



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์โดยการหมักกากปาล์มน้ำมันด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือก
ได้จากดินบริเวณบ่อบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

The production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by fermentation
of oil palm mill by microorganism screened from soil in waste water
treatment area

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณภัฏภัทร จินดา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร.ธาริณี นามพิชญ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์โดยการหมักกากปาล์มน้ำมันด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือก
ได้จากดินบริเวณบ่อบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

The production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by fermentation
of oil palm mill by microorganism screened from soil in waste water
treatment area

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณภัฏภัทร จินดา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธารินี นามพิชญ์

สาขา.....
เลขทะเบียน 142881
พ.ศ. เดือน ปี. = 6 ส.ย. 2559

.b.....
.j.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทโดยการหมักกากปาล์มน้ำมันด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือก
ได้จากดินบริเวณบ่อบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

แหล่งเงิน เงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 261,800.00 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.ณภัฏภัทร จินดา ภาควิชาพื้นฐานทั่วไป วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จ.ชุมพร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผู้ร่วมวิจัย ผศ.ดร.ธาริณี นามพิชญ์ ภาควิชาเทคโนโลยีการบรรจุและวัสดุ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต PHAs จากของน้ำเสียและดินจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จึงได้นำของเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จำนวน 6 โรงงาน ใน จ.กระบี่ จ.สุราษฎร์ธานี และ จ.ชุมพร มาคัดแยกแบคทีเรียที่คาดว่าผลิต PHAs ด้วยการย้อมสี Sudan Black B ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีแบคทีเรียที่สะสมเม็ดไขมันจำนวน 7 ไอโซเลท หลังจากนำมาเลี้ยงในอาหาร Nitrogen limiting medium เป็นเวลา 48 ชม. แล้วนำไปตรวจสอบการสังเคราะห์ PHAs ภายในเซลล์แบคทีเรียอีกครั้ง ด้วยการย้อมสี Nile Blue A และตรวจดูการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์โดยเปรียบเทียบกับ Positive Control พบว่ามีการสะสมของ PHAs จำนวน 3 ไอโซเลท คือ NKBT02, NKBT07 และ NKBT10 จากการศึกษาการหมักกากปาล์มน้ำมันด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ คือ NKBT02, NKBT07 และ NKBT10 บนกากปาล์มน้ำมัน พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท NKBT07 สามารถเจริญและสังเคราะห์เม็ดไขมันได้มากที่สุดในการหมักกากปาล์มน้ำมันชนิดเบต้าที่ผ่านการนึ่งและเติมน้ำตาลกลูโคส 0.5% โดยน้ำหนักกากปาล์ม ซึ่งเมื่อนำเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงมาสกัดและตรวจวัดปริมาณ PHAs พบว่ามีปริมาณ PHAs 22-37% โดยน้ำหนัก

คำสำคัญ : การหมัก, พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท, จุลินทรีย์, กากปาล์มน้ำมัน

Research Title: The production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by fermentation of oil palm mill by microorganism screened from soil in waste water treatment area

Researcher: Asst. Prof. Nakanyapatthara Jinda

Faculty: King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Prince of Chumphon campus

Department: General Science,

Co-research: Asst. Prof. Tharinee Nampitch

Faculty: Agro-Industry

Department: Packaging Technology and Material , Kasetsart University.

ABSTRACT

Palm is the important industrial drop for production of an edible oil. The vegetable oil producing process can release much amount of waste and waste water that have effected on environment problem, that cause by organic compound as starch and lipid, which is the carbon source of bacteria for produce "PHAs". PHAs is the raw material for producing of Bioplastic. Thus, the objective of this research was isolation and screening for bacteria that can produce PHAs from waste of palm oil. The waste water and soil were collected from 6 palm oil industries in Krabi, Surat Thani and Chumphon provinces. Seven isolates of lipid granule producing bacteria were discovered. The cultivated bacteria were estimated, lipid granules in the cell of bacteria that may be produced PHAs were stained with Sudan Black B dyeing and detected with microscope. Seven isolates were found that they showed the lipid granules in cells and cultivates these isolates in the "Nitrogen limiting medium" for 48 hours. Then, confirmation for PHAs synthesis in their cells was approved by Nile Blue A dye staining to inspect the fluorescence of the lipid granules with the Fluorescence Microscope. This was compared to the positive control bacteria. There were found 3 isolates, NKBT02, NKBT07 and NKBT10. However, the results showed that NBKT10 produced 22-37% (w/w) of PHAs when the steamed oil palm (mesocarp) mill added 1% (w/w) of glucose was used as carbon and nitrogen sources with the aeration.

Keywords : fermentation, polyhydroxy-alkanoate, microorganism, oil palm mill

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ส่วนบริหารวิชาการและวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2558

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณณภัทร ฐานवासก์ และ คุณวนิษา ศรีสุวรรณ ที่เอื้อเฟื้อวัตถุดิบและสถานที่สำหรับหมักกากปาล์ม

ขอขอบคุณท่านรองอธิการบดี และท่านผู้ช่วยอธิการบดี วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จ.ชุมพร ทุกท่าน ที่ได้กรุณาสับสนุน และส่งเสริมให้ผู้วิจัยสามารถทำวิจัยจนสำเร็จด้วยดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานวิจัย วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จ.ชุมพร คุณกาญจนา ม่วงทองคำ และ คุณฮาบีบ๊ะ สดอหลง ที่ได้ช่วยประสานงาน และ ให้คำแนะนำกระเบียบที่เกี่ยวข้องกับการทำงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่พัสดุ คุณธิดาพร จิตรภิมย์ และ เจ้าหน้าที่การเงิน คุณจีระนัย แก้วบังตุ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการจัดเตรียมเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการจัดซื้อวัสดุและค่าใช้จ่ายต่างๆในงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายทรัพยากรบุคคลทุกท่านที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการเดินทางซึ่งทำให้สามารถทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วง และขอขอบคุณเพื่อนอาจารย์ และนักศึกษาที่ได้ให้คำแนะนำ ตลอดจนกำลังใจ จนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วง

ผศ.ดร. ณภัฏภัทร จินดา

ผศ.ดร.ธารณี นามพิชญ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	2
1.5 สมมติฐานงานวิจัย	3
1.6 คำสำคัญของการวิจัย	4
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้	5
2.2 Polyhydroxyalkanoates (PHAs)	5
2.3 เมตาบอลิซึมของกระบวนการสังเคราะห์ PHA ที่ผลิตจากจุลินทรีย์	8
2.4 การผลิต Polyhydroxybutyrate (PHB)	11
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHAs	15
2.6 คุณสมบัติที่ได้เปรียบของPHAs	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	21
บทที่ 4 ผลการวิจัย	30
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	59
บทที่ 6 สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย	60
เอกสารอ้างอิง	61
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	63

	สารบัญ (ต่อ)	หน้า
ภาคผนวก ข		64
ภาคผนวก ค		65
ภาคผนวก ง		67
ประวัติผู้เขียน		70



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ลักษณะการเชื่อมต่อกันของมอนอเมอร์	6
2.2 คุณสมบัติของ PHAs และ Polypropylene (PP)	7
2.3 แบคทีเรียที่มีการสังเคราะห์ PHAs	14
4.1 แบคทีเรียที่แยกได้จากของเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแต่ละแหล่ง	30
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลท	31
4.3 ผลการตรวจสอบเม็ดไขมันด้วยสีย้อม Sudan Black B ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการตรวจสอบการสังเคราะห์ PHAs ด้วยสีย้อม Nile Blue A ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์	36
4.4 ผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท NBKT10 ด้วย API 20NE kit	41
4.5 ตำแหน่งโปรตอนจากสเปกตรัม ^{13}C -NMR ของพอลิเมอร์ที่ NBKT10 ผลิตได้	44
4.6 ตำแหน่งโปรตอนจากสเปกตรัม ^1H -NMR ของพอลิเมอร์ที่ NBKT10 ผลิตได้	44
4.7 สเปกตรัมและ wave number ของหมู่ฟังก์ชันที่ดูดกลืนแสงของพอลิเมอร์	46
4.8 สมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้และพอลิเมอร์มาตรฐาน	46
4.9 สมบัติทางเคมีต่างๆของกากปาล์มน้ำมันแต่ละชนิด	47
4.10 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างการหมักของแบคทีเรียผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ในกากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบาที่ผ่านการนึ่งและเติมน้ำตาลกลูโคส	56
4.11 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างการหมักของแบคทีเรียผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ในกากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบาที่ผ่านการนึ่งและเติมแอมโมเนียมซัลเฟต	57
4.12 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิต PHAs ไอโซเลท NBKT10 ในสภาพที่มีการให้อากาศ และไม่ให้อากาศ	58

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Poly (3-hydroxyalkanoates)	6
2.2 Polyhydroxybutyrate copolymers (a) Polyhydroxybutyrate copolymers (b) Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) (PHB4B)	7
2.3 Metabolic pathway to PHB	9
2.4 Poly (3-hydroxybutyrate) biosynthesis, catabolism and regulation	10
2.5 วิธีการสังเคราะห์ PHB	11
2.6 ผลของสภาวะแวดล้อมต่อการสังเคราะห์ PHB	12
2.7 วงจรชีวิตของ PHAs	18
2.8 การย่อยสลายของขวดพลาสติกจาก PHA	18
2.9 วัสดุทางการแพทย์ที่ผลิตจากพลาสติกย่อยสลายได้	19
3.1 ลักษณะน้ำเสียและดินที่เก็บได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	23
3.2 กากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อใน (ซ้าย) และกากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบา (ขวา)	23
4.1 ลักษณะโคโลนีของ <i>B. megaterium</i> NKBT01, NKBT02, NKBT03, NKBT04 และ NKBT05	32
4.2 ลักษณะโคโลนีของ NKBT06, NKBT07, NKBT08, NKBT09, NKBT10 และ NKBT11	33
4.3 ลักษณะการติดสีแกรมของ <i>B. megaterium</i> , NKBT01, NKBT02, NKBT03, NKBT04 และ NKBT05	34
4.4 ลักษณะการติดสีแกรมของ NKBT06, NKBT07, NKBT08, NKBT09, NKBT10 และ NKBT11	35
4.5 การติดสี Sudan Black B ของ <i>B. megaterium</i> , NKBT01, NKBT02, NKBT03, NKBT04 และ NKBT05	37
4.6 การติดสี Sudan Black B ของ NKBT06, NKBT07, NKBT08, NKBT09, NKBT10 และ NKBT11	38
4.7 การติดสี Nile Blue A ของ <i>B. megaterium</i> ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	39
4.8 การติดสี Nile Blue A ของ <i>B. megaterium</i> ที่กำลังขยาย 400 เท่า	39
4.9 การติดสี Nile Blue A ของ NKBT02 ที่กำลังขยาย 400 เท่า	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.10 การติดสี Nile Blue A ของ NKBT07 ที่กำลังขยาย 400 เท่า	40
4.11 การติดสี Nile Blue A ของ NKBT10 ที่กำลังขยาย 400 เท่า	40
4.12 ผลการวิเคราะห์ PHAs ด้วยวิธี TLC	42
4.13 โครมาโตแกรมของ ^{13}C -NMR (ก) และ ^1H -NMR (ข) ของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้	43
4.14 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัด (ก) และของพอลิเมอร์มาตรฐาน PHB (ข)	45
4.15 การเปลี่ยนแปลงความชื้นระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ในกากปาล์ม น้ำมันที่ไม่ผ่านการนึ่ง	49
4.16 การเปลี่ยนแปลงความชื้นระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ในกากปาล์ม น้ำมันที่ผ่านการนึ่ง	49
4.17 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ในกากปาล์ม น้ำมันที่ไม่ผ่านการนึ่ง	50
4.18 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ในกากปาล์ม น้ำมันที่ผ่านการนึ่ง	51
4.19 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ในกากปาล์ม น้ำมันที่ไม่ผ่านการนึ่ง	52
4.20 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ในกากปาล์ม น้ำมันที่ผ่านการนึ่ง	53
4.21 การสะสมเม็ดไขมันภายในเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไอโซเลท NBKT07 (A) NBKT10 (B) และ แบคทีเรียควบคุม <i>B. megaterium</i> (C) ที่กำลังขยาย 400 เท่า	54

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในการผลิตน้ำมันพืชบริโภค ในกระบวนการผลิตน้ำมันพืชมีเศษวัสดุเหลือใช้ และน้ำเสีย อันก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีสารอินทรีย์ประเภทแป้งและไขมันปริมาณมาก ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนสำคัญต่อแบคทีเรียที่ผลิต PHAs อันเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพ อีกทั้งพลาสติกที่ใช้อยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่ย่อยสลายได้ยากหรือแทบจะไม่ย่อยสลายได้เลยตามธรรมชาติ ปัญหาดังกล่าวนี้นำไปสู่ความพยายามในการพัฒนาพลาสติกชนิดย่อยสลายได้ PHAs มีคุณสมบัติเป็นพอลิเอสเตอร์ที่สามารถย่อยสลายด้วยกระบวนการชีวภาพ (biodegradable polymer) และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพอลิเมอร์จากปิโตรเคมีอย่าง พอลิโพรพิลีน และพอลิเอทิลีน อีกด้วย ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมจะนำไปแปรรูปเป็นพลาสติกหรือเทอร์โมพลาสติกได้ และจุดนี้ก็ได้นำไปสู่ความพยายามที่จะผลิต PHAs ในระดับการค้าสำหรับใช้เป็นพอลิเมอร์ทางเลือกใหม่สำหรับทดแทนพอลิเมอร์จากปิโตรเคมีในอนาคต งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต PHAs จากของเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

แบคทีเรียที่สังเคราะห์และสะสม PHAs ที่ได้มาจากการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต PHAs จากเศษวัสดุเหลือใช้และน้ำเสียของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จะช่วยลดปัญหาการกำจัดของเสียของโรงงาน อีกทั้งแบคทีเรียที่ผลิต PHAs อันเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ ทำให้ลดปัญหามลภาวะที่มาจากกร่อยพลาสติกสังเคราะห์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทซึ่งเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้จากของเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์ม ด้วยจุลินทรีย์ผสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต PHAs และลดต้นทุนการผลิตโดยใช้ของเหลือทิ้งจากการสกัดน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งอาหาร โดยมีวัตถุประสงค์เชิงปฏิบัติการทดลองดังนี้

1.2.1 ศึกษาปริมาณและองค์ประกอบทางเคมีของของเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์ม (oil palm meal) จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทที่สามารถเจริญได้ดีในของเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์ม (oil palm meal)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทที่สามารถเจริญได้ดีในของเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์ม (oil palm meal) ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของของเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์ม (oil palm mill) จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มอย่างน้อย 5 โรงงาน

1.3.2 คัดเลือกกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผลิต PHAs (ยีสต์และแบคทีเรีย) (ที่คัดเลือกจากดินที่ปนเปื้อนไขมันจากโรงงานสกัดน้ำมัน) ที่สามารถเจริญและผลิต PHAs จากของเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์ม (oil palm mill) ได้ โดยพิจารณาจากปริมาณ และชนิด ของ PHAs ที่ผลิตได้

1.3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทที่สามารถเจริญได้ดีในของเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์ม (oil palm meal) ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ โดยพิจารณาจากปริมาณ และชนิด ของ PHAs ที่ผลิตได้

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 ศึกษาปริมาณและองค์ประกอบทางเคมีในของเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์ม (oil palm meal) ที่เก็บตัวอย่างจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มอย่างน้อย 5 โรงงาน นำตัวอย่างที่เก็บได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ปริมาณคาร์บอนทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และไนโตรเจนที่ย่อยได้ ปริมาณไขมัน และกรดไขมัน

1.4.2 แยกและคัดเลือกแบคทีเรีย โดยพิจารณาจากปริมาณ ที่ผลิตได้ ด้วยการย้อมติดสีเรืองแสง และตรวจดูความหนาแน่นของเม็ดไขมัน ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ไมโครสโคป

1.4.3 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันจากโรงงานสกัดน้ำมันที่เหมาะสมต่อการผลิต PHAs โดยใช้ oil palm meal เป็นแหล่งอาหาร โดยพิจารณาจากปริมาณ และชนิด ของ PHAs ที่ผลิตได้ เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium*

1.4.4 ศึกษาโครงสร้างทางเคมี และหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) และ Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR) รวมทั้งตรวจสอบสมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) ของพอลิเมอร์ที่แบคทีเรียที่คัดเลือกผลิตได้

1.4.5 ศึกษาสภาวะการหมัก PHAs ด้วยกล้าเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่ได้ โดยใช้กากปาล์มน้ำมันที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้วเป็นแหล่งอาหาร ทำการหมักแบบ solid fermentation โดยทำการศึกษาผลของคาร์บอน ไนโตรเจน และการให้อากาศ ระหว่างการหมักทำการเก็บตัวอย่างมาศึกษาค่าพีเอช และ จำนวนจุลินทรีย์

1.5 สมมุติฐานงานวิจัยและกรอบแนวคิดในการวิจัย

อุตสาหกรรมปิโตรเคมี เป็นอุตสาหกรรมพื้นฐานที่เริ่มต้นจากน้ำมันดิบและก๊าซธรรมชาติ ไปสู่กระบวนการผลิตหรือสังเคราะห์เป็นผลิตภัณฑ์ต่อเนื่อง และพัฒนาไปสู่วัสดุพอลิเมอร์ เส้นใย หรือพลาสติกชนิดต่างๆ ที่เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันของมนุษย์มานานกว่าร้อยปี ตลอดศตวรรษที่ผ่านมา มนุษย์ได้พบถึงข้อจำกัดด้านปริมาณของวัตถุดิบน้ำมันดิบและก๊าซธรรมชาติ ซึ่งประมาณการได้ว่าจะต้องหมดไปในที่สุด นอกจากนี้ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีโดยเฉพาะการเผาไหม้ยังก่อให้เกิดการสะสม ของมลภาวะ ซึ่งได้ขยายไปในวงกว้างต่อระบบนิเวศน์ของโลก ทำให้การคิดค้นและพัฒนากระบวนการใหม่เป็นสิ่งหนึ่งที่ทุกประเทศจำเป็นต้องพัฒนา ทั้งนี้นอกจากจะหมายถึงการรักษาสิ่งแวดล้อมที่ดีของประเทศของตนแล้ว ยังหมายถึงการเพิ่มศักยภาพและโอกาสในการแข่งขันอันจะเชื่อมโยงไปสู่ความเป็นผู้นำด้านเศรษฐกิจการค้าระหว่างประเทศอีกด้วย

พลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ (biodegradable plastic) จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาวัสดุสำหรับการใช้งานเพื่ออนุรักษ์สิ่งแวดล้อม ทั้งในด้านวัตถุดิบ กระบวนการผลิต และกระบวนการกำจัด ปัจจุบันพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ ได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งจากนักวิทยาศาสตร์ ตลอดจนนักอุตสาหกรรมชั้นนำทั่วโลก โดยพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้นั้นผลิตมาจากวัตถุดิบที่สามารถผลิตทดแทนขึ้นใหม่ได้ในธรรมชาติ (renewable resource) ใช้พลังงานในกระบวนการผลิตต่ำ และสามารถย่อยสลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติภายหลังจากการใช้งาน พลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้นั้นจะมีคุณสมบัติในการใช้งานได้เทียบเท่าพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีแบบดั้งเดิม (Commodity Plastics) และสามารถทดแทนการใช้งานที่มีอยู่ได้ จากการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของ สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ สามารถสรุปได้ว่าวัสดุชีวภาพซึ่งมีโอกาพัฒนาเป็นธุรกิจนวัตกรรมในเชิงรุก เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัตถุดิบทางการเกษตรของประเทศมี 3 ชนิด หนึ่งใน 3 ชนิดนี้คือ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates) หรือ PHAs ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ตั้งต้นที่สามารถนำมาใช้ผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยบริษัท Metabolix Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้พัฒนาเทคโนโลยีการผลิต PHAs ได้ในระดับอุตสาหกรรม วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต Polyhydroxyalkanoates (PHAs) คือ แป้งหรือน้ำตาลที่มาจากทรัพยากรธรรมชาติที่เกิดขึ้นใหม่ได้ (renewable resource) ซึ่งได้แก่ พืชที่มีแป้งหรือน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลังและอ้อย เป็นต้น โดยมีกระบวนการผลิตเริ่มต้นจากการบดหรือม่พืชนั้นให้ละเอียดเป็นแป้ง จากนั้นทำการย่อยแป้งให้ได้เป็นน้ำตาล และนำไปหมัก (fermentation) ด้วยจุลินทรีย์ *Escherichia coli* ซึ่งใช้น้ำตาลเป็นอาหาร และเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลภายในตัวเองเป็น PHAs ที่สามารถแยกออกมาได้โดยการสลายเยื่อหุ้มเซลล์ออก เนื่องจาก PHAs มีช่วงอุณหภูมิในการหลอมเหลว (Tm) ที่กว้างตั้งแต่ 50 – 180 °C จึงทำให้มีคุณสมบัติในการนำไปเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์พลาสติกได้หลากหลาย เช่น การขึ้นรูปเป็นฟิล์ม การฉีดยาและการเป่า

นอกจาก *Escherichia coli* ที่สามารถผลิต PHAs ได้แล้ว ยังมีพืช สาหร่าย และจุลินทรีย์อีกหลายชนิดที่มีศักยภาพในการผลิต PHAs ได้หลากหลายชนิด ในสภาวะการเจริญเติบโตและแหล่งอาหารที่แตกต่างกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจทำการผลิต PHAs โดยวิธีการหมักของเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์ม (oil palm mill) ด้วยจุลินทรีย์ผสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต PHAs และ การนำของเสียกลับมาใช้ประโยชน์ อันเป็นการเพิ่มมูลค่าและลดปริมาณของเสีย นำไปสู่การลดปัญหาโลกร้อนนอกจากนี้ยังเพิ่มมูลค่าของของเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ตลอดจนลดต้นทุนในการนำเข้าสู่ PHAs ได้ในอนาคต

1.6 คำสำคัญของการวิจัย

การหมัก, พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท, กากปาล์มน้ำมันที่สกัดน้ำมันแล้ว, ฟิล์มชีวภาพ
fermentation, polyhydroxy-alkanoate, oil palm meal, biofilm

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 มีแนวทางพัฒนาการผลิต พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHAs) ด้วยจุลินทรีย์

1.7.2 สามารถผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทจากของเสียจากการสกัดน้ำมันปาล์มได้

1.7.3 สามารถนำของเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นพิษน้ำมันมาใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่ เป็นการเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้ง เพิ่มรายได้จากกระบวนการผลิต และลดปริมาณขยะอันมีผลทำให้ลดภาระค่าใช้จ่ายด้านการกำจัดขยะ และลดภาวะโลกร้อน

1.7.4 สามารถต่อยอดอันก่อให้เกิดเทคโนโลยีใหม่ซึ่งเป็นการใช้วัสดุภายในประเทศ ลดการนำเข้าจากต่างประเทศ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลาสติกที่ย่อยสลายได้

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ถูกจำแนก ตามความเห็นของ Reddy *et al.* (2003) สาธารณจำแนกได้เป็น 3 ประเภท คือ

2.1.1 พลาสติกที่สลายตัวได้ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตหรือยูวี (Photodegradable) จะมีสารที่มีความไวต่อแสงเป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้างเนื้อวัสดุ สารดังกล่าวได้แก่ สารจำพวก Carbonyl ethylenic หรือ Aromatic สารที่มีความไวต่อแสงเหล่านี้จะดูดกลืนรังสียูวีและทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของพลาสติก ซึ่งก็ยังคงใช้เวลาเป็นหลายสัปดาห์หรือหลายเดือนก่อนที่โมเลกุลของพลาสติกจะสลายตัวหรือแตกแยกออกจากกัน ขณะเมื่อพลาสติกเหล่านี้เมื่อถูกฝังอยู่ในหลุมฝังกลบจะมีโอกาสสัมผัสกับรังสียูวีได้น้อยลงหรือไม่ได้เลยส่งผลให้มีการย่อยสลายของพลาสติกได้น้อย

