song, A.J. Polyhydroxyalkanoate(PHAs). http://mbel.kaist.ac.kr/reserch/pha_ko.html , 2002.
- Park, S.J., Lee, S.H., Park, J.P. and Song, A.J. Production of Chiral of compound. http://mbel.kaist.ac.kr/reserch/pha_ko.html , 2002.
- Rehm, H.-J. and Reed, G. Product of Primary Metabolite. *Biotechnology.* 6 : 405-452, 1996.
- Tokiwa, Y., Ando, T. Suzuki, T. and 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
- Witt, U., Muller, R.J., Augusta, J., Widdecke, H. and Deckwer, W.D. Synthesis and biodegradability of polyesters base on 1,3-propaindiol. *Macromol. Chem. Phys.* 195 : 793-802, 1994.



ภาคผนวก ก.

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ ก.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่ต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณหางนม 20 มิลลิกรัมต่อ ลิตร (1 เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณหางนม 20 มิลลิกรัมต่อ ลิตร (2 เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณหางนม 30 มิลลิกรัมต่อ ลิตร (3 เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณหางนม 40 มิลลิกรัมต่อ ลิตร (4 เปอร์เซ็นต์)
0	0.0894	0.0993	0.1419	0.1642
4	0.1536	0.1996	0.2473	0.1628
8	0.1975	0.2297	0.5436	0.2264
12	0.4179	0.4251	0.6436	0.5001
16	0.3653	0.4612	0.7931	0.4973
20	0.4212	0.6371	0.6064	0.5318

ตารางที่ ก.2 น้ำหนัก PHA แห้ง (cell dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium ที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่ต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณหางนม 10 มิลลิกรัมต่อ ลิตร (1 เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณหางนม 20 มิลลิกรัมต่อ ลิตร (2 เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณหางนม 30 มิลลิกรัมต่อ ลิตร (3 เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณหางนม 40 มิลลิกรัมต่อ ลิตร (4 เปอร์เซ็นต์)
0	0.0015	0.0017	0.0027	0.0018
4	0.0024	0.0025	0.0034	0.0020
8	0.0019	0.0020	0.0029	0.0012
12	0.0013	0.0017	0.0018	0.0011
16	0.0020	0.0011	0.0028	0.0018
20	0.0020	0.0020	0.0021	0.0016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.02 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.04 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.06 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.08 มิลลิกรัมต่อ ลิตร
0	0.1325	0.1874	0.0920	0.2133
4	0.1091	0.1323	0.1674	0.1987
8	0.1041	0.1650	0.2525	0.1895
12	0.1775	0.2154	0.3215	0.2503
16	0.2375	0.5024	0.4002	0.321
20	0.4231	0.8756	0.7221	0.7785

ตารางที่ ก.4 น้ำหนัก PHA แห้ง (cell dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน

เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.02 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.04 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.06 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.08 มิลลิกรัมต่อ ลิตร
0	0.0014	0.0013	0.0012	0.0012
4	0.0023	0.0027	0.0021	0.0016
8	0.0020	0.0025	0.0020	0.0024
12	0.0016	0.0019	0.0017	0.0020
16	0.0018	0.0017	0.0014	0.0014
20	0.0012	0.0014	0.0015	0.0017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.5 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium ที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน

เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.02 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.04 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.06 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.08 มิลลิกรัมต่อ ลิตร
0	0.0385	0.0537	0.0995	0.0261
4	0.1276	0.1592	0.1954	0.0948
8	0.1659	0.2342	0.2547	0.2050
12	0.2489	0.3008	0.3549	0.2734
16	0.4201	0.4832	0.4986	0.3697
20	0.4970	0.4965	0.4821	0.3512

ตารางที่ ก.6 น้ำหนัก PHA แห้ง (PHA dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium ที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน

เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.02 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.04 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.06 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.08 มิลลิกรัมต่อ ลิตร
0	0.0008	0.0008	0.0007	0.0005
4	0.0006	0.0018	0.0008	0.0004
8	0.0008	0.0009	0.0008	0.0011
12	0.0013	0.0013	0.0009	0.0006
16	0.0011	0.0008	0.0010	0.0007
20	0.0011	0.0007	0.0009	0.0009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium ที่มีโพแทสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน

เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.02 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.04 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.06 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.08 มิลลิกรัมต่อ ลิตร
0	0.0652	0.0734	0.0373	0.0782
4	0.1349	0.0991	0.1376	0.1192
8	0.2864	0.1923	0.1757	0.1863
12	0.3402	0.2641	0.3498	0.2419
16	0.3795	0.3691	0.4627	0.2810
20	0.4531	0.3422	0.5369	0.3642

ตารางที่ ก.8 น้ำหนัก PHA แห้ง (cell dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium ที่มีไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่ต่างกัน

เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.02 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.04 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.06 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ไนโตรเจน 0.08 มิลลิกรัมต่อ ลิตร
0	0.0007	0.0010	0.0008	0.0009
4	0.0018	0.0020	0.0016	0.0016
8	0.0016	0.0017	0.0012	0.0018
12	0.0012	0.0010	0.0011	0.0010
16	0.0014	0.0012	0.0009	0.0008
20	0.0012	0.0013	0.0011	0.0012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.9 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium ที่มีแหล่งฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ และ KH_2PO_4) ในปริมาณที่ต่างกัน

เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณ ฟอสเฟต 0.40 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ฟอสเฟต 0.45 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ฟอสเฟต 0.50 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ฟอสเฟต 0.55 มิลลิกรัมต่อ ลิตร
0	0.0942	0.0647	0.1264	0.0965
4	0.1642	0.1264	0.2183	0.1754
8	0.2004	0.1564	0.2649	0.2660
12	0.3102	0.3649	0.3495	0.3524
16	0.3420	0.4632	0.4689	0.4975
20	0.5917	0.4530	0.4321	0.4697

ตารางที่ ก.10 น้ำหนัก PHA แห้ง (cell dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium ที่มีแหล่งฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟต ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ และ KH_2PO_4) ในปริมาณที่ต่างกัน

เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณ ฟอสเฟต 0.40 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ฟอสเฟต 0.45 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ฟอสเฟต 0.50 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ ฟอสเฟต 0.55 มิลลิกรัมต่อ ลิตร
0	0.0005	0.0006	0.0009	0.0007
4	0.0007	0.0012	0.002	0.0013
8	0.0009	0.0007	0.0016	0.0011
12	0.0006	0.0009	0.0014	0.0007
16	0.0005	0.0010	0.0012	0.0008
20	0.0004	0.0004	0.0006	0.0007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.11 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium ที่มีโพแทสเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งโพแทสเซียมในปริมาณที่ต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณ โพแทสเซียม 0.1 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ โพแทสเซียม 0.3 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ โพแทสเซียม 0.5 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ โพแทสเซียม 0.7 มิลลิกรัมต่อ ลิตร
0	0.0475	0.0514	0.0486	0.0325
4	0.1345	0.0893	0.1521	0.0711
8	0.1523	0.1684	0.1867	0.1253
12	0.1687	0.2156	0.1956	0.1325
16	0.1981	0.2873	0.2568	0.2147
20	0.2115	0.2604	0.2359	0.2563

ตารางที่ ก.12 น้ำหนัก PHA แห้ง (PHA dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium ที่มีโพแทสเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งโพแทสเซียมในปริมาณที่ต่างกัน

เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณ โพแทสเซียม 0.1 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ โพแทสเซียม 0.3 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ โพแทสเซียม 0.5 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	ปริมาณ โพแทสเซียม 0.7 มิลลิกรัมต่อ ลิตร
0	0.0002	0.0004	0.0006	0.0003
4	0.0009	0.0015	0.0018	0.0014
8	0.0007	0.0010	0.0012	0.0011
12	0.0005	0.0010	0.0010	0.0008
16	0.0008	0.0009	0.0011	0.0007
20	0.0006	0.0007	0.0008	0.0009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.13 น้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium

เวลา (ชั่วโมง)	PHA medium
0	0.0941
4	0.1362
8	0.2206
12	0.3562
16	0.5203
20	0.5943

ตารางที่ ก.14 น้ำหนัก PHA แห้ง (PHA dry weight) ของ *Bacillus cereus* ในอาหาร PHB medium

เวลา (ชั่วโมง)	PHA medium
0	0.0013
4	0.0030
8	0.0027
12	0.0023
16	0.0020
20	0.0018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.
การใช้เครื่อง FREEZE DRY

1. การเปิดเครื่อง FREEZE DRY

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

2. การปิดเครื่อง FREEZE DRY

1. ปิดปุ่มดูดอากาศและปุ่มอุณหภูมิ
2. เปิดท่้อากาศให้ความดันอากาศภายในเท่ากับความดันอากาศภายนอกเครื่อง
3. เปิดฝาเครื่อง และนำหลอดพลาสติกที่บรรจุเซลล์แห้งออกจากเครื่อง
4. เปิดปุ่มละลายน้ำแข็ง
5. เปิดท่อน้ำเพื่อละลายน้ำทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

การคำนวณหาความเข้มข้นของสูตรอาหาร

$$\begin{aligned} \text{สูตร} \quad \text{จำนวนโมลโมเลกุล} &= \frac{\text{มวลของสาร (กรัม)}}{\text{มวลโมเลกุลของธาตุ}} \\ \text{มวลโมเลกุล} &= \text{จำนวนอะตอม} \times \text{มวลอะตอม} \end{aligned}$$

1. การคำนวณหาปริมาณของไนโตรเจน

1.1 การคำนวณหาปริมาณของไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

$$\text{มวลโมเลกุลของ } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 132$$

$$\begin{aligned} \text{มวลโมเลกุลของไนโตรเจนใน } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 &= \frac{\text{จำนวนอะตอม} \times \text{มวลอะตอม} \times \text{มวลของสาร}}{\text{มวลโมเลกุลของธาตุ}} \\ &= \frac{2 \times 14 \times 0.2}{132} \\ &= 0.04 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ดังนั้น จะมีปริมาณของไนโตรเจนใน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0.04$ กรัม

เมื่อเราหาปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

$$\text{ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.02 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.02 \times 132}{2 \times 14} = 0.1 \text{ กรัม}$$

$$\text{ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.04 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.04 \times 132}{2 \times 14} = 0.2 \text{ กรัม}$$

$$\text{ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.06 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.06 \times 132}{2 \times 14} = 0.3 \text{ กรัม}$$

$$\text{ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.08 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.08 \times 132}{2 \times 14} = 0.4 \text{ กรัม}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 การคำนวณหาปริมาณของไนโตรเจนในรูปของโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)

มวลโมเลกุลของ $\text{KNO}_3 = 101.1$

มวลโมเลกุลของไนโตรเจนใน $\text{KNO}_3 = \frac{\text{จำนวนอะตอม} \times \text{มวลอะตอม} \times \text{มวลของสาร}}$

มวลโมเลกุลของธาตุ

$$= \frac{14 \times 0.2}{101.1}$$

$$= 0.02 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น จะมีปริมาณของไนโตรเจนใน $\text{KNO}_3 = 0.02 \text{ กรัม}$

เมื่อเราหาปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.02 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ $\frac{0.02 \times 101.1}{14} = 0.2 \text{ กรัม}$

ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.04 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ $\frac{0.04 \times 101.1}{14} = 0.3 \text{ กรัม}$

ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.06 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ $\frac{0.06 \times 101.1}{14} = 0.4 \text{ กรัม}$

ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.08 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ $\frac{0.08 \times 101.1}{14} = 0.5 \text{ กรัม}$

1.3 การคำนวณหาปริมาณของไนโตรเจนในรูปของยูเรีย (NH_4CONH_2)

มวลโมเลกุลของ $\text{NH}_4\text{CONH}_2 = 54$

มวลโมเลกุลของไนโตรเจนใน $\text{KNO}_3 = \frac{\text{จำนวนอะตอม} \times \text{มวลอะตอม} \times \text{มวลของสาร}}$

มวลโมเลกุลของธาตุ

$$= \frac{2 \times 14 \times 0.2}{54}$$

$$= 0.1 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น จะมีปริมาณของไนโตรเจนใน $\text{KNO}_3 = 0.1 \text{ กรัม}$

เมื่อเราหาปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.02 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.02 \times 54}{2 \times 14} = 0.04 \text{ กรัม}$$

$$\text{ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.04 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.04 \times 54}{2 \times 14} = 0.08 \text{ กรัม}$$

$$\text{ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.06 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.06 \times 54}{2 \times 14} = 0.12 \text{ กรัม}$$

$$\text{ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.08 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.08 \times 54}{2 \times 14} = 0.16 \text{ กรัม}$$

$$\text{ที่ปริมาณไนโตรเจน 0.10 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.10 \times 54}{2 \times 14} = 0.20 \text{ กรัม}$$

2. การคำนวณหาปริมาณของฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปของฟอสเฟต

$$\text{มวลโมเลกุลของ } \text{KH}_2\text{PO}_4 = 136.1$$

$$\text{มวลโมเลกุลของ } \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} = 228.2$$

$$\begin{aligned} \text{มวลโมเลกุลของฟอสเฟตใน } \text{KH}_2\text{PO}_4 &= \frac{\text{จำนวนอะตอม} \times \text{มวลอะตอม} \times \text{มวลของสาร}}{\text{มวลโมเลกุลของธาตุ}} \\ &= \frac{95 \times 0.2}{136.1} \\ &= 0.14 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

$$\text{ดังนั้น จะมีปริมาณฟอสเฟตของใน } \text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.14 \text{ กรัม}$$

เมื่อเราหาปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

$$\text{ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.125 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.125 \times 136.1}{95} = 0.17 \text{ กรัม}$$

$$\text{ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.15 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.15 \times 136.1}{95} = 0.21 \text{ กรัม}$$

$$\text{ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.175 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.175 \times 136.1}{95} = 0.25 \text{ กรัม}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.20 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ $\frac{0.20 \times 136.1}{95} = 0.29$ กรัม

มวลโมเลกุลของฟอสเฟตใน $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O = \frac{\text{จำนวนอะตอม} \times \text{มวลอะตอม} \times \text{มวลของสาร}}{\text{มวลโมเลกุลของธาตุ}}$

$$= 95 \times 0.6$$

$$228.2$$

$$= 0.25 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น จะมีปริมาณฟอสเฟตของใน $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O = 0.25$ กรัม

เมื่อเราหาปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.225 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ $\frac{0.225 \times 228.2}{95} = 0.54$ กรัม

ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.25 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ $\frac{0.25 \times 228.2}{95} = 0.60$ กรัม

ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.275 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ $\frac{0.275 \times 228.2}{95} = 0.66$ กรัม

ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.30 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ $\frac{0.30 \times 228.2}{95} = 0.72$ กรัม

ดังนั้น จะมีความเข้มข้นของฟอสเฟตทั้งหมด ดังนี้

ปริมาณฟอสเฟต 0.35 กรัม โดยมี KH_2PO_4 0.17 กรัม และ $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.54 กรัม

ปริมาณฟอสเฟต 0.40 กรัม โดยมี KH_2PO_4 0.21 กรัม และ $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.60 กรัม