2.1.2 พลาสติกกึ่งย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Semi-biodegradable) คือ พลาสติกที่มีส่วนผสมของแป้งหรือสารประเภทแป้งอยู่ในองค์ประกอบของพลาสติก ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพนี้จะถูกจุลชีพในสิ่งแวดล้อมย่อยสลายก่อน ส่งผลให้วัสดุเกิดการแตกสลายเป็นชิ้นเล็กๆ หรือเกิดรูพรุนภายใน ซึ่งคาดว่าจะช่วยในการย่อยสลายพลาสติกได้ดีขึ้น แต่จากการศึกษาโดย (Krupp and Jewell, 1992) พบว่าแบคทีเรียเข้าย่อยสลายองค์ประกอบที่เป็นแป้งเท่านั้น แต่ไม่ย่อยสลายส่วนที่เป็นพลาสติก

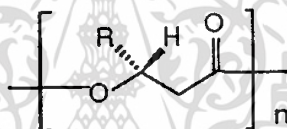
2.1.3 พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable) คือ พลาสติกที่แบคทีเรียหรือจุลชีพในสิ่งแวดล้อมสามารถย่อยสลายได้ทั้งหมด พลาสติกในกลุ่มนี้ ได้แก่ สารในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates; PHAs) พอลิ-แลกไทด์ (Polylactide) และพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol) ที่สามารถละลายน้ำได้ เป็นต้น โดยสารในกลุ่ม PHAs เป็นสารที่ได้รับความสนใจศึกษาเพื่อนำไปผลิตในเชิงพาณิชย์ค่อนข้างมาก เนื่องจากมีสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิโพรพิลีนและพอลิเอทิลีน ซึ่งเป็นพลาสติกทั่วไปที่ใช้งานอยู่ในปัจจุบันและยังสามารถย่อยสลายได้ในสภาพแวดล้อมทั่วไป

2.2 Polyhydroxyalkanoates (PHAs)

Polyhydroxyalkanoates เป็นพอลิเอสเทอร์ที่สะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดในลักษณะเม็ดแกรนูล ลักษณะของ PHAs นั้นจะประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ 3-hydroxy-acid (HA) (ภาพที่ 2.1) เช่น poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นเพื่อเป็นพลังงานสำรองสำหรับแบคทีเรีย และยังพบว่ามีสาร PHAs มากกว่า 80 ชนิด เป็นสารประกอบของ PHAs ซึ่งสารเทอร์โมพลาสติกเหล่านี้จะมีคุณสมบัติเชิงกลต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับการรวมตัวกันของมอนอเมอร์ (ตารางที่ 2.1) (Lee, 1996; Doi, 1990)

นอกจากนี้ ถ้าจำแนก PHAs ตามลักษณะการเชื่อมต่อกันของมอนอเมอร์สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

2.2.1 โฮโมพอลิเมอร์ (Homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของโฮโมเมอร์มีเพียงชนิดเดียวมาต่อรวมกันซึ่งใน กรณีนี้จะยกตัวอย่างของการเชื่อมต่อกันของ R- β -hydroxy fatty acid ชนิด



ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Poly (3-hydroxyalkanoates)

ที่มา : Verlinden *et al.*, 2007

ตารางที่ 2.1 ลักษณะการเชื่อมต่อกันของมอนอเมอร์

R-group	Full name	Short
CH ₃	Poly(3-hydroxybutyrate)	PHB
CH ₂ CH ₃	Poly(3-hydroxyvalerate)	PHV
CH ₂ CH ₂ CH ₃	Poly(3-hydroxyhexanoate)	PHHx

ที่มา : Verlinden *et al.*, 2007

β -hydroxybutyrate ซึ่งมีหมู่เมธิลมาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่ง β หรือตำแหน่งที่ 3 และมีมอนอเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์เกิดเป็นสารประกอบพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยมีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์คือพอลิโพรพิลีน (ตารางที่ 2.2)

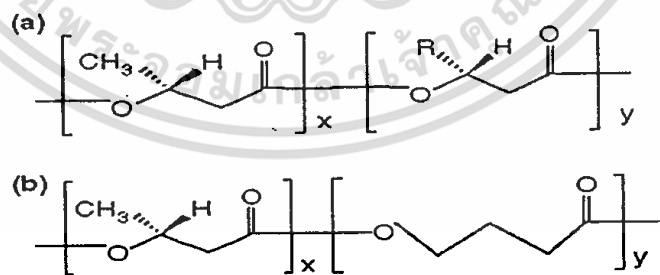
ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของ PHAs และ Polypropylene (PP)

Parameter	PHB	PHBV	PHB4B	PHBHx	PP
Melting temperature (°C)	177	145	150	127	176
Glass transition temperature (°C)	2	-1	-7	-1	-10
Crystallinity (%)	60	56	45	34	50-70
Tensile strength (MPa)	43	20	26	21	38
Extension to break (%)	5	50	444	400	400

หมายเหตุ PHBV contains 20% 3HV-monomers, PHB4B contains 16% 4HB-monomers, PHBHx contains 10% 3HHx-monomers

ที่มา : Verlinden *et al.*, 2007

2.2.2 โคพอลิเมอร์ (Copolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบขึ้นด้วยหน่วยย่อยของมอนอเมอร์ หลายชนิดมาต่อรวมกัน ในกรณีของโคพอลิเมอร์ของสารพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตโคควารีเรต นอกจากมอนอเมอร์ที่เป็น β -hydroxybutyrate แล้วจะมีการเชื่อมต่อกับมอนอเมอร์ของไฮดรอกซีวารีเรตทำให้เกิดเป็นโคพอลิเมอร์ P(3HB-3HV) หรือที่เรียกว่า poly(3-hydroxybutyrate-copolymer-3-hydroxyvalerate) (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 Polyhydroxybutyrate copolymers (a) Polyhydroxybutyrate copolymers

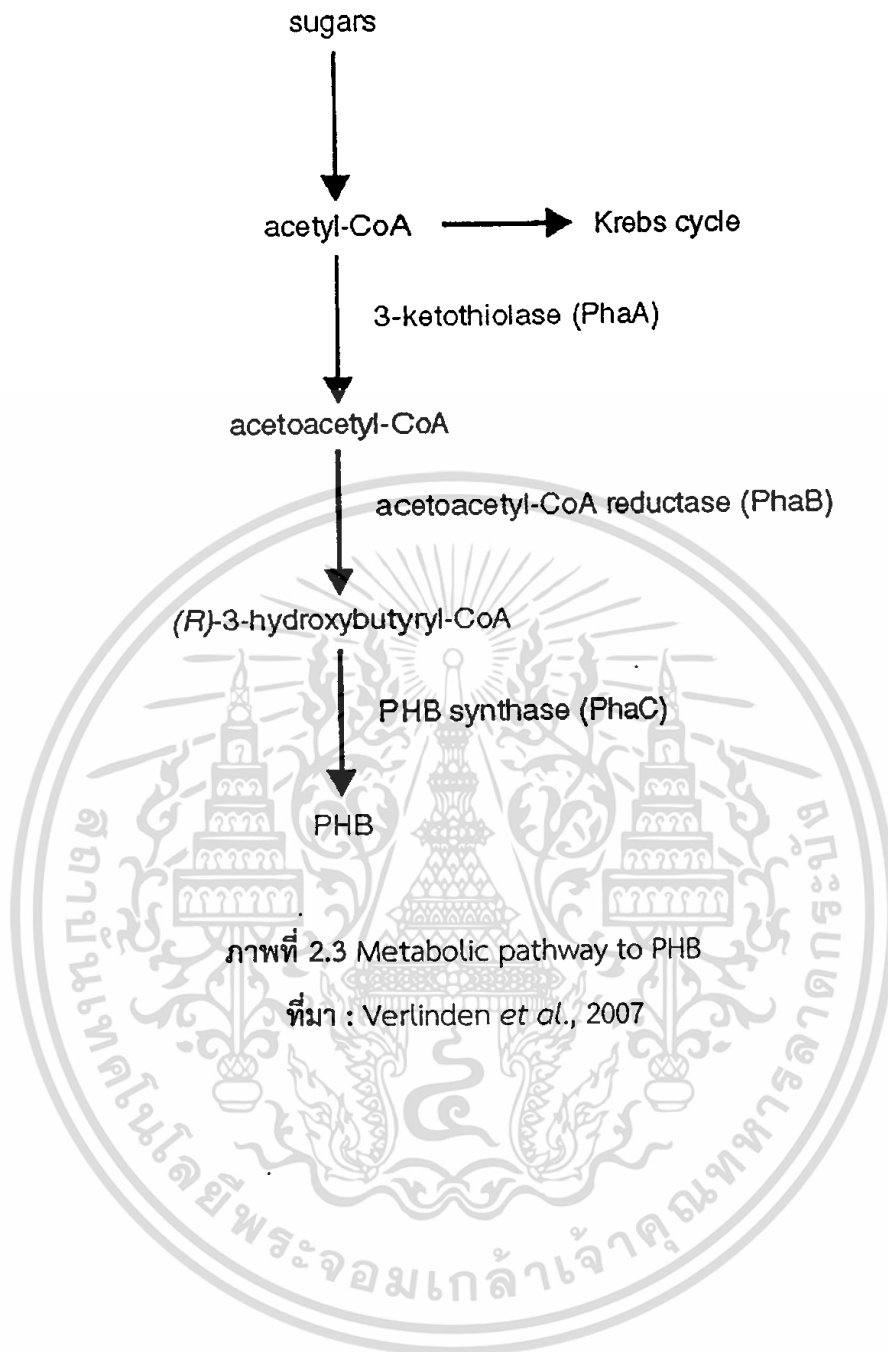
(b) Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) (PHB4B)

ที่มา : Verlinden *et al.*, 2007

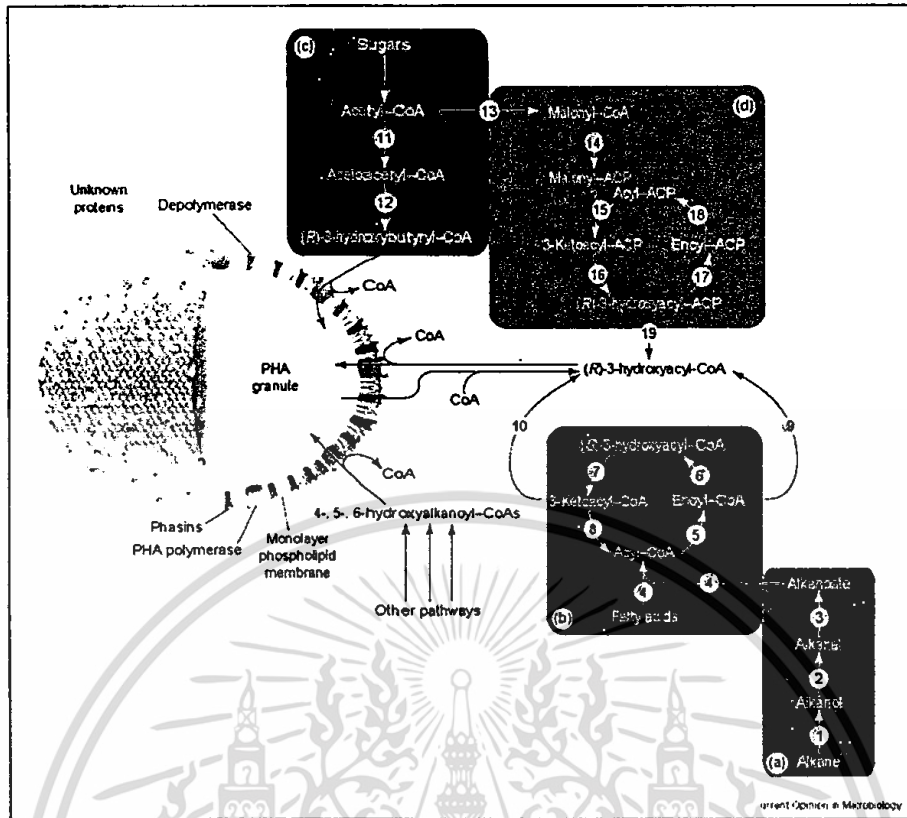
2.3 เมตาบอลิซึมของกระบวนการสังเคราะห์ PHA ที่ผลิตจากจุลินทรีย์

PHA เป็นสารกลุ่มพอลิเอสเทอร์ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ (R)-3HA ซึ่งสารจะอยู่ในรูป R Configuration ทำให้มีความจำเพาะของสเตอริโอไอโซเมอร์ของการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของเอนไซม์ PHA synthase และมีเพียงส่วนน้อยที่มีลักษณะเป็นส่วนหนึ่งของเอสมอนอเมอร์ที่ตรวจพบ โดยส่วนใหญ่จะรู้จักพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตกันดีในชื่อของพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงอยู่ในช่วง 200,000 – 3,000,000 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะในการเจริญของเชื้อ (Sudesh *et al.*, 2000)

การควบคุมการผลิต PHAs นั้นพบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับ *phaCBA* cluster ซึ่งประกอบด้วย *phaA*, *phaB* และ *phaC* (ภาพที่ 2.3) โดย *phaA* เป็นส่วนที่ควบคุมสำหรับการสำหรับการผลิตเอนไซม์ β -ketothiolase โดยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลง acetyl-coA ไปเป็น acetoacetyl-coA สำหรับ *phaB* เป็นส่วนที่ควบคุมการผลิตหรือสร้างเอนไซม์ NADPH-oxidoreductase ซึ่งทำการเปลี่ยน acetoacetyl-coA ให้เป็น R-3-hydroxybutyryl-coA และสำหรับ *phaC* เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ PHA polymerase โดยทำการสังเคราะห์พอลิเมอร์จาก R-3-hydroxybutyryl-coA ส่วน *phaP* ทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของ PHA granule นั่นคือโปรตีน phasin ซึ่งเป็น low-molecular weight protein โดยมีการสะสมเมื่อเกิดกระบวนการสังเคราะห์ และมีหน้าที่ส่งเสริมการผลิตด้วยการเชื่อมกับ granule เพื่อทำการควบคุมขนาด จำนวน และพื้นที่ผิวของ PHA inclusion การสังเคราะห์และการสะสม phasin เป็นกลไกที่เกิดขึ้นร่วมกับ *phaR* ซึ่งเป็น autoregulate repressor อย่างไรก็ตาม การควบคุมขนาด และจำนวนของ PHAs inclusion ก็ยังขึ้นกับปริมาณของ *phaC* ที่มีอยู่ในเซลล์อีกด้วย และยังมี *phaZ* ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ออกมาในรูปที่ไม่สามารถก่อให้เกิดกิจกรรมได้ ซึ่งต้องอาศัยตัวกระตุ้น เช่น ทริปซิน เป็นตัวกระตุ้นทำให้มีข้อสังเกตว่า *phaZ* จะผลิตเอนไซม์ออกมาในรูปของ proenzyme ในขณะที่เดียวกันสลาย PHB granule จำเป็นต้องอาศัย proteolytic enzyme ร่วมเช่นกัน มีการคาดการณ์ว่า depolymerase น่าจะทำงานร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ อีกหลายชนิด ดังแสดงในภาพที่ 2.4 (Luengo *et al.*, 2003)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หมายเหตุ Structural organisation of a PHA granule and metabolic interconnections between the different pathways involved in the biosynthesis and catabolism of PHBs and PHAs. (a) Alkane oxidation pathway. (1) Alkane 1-monooxygenase, (2) alcohol dehydrogenase, (3) aldehyde dehydrogenase. (b) Fatty-acid β -oxidation. (4) acyl-CoA ligase, (5) acyl-CoA dehydrogenase, (6) enoyl-CoA hydratase, (7) 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, (8) 3-ketothiolase, (9) (R)-enoyl-CoA hydratase, (10) 3-ketoacyl-CoA reductase. (c) Biosynthesis from carbohydrates. (11) β -ketothiolase, (12) NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase. (d) De novo fatty acid synthesis. (13) acetyl-CoA carboxylase, (14) ACP-malonyltransferase (15) 3-ketoacyl-ACP synthase, (16) 3-ketoacyl-ACP reductase, (17) 3-hydroxyacyl-ACP reductase, (18) enoyl-ACP reductase, (19) 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transacylase.

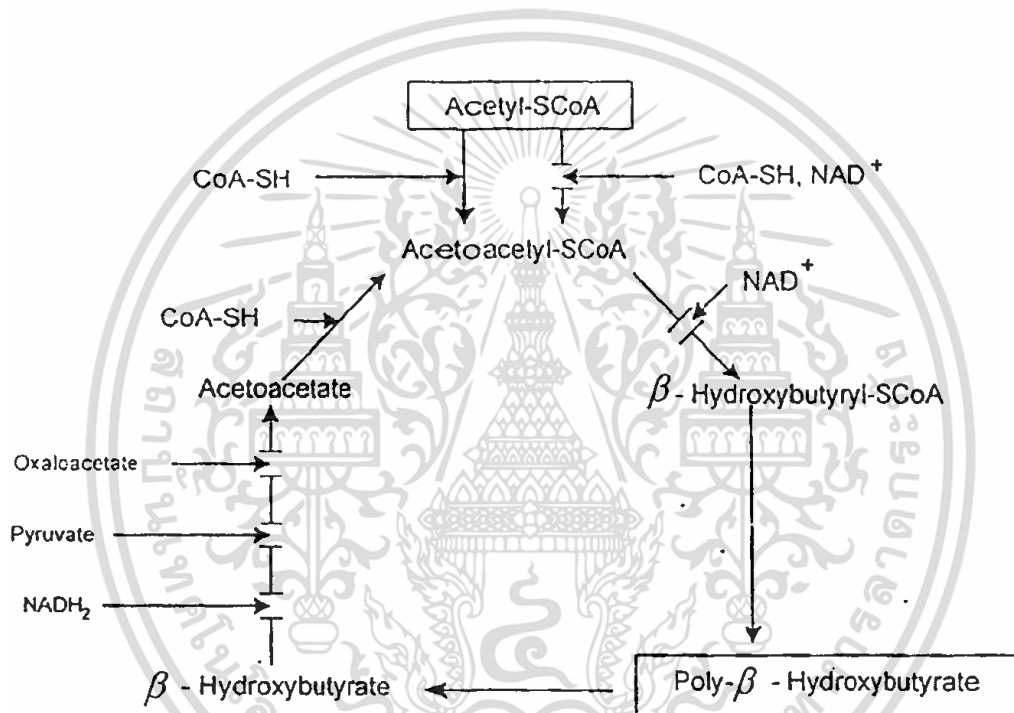
ภาพที่ 2.4 Poly (3-hydroxybutyrate) biosynthesis, catabolism and regulation

ที่มา : Luengo *et al.*, 2003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การผลิต Polyhydroxybutyrate (PHB)

PHB ถูกสังเคราะห์จากเอนไซม์ 3 ชนิดและเกี่ยวข้องกับสารในวัฏจักรเคร็บ (Kreb's cycle) (ภาพที่ 2.4) โดยเริ่มจาก acetyl CoA เปลี่ยนเป็น acetoacetyl-CoA และ hydroxybutyryl-CoA โดยการทำงานของเอนไซม์ β -ketothiolase และ acetoacetyl-CoA reductase ตามลำดับ จากนั้นจะเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ของ hydroxybutyryl-CoA ไปเป็น PHB ด้วยเอนไซม์ PHB syntase และ PHB ที่เกิดขึ้นสามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β -hydroxybutyrate dehydrogenase (ภาพที่ 2.5) (Oeding and Schlegel, 1973; Lafferty *et al.*, 1988)



ภาพที่ 2.5 วิธีการสังเคราะห์ PHB

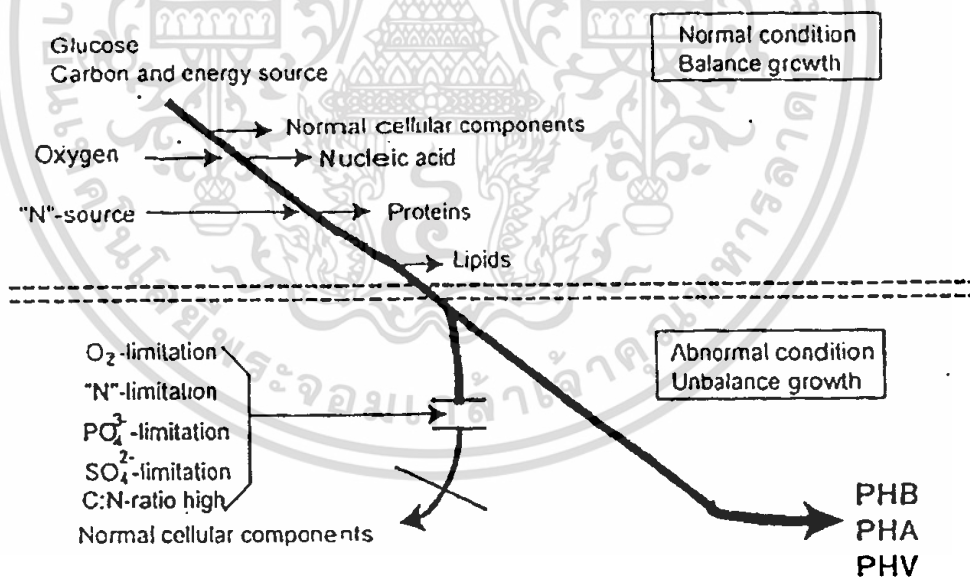
ที่มา : Lafferty *et al.*, 1988

นอกจากนี้อัตราการสังเคราะห์จะขึ้นกับสัดส่วนของ $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$ (ภาพที่ 5) ที่มีอยู่ในเซลล์ กล่าวคือ ถ้าสัดส่วนของ $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$ มีค่ามากจะทำให้เกิดการสังเคราะห์ PHB ขึ้น แต่ถ้ามีค่าต่ำจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ PHB ซึ่งในสภาวะจำกัดอาหารนั้นจะทำให้สัดส่วนของ $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$ ภายในเซลล์สูง จึงส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์ PHB ขึ้น (Lafferty *et al.*, 1988) ดังนั้นในการผลิต PHB ของจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะพบว่าการสังเคราะห์และสะสม PHB จะเกิดขึ้นสูงหลังจากการเติบโตของแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเติบโตแบบที่เรียจะใช้สารอาหารเหล่านั้นเพื่อสังเคราะห์โปรตีน ไขมันและสารอื่นๆ ที่จำเป็น แต่เมื่อ

จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ออกซิเจน หรือ ฟอสฟอรัส แบคทีเรียจะสังเคราะห์และสะสม PHB จากแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป (ภาพที่ 2.6)

แบคทีเรียที่พบว่าสามารถสะสม PHA ได้มีถึงประมาณ 300 ชนิด (ตารางที่ 2.3) มีทั้งชนิด แกรมลบ และ แกรมบวก (Lee, 1996b) แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถนำมาผลิต PHA ในทางการค้าได้ เช่น *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, แบคทีเรียพวก Methylotrophs หลายชนิด *Pseudomonas oleovorans* และแบคทีเรียที่ได้รับการดัดต่อยีนบางชนิด เช่น recombinant *Escherichia coli*, recombinant *A. eutrophus* และ recombinant *Klebsiella aerogenes* (Lee, 1996a)

PHAs เป็นพอลิเอสเทอร์ที่สังเคราะห์โดยได้โดยแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ PHAs จะสะสม ในเซลล์แบคทีเรียหรือ intracellular ซึ่งมีปริมาณ PHAs สูงถึง 90% ของเซลล์น้ำหนักแห้ง ขึ้นอยู่กับสารอาหาร PHAs ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำรอง (Madison and Huisman, 1999)



ภาพที่ 2.6 ผลของสภาวะแวดล้อมต่อการสังเคราะห์ PHB

ที่มา : Lafferty et al., 1988

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสังเคราะห์สาร PHAs ปริมาณมาก ๆ ในเซลล์ของแบคทีเรียส่วนใหญ่จะไม่เกิดขึ้นในสภาพการดำรงชีวิตปกติของเซลล์ แต่จะเกิดขึ้นเมื่อมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เกิดขึ้น นั่นคือมีสารอาหารคาร์บอนมากเกินไปแต่ขาดธาตุอาหารสารอาหารจำเป็นบางชนิดได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ หรือ ออกซิเจน ทั้งนี้ในช่วงการเจริญเติบโตตามปกติ คาร์บอนส่วนใหญ่จะถูกสันดาปโดยสมบูรณ์กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำผ่านวัฏจักรทีซีเอ (TCA cycle) คาร์บอนบางส่วนและพลังงานดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในการสร้างและซ่อมแซมส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ การขาดธาตุอาหารบางชนิดที่จำเป็นในการสังเคราะห์โปรตีนทำให้กระบวนการดังกล่าวไม่สมบูรณ์หรือไม่อาจเกิดขึ้นได้แม้ว่าจะมีแหล่งคาร์บอนเพียงพอก็ตาม เซลล์จึงปรับตัวเพื่อความอยู่รอดโดยการนำคาร์บอนที่มีไปเก็บสำรองในรูป PHAs นั้นเอง เมื่อเซลล์กลับไปอยู่ในสภาวะที่มีธาตุอาหารจำเป็นครบถ้วนก็จะสามารถดึงคาร์บอนและพลังงานที่สำรองไว้ในสาร PHAs ในเซลล์ออกมาใช้งานได้ (โสภา, 2550)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แบคทีเรียที่มีการสังเคราะห์ PHAs

Bacterial strain (s)	Carbon source (s)	Polymer (s) produced	Reference
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Lauric acid, oleic acid	mcl-PHAs	(Lee et al. 2000; Han et al. 2004)
<i>Alcaligenes latus</i>	Malt, soy waste, milk waste, vinegar waste, sesame oil	PHB	(Wong et al. 2004, 2005)
<i>Bacillus cereus</i>	Glucose, ϵ -caprolactone, sugarbeet molasses	PHB, terpolymer	(Labuzek and Radecka 2001; Yilmaz and Beyatli 2005; Valappil et al. 2007)
<i>Bacillus spp.</i>	Nutrient broth, glucose, alkanooates, ϵ -caprolactone, soy molasses	PHB, PHBV, copolymers	(Katircioglu et al. 2003; Shamala et al. 2003; Tajima et al. 2003; Yilmaz et al. 2005; Full et al. 2006)
<i>Burkholderia sacchari</i> sp. nov.	Adonitol, arabinose, arabitol, cellobiose, fructose, fucose, lactose, maltose, melibiose, raffinose, rhamnose, sorbitol, sucrose, trehalose, xylitol	PHB, PHBV	(Bramer et al. 2001)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Palm olein, palm stearin, crude palm oil, palm kernel oil, oleic acid, xylose, levulinic acid, sugarbeet molasses	PHB, PHBV	(Keenan et al. 2004; Nakas et al. 2004; Alias and Tan 2005; Çelik et al. 2005)
<i>Caulobacter crescentus</i>	Caulobacter medium, glucose	PHB	(Qi and Rehm 2001)
<i>Escherichia coli</i> mutants	Glucose, glycerol, palm oil, ethanol, sucrose, molasses	(UHMW)PHB	(Mahishi et al. 2003; Kahar et al. 2005; Park et al. 2005a; Nikel et al. 2006; Sujatha and Shenbagarathai 2006)
<i>Halomonas boliviensis</i>	Starch hydrolysate, maltose, maltotetraose and maltohexaose	PHB	(Quillaguanan et al. 2005, 2006)
<i>Legionella pneumophila</i>	Nutrient broth	PHB	(James et al. 1999)
<i>Methylocystis</i> sp.	Methane	PHB	(Wendlandt et al. 2005)
<i>Microlunatus phosphovorius</i>	Glucose, acetate	PHB	(Akar et al. 2006)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glucose, technical oleic acid, waste free fatty acids, waste free frying oil	mcl-PHAs	(Hoffmann and Rehm 2004; Fernández et al. 2005)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Octanoic acid	mcl-PHAs	(Durner et al. 2000; Foster et al. 2005)
<i>Pseudomonas putida</i>	Glucose, octanoic acid, undecenoic acid	mcl-PHAs	(Tobin and O'Connor 2005; Hartmann et al. 2006)
<i>Pseudomonas putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. jessenii</i>	Glucose, aromatic monomers	aromatic polymers	(Tobin and O'Connor 2005; Ward and O'Connor 2005; Ward et al. 2005)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Glucose, soybean oil, alcohols, alkanooates	mcl-PHAs	(Xu et al. 2005)
<i>Rhizobium meliloti</i> , <i>R. viciae</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Glucose, sucrose, galactose, mannitol, trehalose, xylose, raffinose, maltose, dextrose, lactose, pyruvate, sugar beet molasses, whey	PHB	(Mercan and Beyatli 2005)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Acetate, malate, fumarate, succinate, propionate, malonate, gluconate, butyrate, glycerol, citrate	PHB, PHBV	(Mukhopadhyay et al. 2005)
<i>Spirulina platensis</i> (cyanobacterium)	Carbon dioxide	PHB	(Jau et al. 2005)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Malt, soy waste, milk waste, vinegar waste, sesame oil	PHB	(Wong et al. 2004, 2005)
<i>Cupriavidus necator</i>	Glucose, sucrose, fructose, valerate, octanoate, lactic acid, soybean oil	PHB, copolymers	(Kim et al. 1995; Kichise et al. 1999; Taguchi et al. 2003; Kahar et al. 2004; Khanna and Srivastava 2005a; Volova and Kalacheva 2005; Volova et al. 2005)
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Hydrogen, carbon dioxide	PHB	(Pohlmann et al. 2006)

ที่มา : Verlinden et al., 2007

การเลือกแบคทีเรียเพื่อมาผลิต PHAs ในเชิงพาณิชย์ต้องพิจารณาถึงปัจจัยหลายประการ เช่น ความสามารถในการใช้สารอาหารที่มีราคาถูก อัตราการเจริญเติบโต อัตราการสังเคราะห์พอลิเมอร์ เนื้อที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการสะสมพอลิเมอร์ในเซลล์ได้สูงสุด และความยากง่ายในการสกัดพอลิเมอร์ออกจากเซลล์เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่มีค่าใช้จ่ายสูง (โสภภา, 2550)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHAs

การผลิต PHAs โดยกระบวนการทางชีวภาพ มีกลไกการสังเคราะห์ที่มีความซับซ้อน และเปลี่ยนแปลงไปตามสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงต้องให้ความสำคัญถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHAs มีดังนี้

2.5.1 จุลินทรีย์

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเดียวกันแต่เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ต่างกันจะทำให้ได้พอลิเมอร์ที่ต่างกัน เช่น บางสายพันธุ์ได้พอลิเมอร์ชนิดโฮโมพอลิเมอร์ บางสายพันธุ์ได้พอลิเมอร์ชนิดโคพอลิเมอร์ (Anderson and Wynn, 1995) ดังแสดงในตารางที่ 2.3

2.5.2 แหล่งอาหาร

2.5.2.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ PHAs การสะสม PHAs ในเซลล์แบคทีเรียจะเกิดขึ้นสูงหลังจากแบคทีเรียเข้าสู่ระยะเจริญสูงสุดและภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล โดยมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป แต่มีการจำกัดปัจจัยบางชนิดเช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน หรือ ฟอสฟอรัส นอกจากนี้จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ยังมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

Lee and Yu (1997) ได้ศึกษาการผลิต PHAs จากตะกอนสลัดจ์ชุมชน โดยทำการผลิต 2 ขั้นตอน โดยทำการย่อยสลายตะกอนสลัดจ์แบบไร้อากาศในขั้นตอนแรก จากนั้นจึงนำน้ำใสที่ได้จากขั้นตอนแรกมาเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *A. eutrophus* เพื่อผลิต PHAs ในถังหมักที่มีการกวน 50 rpm มีการให้อากาศ 300 m³ ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับควบคุมปริมาณไนโตรเจน และไม่มีการควบคุม pH พบว่า สามารถผลิต PHAs ได้ปริมาณ 0.61 กรัมต่อลิตร หรือ 34%ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Boom et al. (1994) พบว่า *A. eutrophus* NCIM 11599 สามารถผลิต PHAs โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ ควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสไว้ที่ 10-20 กรัมต่อลิตร และควบคุมปริมาณไนโตรเจนให้มีอย่างจำกัด พบว่า สามารถส่งเสริมให้ *A. eutrophus* ผลิต PHB ได้สูงถึง 76%ของน้ำหนักแห้ง

Yu (2001) ศึกษาการผลิต PHA จากน้ำเสียที่มีแอมโมเนียเป็นองค์ประกอบด้วยกระบวนการหมัก 2 ขั้นตอน คือ ในขั้นตอนแรกใช้การหมักแบบไร้อากาศแบบ UASB (Upflow) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anaerobic Sludge Blanket) จากนั้นจึงกรองน้ำหมักที่ได้จากขั้นตอนแรกซึ่งประกอบด้วย กรดไขมัน ละเอียดง่าย 43% (ประกอบด้วย กรดอะซิติก 60-80% กรดโพรพอนิก 10-30% และกรดบิวทริก 5-40%) แล้วนำไปใช้เพาะเลี้ยง *A. eutrophus* ในสภาวะมีอากาศในขั้นตอนที่ 2 เพื่อผลิต PHAs โดยมีการเติม Na_2HPO_4 4.8 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 2.65 กรัมต่อลิตร และ MgSO_4 0.4 กรัมต่อลิตร พบว่า สามารถผลิต PHAs ได้ 1.2 กรัมต่อลิตรหรือ 34% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

2.5.2.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปสารประกอบอินทรีย์เช่น กรดอะมิโน ยีสต์สกัด เตชินเปปโตน หรือ corn steep liquor และสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนเช่น กลีโอสโมเนียมได้

Grothe *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนของเชื้อ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้มีค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) เท่ากับ 28.3 และให้ผลผลิต PHB 4.6 กรัมต่อลิตร

2.5.2.3 กลีโอสโมเนียม

การสะสมพอลิเมอร์เกิดขึ้นในเซลล์จุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล โดยมีการจำกัดปัจจัยบางอย่างเช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือ ซัลเฟอร์ ซึ่ง ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และ ซัลเฟอร์ จัดเป็นแร่ธาตุหลัก (major element) ที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณมากพอสมควร โดยเฉพาะฟอสฟอรัสและแมกนีเซียมที่มีความจำเป็นอย่างมากในกระบวนการเร่งปฏิกิริยาการสร้างและถ่ายเทพลังงาน สำหรับการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของจุลินทรีย์

Grothe *et al.* (1999) ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่เติมธาตุอาหารรองต่อการเจริญและการผลิต PHB ของเชื้อ *Alcaligenes latus* โดยมีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเติมธาตุอาหารรอง $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 กรัมต่อลิตร $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 กรัมต่อลิตร $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 กรัมต่อลิตร $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 กรัมต่อลิตร H_3BO_3 0.03 กรัมต่อลิตร $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03 กรัมต่อลิตร $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัมต่อลิตร $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 กรัมต่อลิตร และ Ammonium Iron (III) citrate 6 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้การเจริญและการผลิต PHB สูงขึ้นเป็น 6.8 และ 3.2 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

2.5.2.4 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHB เนื่องจากในสภาวะออกซิเจนจำกัด

เอนไซม์ซีเตรทซินเทส และไอโซซิเตรททีไฮโดรจีนเนสจะถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิลิลไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์เอนไซม์ไม่เข้าสู่วัฏจักร TCA (TCA cycle) แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตะซิติลโคเอ เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยเอนไซม์บีต้าคีโตไรโอเลส จึงมีการสะสม PHB ซึ่งการที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัดมีผลในการลดการทำงานของกระบวนการหายใจ ในขณะที่ PHB จะทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บสารที่มีหน้าที่รีดิวซิง (reducing power) หรือเป็นหน่วยควบคุมปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox regulator) ภายในเซลล์ (Luengo *et al.*, 2003)

2.5.2.5 ความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช)

พีเอชเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิต PHB Grothe *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ของ *Alcaligenes latus* โดยใช้อาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และปรับพีเอชเริ่มต้นในอยู่ในช่วง 6.0-8.5 พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงพีเอช 6.0-7.5 และผลิต PHB ได้ดีที่พีเอช 6.5 ซึ่งผลิต PHB ได้สูงถึง 3.6 กรัมต่อลิตร

2.5.2.6 อุณหภูมิ

ผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHB อยู่ในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส Shimizu *et al.* (1990) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิการผลิต PHB ของเชื้อ *A. eutrophus* โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย และการผลิต PHB ซึ่งผลิตได้สูงถึง 0.8 กรัมต่อลิตร

2.6 คุณสมบัติที่ได้ของ PHAs

ศิริรัตน์ (2008) กล่าวถึงความได้เปรียบที่สำคัญของ PHAs เมื่อเทียบกับพอลิเมอร์จากปิโตรเคมีไว้ 3 ประการ คือ ความเป็นวัสดุหมุนเวียนตามธรรมชาติ (Naturally renewable material) ความสามารถย่อยสลายได้ทางกระบวนการชีวภาพ (Biodegradable) และความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility)

2.6.1 ความเป็นวัสดุหมุนเวียนตามธรรมชาติ

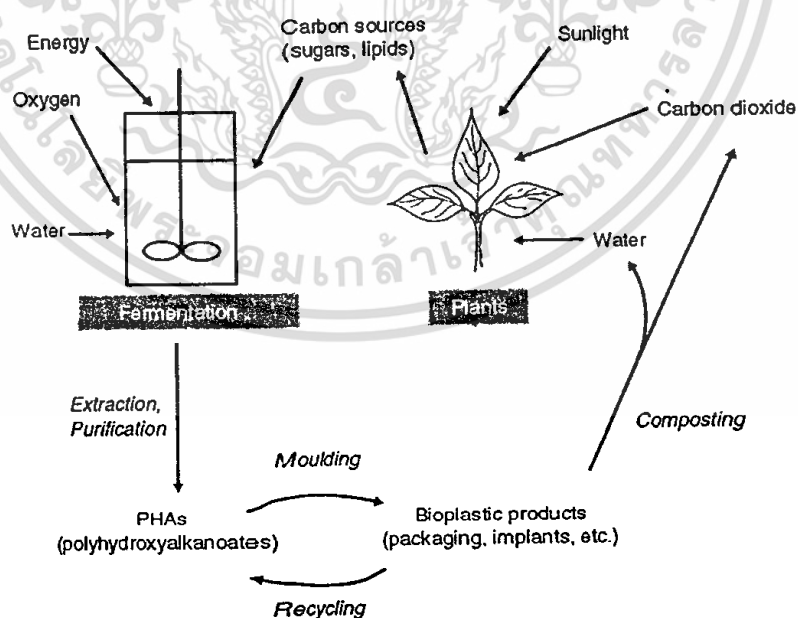
PHAs เป็นไบโอพอลิเอสเทอร์ที่สามารถผลิตได้จากสารหมักของจุลินทรีย์โดยใช้ชีวมวล หรือน้ำมันพืช หรือวัสดุประเภทน้ำตาล เป็นวัตถุดิบสำหรับการหมัก และเนื่องจากชีวมวลเหล่านี้เป็นวัสดุหมุนเวียนที่มนุษย์สามารถผลิตได้อย่างเพียงพอโดยการเพาะปลูก จึงทำให้มั่นใจได้ระดับหนึ่งว่า หากเทคโนโลยีในอนาคตเอื้ออำนวยให้ต้นทุนการผลิต PHAs ลดลงได้ เราก็จะสามารถผลิต PHAs ขึ้นมาใช้อย่างต่อเนื่องและยั่งยืน トラบเท่าที่ชีวมวลยังสามารถหาได้ ซึ่งจุดนี้ต่างจากพอลิเมอร์ที่ได้จากการกลั่นปิโตรเลียม เพราะถ้าหากน้ำมันดิบสำรองบนพื้นโลกหมดไป สาธารณของพอลิเมอร์จากปิโตรเคมีก็จะขาด

ทันที (ภาพที่ 2.7) สวรรค์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 ความสามารถในการย่อยสลายได้โดยกระบวนการชีวภาพ

สำหรับขยะพลาสติกที่เกิดขึ้นในแต่ละวัน ส่วนหนึ่งจะนำไปรีไซเคิล และที่เหลือจะกำจัดเพื่อลดการสะสม วิธีการหลักที่นิยมใช้ในการกำจัดมี 2 วิธี คือ การเผาทำลาย และการฝังกลบ แต่ทั้ง 2 วิธีมีผลกระทบระยะยาว ในการเผาพลาสติกให้มีประสิทธิภาพตามมาตรฐานจำเป็นต้องใช้พลังงานที่สูง และการเผาเป็นมลพิษต่อบรรยากาศ จึงต้องมีการนำเทคโนโลยีขั้นสูงเข้ามาช่วยดักก๊าซพิษ ส่วนการฝังกลบนั้นต้องใช้ระยะเวลายาวนานทำให้อัตราการย่อยสลายไม่สอดคล้องกับอัตราการเกิด จึงต้องมีการขยายพื้นที่ฝังกลบขึ้นเรื่อยๆ ถือเป็นภาระมูลค่าทางที่ดินไป ดังนั้นหากมองระยะยาว การกำจัดทั้ง 2 วิธีอาจไม่ใช่คำตอบ นักวิทยาศาสตร์จึงมองว่าพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการชีวภาพ จึงน่าจะเป็นคำตอบที่ยั่งยืนกว่า

PHAs พลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายทางกระบวนการชีวภาพ คุณสมบัติข้อนี้ช่วยให้การจัดการหลังทิ้งทำได้ง่ายกว่าพลาสติกจากปิโตรเคมีอย่างมาก เพราะผลิตภัณฑ์จาก PHAs สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ (ภาพที่ 2.8) โดยเกิดขึ้นได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ จึงเหมาะสมอย่างยิ่งกับวิธีการฝังกลบ ที่สำคัญ กระบวนการย่อย PHAs โดยจุลินทรีย์จะให้ผลผลิตเป็นชีวมวล น้ำ และ คาร์บอนไดออกไซด์เท่านั้น จึงไม่ก่อให้เกิดผลกระทบรุนแรงต่อสิ่งแวดล้อม



ภาพที่ 2.7 วงจรชีวิตของ PHAs

ที่มา : Verlinden et al., 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.8 การย่อยสลายของขวดพลาสติกจาก PHA

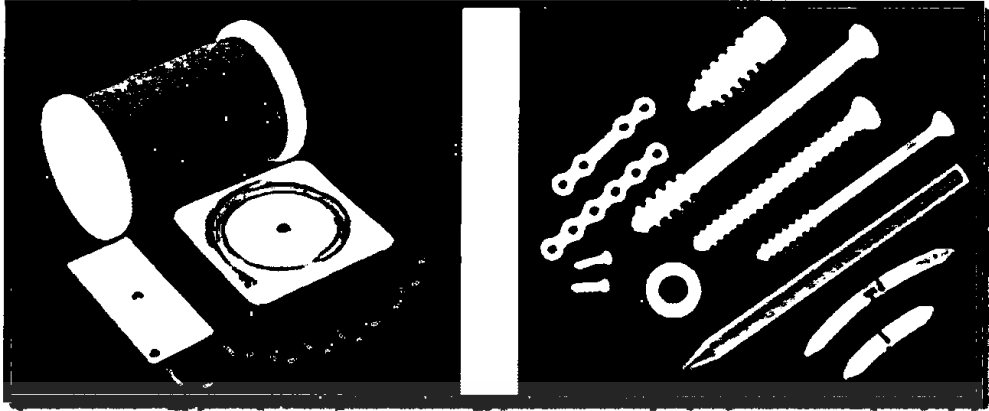
ที่มา : <http://www.vcharkarn.com/varticle/38245> (18-09-2016)

การย่อยสลายตัวได้ด้วยกระบวนการชีวภาพ ไม่ได้มีประโยชน์แค่เฉพาะในการควบคุมกำจัด หลังทิ้ง นักเทคโนโลยีการเกษตรก็ย่นำ PHAs ไปใช้ เช่น เป็นวัสดุเคลือบเมล็ดพันธุ์พืช (Seed encapsulation) เพื่อรักษาคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ หรือใช้เคลือบเมล็ดปุ๋ยเคมี หรือสารกำจัดศัตรูพืช เพื่อให้สารเคมีเหล่านั้นกระจายตัวอย่างช้าๆเป็นระยะเวลาตามที่ต้องการได้ ซึ่งนับเป็นการเพิ่ม ประสิทธิภาพปุ๋ยอีกวิธีหนึ่ง

2.6.2 ความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต

ความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต หมายถึง คุณสมบัติของวัสดุที่สามารถปลูกถ่ายเข้าสู่ร่างกาย ของสิ่งมีชีวิตได้โดยไม่ก่อให้เกิดพิษแก่ร่างกายนั้นๆ ซึ่งเป็นคุณสมบัติเด่นอีกข้อหนึ่งของ PHAs ที่นำไปสู่ ความพยายามในการประดิษฐ์วัสดุทางการแพทย์จาก PHAs โดยเฉพาะวัสดุประเภทที่ต้องฝังเข้าสู่ร่างกาย ผู้ป่วย อาทิ วัสดุค้ำจุนและช่วยการผสมกระดูกในงานผ่าตัด เช่น ไหมเย็บแผลและผ้าตาข่ายสำหรับรอง แผล หรือห้ามเลือดจากอวัยวะภายในที่บาดเจ็บ ข้อดีของ PHAs คือสามารถสลายตัวได้ในร่างกาย คือ สามารถสลายตัวได้ในร่างกายหลังจากผู้ป่วยหายจากอาการบาดเจ็บแล้ว จึงไม่มีวัสดุแปลกปลอมเหลืออยู่ในร่างกาย โดยไม่จำเป็นต้องผ่าตัดซ้ำเพื่อนำวัสดุเหล่านั้นออกมา (ภาพที่ 2.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.9 วัสดุทางการแพทย์ที่ผลิตจากพลาสติกย่อยสลายได้

ที่มา : <http://www.vcharkarn.com/varticle/38245> (18-09-2010)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1.1.1 กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus, USA)
- 3.1.1.2 กล้องจุลทรรศน์ (Primo Star, Carl Zeiss, USA)
- 3.1.1.3 เครื่องผสม (Genies, USA)
- 3.1.1.4 เครื่องชั่ง 3 และ 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)
- 3.1.1.5 ตู้ดูดควัน (Fume Hood)
- 3.1.1.6 หม้อนึ่งความดันไอ (Tomy, USA)
- 3.1.1.7 เครื่องบ่มแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Vision, Korea)
- 3.1.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกควบคุมอุณหภูมิ (Whatman, Switzerland)
- 3.1.1.9 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis1201, Satorious, USA)
- 3.1.1.10 อ่างควบคุมความอุณหภูมิ (Mettler, USA)
- 3.1.1.11 TLC Silica gel 60 F254 (Merck, Germany)
- 3.1.1.12 TLC Tank

3.1.2 สารเคมี

- 3.1.2.1 Sodium ammonium hydrogen phosphate tetrahydrate (Sigma, USA)
- 3.1.2.2 Di-potassium hydrogen orthophosphate (Ajax, Australia)
- 3.1.2.3 Potassium dihydrogen orthophosphate (Ajax, Australia)
- 3.1.2.4 Glucose (Ajax, Australia)
- 3.1.2.5 Calcium chloride (Sharlau, Spain)
- 3.1.2.6 Copper chloride (Merck, Germany)
- 3.1.2.7 Cobalt (II) sulphate (Asia Pacific Specialty Chemical, Australia)
- 3.1.2.8 Manganese chloride (Carlo Erba, Italy)
- 3.1.2.9 Zinc oxide (Ajax, Australia)
- 3.1.2.10 Ferrous sulfate (Carlo Erba, Italy)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.2.11 Magnesium sulphate hydrate (Ajax, Australia)
- 3.1.2.12 Nutrient broth (Himedia, India)
- 3.1.2.13 Nile Blue A (Sigma, U.S.A.)
- 3.1.2.14 Sudan Black B (Fluka, U.S.A.)
- 3.1.2.15 Acetic acid (LabScan, Ireland)
- 3.1.2.16 Toluene (Merck, Germany)
- 3.1.2.17 Sodium hypochlorite (Carlo Erba, Italy)
- 3.1.2.18 Acetone (Mallinckrodt, U.S.A.)
- 3.1.2.19 Iodine (Asia Pacific Specialty Chemical, Australia)
- 3.1.2.20 Ethyl acetate (Carlo Erba, Italy)
- 3.1.2.21 Benzene (Rankem, India)
- 3.1.2.22 Ethanol (LabScan, Ireland)
- 3.1.2.23 Chloroform (LabScan, Ireland)
- 3.1.2.24 Hydrochloric acid (Carlo Erba, Italy)
- 3.1.2.25 Potassium hydroxide (Ajax, Australia)
- 3.1.2.26 Potassium sulfate (LabScan, Ireland)
- 3.1.2.27 Polyhydroxyalkabutyrate (PHB) (Sigma, USA)
- 3.1.2.28 Tetramethylsilane (Merck, Germa