ปริมาณฟอสเฟต 0.45 กรัม โดยมี KH_2PO_4 0.25 กรัม และ $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.66 กรัม

ปริมาณฟอสเฟต 0.50 กรัม โดยมี KH_2PO_4 0.29 กรัม และ $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.72 กรัม

3. การคำนวณหาปริมาณของโพแทสเซียมในรูปของโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณของโพแทสเซียมใน } KH_2PO_4 \text{ และ } K_2HPO_4 \cdot 3H_2O &= \frac{0.2}{136.1} + \frac{0.6 \times 2}{228.2} \\ &= 0.0068 \text{ โมลโพแทสเซียม} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น } K_2SO_4 \text{ จะมีปริมาณโพแทสเซียมเมื่อเปรียบเทียบกับ } KH_2PO_4 \text{ และ } K_2HPO_4 \cdot 3H_2O \\ &= \frac{0.0068 \times 174.2}{2} \\ &= 0.6 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{มวลโมเลกุลของโพแทสเซียมใน } K_2SO_4 &= \frac{\text{จำนวนอะตอม} \times \text{มวลอะตอม} \times \text{มวลของสาร}}{\text{มวลโมเลกุลของธาตุ}} \\ &= \frac{2 \times 0.6 \times 39.1}{174.2} \\ &= 0.3 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ดังนั้น จะมีปริมาณของโพแทสเซียมใน $K_2SO_4 = 0.3$ กรัม

เมื่อเราหาปริมาณความเข้มข้นของโพแทสเซียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ที่ปริมาณโพแทสเซียม } 0.1 \text{ กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } &\frac{0.1 \times 174.2}{31.9 \times 2} = 0.20 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ที่ปริมาณโพแทสเซียม } 0.3 \text{ กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } &\frac{0.3 \times 174.2}{31.9 \times 2} = 0.67 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ที่ปริมาณโพแทสเซียม } 0.5 \text{ กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } &\frac{0.5 \times 174.2}{31.9 \times 2} = 1.11 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ที่ปริมาณโพแทสเซียม } 0.7 \text{ กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } &\frac{0.7 \times 174.2}{31.9 \times 2} = 1.56 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การคำนวณหาฟอสเฟตใน Na_2HPO_4 และ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

มวลโมเลกุลของ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 142.10$

มวลโมเลกุลของ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 137.99$

มวลโมเลกุลของฟอสเฟตใน $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = \frac{\text{จำนวนอะตอม} \times \text{มวลอะตอม} \times \text{มวลของสาร}}$

มวลโมเลกุลของธาตุ

$$= \frac{95 \times 0.6}{142.10}$$

$$= 0.40 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น จะมีปริมาณฟอสเฟตของใน $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 0.40 \text{ กรัม}$

เมื่อเราหาปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.34 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ $\frac{0.34 \times 142.10}{95} = 0.51 \text{ กรัม}$

ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.36 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ $\frac{0.36 \times 142.10}{95} = 0.54 \text{ กรัม}$

ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.38 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ $\frac{0.38 \times 142.10}{95} = 0.57 \text{ กรัม}$

ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.40 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ $\frac{0.40 \times 142.10}{95} = 0.60 \text{ กรัม}$

มวลโมเลกุลของฟอสเฟตใน $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = \frac{\text{จำนวนอะตอม} \times \text{มวลอะตอม} \times \text{มวลของสาร}}$

มวลโมเลกุลของธาตุ

$$= \frac{95 \times 0.2}{137.99}$$

$$= 0.14 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น จะมีปริมาณฟอสเฟตของใน $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 0.14 \text{ กรัม}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเราหาปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

$$\text{ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.06 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.06 \times 137.99}{95} = 0.09 \text{ กรัม}$$

$$\text{ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.09 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.09 \times 137.99}{95} = 0.13 \text{ กรัม}$$

$$\text{ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.12 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.12 \times 137.99}{95} = 0.17 \text{ กรัม}$$

$$\text{ที่ปริมาณฟอสเฟต 0.15 กรัม จะมีมวลของสารเท่ากับ } \frac{0.15 \times 137.99}{95} = 0.21 \text{ กรัม}$$