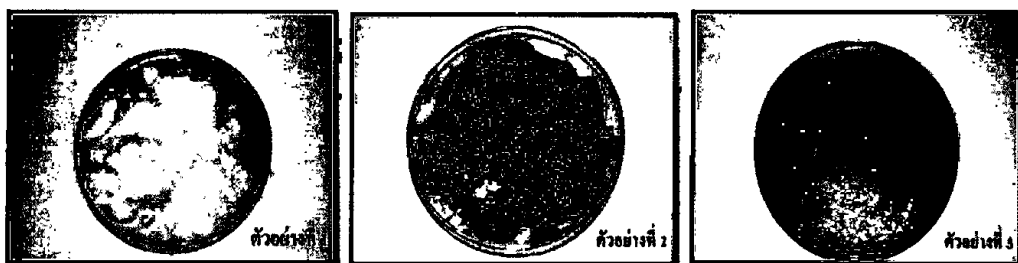
3.1.3 แบคทีเรียควบคุม

Bacillus megaterium และ *Ralstonia eutrophus* ได้รับความอนุเคราะห์จาก
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตรศาสตร์

3.1.4 ตัวอย่างน้ำเสียและดิน

เก็บตัวอย่างน้ำเสียและดิน จากโรงงานสกัดน้ำมันใน จ.กระบี่ (ตัวอย่างที่ 1) จ.สุ
ราษฎร์ธานี (ตัวอย่างที่ 2) และ จ.ชุมพร (ตัวอย่างที่ 3) จังหวัดละ 2 โรงงาน รวม 6 โรงงาน ในการเก็บ
ตัวอย่างจะเก็บตัวอย่างน้ำจากรางระบายน้ำก่อนลงสู่อบ่อกักน้ำเสีย 1 ลิตร และ ดินบริเวณบ่อกักน้ำเสีย
(ห่างจากบ่อกักน้ำเสียไม่เกิน 1 เมตร ลึก ไม่น้อยกว่า 30 ซม) จำนวน 12 ตำแหน่งๆละประมาณ 100 กรัม
แล้วนำมาผสมกัน ก่อนทำการคัดแยกจุลินทรีย์ นำตัวอย่างดินและน้ำเสียที่เก็บได้จากโรงงานแต่ละแห่ง
ผสมกัน (ดังภาพที่ 3.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 ลักษณะน้ำเสียและดินที่เก็บได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

3.1.5 กากปาล์มน้ำมัน (Oil palm mill)

กากปาล์มน้ำมันที่ทำการศึกษา มี 2 ชนิดคือ กากปาล์มน้ำมันที่ได้จากการบดเมล็ด (กะลารวมกับเมล็ดใน) คือ กากปาล์มชนิดเนื้อใน (K) และ กากปาล์มชนิดเนื้อเบา (M) ซึ่งเป็นกากปาล์มจากการบดส่วนเนื้อหุ้มเมล็ด ดังภาพที่ 3.2



กากปาล์มน้ำมันเนื้อใน

กากปาล์มน้ำมันเนื้อเบา

ภาพที่ 3.2 กากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อใน (ซ้าย) และ กากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบา (ขวา)

3.1.5.1 เก็บตัวอย่างกากปาล์มน้ำมันที่เป็นของเหลือจากการสกัดน้ำมันปาล์มจากโรงงานสกัดน้ำมันใน จ.กระบี่ จ.สุราษฎร์ธานี และ จ.ชุมพร แหล่งละ 2 ตัวอย่างละประมาณ 1 กิโลกรัม แล้วนำมาผสมรวมกัน จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 สุ่มตัวอย่างเพื่อหาความชื้นตามวิธี AOAC (2005) 945.39 และเก็บรักษาส่วนที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส เพื่อรอการศึกษาในขั้นตอนต่อไป ส่วนกากปาล์มน้ำมันส่วนที่ 2 นำไปนึ่งตามวิธีในข้อ 3.1.5.2

3.1.5.2 นำกากปาล์มน้ำมันส่วนที่ 2 มานึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำออกจากหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เกลี่ยบนถาดอลูมิเนียมรอให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วทำให้แห้งโดยอบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีความชื้นไม่เกิน 11% โดยน้ำหนัก สุ่มตัวอย่างเพื่อหาความชื้นตามวิธี AOAC (2005) 945.39 และเก็บรักษาส่วนที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส เพื่อรอการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1. การแยกแบคทีเรียจากของเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ชั่งตัวอย่างของเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องผสม จากนั้นบีบเปิดสารละลายที่ผสมแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Nutrient Broth ปริมาตร 95 มิลลิลิตร นำไปปั่นบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางตามลำดับ (10^{-4} - 10^{-8}) แล้วนำสารละลายในแต่ละค่าความเจือจางมาเกลี่ย (Spread) ลงบนอาหาร Nutrient Agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร Nutrient Agar โดยวิธีการสุ่มเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันจากการสังเกตด้วยสายตาบนจานเพาะเชื้อ แล้วทำให้แบคทีเรียบริสุทธิ์โดยนำมาลากกล้าเชื้อ (Streak) ลงบนอาหาร Nutrient Agar อีกครั้ง จากนั้นเก็บเชื้อแบคทีเรียในหลอดที่มีอาหารแข็ง NA (Nutrient agar slant) เพื่อรอการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และการทดสอบทางชีวเคมี ของแบคทีเรียบริสุทธิ์

นำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมา Smear ลงบนแผ่นสไลด์ จากนั้นตรวจดูลักษณะรูปร่างขนาดโคโลนี และการติดสีแบบแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สำหรับการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (Chemical test) ทำการทดสอบด้วย API 20E kit (bioMerieux, France)

3.2.3 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs

3.2.3.1 ตรวจสอบดูเม็ดไขมันภายในเซลล์แบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาตรึงด้วยความร้อน (Heat fix) จากนั้นหยดสารละลาย Sudan Black B ลงบนสไลด์ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสีบนสไลด์ทิ้ง จากนั้นนำสไลด์ไปจุ่มลงในสารละลาย Toluene เพื่อทำความสะอาดสไลด์ แล้วจึงหยดสารละลาย Saffranin O บนสไลด์ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2.3.2 ตรวจสอบการสะสม PHAs ภายในเซลล์แบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่มีการสะสมเม็ดไขมันมา 1 loop ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ Nitrogen limiting medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบที่ 250 รอบต่อนาที เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่อผู้ผู้ใดเห็นใบเซอร์ไอเซนที่นักวิจัย ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เจริญใน Nitrogen limiting medium ไปตรวจสอบการสังเคราะห์ PHAs ภายในเซลล์ โดยการนำแบคทีเรียมาตรึงด้วยความร้อน (Heat fix) จากนั้นหยดสารละลาย Nile Blue A ลงบนสไลด์ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วเหสีบนสไลด์ทิ้ง จากนั้นล้างออกด้วยน้ำและ Acetic acid ความเข้มข้น 8% ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

3.2.4 ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของ PHAs ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.2.4.1 เตรียมแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่มีการสังเคราะห์ PHAs มา 1 loop ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ Nitrogen limiting medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียจากหลอด Starter ลงในฟลาสก์ที่บรรจุ Nitrogen limiting medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (กำหนดให้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 660 มีค่าเท่ากับ 0.5) จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่าความเร็วรอบที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.4.2 สกัด PHAs ภายในเซลล์แบคทีเรีย

นำตัวอย่างน้ำหมักทั้งหมดมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้าง PHAs แกรนูลที่ได้ด้วยแอสีโตน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ล้าง PHAs แกรนูลอีกครั้งด้วยเอทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสเก็บไว้ จากนั้นสกัดด้วยคลอโรฟอร์มซ้ำอีก 2 ครั้ง เก็บส่วนใสไว้รวมกัน แล้วนำไปวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของ PHAs ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

3.2.4.3 ตรวจสอบ PHAs บนแผ่น TLC

หยดสารสกัด ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC แล้วนำแผ่น TLC ใส่ในบีกเกอร์ที่มี Developing agent ได้แก่ Ethyl acetate และ Benzene ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่ควรเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 40 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำแผ่น TLC ใส่ในปีกเกอร์ที่มีเกล็ดไอโอดีนเพื่อให้ไอของ ไอโอดีนระเหยไปจับกับโมเลกุลสารที่เคลื่อนที่บนแผ่น TLC

3.2.4.5 วิเคราะห์โครงสร้างเคมีด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

ละลายพอลิเมอร์ที่สกัดได้ ในคลอโรฟอร์ม ทำการวัดอุณหภูมิห้องด้วยเครื่อง ^1H NMR spectrometer (INOVA, VARIAN, 300 MHz) และ ^{13}C NMR spectrometer (VARIAN, 75 MHz) โดยใช้เตตระเมทิลไซเลนเป็นสารมาตรฐานภายใน

3.2.4.6 วิเคราะห์ทางความร้อนด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC)

ศึกษาสมบัติทางความร้อนอันได้แก่ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) อุณหภูมิการเกิดผลึก (T_c) และ glass transition temperature (T_g) ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (Perkin Elmer, USA) โดยใส่พอลิเมอร์ที่สกัดได้ 5 มิลลิกรัม ลงในจานอลูมิเนียมภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ให้ความร้อนตั้งแต่ -20 องศาเซลเซียส จนถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (first run) แล้วทำให้เย็นลงจนถึง -20 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (second run) อ่านค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) อุณหภูมิการเกิดผลึก (T_c) และ glass transition temperature (T_g)

3.2.5 ศึกษาการผลิตแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้โดยใช้กากปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งอาหาร

3.2.5.1 ศึกษาสมบัติทางเคมีของกากปาล์มน้ำมัน (Oil palm mill)

สุ่มเก็บตัวอย่างกากปาล์มน้ำมันที่ไม่ผ่านการนึ่งและที่ผ่านการนึ่งมาวิเคราะห์ค่าความชื้น ปริมาณคาร์บอนทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และไนโตรเจนที่ย่อยได้ ปริมาณไขมัน และกรดไขมันอิสระ ทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์ค่าเหล่านี้ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

3.2.5.2 ศึกษาการผลิตแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ขั้นต้นโดยใช้กากปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งอาหาร

ในการศึกษาขั้นตอนนี้แบคทีเรียที่ผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้จะถูกเตรียมให้อยู่ในรูปของกล้าเชื้อ (Inoculum) และถูกนำไปเพาะเลี้ยงในกากปาล์มน้ำมัน แบบ aerobe/anaerobe fermentation โดยทำการศึกษาในกากปาล์มน้ำมันที่ผ่านการนึ่ง และกากปาล์มน้ำมันที่ไม่ผ่านการนึ่ง โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1) การเตรียมกล้าเชื้อ

เชื้อแบคทีเรียที่ผลิต PHAs 1 loop ถ่ายลงในหลอดทดลองที่บรรจุ Nitrogen

limiting Medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบที่ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (หรือความเข้มข้นของแบคทีเรียที่เรียกว่าความยาวคลื่น 660 มีค่าเท่ากับ 0.5) จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียจุกหลอด Starter ลงในฟลาสก์ที่บรรจุ Nitrogen limiting medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่าความเร็วรอบที่ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 มีค่าเท่ากับ 0.5

2) การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิต PHAs ในกากปาล์มน้ำมันที่ไม่ผ่านการนึ่ง

ใส่กากปาล์มน้ำมันที่ไม่ผ่านการนึ่ง 100 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นด้วย 0.1 N NaOH ให้มีค่าเท่ากับ 7.0 จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ลงไป 5 มิลลิลิตร เขย่าให้กล้าเชื้อกระจายให้ทั่วกากปาล์มน้ำมัน ทำการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (31-34 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จนกระทั่งจำนวนแบคทีเรียไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ช่วง Stationary phase) ทำการศึกษา 3 ข้อ โดยในการเก็บตัวอย่างจะทำการเก็บตัวอย่างฟลาสก์ละประมาณ 10 กรัม เพื่อวัดความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง จำนวนแบคทีเรีย และตรวจสอบการสะสมของเม็ดไขมันภายในเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ แล้วหาค่าเฉลี่ย ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อแบคทีเรีย *R. eutrophus* และ *B. megaterium*

ในขั้นตอนนี้ศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิต PHAs ในกากปาล์มน้ำมันที่มีอัตราส่วน C/N น้อยที่สุด

3) การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิต PHAs ในกากปาล์มน้ำมันที่ผ่านการนึ่ง

ทำการทดลองตามวิธีการเดียวกันในข้อ (2) แต่เปลี่ยนวัตถุดิบจากกากปาล์มที่ไม่ผ่านการนึ่งเป็นกากปาล์มน้ำมันที่ผ่านการนึ่ง จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการเติบโตของแบคทีเรียที่เรีย และปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้และทำคัดเลือกแบคทีเรียที่มีการเจริญเติบโตและผลิต PHAs ที่ดีที่สุด ไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.6 ศึกษาสภาวะการหมัก PHAs ด้วยกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้

3.2.6.1 ศึกษาผลของอัตราส่วนของ C/N ต่อการสังเคราะห์ PHAs

นำกากปาล์มน้ำมันที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 และกล้าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 5 มาทำการหมักในกากปาล์มน้ำมันที่ปรับสภาพให้มีอัตราส่วนของ C/N แตกต่างกันไป โดยในขั้นตอนนี้ทำการทดลอง 2 การทดลองดังนี้

1) ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่อปริมาณแบคทีเรียและปริมาณ PHAs ที่สังเคราะห์ได้

เตรียมกากปาล์มน้ำมัน 5 กิโลกรัม ใส่ในกะละมังสแตนเลสที่ทำความสะอาดด้วย 70% เอทานอล ปรับความชื้นให้มีความชื้น ด้วยน้ำสะอาด 2.5 ลิตร (50% ของน้ำหนักกากปาล์ม) ที่ผสมน้ำตาลกลูโคส คลุกให้ทั่ว จากนั้นเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ปริมาณ 5% โดยน้ำหนักกากปาล์ม น้ำมัน คลุกให้ทั่ว แล้วถ่ายเทลงสู่ถังหมัก ซึ่งเป็นถังพลาสติก โดยเกลี่ยให้มีความสูงของชั้นกากปาล์มให้มีความสูงประมาณ 10 ซม. ปิดฝาถังหมักโดยที่ฝาหมักหมักเจาะรูเพื่อเสียบเทอร์โมมิเตอร์เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงภายในของหมัก เก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง มาวัดปริมาณแบคทีเรียโดยเทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง NA ตรวจสอบการสะสมของเม็ดไขมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ และนำตัวอย่างกากปาล์มหมักมาทำการแยกเซลล์แบคทีเรียโดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อกากปาล์มหมัก 5 กรัม จากนั้นนำไปสกัดบนเครื่องผสมแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) ปั่นที่ความเร็วสูงสุด จากนั้นกรองแยกกากปาล์มผ่านกระดาษกรอง No. 1 ที่ปลอดเชื้อ ล้างกากปาล์มด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 50 มิลลิลิตร เพื่อให้มีเซลล์แบคทีเรียหลงเหลือบนกระดาษกรองน้อยที่สุด เก็บส่วนที่กรองได้ไปเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Refrigerated centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกเซลล์แบคทีเรียมาสกัด PHAs นำสารสกัดไปศึกษาปริมาณ PHAs ตามวิธีของ Timm and Steinbuchel (1990)

ในการทดลองนี้ทำการศึกษาโดยการเติมน้ำตาลกลูโคสในกากปาล์มในปริมาณ 0, 0.25, 0.5 และ 1% ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2) ศึกษาผลของปริมาณแอมโมเนียซัลเฟตต่อปริมาณแบคทีเรียและปริมาณ PHAs ที่สังเคราะห์ได้

เตรียมกากปาล์มน้ำมัน 5 กิโลกรัม ใส่ในกะละมังสแตนเลสที่ทำความสะอาดด้วย 70% เอทานอล ปรับความชื้นให้มีความชื้น ด้วยน้ำสะอาด 2.5 ลิตร (50% ของน้ำหนักกากปาล์ม) ที่ผสมแอมโมเนียซัลเฟต คลุกให้ทั่ว จากนั้นเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ปริมาณ 5% โดยน้ำหนักกากปาล์ม น้ำมัน คลุกให้ทั่ว แล้วถ่ายเทลงสู่ถังหมัก ซึ่งเป็นถังพลาสติก โดยเกลี่ยให้มีความสูงของชั้นกากปาล์มให้มีความสูงประมาณ 10 ซม. ปิดฝาถังหมักโดยที่ฝาหมักหมักเจาะรูเพื่อเสียบเทอร์โมมิเตอร์เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงภายในของหมัก เก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง มาวัดปริมาณแบคทีเรียโดยเทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง NA ตรวจสอบการสะสมของเม็ดไขมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ และนำตัวอย่างกากปาล์มหมักมาทำการแยกเซลล์แบคทีเรียโดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อกากปาล์มหมัก 5 กรัม จากนั้นนำไปสกัดบนเครื่องผสมแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) ปั่นที่ความเร็วสูงสุด จากนั้นกรองแยกกากปาล์มผ่านกระดาษกรอง No. 1 ที่ปลอดเชื้อ ล้างกากปาล์มด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 50 มล. เพื่อให้มีเซลล์แบคทีเรียหลงเหลือบนกระดาษกรองน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถเผยแพร่หรือใช้ซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สุด เก็บส่วนที่กรองได้ไปเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกเซลล์แบคทีเรียมาสกัด PHAs นำสารสกัดไปศึกษาปริมาณ PHAs ตามวิธีของ Timm and Steinbuchel (1990) การทดลองนี้ทำการศึกษาโดยการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในกากปาล์มในปริมาณ 0, 0.025, 0.05 และ 0.1% ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3) ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการสังเคราะห์ PHAs

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาการให้อากาศโดยการถ่ายกากปาล์มจากถังหมักหนึ่งไปสู่ถังอีกถังหมักหนึ่ง ซึ่งมีวิธีการดังนี้

เตรียมกากปาล์มน้ำมัน 5 กิโลกรัม ใส่ในกะละมังสแตนเลสที่ทำความสะอาดด้วย 70% เอทานอล ปรับความชื้นให้มีความชื้น โดยเติมน้ำสะอาด 2.5 ลิตร (50% โดยน้ำหนักกากปาล์ม) ที่ผสมน้ำตาลกลูโคส 0.5% โดยน้ำหนักกากปาล์ม และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% โดยน้ำหนักกากปาล์ม คลุกให้ทั่ว จากนั้นเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ปริมาณ 5% โดยน้ำหนักกากปาล์มน้ำมัน คลุกให้ทั่ว แล้วถ่ายเทลงสู่ถังหมัก ซึ่งเป็นถังพลาสติก โดยเปลี่ยนให้มีความสูงของชั้นกากปาล์มให้มีความสูงประมาณ 10 ซม. ปิดฝาถังหมักโดยที่ฝาหมักหมักเจาะรูเพื่อเสียบเทอร์โมมิเตอร์เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงภายในถังหมัก เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยเริ่มเก็บตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมง เมื่อทำการหมักครบทุก 24 ชั่วโมงได้ทำการเก็บตัวอย่าง และถ่ายกากปาล์มลงสู่กะละมัง และปิดฝาเช่นเดิม ทำเช่นนี้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ตัวอย่างที่เก็บได้มาวัดปริมาณแบคทีเรียโดยเทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง NA ตรวจสอบการสะสมของเม็ดไขมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และนำตัวอย่างกากปาล์มหมักมาทำการแยกเซลล์แบคทีเรียโดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 100 มล. ต่อกากปาล์มหมัก 5 กรัม จากนั้นนำไปสกัดบนเครื่องผสมแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) ปั่นที่ความเร็วสูงสุด จากนั้นกรองแยกกากปาล์มผ่านกระดาษกรอง No. 1 ที่ปลอดเชื้อ ล้างกากปาล์มด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 50 มล. เพื่อให้มีเซลล์แบคทีเรียหลงเหลือบนกระดาษกรองน้อยที่สุด เก็บส่วนที่กรองได้ไปเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกเซลล์แบคทีเรียมาสกัด PHAs นำสารสกัดไปศึกษาปริมาณ PHAs ตามวิธีของ Timm and Steinbuchel (1990)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การแยกแบคทีเรียจากของเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ปิเปตต์น้ำตัวอย่างของเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (เจือจาง 10 เท่า) มาใส่ลงในอาหาร Nutrient Broth เพื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย จากนั้นนำน้ำหมัก (culture medium) มาทำการเจือจาง (serial dilution) และเกลี่ย (spread) ลงบนอาหาร Nutrient Agar พบว่ามีแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันเมื่อสังเกตด้วยสายตาเจริญบนอาหารทั้งหมด 11 ไอโซเลท โดยจำนวนไอโซเลทที่ได้จากของเสียแต่ละแหล่งแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แบคทีเรียที่แยกได้จากของเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแต่ละแหล่ง

แหล่ง	ระดับความเจือจาง	จำนวนไอโซเลท
จ.กระบี่	10^{-5}	4
จ.สุราษฎร์ธานี	10^{-5}	4
จ.ชุมพร	10^{-6}	3

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จำนวน 11 ไอโซเลท รวมทั้ง *B. megaterium* (แบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ซึ่งใช้เป็น Positive control สำหรับงานวิจัยนี้) มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ได้แก่ ลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลท และ *B. megaterium* แสดงในภาพที่ 4.1 และภาพที่ 4.2 ขณะที่การติดสีแกรมและรูปร่างเซลล์แบคทีเรียแสดงในภาพที่ 4.3 และภาพที่ 4.4

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs

4.2.1 ศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์ PHAs

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลท มาตรวจสอบการสะสมเม็ดไขมันภายในเซลล์ด้วยสีย้อม Sudan Black B ตามวิธีของ Burdon (1946) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลทที่มีการสะสมเม็ดไขมัน เนื่องจากสามารถสังเกตเห็นการติดสีน้ำเงินของเม็ดไขมันภายในเซลล์เช่นเดียวกับ *B. megaterium* (Positive control) ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และภาพที่ 4.6

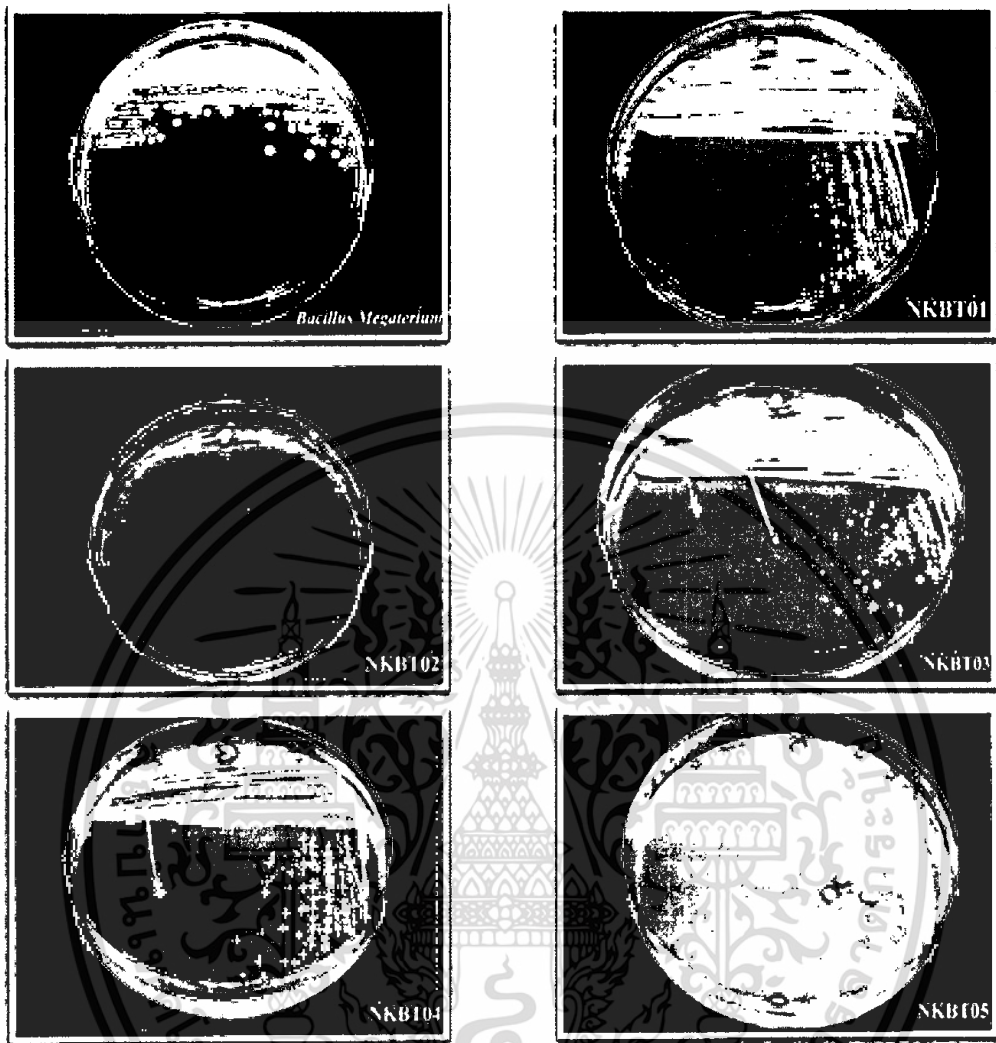
จากการนำแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลท มาเลี้ยงใน N-limiting medium ซึ่งเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ PHAs (Lageveen et al., 1988) จากนั้นนำแบคทีเรียที่เจริญใน Nitrogen limiting medium ไปตรวจสอบการสังเคราะห์ PHAs ภายในเซลล์ด้วยการย้อมสี Nile Blue A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามวิธีของ Ostle และ Holt (1982) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีการสังเคราะห์ PHAs เนื่องจากสามารถสังเกตเห็นการเรืองแสงสีเหลืองส้มภายในเซลล์ เช่นเดียวกับ *B. megaterium* (Positive control) ดังแสดงในภาพที่ 4.7-4.11 และ ตารางที่ 4.2

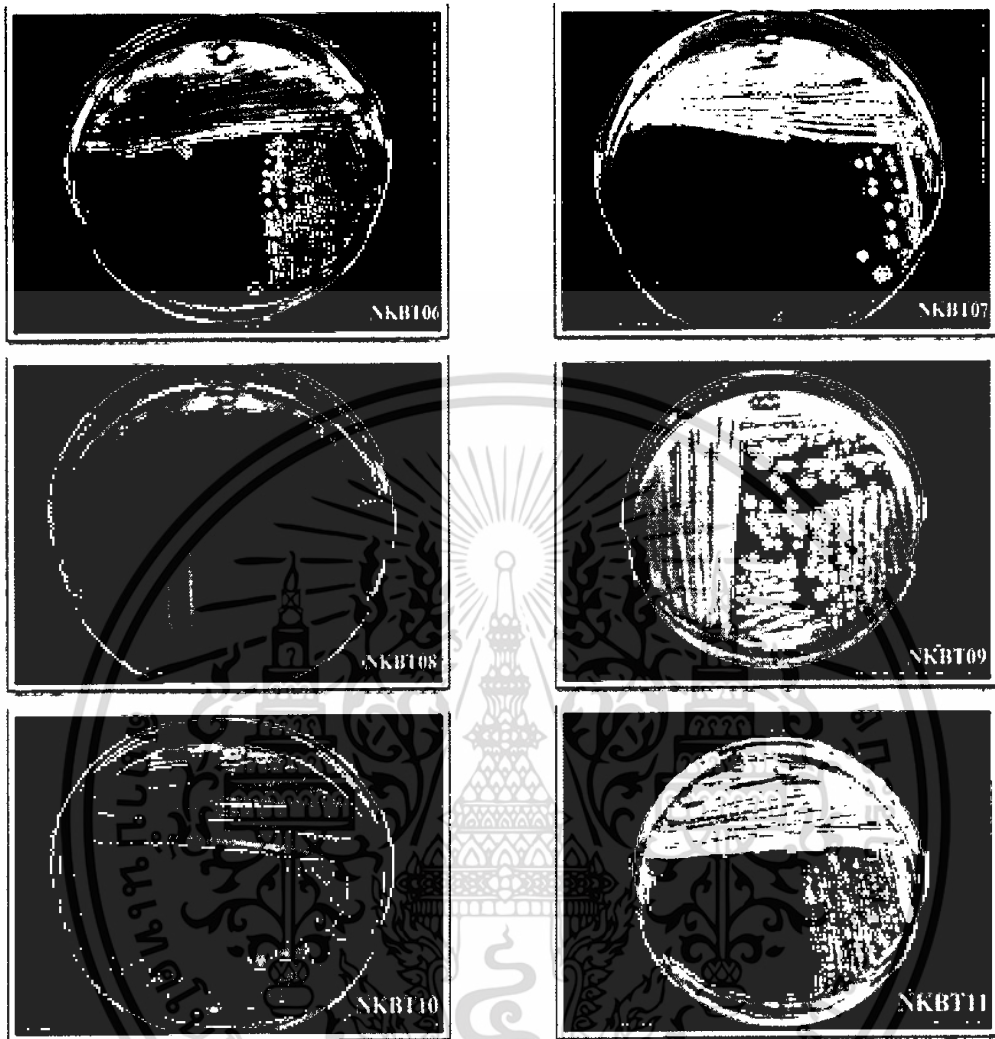
ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลท

ไอโซเลท	สัณฐานวิทยา		
	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม	รูปร่างแบคทีเรีย
NKBT01	สีขาว ขนาดเล็ก ผิวมัน	แกรมบวก	cocci
NKBT02	สีขาว ขนาดเล็กมาก ผิวด้าน	แกรมบวก	rod
NKBT03	สีขาว ขนาดเล็ก ผิวด้าน	แกรมบวก	cocci
NKBT04	สีขาว ขนาดเล็ก ผิวมัน	แกรมบวก	cocci
NKBT05	สีขาว ขนาดใหญ่ ผิวมันเยิ้ม	แกรมบวก	cocci
NKBT06	สีขาว ขนาดใหญ่ ผิวมันเยิ้ม	แกรมบวก	cocci
NKBT07	สีขาว ขนาดใหญ่ ผิวมันเยิ้ม	แกรมบวก	cocci
NKBT08	สีขาว ขนาดเล็ก ผิวมันเยิ้ม	แกรมบวก	cocci
NKBT09	สีขาว ขนาดเล็ก ผิวมันเยิ้ม	แกรมบวก	rod
NKBT10	สีขาว ขนาดใหญ่ ผิวด้าน	แกรมบวก	rod
NKBT11	สีขาว ขนาดเล็ก ผิวมัน	แกรมบวก	cocci
<i>B. megaterium</i>	สีขาว ขนาดใหญ่ ผิวด้าน	แกรมบวก	rod



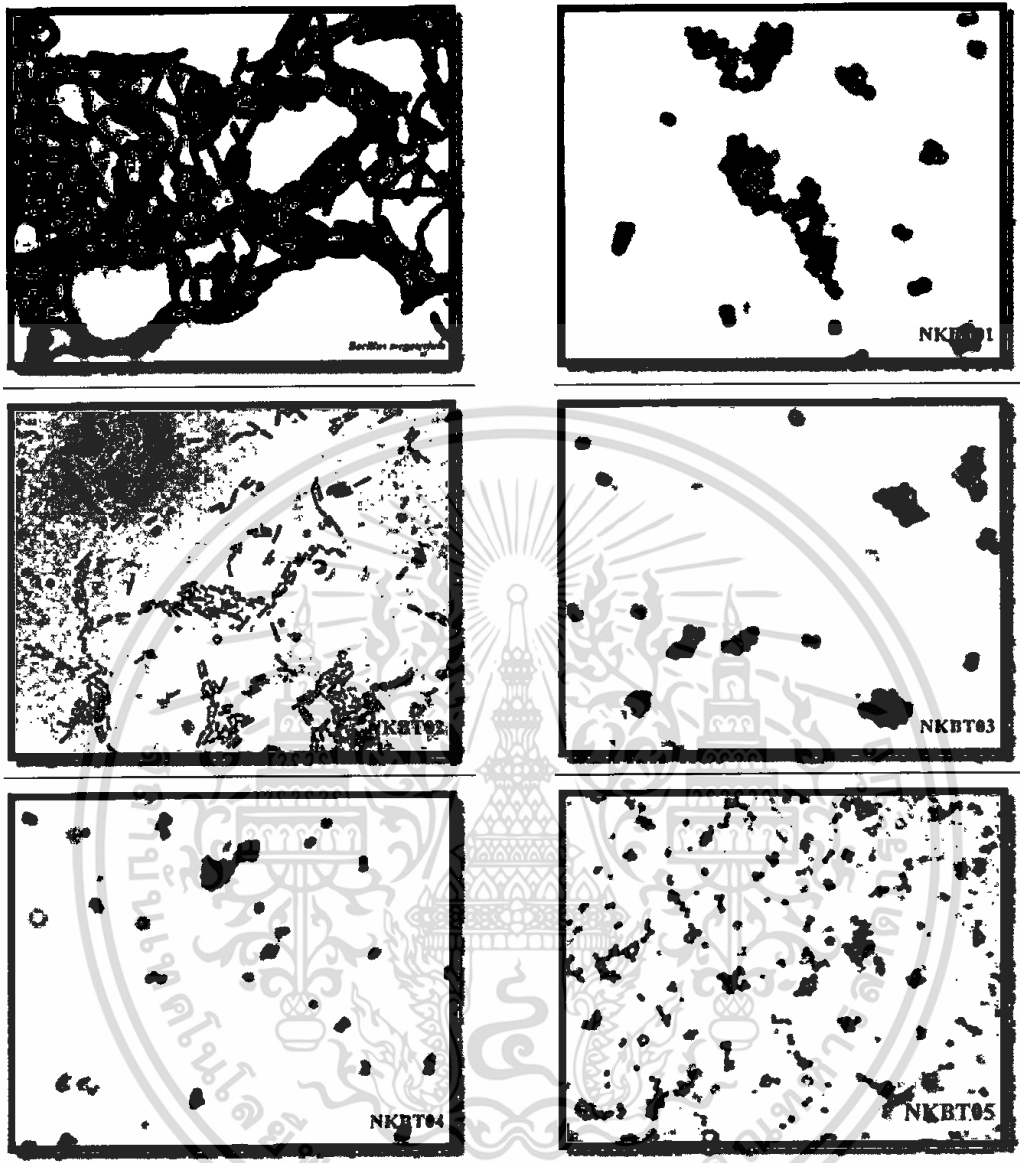
ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของ *B. megaterium*, NKBT01, NKBT02, NKBT03, NKBT04 และ NKBT05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



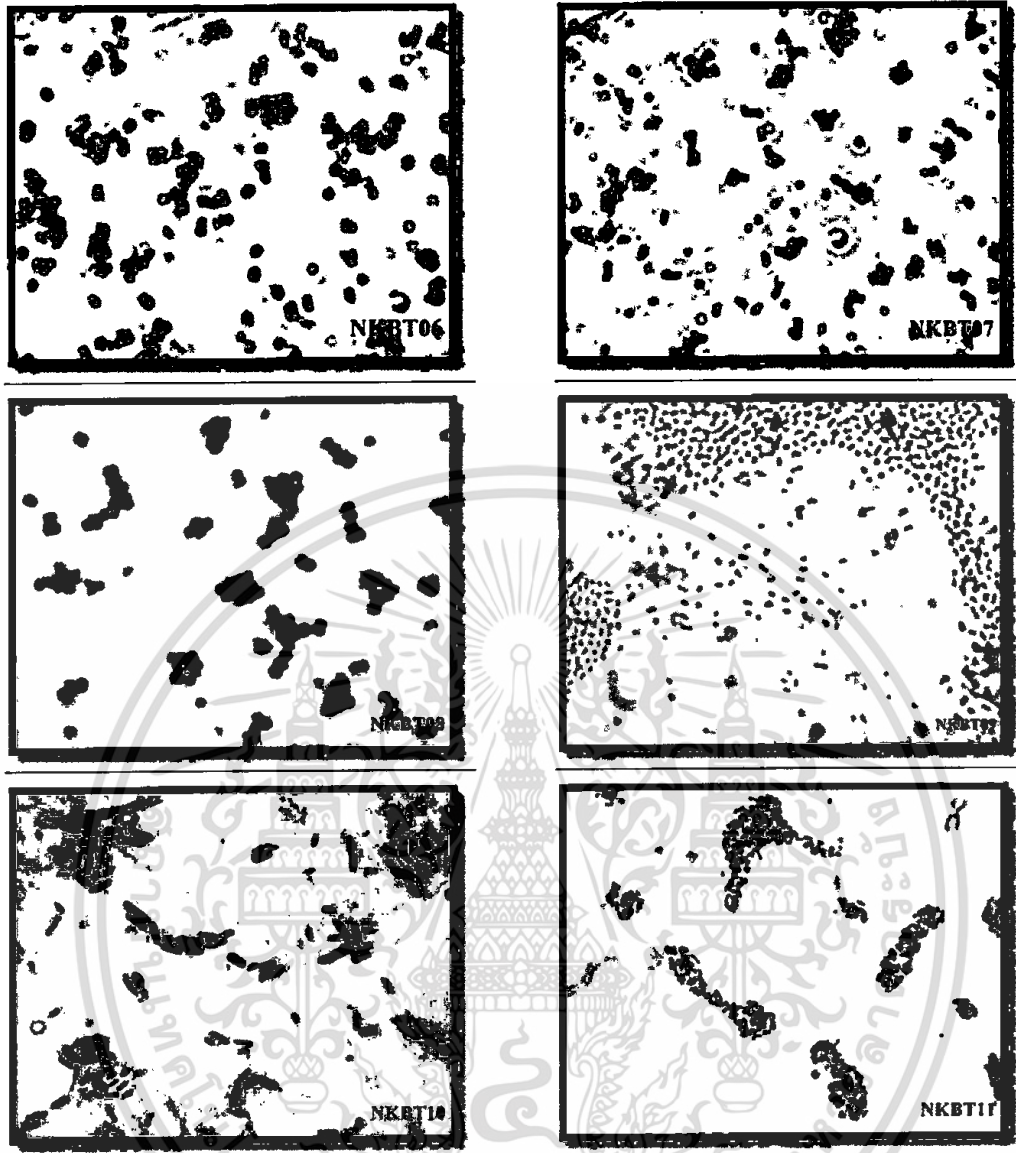
ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของNKBT06, NKBT07, NKBT08, NKBT09, NKBT10 และ NKBT11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ลักษณะการติดสีแกรมของ *B. megaterium*, NKBT01, NKBT02, NKBT03, NKBT04 และ NKBT05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 ลักษณะการติดสีแกรมของNKBT06, NKBT07, NKBT08, NKBT09, NKBT10 และ NKBT11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

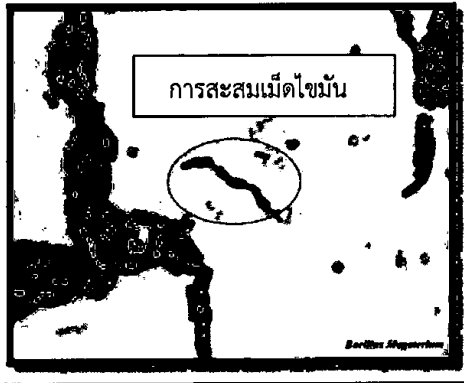
ตารางที่ 4.3 ผลการตรวจสอบเม็ดไขมันด้วยสีย้อม Sudan Black B และการตรวจสอบการสังเคราะห์ PHAs ด้วยสีย้อม Nile Blue A ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

ไอโซเลข	ตรวจสอบเม็ดไขมัน ด้วยสีย้อม Sudan Black B	ตรวจสอบการสังเคราะห์ PHAs ด้วยสีย้อม Nile Blue A
NKBT01	+	-
NKBT02	+	+
NKBT03	+	-
NKBT04	+	-
NKBT05	-	-
NKBT06	-	-
NKBT07	+	+
NKBT08	-	-
NKBT09	+	-
NKBT10	+	+
NKBT11	-	-

หมายเหตุ

- + หมายถึง เซลล์มีการติดสีย้อม
- หมายถึง เซลล์ไม่มีการติดสีย้อม

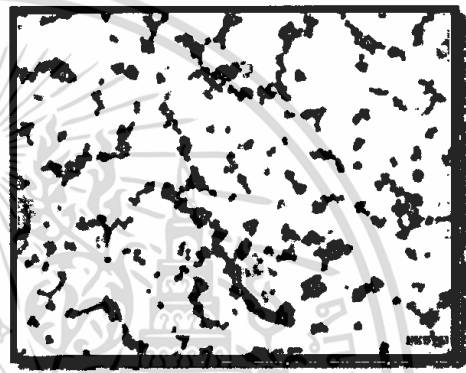
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*B. megaterium*

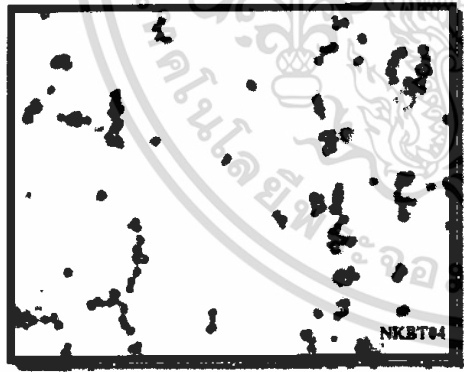
NKBT01



NKBT02



NKBT03



NKBT04



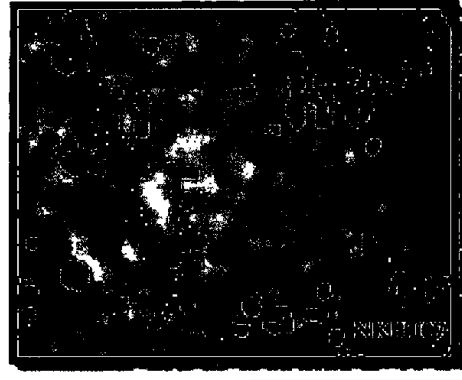
NKBT05

ภาพที่ 4.5 การติดสี Sudan Black B ของ *B. megaterium*, NKBT01, NKBT02, NKBT03, NKBT04 และ NKBT05

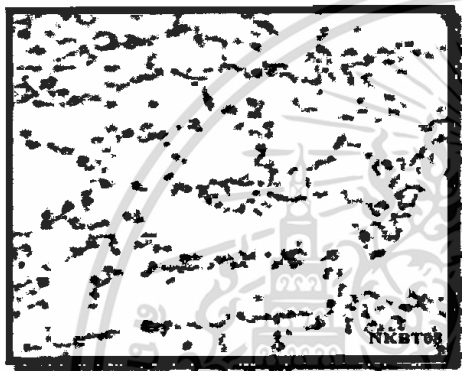
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



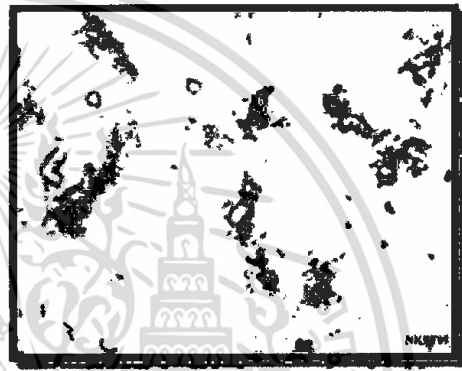
NKBT06



NKBT07



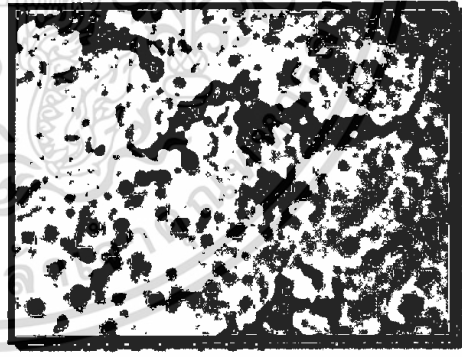
NKBT08



NKBT09



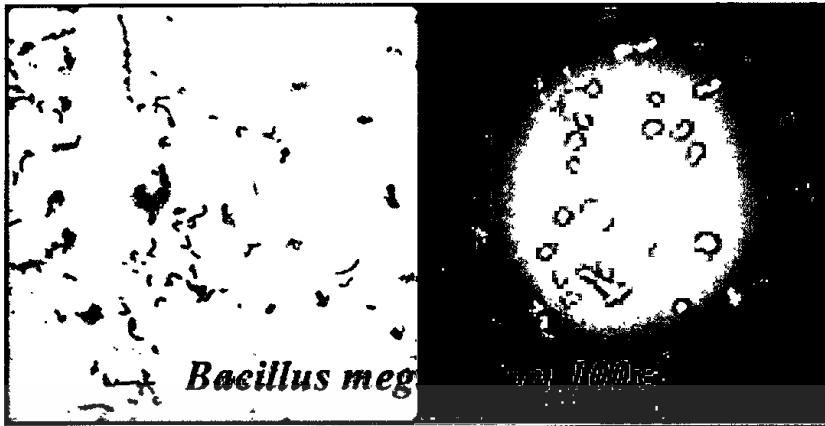
NKBT10



NKBT11

ภาพที่ 4.6 การติดสี Sudan Black B ของ NKBT06, NKBT07, NKBT08, NKBT09, NKBT10 และ NKBT11

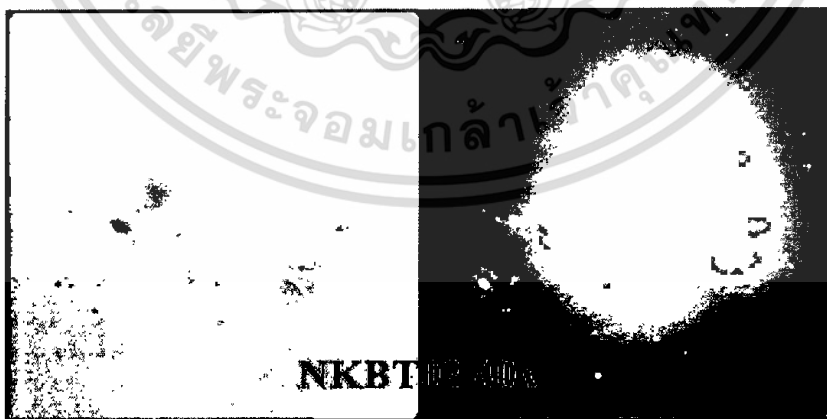
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 การติดสี Nile Blue A ของ *B. megaterium* ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

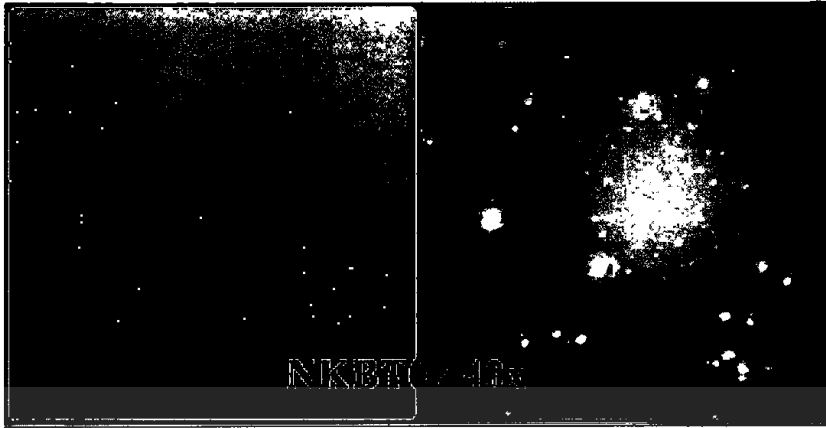


ภาพที่ 4.8 การติดสี Nile Blue A ของ *B. megaterium* ที่กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 4.9 การติดสี Nile Blue A ของ NKBT02 ที่กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 การติดสี Nile Blue A ของ NKBT07 ที่กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 4.11 การติดสี Nile Blue A ของ NKBT10 ที่กำลังขยาย 400 เท่า

ผลการศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์ PHAs แสดงว่า แบคทีเรียไอโซเลท NBKT02 NBKT07 และ NBKT10 มีความสามารถในการสังเคราะห์ PHAs ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทนี้ ไปศึกษาสมบัติทางชีวเคมีต่อไป

4.2.2 ผลการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

จากการศึกษาผลทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท NBKT02 NBKT07 และ NBKT10 ด้วย API 20NE kit ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียโอโซเลท NBKT10 ด้วย API 20NE kit