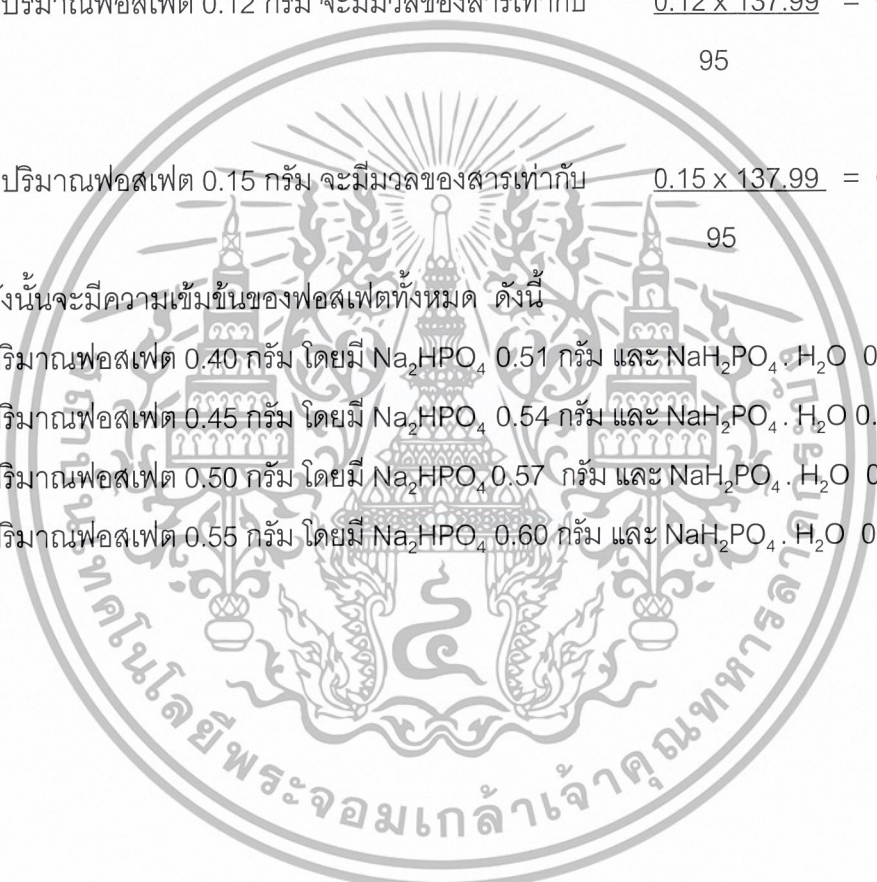
ดังนั้นจะมีความเข้มข้นของฟอสเฟตทั้งหมด ดังนี้

ปริมาณฟอสเฟต 0.40 กรัม โดยมี Na_2HPO_4 0.51 กรัม และ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.09 กรัม

ปริมาณฟอสเฟต 0.45 กรัม โดยมี Na_2HPO_4 0.54 กรัม และ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.13 กรัม

ปริมาณฟอสเฟต 0.50 กรัม โดยมี Na_2HPO_4 0.57 กรัม และ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.17 กรัม

ปริมาณฟอสเฟต 0.55 กรัม โดยมี Na_2HPO_4 0.60 กรัม และ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.21 กรัม



ภาคผนวก ง.
การวิเคราะห์องค์ประกอบของหางนม

SGS (Thailand) Limited - Laboratory Services
41/23 Soi Rama III (59) Rama III Road, Chongnonsee, Yannawa, Bangkok 10120 Thailand
t +66 (0)2 683 05 41-9 f +66 (0)2 294 74 84 e TH_Laboratory@sgs.com

Date : 24-Mar-2003

Test Report

911119

Kulwadee Tongphubet
Applied Biotechnology, Faculty of Science King Mongkut's Institute of Technology
Ladkrabang Bangkok Thailand

Sample No. : 899740
Date Received : 18-Mar-2003

Date Commenced : 18-Mar-2003

Sample Description : Whey
Sample Condition : Sample is contained in plastic bag.

Tests Required	Method	Results	Units
Nitrogen	Kjeldahl	5.22	%
Phosphate (PO4)	AOAC(1995)965.17	967.40	mgP/100g
Potassium (K)	Based on AOAC(2000)985.35	1.21	%

***** End of Report *****

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ.
การคำนวณทางสถิติ

Saturday, September 15, 2001, 03:33:40

One Way Analysis of Variance

Normality Test: Failed (P = <0.0001)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Saturday, September 15, 2001, 03:33:41

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Group	N	Missing	Median	25%	75%
nonop0	3	0	0.01430	0.01145	0.02555
nonop4	3	0	0.01270	0.01150	0.01338
nonop8	3	0	0.00930	0.00682	0.01088
nonop12	3	0	0.00470	0.00290	0.00500
nonop16	3	0	0.00240	0.00225	0.00240
nonop20	3	0	0.00340	0.00303	0.00378
op0	3	0	0.01480	0.01113	0.01818
op4	3	0	0.02220	0.02168	0.02228
op8	3	0	0.01270	0.01225	0.01390
op12	3	0	0.00640	0.00558	0.00753
op16	3	0	0.00400	0.00355	0.00415
op20	3	0	0.00310	0.00250	0.00363

H = 31.5 with 11 degrees of freedom. (P = 0.0009)

The differences in the median values among the treatment groups are

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = 0.000904$)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Ranks	p	q
op4 vs nonop16	92.00	12	5.042
op4 vs op20	82.50	11	4.926
op4 vs nonop20	76.50	10	5.017
op4 vs nonop12	70.50	9	5.128
op4 vs op16	68.50	8	5.593
op4 vs op12	49.00	7	4.559
op4 vs nonop8	41.00	6	4.434
op4 vs nonop4	24.50	5	3.163
op4 vs op8	21.00	4	3.363
op4 vs op0	18.00	3	3.795
op4 vs nonop0	14.50	2	4.475
nonop0 vs nonop16	77.50	11	4.627
nonop0 vs op20	68.00	10	4.460
nonop0 vs nonop20	62.00	9	4.510
nonop0 vs nonop12	56.00	8	4.572
nonop0 vs op16	54.00	7	5.025
nonop0 vs op12	34.50	6	3.731
nonop0 vs nonop8	26.50	5	3.421
nonop0 vs nonop4	10.00	4	1.601
nonop0 vs op8	6.50	3	1.370
nonop0 vs op0	3.50	2	1.080
op0 vs nonop16	74.00	10	4.853
op0 vs op20	64.50	9	4.692
op0 vs nonop20	58.50	8	4.777
op0 vs nonop12	52.50	7	4.885
op0 vs op16	50.50	6	5.461
op0 vs op12	31.00	5	4.002
op0 vs nonop8	23.00	4	3.683
op0 vs nonop4	6.50	3	1.370
op0 vs op8	3.00	2	0.926
op8 vs nonop16	71.00	9	5.164
op8 vs op20	61.50	8	5.021
op8 vs nonop20	55.50	7	5.164
op8 vs nonop12	49.50	6	5.353
op8 vs op16	47.50	5	6.132
op8 vs op12	28.00	4	4.484
op8 vs nonop8	20.00	3	4.216
op8 vs nonop4	3.50	2	1.080
nonop4 vs nonop16	67.50	8	5.511
nonop4 vs op20	58.00	7	5.397
nonop4 vs nonop20	52.00	6	5.624
nonop4 vs nonop12	46.00	5	5.939