Active ingredients	Reaction/Enzymes	Results
D-glucose	Assimilation	+
Arabinose	Assimilation	+
D-mannose	Assimilation	-
D-mannitol	Assimilation	+
D-maltose	Assimilation	+
Capric acid	Assimilation	-
Acipic acid	Assimilation	-
Malic acid	Assimilation	+
N-acetyl-glucosamine	Assimilation	+
Potassium gluconate	Assimilation	+
Trisodium citrate	Assimilation	+
Phenylacetic acid	Assimilation	-
D-glucose	Fermentation	+
L-tryptophane	Indole production	-
Arginine	Arginine dihydrolase	-
Urea	Urease	+
Esculin ferric citrate	Hydrolysis (β -glucosidase)	+
Gelatin	Protease	+
4-nitrophenyl- β D-galactopyranoside	β -galactosidase	+
NO ²⁻	Reduction of nitrates to nitrites	-
N ₂	Reduction of nitrates to nitrogen	-

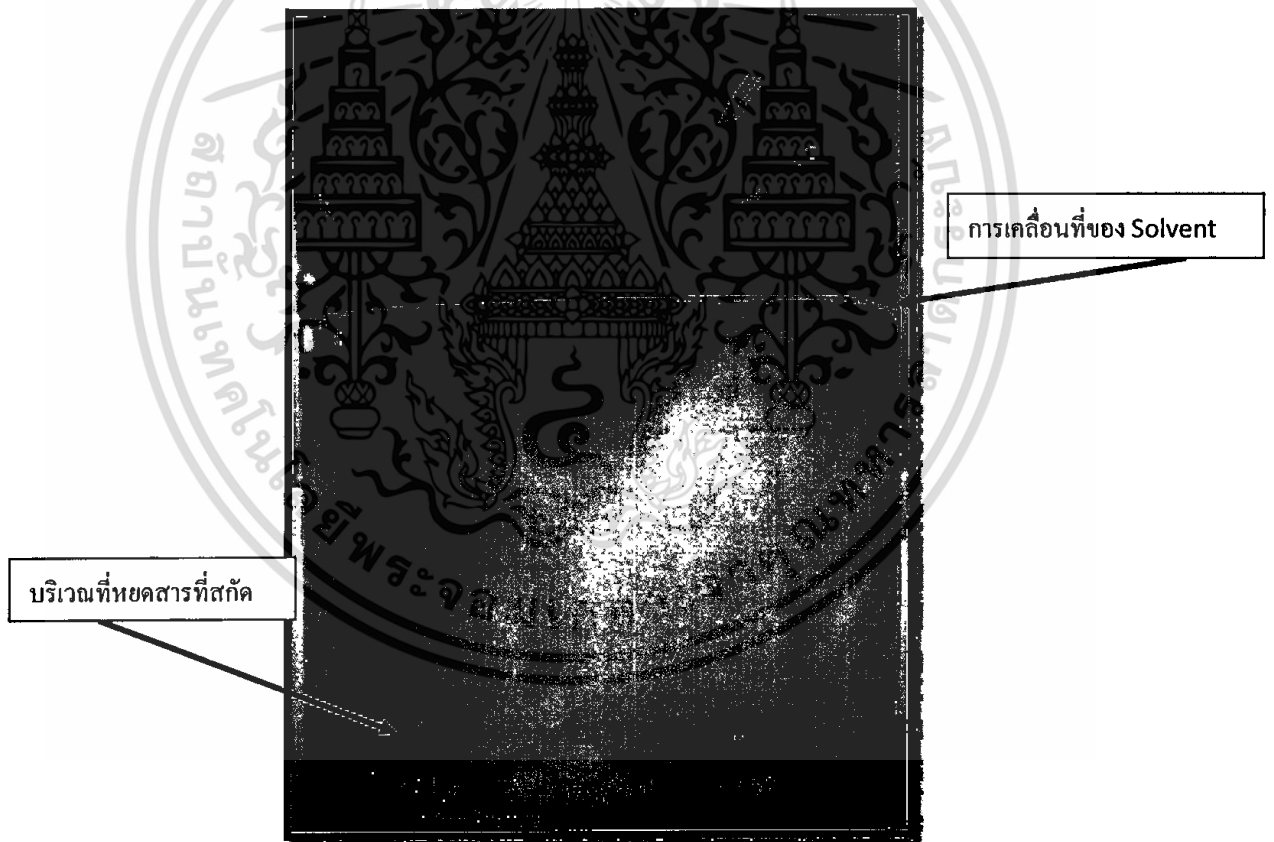
จากผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียโอโซเลท NBKT10 ตามระบบ API ด้วย API-20NE kit พบว่าเมื่อเทียบผลการทดสอบกับข้อมูลใน API Database (biomérieux) พบว่ามีความใกล้เคียงกับผลการทดสอบของ *Ralsmonia eutrophus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของ PHAs ที่แบคทีเรียที่คัดเลือกผลิตได้

4.2.3.1 ตรวจสอบ PHAs ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

นำสารสกัดที่คาดว่าเป็นสารประกอบ PHAs จาก *Bacillus megaterium*, NKBT02, NKBT07 และ NKBT10 มาหยดลงบนแผ่น TLC ปรากฏว่ายังไม่พบลักษณะของการแยกสาร (ภาพที่ 4.12) อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการสกัด และหลังการสกัด NKBT02 NKBT07 และ NKBT10 มีตะกอนเซลล์เหลืออยู่น้อยมาก อาจจะเนื่องมาจากแบคทีเรียมีการเจริญน้อยจึงจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียให้มากขึ้น จากนั้นนำมาหยดลงบนแผ่น TLC ไม่มีการเคลื่อนที่ของสาร อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารสกัดน้อยเกินไป จากผลการตรวจวัดวิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC อาจไม่เหมาะสมต่อการตรวจสอบพอลิเมอร์ที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นจึงได้เพิ่มปริมาณการผลิตและทำการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์ต่อไป

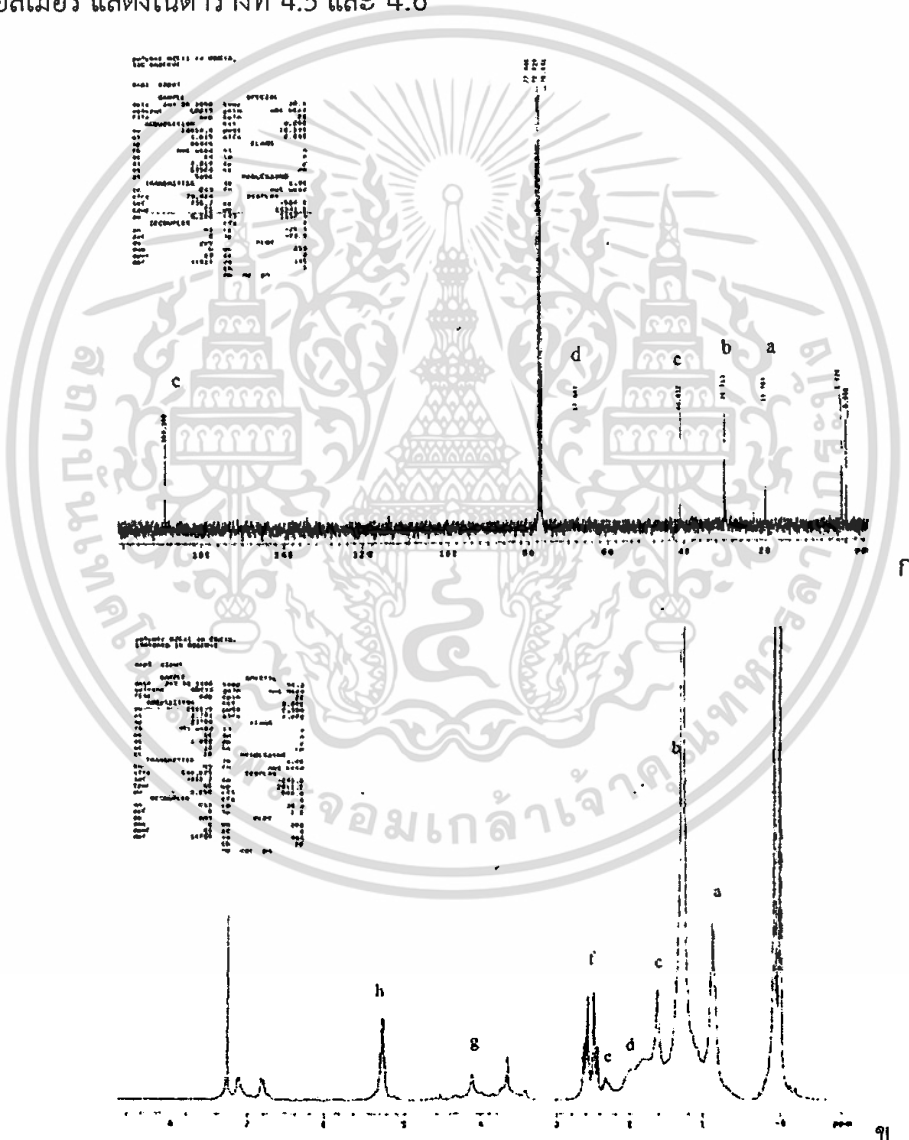


ภาพที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ PHAs ด้วยวิธี TLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3.2 ผลการศึกษาโครงสร้างเคมีของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ด้วย NMR และ FTIR

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไฮโซเลท NBKT10 ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ โดยพิจารณาค่าแห่งของ carbon shift ของคาร์บอนในโครมาโตแกรม ดังแสดงในภาพที่ 4.13 จากภาพจะเห็นว่าสเปกตรัมที่เกิดขึ้นมีการแยกของพีคอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาสูตรโครงสร้างของพอลิเมอร์ P(3HB-co-19%HV) ของ Doi (1990) พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกัน และมีลักษณะใกล้เคียงกับ PHB ซึ่งเป็นพอลิเมอร์มาตรฐาน จากพีคภาพที่ 4.13ก และ ข ของตัวอย่างพอลิเมอร์ที่ผลิตได้สามารถแยกแต่ละพีคได้ว่าเป็นตำแหน่งคาร์บอนที่ตำแหน่งใดในโครงสร้างพอลิเมอร์ แสดงในตารางที่ 4.5 และ 4.6



ภาพที่ 14.13 โครมาโตแกรมของ $^{13}\text{C-NMR}$ (ก) และ $^1\text{H-NMR}$ (ข) ของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ตำแหน่งโปรตอนจากสเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของพอลิเมอร์ที่ NBKT10 ผลิตได้

Chemical shift (ppm)	Peak	ตำแหน่งโปรตอนของหมู่
20	a	-CH ₃ -
29	b	-CH ₂ -(จับกับ-CH ₂ -และ -CH ₂)
40	c	-CH ₂ -
67	d	-CH-
169	e	-COO-

ตารางที่ 4.6 ตำแหน่งโปรตอนจากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของพอลิเมอร์ที่ NBKT10 ผลิตได้

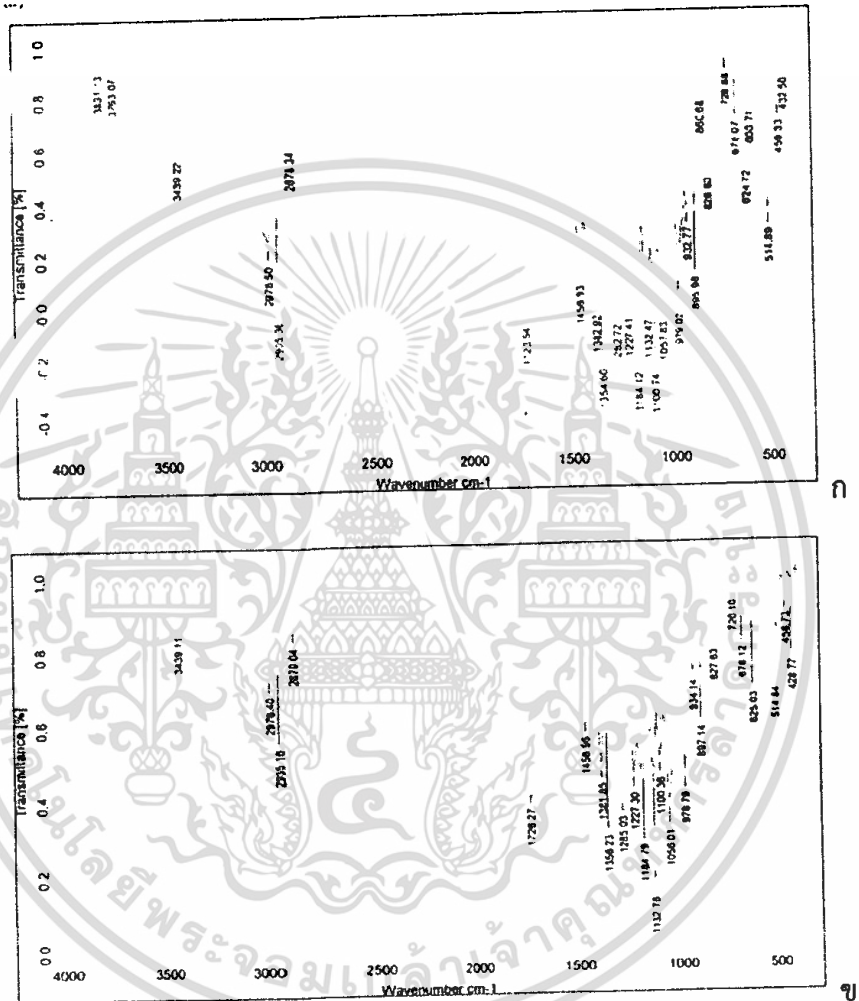
Chemical shift (ppm)	Peak	ตำแหน่งโปรตอนของหมู่
0.82	a	-CH ₃ -(ที่จับกับ -CH ₂ -)
1.23	b	-CH ₃ -(ที่จับกับ -CH-)
1.57	c	-CH ₂ -(ที่จับกับ-CH ₂ -และ -CH ₃)
1.97	d	-CH ₃ -(ที่จับกับ -CH ₂ -และ -CH ₂)
1.99	e	-CH ₂ -(ที่จับกับ -CH- และ -C=O)
2.3	f	-CH ₂ -(ที่จับกับ -CH-และ -C=O)
4.05	g	-CH ₂ -(ที่จับกับ-CH ₂ -และ -O-)
5.24	h	-CH-(ที่จับกับ -O-)

จาก chemical shift ของพอลิเมอร์ที่แบคทีเรียไอโซเลท NBKT10 ผลิตได้นั้น ทำให้ทราบ
ว่าพอลิเมอร์ที่ได้มีโครงสร้างเป็นพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทชนิดพอลิ-3ไฮดรอกซีบิวทริก (P(3HB) และ
ชนิดพอลิ-4ไฮดรอกซีบิวทริก (P(4HB)

จากการศึกษาสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ด้วยวิธี FTIR เปรียบเทียบกับพอลิเมอร์
มาตรฐาน คือ PHB ชนิด PHBV (12%HV) ของ Sigma (USA) พบว่าสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่แบคทีเรีย
ไอโซเลท NBKT10 และของพอลิเมอร์มาตรฐานมีความคล้ายกันมาก ดังแสดงในภาพที่ 4.14 พอลิเมอร์
มาตรฐาน PHBV เป็นพอลิเมอร์ที่ทราบสูตรโครงสร้างแน่นอน จึงทำให้ผลวิเคราะห์มีความแม่นยำยิ่งขึ้นโดย
สามารถระบุสเปกตรัมที่ชัดเจนของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ได้ จากตารางที่ 4.7 จะเห็นว่าสเปกตรัมที่มีความถี่
3439.22 ซึ่งเป็นสเปกตรัมของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และการที่พอลิเมอร์ที่แบคทีเรียไอโซเลท NBKT10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตได้ให้ค่าสเปกตรัมในช่วงกว้าง แสดงว่ามีหมู่ไฮดรอกซิลในปริมาณมาก ซึ่งอาจเป็นผลมาจากตัวอย่างมีความชื้นสูง จึงทำให้เกิดสเปกตรัมของหมู่ไฮดรอกซิลที่มาจากโมเลกุลของน้ำหรือมีผลมาจากการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างของพอลิเมอร์ พอลิเมอร์จึงมีขนาดสั้นลง และเกิดหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่ปลายพอลิเมอร์สายสั้นๆ เหล่านั้น



ภาพที่ 4.14 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัด (ก) และของพอลิเมอร์มาตรฐาน PHB (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 สเปคตรัมและ wave number ของหมู่ฟังก์ชันที่ดูดกลืนแสงของพอลิเมอร์

Frequency (cm ⁻¹)	Functional group
3439.22	OH(H ₂ O)
2978.50, 2935	CH ₃ , CH ₂ (CH stretching)
2879	CH(CH stretching)
1723.54	C=O (ester)
1456.93	CH ₃ , CH ₂ (CH deformation)
1381	CH ₃ , (CH ₃ symmetrical deformation)
978	C-O-C stretching

4.2.3.3 ผลการศึกษาสมบัติทางความร้อน

จากการนำพอลิเมอร์ที่แบคทีเรียไอโซเลท NBKT10 และพอลิเมอร์มาตรฐาน PHB มาศึกษาอุณหภูมิหลอมเหลว (Tm) และอุณหภูมิการเกิดผลึก (Tc) ด้วยเครื่อง DSC พบว่า หลังจากการให้ความร้อนครั้งที่ 2 จะปรากฏพีคของอุณหภูมิหลอมเหลวของผลึก ที่มีค่าใกล้เคียงกัน โดยพีคที่ได้จากพอลิเมอร์ประเภทโฮโมพอลิเมอร์ พีคจะมีลักษณะเป็นยอดแหลม เมื่อวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว glass temperature (Tg) และ อุณหภูมิการเกิดผลึก (Tc) ของพอลิเมอร์มาตรฐาน พบว่ามีค่า 172.3 องศาเซลเซียส 1.035 องศาเซลเซียส และ 121.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ขณะที่ค่าอุณหภูมิหลอมเหลว glass temperature (Tg) และ อุณหภูมิการเกิดผลึก (Tc) ของพอลิเมอร์ที่แบคทีเรียไอโซเลท NBKT10 มีค่า 135.2 องศาเซลเซียส -9.70 องศาเซลเซียส และ 49.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 สมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้และพอลิเมอร์มาตรฐาน

พอลิเมอร์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	Tm	Tg	Tc
พอลิเมอร์ที่ผลิตได้	132.2	-9.70	49.0
พอลิเมอร์มาตรฐาน PHB	172.3	1.035	121.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 สมบัติทางเคมีของกากปาล์มน้ำมัน (Oil palm mill)

ผลการตรวจสอบสมบัติทางเคมีต่างๆของกากปาล์มน้ำมันแต่ละชนิด แสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 สมบัติทางเคมีต่างๆของกากปาล์มน้ำมันแต่ละชนิด

สมบัติทางเคมี	ชนิดกากปาล์มน้ำมัน		
	กากปาล์มชนิดเนื้อใน (K)	กากปาล์มชนิดเนื้อเบา (M)	K + M อัตรา 1:1 โดยน้ำหนัก
% ความชื้น	12.1567±0.6326 ^a	9.5200±0.5021 ^b	7.1600±0.6092 ^c
%ไนโตรเจนที่ย่อยได้	7.2067±0.3101 ^c	11.4900±1.2013 ^a	9.4967±0.5829 ^b
% ไนโตรเจนทั้งหมด	38.6933±0.3522 ^b	40.9033±0.3927 ^a	38.7967±0.5072 ^b
% คาร์บอน	61.78±1.3839 ^b	66.65±1.1409 ^a	66.27±1.4131 ^a
Reducing sugar (mg/ml)	2.1600±0.0721 ^a	2.3470±0.1201 ^a	2.2733±0.1570 ^a
% fat /oil	7.0667±0.1716 ^c	10.2333±0.1904 ^b	15.3100±0.5411 ^a
Free fatty acid as palmitic acid (mg/g)	0.5600±0.0964 ^a	0.4400±0.1054 ^a	0.3533±0.0851 ^a

หมายเหตุ ตามอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ชนิด เมื่อนำมาศึกษาอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน: ไนโตรเจนที่ย่อยสลายได้ (C/N) พบว่า กากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อใน (K) กากปาล์มชนิดเนื้อเบา (M) และ กากปาล์มน้ำมันผสม อัตรา 1:1 โดย น้ำหนัก (K + M) มีปริมาณ C/N เท่ากับ 8.57, 5.80 และ 6.98 ตามลำดับ

โดยปกติแล้วแบคทีเรียจะมีการสร้าง PHAs ในสภาวะที่ปริมาณคาร์บอนสูงแต่ขาดสารอาหารไนโตรเจน ดังนั้นกากปาล์มน้ำมันที่เหมาะสมต่อการนำไปศึกษาเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์ (NKBT02, NKBT07 และ NKBT10) และแบคทีเรียควบคุม *Bacillus megaterium* และ *Ralstonia eutrophus* ได้แก่ กากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบา เอกสารฉบับเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การผลิตแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้โดยใช้กากปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งอาหาร

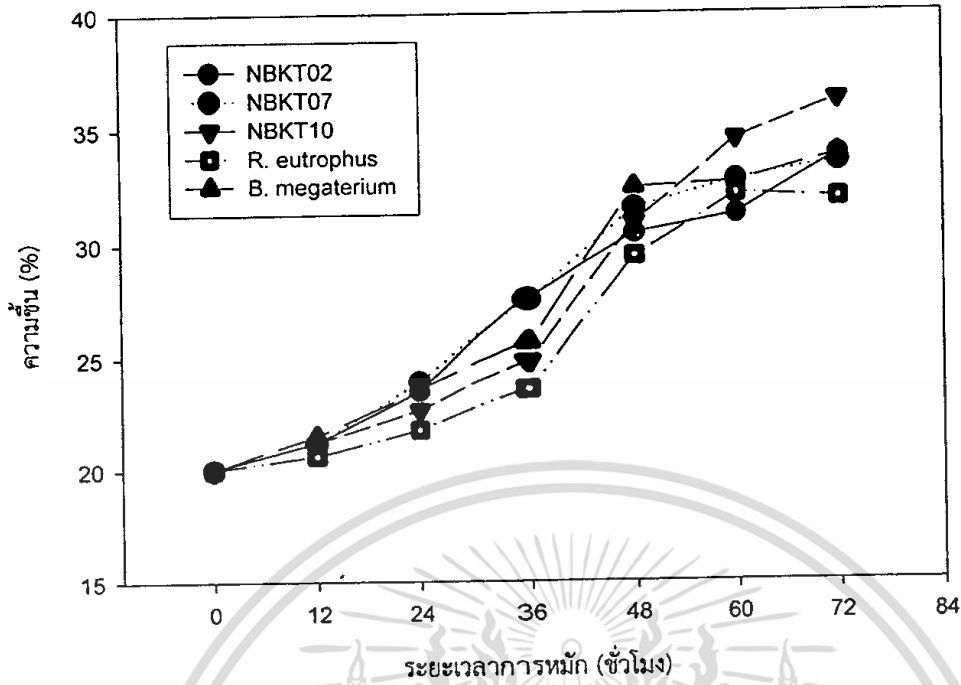
4.5.1 ผลของการนิ่งและไม่นิ่งกากปาล์มน้ำมันชนิดเบา

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้คือ NKBT02, NKBT07 และ NKBT10 ในกากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบาที่ไม่ผ่านการนิ่ง และที่ผ่านการนิ่ง จำนวน 100 กรัม ในพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง (31-34 องศาเซลเซียส) และเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อวัดความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และตรวจดูการสะสมเม็ดไขมันภายในเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เปรียบเทียบกับแบคทีเรียควบคุม *Ralstonia eutrophus* และ *B. megaterium* พบว่า