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

nonop4 vs op16	44.00	4	7.046
nonop4 vs op12	24.50	3	5.165
nonop4 vs nonop8	16.50	2	5.092
nonop8 vs nonop16	51.00	7	4.745
nonop8 vs op20	41.50	6	4.488
nonop8 vs nonop20	35.50	5	4.583
nonop8 vs nonop12	29.50	4	4.724
nonop8 vs op16	27.50	3	5.798
nonop8 vs op12	8.00	2	2.469
op12 vs nonop16	43.00	6	4.650
op12 vs op20	33.50	5	4.325
op12 vs nonop20	27.50	4	4.404
op12 vs nonop12	21.50	3	4.533
op12 vs op16	19.50	2	6.018
op16 vs nonop16	23.50	5	3.034
op16 vs op20	14.00	4	2.242
op16 vs nonop20	8.00	3	1.687
op16 vs nonop12	2.00	2	0.617
nonop12 vs nonop16	21.50	4	3.443
nonop12 vs op20	12.00	3	2.530
nonop12 vs nonop20	6.00	2	1.852
nonop20 vs nonop16	15.50	3	3.268
nonop20 vs op20	6.00	2	1.852
op20 vs nonop16	9.50	2	2.932

Comparison	P<0.05
op4 vs nonop16	Yes
op4 vs op20	Yes
op4 vs nonop20	Yes
op4 vs nonop12	Yes
op4 vs op16	Yes
op4 vs op12	Yes
op4 vs nonop8	Yes
op4 vs nonop4	No
op4 vs op8	Do Not Test
op4 vs op0	Do Not Test
op4 vs nonop0	Do Not Test
nonop0 vs nonop16	Yes
nonop0 vs op20	No
nonop0 vs nonop20	Do Not Test
nonop0 vs nonop12	Do Not Test
nonop0 vs op16	Do Not Test
nonop0 vs op12	Do Not Test
nonop0 vs nonop8	Do Not Test
nonop0 vs nonop4	Do Not Test
nonop0 vs op8	Do Not Test
nonop0 vs op0	Do Not Test
op0 vs nonop16	Yes
op0 vs op20	Do Not Test
op0 vs nonop20	Do Not Test
op0 vs nonop12	Do Not Test
op0 vs op16	Do Not Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

op0 vs op12	Do Not Test
op0 vs nonop8	Do Not Test
op0 vs nonop4	Do Not Test
op0 vs op8	Do Not Test
op8 vs nonop16	Yes
op8 vs op20	Do Not Test
op8 vs nonop20	Do Not Test
op8 vs nonop12	Do Not Test
op8 vs op16	Do Not Test
op8 vs op12	Do Not Test
op8 vs nonop8	Do Not Test
op8 vs nonop4	Do Not Test
nonop4 vs nonop16	Yes
nonop4 vs op20	Do Not Test
nonop4 vs nonop20	Do Not Test
nonop4 vs nonop12	Do Not Test
nonop4 vs op16	Do Not Test
nonop4 vs op12	Do Not Test
nonop4 vs nonop8	Do Not Test
nonop8 vs nonop16	Yes
nonop8 vs op20	Do Not Test
nonop8 vs nonop20	Do Not Test
nonop8 vs nonop12	Do Not Test
nonop8 vs op16	Do Not Test
nonop8 vs op12	Do Not Test
op12 vs nonop16	Yes
op12 vs op20	Do Not Test
op12 vs nonop20	Do Not Test
op12 vs nonop12	Do Not Test
op12 vs op16	Do Not Test
op16 vs nonop16	No
op16 vs op20	Do Not Test
op16 vs nonop20	Do Not Test
op16 vs nonop12	Do Not Test
nonop12 vs nonop16	Do Not Test
nonop12 vs op20	Do Not Test
nonop12 vs nonop20	Do Not Test
nonop20 vs nonop16	Do Not Test
nonop20 vs op20	Do Not Test
op20 vs nonop16	Do Not Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้