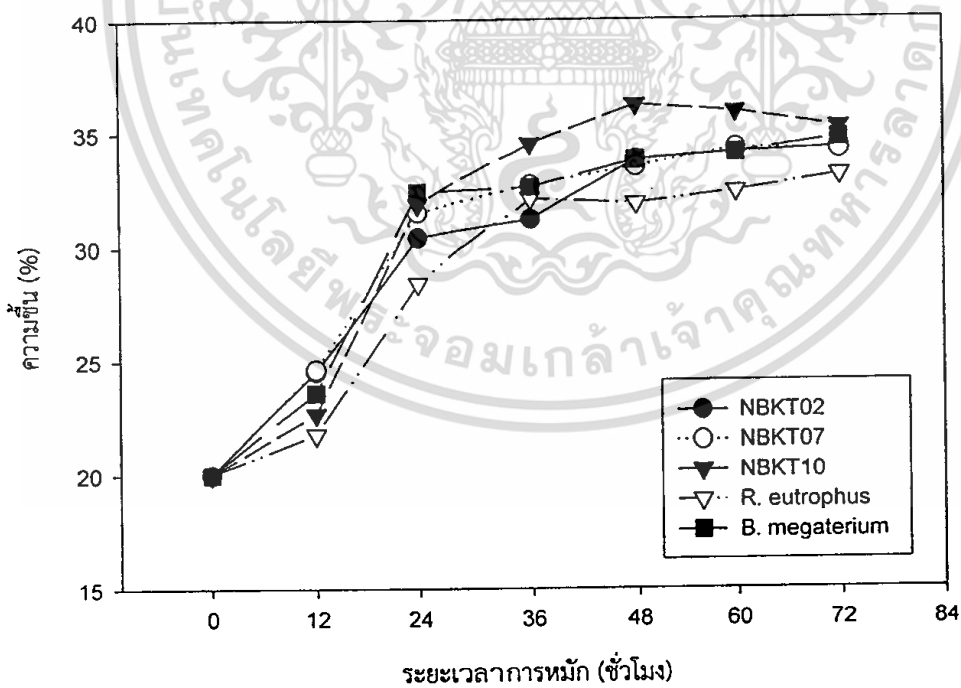
4.5.1.1 การเปลี่ยนแปลงความชื้น

ความชื้นภายในกากปาล์มน้ำมันเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก นั้นแสดงว่ามีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียภายในกองหมัก ความชื้นที่เพิ่มขึ้นมาจากการหายใจของจุลินทรีย์ในกองหมักที่เพิ่มขึ้นจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ 3 ไอโซเลท ในกากปาล์มน้ำมันที่ไม่ผ่านการนิ่ง พบว่าความชื้นของกองหมักด้วยแบคทีเรียไอโซเลท NBKT07 จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 36 ชั่วโมงแรก ขณะที่ ความชื้นของกองหมักด้วยแบคทีเรียไอโซเลท NBKT10 เพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 60-72 และเมื่อเปรียบเทียบกับกองหมักด้วยแบคทีเรียควบคุมพบว่าลากลอกที่หมักด้วยแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความชื้นสูงกว่าในพลาสติกที่หมักด้วยแบคทีเรียควบคุมทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังภาพที่ 4.15

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงความชื้นภายในกากปาล์มน้ำมันที่ผ่านการนิ่งพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่คล้ายกันกับการหมักกากปาล์มที่ไม่ผ่านการนิ่ง กล่าวคือ ความชื้นในพลาสติกเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมักทุกการทดลอง แต่ความชื้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าการหมักในกากปาล์มที่ไม่ผ่านการนิ่ง โดยความชื้นของกองหมักด้วยแบคทีเรียไอโซเลท NBKT07 จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสูงกว่าการหมักด้วยแบคทีเรีย NBKT02 NBKT07 และแบคทีเรียควบคุมทั้ง 2 สายพันธุ์ ตลอดระยะเวลาการหมัก ดังภาพที่ 4.16 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ไอโซเลท NBKT10 มีแนวโน้มที่จะเจริญได้ดีในกากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบาที่ผ่านการนิ่ง



ภาพที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงความชื้นระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ในกากปาล์มน้ำมันที่ไม่ผ่านการนึ่ง

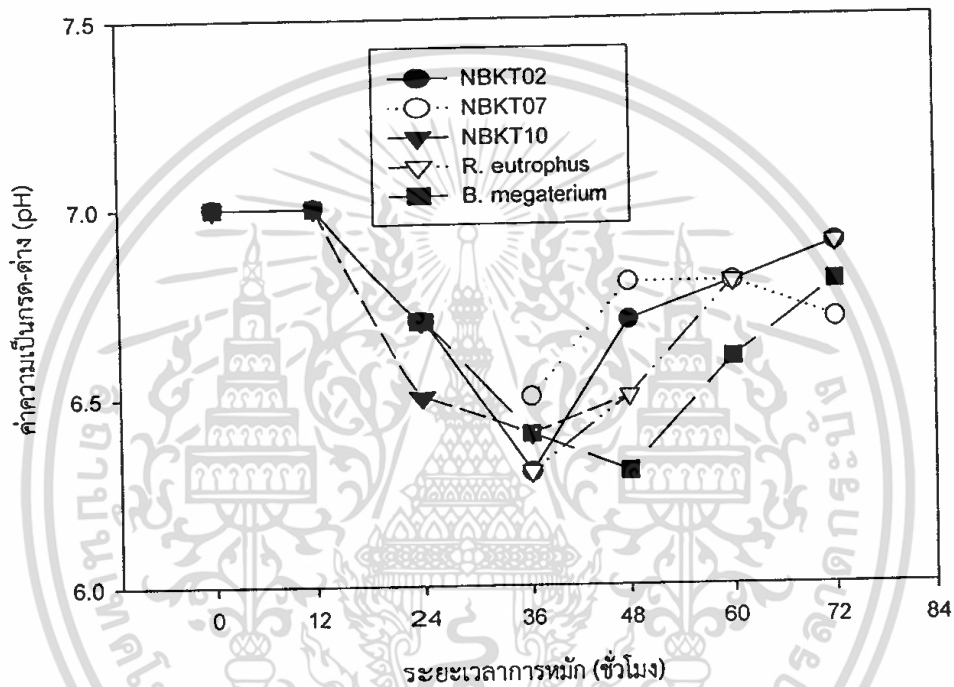


ภาพที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงความชื้นระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ในกากปาล์มน้ำมันที่ผ่านการนึ่ง

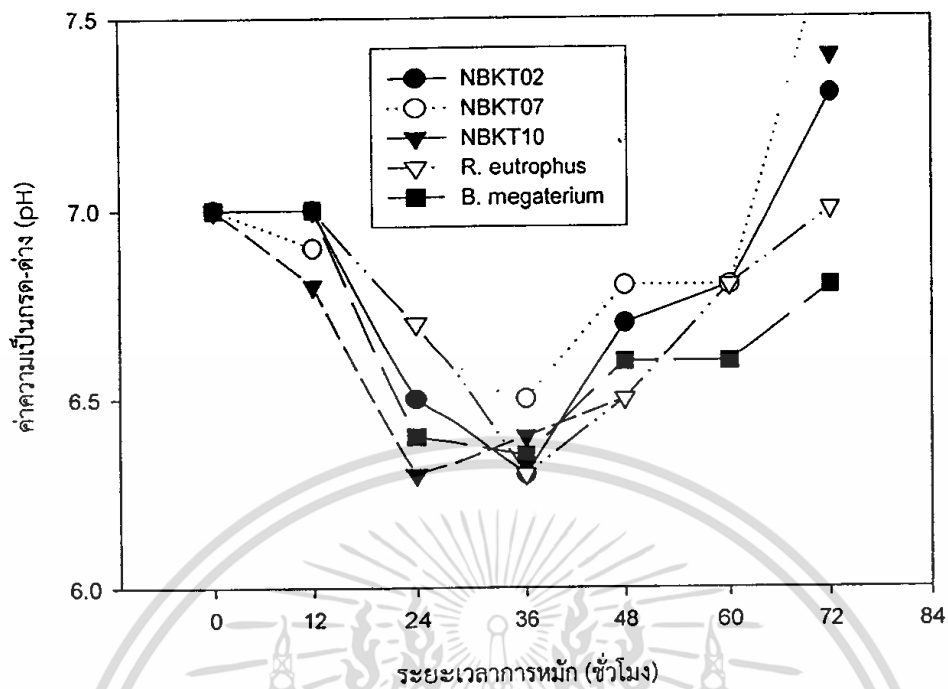
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ 3 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับแบคทีเรียควบคุม ในกากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบาที่ไม่ผ่านการนึ่งและที่ผ่านการนึ่ง พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างภายในกากปาล์มน้ำมันมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงแคบๆ โดยค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงเล็กน้อยในช่วงแรกของการหมัก หลังจากนั้นจึงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังภาพที่ 4.17 และ ภาพที่ 4.18



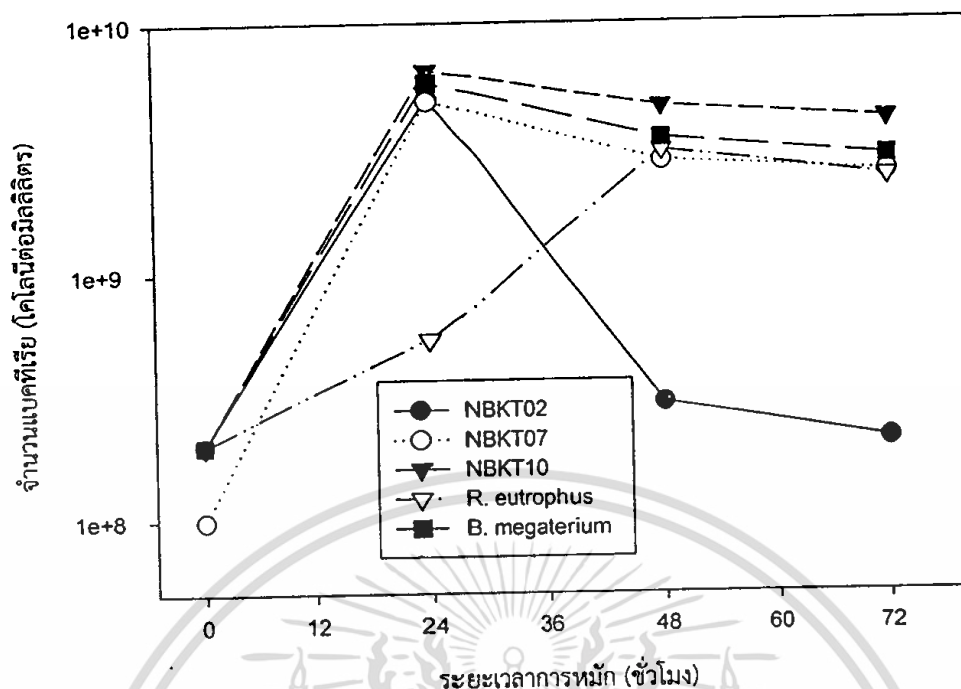
ภาพที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ในกากปาล์มน้ำมันที่ไม่ผ่านการนึ่ง



ภาพที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ในกากปาล์มน้ำมันที่ผ่านการนึ่ง

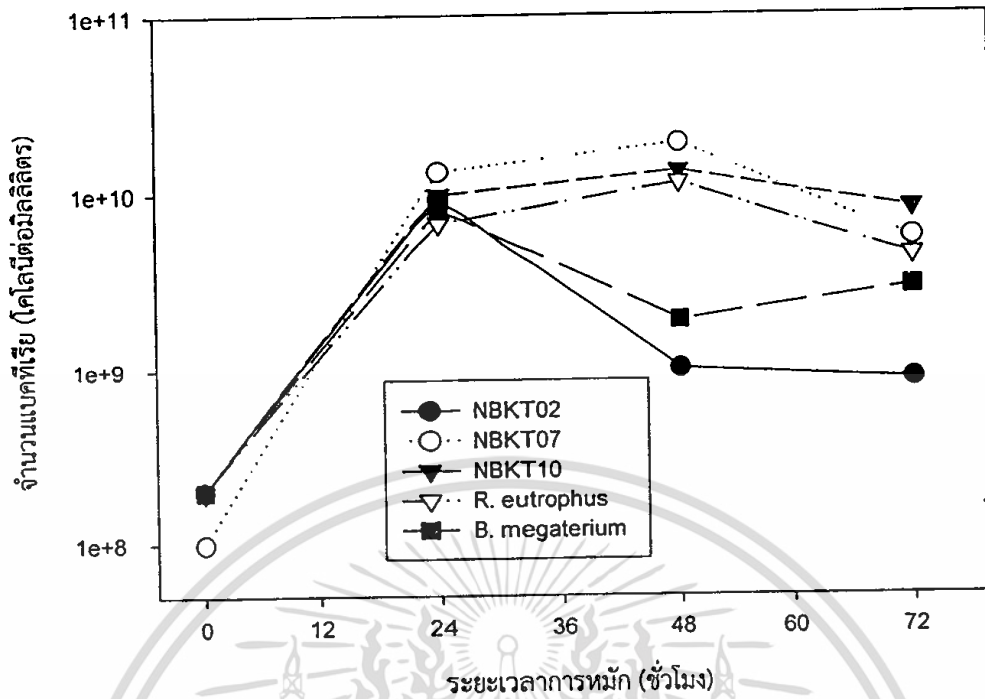
2) จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกองหมักระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ 3 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับแบคทีเรียควบคุม ในกากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบาที่ไม่ผ่านการนึ่งและที่ผ่านการนึ่ง พบว่า จำนวนแบคทีเรียในกองหมักกากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบาที่ไม่ผ่านการนึ่งที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท NBKT 07 และ NBKT 10 มีลักษณะการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับแบคทีเรียควบคุมและมีจำนวนแบคทีเรียสูงกว่าแบคทีเรียไอโซเลท NBKT 02 โดยกองหมักที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท NBKT 10 มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดสูงที่สุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และหลังจากนั้นลดลงเล็กน้อย ดังภาพที่ 4.19



ภาพที่ 4.19 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ในกากปาล์มน้ำมันที่ไม่ผ่านการนึ่ง

สำหรับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกองหมักระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ 3 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับแบคทีเรียควบคุม ในกากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบาที่ผ่านการนึ่งพบว่า จำนวนแบคทีเรียในกองหมักกากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบาที่ผ่านการนึ่งที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท NBKT 07 และ NBKT 10 มีลักษณะการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับแบคทีเรียควบคุม *R. eutrophus* เพียงสายพันธุ์เดียว โดยกองหมักที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท NBKT 07 มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดสูงที่สุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 และหลังจากนั้นลดลงเล็กน้อย ดังภาพที่ 4.20



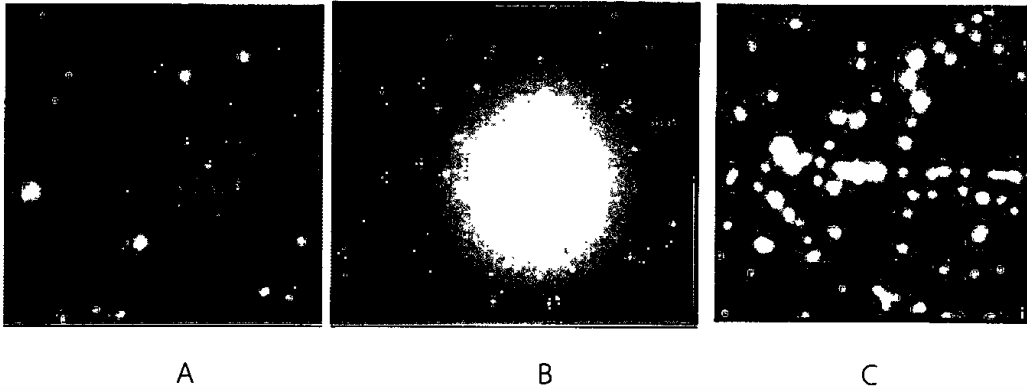
ภาพที่ 4.20 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ในกากปาล์มน้ำมันที่ผ่านการนึ่ง

จากภาพที่ 4.19 และ ภาพที่ 4.20 จะเห็นว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่สูงที่สุดภายในกองหมักกากปาล์มที่ผ่านการนึ่งที่เติมกล้าเชื้อ NBKT 07 มีจำนวนสูงกว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในกองหมักกากปาล์มที่ไม่ผ่านการนึ่ง ที่เติมกล้าเชื้อ NBKT 10

อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการหมักได้ทำการตรวจสอบการสะสมเม็ดไขมันในเซลล์แบคทีเรียที่เจริญในกองหมักกากปาล์มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่ไอโซเลทได้ทั้ง 3 ไอโซเลท อีกครั้ง เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียในกองหมักมีการสังเคราะห์เม็ดไขมัน

3) การตรวจสอบการสะสมเม็ดไขมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

จากการตรวจดูการสะสมเม็ดไขมันของแบคทีเรียผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท เมื่อสิ้นสุดการหมัก พบว่า มีเพียงแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ไอโซเลท NBKT07 NBKT10 และ แบคทีเรียควบคุม *B. megaterium* เท่านั้นที่มีการสะสมเม็ดไขมัน ดังภาพที่ 4.21



ภาพที่ 4.21 การสะสมเม็ดไขมันภายในเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไอโซเลท NBKT07 (A) NBKT10 (B) และ แบคทีเรียควบคุม *B. megaterium* (C) ที่กำลังขยาย 400 เท่า

4.6 สภาวะการหมัก PHAs ด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ NBKT10

4.6.1 ผลของอัตราส่วนของ C/N ต่อการสังเคราะห์ PHAs

1) ผลของปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่อปริมาณแบคทีเรียและปริมาณ PHAs ที่สังเคราะห์ได้

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ NBKT07 และ NBKT10 ในกากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบาที่ผ่านการนึ่ง 5 กิโลกรัม ที่มีปริมาณกลูโคส 0, 0.25, 0.5 และ 1% ของน้ำหนักกากปาล์ม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง มาวัดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 4.9 จะเห็นว่าแบคทีเรียไอโซเลท NBKT10 เจริญได้รวดเร็วและดีกว่าแบคทีเรียไอโซเลท NBKT07 ในทุกความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส โดยแบคทีเรียไอโซเลท NBKT10 โดยมีการเจริญดีที่สุด ในกากปาล์มน้ำมันที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1%

2) ผลของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตต่อปริมาณแบคทีเรียและปริมาณ PHAs ที่สังเคราะห์ได้

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ NBKT07 และ NBKT10 ในกากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบาที่ผ่านการนึ่ง 5 กิโลกรัม ที่เติมกลูโคส 1% ของน้ำหนักกากปาล์ม และแอมโมเนียมซัลเฟต 0, 0.025, 0.05 และ 0.1% ของน้ำหนักกากปาล์มน้ำมัน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง มาวัดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ จะเห็นว่าทั้งแบคทีเรียไอโซเลท NBKT07 และ NBKT10 เจริญได้ดี ในทุกความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (ตารางที่ 4.10) แต่เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทที่เลี้ยงในกากปาล์มที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 72 ชั่วโมงไปตรวจดูการสะสมเม็ดไขมัน พบว่าแบคทีเรียผลิต PHAs ไอโซเลท NBKT10 มีความหนาแน่นของเม็ดไขมันมากกว่า

ดังนั้นจึงได้นำเซลล์แบคทีเรีย NBKT10 ไปทำการสกัด และศึกษาปริมาณPHAs พบว่ามีปริมาณอยู่ในช่วง 17.00-35.45% (w/w)

3) ผลของการให้อากาศต่อการสังเคราะห์ PHAs

จากการทดลองการให้อากาศโดยการถ่ายกากปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบาที่ผ่านการนึ่งและเติมน้ำตาลกลูโคส 1% จากถังหมักหนึ่งไปสู่อีกกะบะหนึ่ง ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง นำมาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เปรียบเทียบกับการไม่ถ่ายกองหมัก ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.12

จากตารางที่ 4.12 จะเห็นว่า เมื่อมีการให้อากาศโดยการถ่ายกองหมักไปสู่ถังหมักใหม่ จะมีผลทำให้จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และเมื่อนำเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในถังหมักที่มีการให้อากาศเป็นเวลา 72 ชั่วโมงไปสกัดและศึกษาปริมาณPHAs พบว่ามี PHAs อยู่ในช่วง 22-37% (w/w)



ตารางที่ 4.10 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างการทำหมักของแบคทีเรียผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ในภาคปาล์มน้ำมันชนิดเนื้อเบาที่ผ่านการหมักและเติมน้ำตาลกลูโคส

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนแบคทีเรียในกองหมัก NBKT07 ที่เติมน้ำตาลกลูโคส (โคโลนีต่อมิลลิเมตร)					จำนวนแบคทีเรียในกองหมัก NBKT10 ที่เติมน้ำตาลกลูโคส (โคโลนีต่อมิลลิเมตร)				
	0%	0.25%	0.5%	1.0%	0%	0.25%	0.5%	1.0%		
0	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	
24	2.60×10^9	3.10×10^9	4.90×10^9	7.87×10^9	2.60×10^9	3.10×10^9	3.97×10^9	8.93×10^9	8.93×10^9	
48	7.50×10^9	6.80×10^9	5.43×10^{10}	6.30×10^9	4.56×10^{10}	6.80×10^{10}	6.43×10^{10}	8.23×10^{10}	8.23×10^{10}	
72	2.00×10^9	5.40×10^9	1.04×10^{10}	5.10×10^9	1.70×10^{10}	2.40×10^{10}	3.04×10^{10}	6.70×10^{10}	6.70×10^{10}	

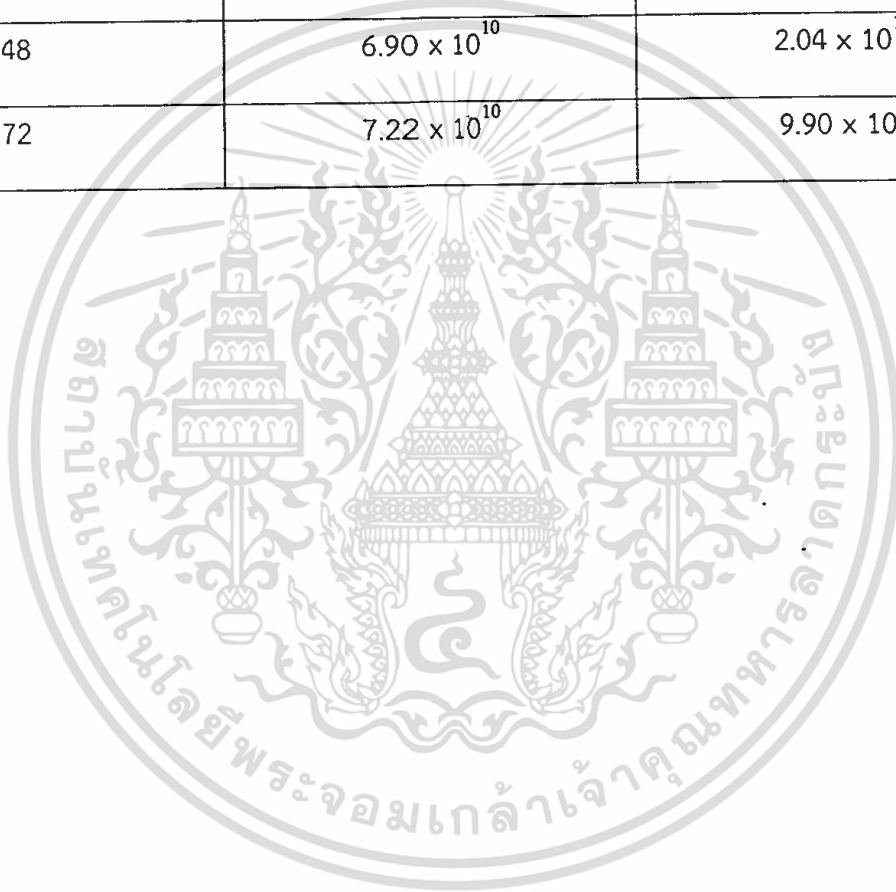
ตารางที่ 4.11 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างการทำหมักของแบคทีเรียผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ในสภาพการนำมันชนิดเนื้อเป่าที่ผ่านการนึ่งและเติมแอมโมเนียมซัลเฟต

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนแบคทีเรียในกองหมัก NBKT07 ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต (โคโลนีต่อมิลลิเมตร)					จำนวนแบคทีเรียในกองหมัก NBKT10 ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต (โคโลนีต่อมิลลิเมตร)				
	0%	0.025%	0.05%	0.1%	0%	0.025%	0.05%	0.1%	0.025%	0.05%
0	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9	1.99×10^9
24	2.00×10^9	2.10×10^9	5.70×10^9	8.87×10^9	3.60×10^9	4.10×10^9	6.97×10^9	7.12×10^9	6.97×10^9	7.12×10^9
48	4.33×10^9	4.80×10^9	3.93×10^{10}	9.23×10^{10}	5.66×10^9	6.80×10^{10}	8.43×10^{10}	7.23×10^{10}	8.43×10^{10}	7.23×10^{10}
72	8.77×10^9	8.40×10^9	4.04×10^{10}	7.10×10^{10}	3.70×10^9	2.40×10^{10}	3.04×10^{10}	6.70×10^{10}	3.04×10^{10}	6.70×10^{10}

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิต PHAs ไอโซเลท NBKT10 ในสภาพที่มีการให้อากาศ และไม่ให้อากาศ

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	
	มีการให้อากาศ	ไม่มีการให้อากาศ
0	2.02×10^9	2.12×10^9
24	3.87×10^9	3.50×10^9
48	6.90×10^{10}	2.04×10^{10}
72	7.22×10^{10}	9.90×10^9



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากของเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ทั้ง 3 โรงงาน โดยคัดแยกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะโคโลนี รูปร่างของเซลล์และการติดสีแกรม คัดแยกได้จำนวน 11 ไอโซเลท คือ NKBT01, NKBT02, NKBT03, NKBT04, NKBT05, NKBT06, NKBT07, NKBT08, NKBT09, NKBT10 และ NKBT11 พบว่า ทุกไอโซเลทเป็นแกรมบวก รูปร่างของเซลล์ มีลักษณะกลม 8 ไอโซเลท และท่อน 3 ไอโซเลท

จากการตรวจสอบดูเม็ดไขมัน ด้วยสีย้อม Sudan Black B พบว่ามีแบคทีเรียที่สะสมเม็ดไขมันภายในเซลล์ จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ NKBT01, NKBT02, NKBT03, NKBT04, NKBT07, NKBT09 และ NKBT10

จากการตรวจสอบการสะสม PHAs ด้วยสีย้อม Nile Blue A พบว่ามีแบคทีเรียที่มีการสะสม PHAs จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ NKBT02, NKBT07 และ NKBT10 และจากการศึกษาสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรีย NBKT10 พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Ralstonia eutrophus*

จากการศึกษาเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ในอาหารกากปาล์มน้ำมัน พบว่าแบคทีเรียผลิต PHAs ไอโซเลท NBKT10 สามารถผลิต PHAs ได้ปริมาณ 37% (w/w) เมื่อเพาะเลี้ยงในกากปาล์มน้ำมันที่ผ่านการนึ่งและเติมกลูโคส 1% โดยน้ำหนักกากปาล์มในสภาพที่มีการถ่ายก่องหมักทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

บทที่ 6

สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

จากการทำวิจัยได้ผลผลิตจากการวิจัย ดังนี้

1. ชิ้นงานและกระบวนการ

1.1 แบคทีเรียที่สามารถผลิต polyhydroxyalkanoates (PHAs) ได้ 3 ไอโซเลทคือ แบคทีเรีย NBKT02, NBKT07 และ NBKT10

1.2 ลักษณะกากปาล์มน้ำมันที่เป็นแหล่งอาหารและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิต PHAs NBKT10 คือกากปาล์มน้ำมันชนิดเบาที่ผ่านการนึ่งไอน้ำแล้วและเติมกลูโคส 1% โดยน้ำหนักกากปาล์มในสภาพที่มีการถ่ายก่องหมักทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการนานาชาติ

2.1 นำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ เรื่อง THE ISOLATION AND SCREENING OF POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCING BACTERIA FROM WASTEWATER AND SOIL FROM PALM OIL REFINING PLANT AREA ในการประชุมวิชาการนานาชาติ THE AFOB REGIONAL SYMPOSIUM: Asian Biotechnology: Research and Application ระหว่างวันที่ 28-30 มกราคม 2559 ณ Green Hotel Hue, Hue City Vietnam

3. บทความวิชาการในวารสารวิชาการนานาชาติ

3.1 บทความวิจัยเรื่อง THE ISOLATION AND SCREENING OF POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCING BACTERIA FROM WASTEWATER AND SOIL FROM PALM OIL REFINING PLANT AREA เสนอตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Biotechnology (อยู่ระหว่างการพิจารณาตอบรับ)

เอกสารอ้างอิง

- ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล. 2008. PHA: พลาสติกชีวภาพจากแบคทีเรีย. *ส่งเสริมเทคโนโลยี*. 35(202): 66-72.
- โสภา ชินเวชกิจวานิชย์. 2550. พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable Plastic): การผลิตพีเอชเอจากระบบบำบัดน้ำเสีย. *สิ่งแวดล้อม*. 11(3): 49-66.
- Anderson, A. J. and J. P. Wynn. 1995. Microbial polyhydroxyalkanoates, polysaccharides, and Lipids. In *Basic Biotechnology*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge. p.325-333.
- Doi, Y., I. Matsubara and H. Abe. 1995. Physical property and enzymatic degradability of polymer blends of bacterial poly [(R)-3-hydroxybutyrate] and poly [(R,S)-3-hydroxybutyrate] stereoisomers. *Macromolecule*. 28: 844-853
- Grothe, E., M. Y. Murray, and C. Yusuf. 1999. Fermentation optimization for the production of poly(β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme Microbial Technology*. 25:132-141.
- Krupp, L.R. and W.J. Jewell. 1992. Biodegradability of modified plastic films in controlled Biological environments. *Environmental Science Technology*. 26: 193-198.
- Lafferty, M.R., B. Korsatko and W. Korsatko. 1988. *Special Microbial Process : Microbial Production of of Poly- β -hydroxybutyric Acid*. VCH Publishers, Germany. 256.
- Lageveen, R.G., G.W. Huisman, H. Preusting, H. Ketelaar, G. Eggink, and B. Witholt. 1988. Formation of polyesters by *Pseudomonas eleovans*: Effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkanoates. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 2924-2932.
- Lee, S.Y. 1996a. Review bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. 49: 1-14.
- Lee, S.Y. 1996b. Plastic Bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Tibtech*. 14: 431-438.
- Lee, S. and J., Yu. 1997. Production of biodegradable thermoplastic from municipal sludge by a two-stage bioprocess. *Conserv. Recycling*. 19:51-64.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Luenggo, J.M., B. Garcia, A. Sandoval, G. Noharro, and E.R. Olivera. 2003. Bioplastic from microorganism. *Curr. Opin Microbiol.* 6: 256-260.
- Madison, L.L. and G.W. Huisman. 1999. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoate) DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Review.* 63: 21-53.
- Oeding, V. and H.G. Schlegel. 1973. β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutrophus* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. *Biochem. J.* 134: 293-248.
- Ostle, A.G. and J.G. Holts. 1982. Nile Blue A as a fluorescent stain of poly-B-Hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology.* 44: 238-241.
- Reddy, C.S.K., R. Ghai, Rashmi and V.C. Kalia. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology.* 87: 137-146.
- Redzwan, G., S.N. Gan and I.K.P. Tan. 1997. Short Communication: Isolation of polyhydroxyalkanoate producing bacteria from an integrated-farming pond and plam-oil mill effluent ponds. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 13: 707-709.
- Shimizu, H., S. Shioya, and K. I. Suya. 1990. Cultivation condition for production of biodegradable poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* H16. In Annual Report of IC biotech (ed. Osshima, Y.) Osaka University, Osaka. pp. 113-119.
- Sudesh, H., H. Abe, and Y. Doi. 2000. Synthesis, structure and properties of Polyhydroxyalkanoate: biological polyester. *Prog. In Polym. Sci.* 25: 1503-1555.
- Verlinden, R.A.J., D.J. Hill, M.A. Kenward, C.D. Williams and I. Radecka. 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.* 102: 1437-1449.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Nutrient broth

Nutrient broth	13	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

2. อาหาร Nutrient agar

Nutrient broth	13	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

3. อาหาร Nitrogen limiting medium

Sodium ammonium hydrogen phosphate tetrahydrate	3.5	กรัม
Di-potassium hydrogen orthophosphate	7.5	กรัม
Potassium dihydrogen orthophosphate	3.7	กรัม
Glucose	20	กรัม
MT micro elements stock solution	1	มิลลิลิตร
100 mM Magnesium sulphate hydrate	10	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. MT micro elements stock solution

- Calcium chloride dehydrate	0.147 กรัม
- Copper chloride	0.017 กรัม
- Cobalt (II) sulphate	0.281 กรัม
- Manganese chloride	0.15 กรัม
- Zinc oxide	0.0082 กรัม
- ferrous sulfate	0.278 กรัม

ละลายใน 1N HCl 100 มิลลิลิตร

2. สารละลาย 100 mM Magnesium sulphate hydrate

Magnesium sulphate hydrate 4.92 กรัม ละลายในน้ำ 200 มิลลิลิตร

3. สารละลาย Sudan Black B solution

Sudan Black B 0.3 กรัม ละลายใน 70% Ethyl alcohol 100 มิลลิลิตร

4. สารละลาย Nile Blue A solution

Nile Blue A 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต

1. อีเมลตอบรับ และ บทคัดย่อ ที่นำเสนอผลงานทางวิชาการภาคโปสเตอร์ เรื่อง THE ISOLATION AND SCREENING OF POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCING BACTERIA FROM WASTEWATER AND SOIL FROM PALM OIL REFINING PLANT AREA ในการประชุมวิชาการนานาชาติ THE AFOB REGIONAL SYMPOSIUM: Asian Biotechnology: Research and Application ระหว่าง วันที่ 28-30 มกราคม 2559 ณ Green Hotel Hue, Hue City Vietnam

16/2015

Gmail - ARS 2016 - Template of the abstract

Gmail

nakanyapatthara Jinda <nakanyapattharaj@gmail.com>

ARS 2016 - Template of the abstract

Nguyễn Đức Huy <7thars2016@gmail.com>
 ถึง: nakanyapatthara Jinda <nakanyapattharaj@gmail.com>

7 ธันวาคม 2558 09:12

Dear Sir/Madam.

We have received your abstract for 7th ARS2016. We would like to thank for your kindly attendance to 7th ARS2016.
 We would like to remind that international participants should perform online registration through AFOB's system at: <http://registration.afob.org> not later than December, 30th 2015.

We look forward to meeting you in Hue.

Sincerely,

7th ARS secretariat

Hue University of Sciences

Tel: (+84)(54).3822934. 916066357

Fax: +84(54).3824901

Email: 7thars2016@gmail.com

Website: <http://www.husc.edu.vn> ars2016-

On Mon, Dec 7, 2015 at 8:59 AM, Hue University of Sciences <doingoaidhkh@gmail.com> wrote:
 FYI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE ISOLATION AND SCREENING OF POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCING BACTERIA FROM WASTEWATER AND SOIL FROM PALM OIL REFINING PLANT AREA

Nakanyapathara Jinda^{1*} and Thanyapat Paniticharoenwong²

Division of Biotechnology, Department of Science and Liberal Arts, King Mongkut's Institute of
Technology Ladkrabang, Prince of Chumphon campus, Chumphon Province, 86160, Thailand
Department of Biotechnology, Agro-Industry Faculty, Kasetsart University, Bangkok, 10900, Thailand

E-mail: nakanyapathara.j@gmail.com

Abstract

Crude palm oil (CPO) is the important raw material for edible oil production and non-food products. In fact, the CPO producing process and RBD oil process releases much amount of solid waste (oil palm meal, bunches, etc.) and waste water contain very high organic matter that affects on environment. The oil palm meal is residue from oil extraction process, it mainly consist of organic compounds, such as starch and lipid. It is the carbon source of PHAs producing bacteria. The PHAs is a biopolymer. In this way, the objectives of this research were isolation and screening of PHAs producing bacteria from waste water and soil contaminated the oil in palm oil industries area. The isolated bacteria were cultured in selective media. The in bacteria cell were stained with Sudan Black B and their lipid granules were detected under microscope. There were 7 isolates showed the lipid granules in cells. Then, all of 7 isolate were cultivated in the "Nitrogen limiting medium" for 48 hours. After that, the PHAs synthesis in their cells were approved by Nile Blue A dye staining and the fluorescent granules were inspected under the fluorescence microscope. *Bacillus megaterium* was used as the positive control bacteria. The results showed that the fluorescent granules were found in three isolates, NKBT02, NKBT07 and NKBT10. The PHAs in the extracts of three isolates performed were recognized by GC, finally.

Keywords: PHAs producing bacteria, palm oil refining waste, lipid granule

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
สรุปค่าใช้จ่ายเงินโครงการวิจัย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบรายงานการใช้จ่ายเงินโครงการวิจัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปีงบประมาณ.....2558.....

หน่วยงาน..... วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์..... จังหวัดชุมพร.....

 แหล่งงบประมาณแผ่นดิน (แบบปกติ) แหล่งเงินรายได้

ชื่อโครงการ การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทโดยการหมักกากปาล์มน้ำมันด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

ได้จากดินบริเวณบ่อบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

The production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by fermentation of oil palm mill by microorganism screened from soil in waste water treatment plant area.

ชื่อ-สกุลหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน/ผู้วิจัย (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.) ฅกัญภัทร จินดา.....

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่..... 1 ตุลาคม 2557..... ถึงวันที่..... 30 กันยายน 2558.....

ระยะเวลาดำเนินการ..... 1..... ปี..... เดือน ตั้งแต่วันที่..... 1 ตุลาคม 2557..... ถึงวันที่..... 30 กันยายน 2558.....

ข้อมูลการรายงานค่าใช้จ่ายงบประมาณโครงการวิจัย

1. การเบิกจ่ายงบประมาณ

งวดที่ 1 130,900.-..... บาท 50 % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน 05/12/57

งวดที่ 2 130,900.-..... บาท 50 % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน 01/05/58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน (จำแนกตามหมวดค่าใช้จ่าย)

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่าย (บาท)	คงเหลือ หรือเกิน
งบบุคลากร : ค่าจ้างชั่วคราว	-	-	-
งบดำเนินงาน			
ค่าตอบแทน	-	-	-
ค่าใช้สอย	151,800.-	95,294.39	56,505.61
ค่าวัสดุ	110,000.-	110,000.-	0.-
ค่าสาธารณูปโภค		-	
งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์	-		-
รวม	261,800.-	205,294.39	56,505.61

(ผศ.ดร.ณภัฏภัทร จินดา)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

20/ธ.ค./58

(นางสาวจิรณัฐณัฐ บังชู)

นักวิชาการเงินและบัญชี

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงิน/เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง

20 / ธ.ค. / 2008

หมายเหตุ ยอดเงินคงเหลือ ณ ปัจจุบันเป็นค่าใช้จ่ายสำหรับการนำเสนอผลงานวิชาการในการประชุม
นานาชาติ The 7th AFOB REGIONAL SYMPOSIUM 2016: Asian Biotechnology: Research and Application
ณ เมือง Hue ประเทศเวียดนาม ในวันที่ 28-30 มกราคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวณกัญภัทร (ชื่อเดิม จันทนา) จินดา

ชื่อ-นามสกุล(ภาษาอังกฤษ) Miss Nakanyapatthara (Jantana) Jinda

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีจบ
วท.บ.	อุตสาหกรรมเกษตร	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ลาดกระบัง	2534
วท.ม.	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2537
ปร.ด.	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (โครงการนานาชาติ)	2547

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

เทคโนโลยีเอนไซม์ เทคโนโลยีน้ำมันพืชและผลิตภัณฑ์ประเภท non food products และการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

บ. พ.ศ.	ทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2541	การคัดเลือกและศึกษาแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากผลปาล์ม น้ำมันเสีย	สำนักงานคณะกรรมการการ อุดมศึกษา
2548	การผลิตไบโอดีเซลจากผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมกลั่นน้ำมันพืช เศรษฐกิจแบบต่อเนื่องด้วยวิธีทางชีวภาพ	AGENDA มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2549	การสกัดสารออกฤทธิ์จากดาวเรืองด้วยเอนไซม์และการใช้ ประโยชน์	วช
2548	การเพิ่มปริมาณไขมันไม่อิ่มตัวในน้ำมันสบู่ดำดิบด้วยเอนไซม์ไลเปส สำหรับไบโอดีเซล	กระทรวงพลังงาน/ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2553	การสารสกัดไบโอสบูดำยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคแบบฉวย โอกาสในคนและการใช้ประโยชน์	วช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานวิจัย

1. Bhumibhamon, O. and J. Jinda. 1996. Cocoa Fermentation I: Identification and metabolites study of natural cocoa fermentation microorganisms. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 30:64-73.
2. Bhumibhamon, O. and J. Jinda. 1997. Cocoa Fermentation II: Effect of enzyme pectinase on natural cocoa fermentation. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 31:206-212.
3. Bhumibhamon, O. and J. Jinda. 1997. Cocoa Fermentation III: Improvement of cocoa fermentation by inoculated with selected mixed culture in laboratory and farm trial. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 31:327-341.
4. Bhumibhamon, O. and J. Jinda. 1997. Cocoa Fermentation IV: Chemical properties and Sensory evaluation in Mix-culture fermented Cocoa. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 31:491-428.
5. Jinda, J. 2002. Selection and study on lipase-producing bacteria from rotten oil palm fruit. Research Report. Private University Division. Commission on Higher Education. Bangkok. Thailand.
6. Bhumibhamon, O., J. Jinda and S. Fungthong. 2003. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. KLB1 lipase from high fat wastewater. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 37:176-185.
7. Jinda, J., O. Bhumibhamon, W. Vanichsriratana, and A. Engkakul. 2003. Sol-gel of rice husk ash: Entrapment of alkaliphilic lipase from *Pseudomonas* sp. KLB1. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 37:186-196.
8. Jinda, N. 2005. Lipase I: Source and Industrial Utilization. *J. of UTCC*. 24(3):20-34.
9. Jinda, N. 2006. Effect of Ammonium sulphate concentration on the immobilization of *Candida rugosa* and *Mucor javanicus* lipase. *Thai Journal of Biotechnology*. (In press).
10. Jinda, N. and S. Phunthong. 2006. Lipase: production and physico-chemicals properties. *J. of UTCC*. 26(2):114-131.

การเสนอผลงานวิชาการ

1. Bhumibhamon, O., J. Jinda. 1993. Production of Cocoa to Earning Income for Farmer. In the 5th Annual Kasetsart University Symposium (1- 5 February 1993), Kasetsart University, Bangkok.
 2. Bhumibhamon, O., J. Jinda, B. Laepet, and P. Naka. 1997. Cocoa Fermentation III: Improvement of cocoa fermentation by inoculated with selected mixed culture in laboratory
- ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- and farm trial, p.269. In Abstracts on The proceedings of the 35th Kasetsart University Annual Conference (Subject: Agro-Industry). Kasetsart University, Bangkok.
- 3.Bhumibhamon, O., B. Laepet, J. Jinda, and P. Naka. 1997. Cocoa Fermentation IV: Evaluation on quality of mixed culture fermentation of cocoa. p.270. Proceedings of the 35th Kasetsart University Annual Conference (Subject: Agro-Industry). Kasetsart University, Bangkok.
- 4.Bhumibhamon, O., P. Naka, J. Jinda, and B. Laepet. 1998. Improvement of Cocoa Fermentation by Mixed Culture. p. Proceedings of 36nd Kasetsart University Annual Conference (Subject: Agro-Industry). Kasetsart University, Bangkok.
- 5.Bhumibhamon, O., P. Naka, J. Jinda, and B. Laepet. 1999. Improvement of Cocoa Fermentation by Mixed Micro-organisms. In the 1 st Symposium on Technology to ANDAMAN (19-21 December 1999). Krabi. Thailand.
- 6.Bhumibhamon, O. and J. Jinda. 2003. Hydrolysis characteristics of alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. KLB1. p. 209-218. Proceedings of 41st Kasetsart University Annual Conference (Subject: Agro-Industry). Kasetsart University, Bangkok.
- 7.Jinda, J., O. Bhumibhamon, W. Vanichsriratana, A. Ingkakul, and S. Pakpan. 2003. Feasibility of *Mucor Javanicus* lipase catalyzed replacement in triacylglycerol of crude palm oil with oleic acid, pp. 516-526. Proceedings of the 5th Agro-Industrial Conference THAIFEX & THAIMEX 2003 on Innovation of Health Food Products (Subject:Food Biotechnology/ Fermentation). July 30-31, 2003. King Mongkuk Institute of Technology Ladkrabang, BITECH, Bangkok.
- 8.Bhumibhamon, O., J. Jinda, W. Vanichsriratana, and A. Ingkakul. 2003. The catalysis of the lipase from *Pseudomonas* sp. KLB1 for the acidolysis of crude palm oil and oleic acid. p.205. Proceedings of Symposium on The BioThailand 2003: Technology for Life (Subject: Enzyme and protein technology). Pattaya. Thailand.
- 9.Jinda, N. 2005. Effect of Ammonium Sulphate Concentration on the Immobilization of *Candida rugosa* and *Mucor javanicus* Lipase. p.152. Proceedings of the 1st International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products proceeding: oral presentation. March 22-25, 2005. Khon Kaen. Thailand.

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. Jinda, N. and T. Inpuk. 2005. Silica Content in Husk and Husk Ash from Variety Rice. p. 152. Proceeding of the 1st Conference on Research for North Eastern Part of Thailand. September 1-2, 2005. Mahasarakham University. Mahasarakham, Thailand.
11. Jinda, N. 2005. Effect of oil palm leaf ash and extract on the activity of lipase from *Mucor javanicus*. p.109. Proceedings of the 31st Congress on Science and technology of Thailand. October 18-20, 2005. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima. Thailand.
12. Jinda, N., O. Bhumibhamon, and A. Ingkakul. 2005. Immobilization of *Pseudomonas* sp. KLB1 Lipase on Rice Husk Ash and on Rice Husk Ash Xerogel. p. 156. Proceedings of International Symposium on The BioThailand 2005: Innovative Biotechnology (Subject: Enzyme and protein technology). November 2-5, 2005. Queen Sirikit National Convention Center. Bangkok. Thailand.
13. Jinda, N., N. Chantrarak, and S. Chunhakan. 2006. Antimicrobial Extract from *Jatropha curcus* L. In Kasetsart Symposium "On Research Road, Kasetsart University". January 27-February 4, 2006. Kasetsart University. Bangkok. Thailand.
14. Jinda, N., and C. Chaipattanapuk. 2006. Extraction of Xanthophyll Carotenoids and Pyretrin from Marigold by Cellulase. In The 7th National Seminar on Pharmaceutical Biotechnology "Innovation: Applications of Nanotechnology in Pharmaceuticals, Cosmetics and Natural Products". 9- 11 August 2006. Chaing Mai University, Chaing-Mai, Thailand.
15. Jinda, N., P. Chunhapimon, and C. Chaipattanapuk. 2007. Xanthophylls from marigold by cellulose and lipase extraction. p.90. Proceedings of the 2nd International Conference on Fermentation Technology for Value Agricultural Products proceeding: Poster presentation. May 23-26, 2007. Khon Kaen. Thailand.
16. เกสรี วารรัตน์กุล, จันจิรา จันทรโณม, พรพรรณ ศรีพงษ์พันธุ์กุล, และ ณัฏญภัทร จินดา* .2550. ไตรกลีเซอไรด์และสมบัติไบโอดีเซลบางประการจากน้ำมันเมล็ดสบู่ดำดิบ. โปสเตอร์หมายเลข P05. ใน การประชุมวิชาการสบู่ดำแห่งชาติครั้งที่ 1. 9-30 พฤษภาคม 2550. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
17. Jinda, N., N. Chantrarak, and P. Chunhapimol. 2007. Antimicrobial activity of *Jatropha curcus* extract. P. 379. Proceeding of The 21st Pacific Science Congress, PSC "Diversity

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and Change: Challenges and Opportunities for Managing Natural and Social Systems in Asia-Pacific" Proceeding: Poster No. 4-8-4. 12-18 June 2007. Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan.

18. Chunhakant, S., N. Jinda, and W. Chavasiri. 2007. Antibacterial Activity of The Extracts from *Jatropha curcas* Linn. Proceeding of The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. p. 77. Nov. 1-3, 2007. Khon Kaen University, Nong Khai Campus, Nong Khai, Thailand.

19. Chunhakant, S., N. Jinda, and W. Chavasiri. 2007. Antibacterial Activity of The Extract from the Leaf of *Jatropha curcas* against Livestock Dermatitis. Proceeding of The 12th Biological Sciences Graduate Congress. University of Malaya, 17- 19 December 2007. Malaysia.

20. Jinda, N., S. Ngamprasit, C. Chanchorn, P. Sripongpankul, K. Wareeratananukul, and T. Mulika. 2008. Oil and Fatty acid content, Triacylglycerol Distribution, and Its Ester Produced by Methanolysis Catalyzed by Lipase. Proceeding of The Methyl BIT's 1st Annual World Congress of ibio-2008, p. 278.. May 18-21, 2008. Hangzhou, China.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้