การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (พีเอชบี) จากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium*

OPTIMIZATION OF POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) PRODUCTION FROM *Bacillus megaterium*

นางสาวพชรพร ไชยกูล

นางสาวภคพร ตาบประดับ

นายวรัญญู บุญผล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปีการศึกษา 2561

OPTIMIZATION OF POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) PRODUCTION FROM *Bacillus megaterium*

PHATCHARAPHON CHAIYAKUL
PHAKKAPRON TABPRADAB
WARUNYU BUNPHOL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE IN BIOLOGY

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (พีเอชบี) จากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium*

OPTIMIZATION OF POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) PRODUCTION FROM *Bacillus megaterium*

ชื่อนักศึกษา นางสาวพชรพร ไชยกูล 58050788

นางสาวภคพร ตาบประดับ 58050798

นายวรัญญู บุญผล 58050810

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.มงคล เพ็ญสายใจ	
กรรมการ ผศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์	
กรรมการ ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์	ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (พีเอชบี) จากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium*

ชื่อนักศึกษา นางสาวพชรพร ไชยกูล 58050788

นางสาวภคพร ตาบประดับ 58050798

นายวรัญญู บุญผล 58050810

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีปริมาณการใช้พลาสติกสูง ซึ่งส่งผลให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการจัดการของเสียจากพลาสติกที่ย่อยสลายยาก หนึ่งในทางเลือกในการช่วยลดปัญหานี้ คือ การใช้พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ง่าย เช่น พอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ PHB งานวิจัยส่วนใหญ่ทำการทดลองผลิต PHB ในอาหารเหลว ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในอาหารแข็ง จากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 โดยศึกษาสภาวะต่าง ๆ คือ อาหารแข็ง (Nutrient agar) ผสมกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.5%, 1%, 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) และไม่ผสมกากน้ำตาล จากนั้นศึกษาปริมาตรอาหาร ได้แก่ 10, 15, 20 และ 25 มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD Starter) เท่ากับ 0.5, 1, 1.5 และ 2 ที่ OD600 และศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาที่กำหนด ทำการเก็บตัวอย่างมาคำนวณค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนัก PHB ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่ให้ปริมาณ PHB ที่สูงที่สุด คือ อาหารแข็งผสมกากน้ำตาล 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตรอาหาร 15 มิลลิลิตร, ปริมาณเชื้อเริ่มต้น OD600 เท่ากับ 1 และที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ได้น้ำหนัก PHB 11.41 กรัม/ลิตร

คำสำคัญ : พอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต PHB *Bacillus megaterium* สภาวะ กากน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title Optimization of PHB production from *Bacillus megaterium*

Student Miss Phatcharaphon Chaiyakul

Miss Phakkapron Tabpradab

Mr. Warunyu Bunphol

Degree Bachelor of Science

Program Biotechnology

Academic Year 2561

Advisor Asst. Prof. Tipachai Vatanavicharn

ABSTRACT

At present, the use of plastic cause serious environmental problems due to their non-degradable nature. Biodegradable plastics is the best solution to protect the environment especially Polyhydroxybutyrate (PHB). Most research are related to the production of PHB in nutrient broth (NB) Therefore, this special project aimed to study the optimum conditions for producing PHB in nutrient agar from *Bacillus megaterium* SWU01 strains at various conditions starting from molasses concentration at 0% (without molasses) , 0.5%, 1% and 2% (volume/volume) the volume of nutrient agar at 10, 15, 20 and 25 ml, The OD starter at 0.5, 1, 1.5 and 2 at 600 nm, and the incubation period at 24, 48 and 72 hour. Samples were collected and dry weight and PHB weight were calculated. The results showed the optimum condition for bacterial growth and the maximum amount of PHB was nutrient agar with 1 % molasses concentration, 15 ml plate per culture, initial quantity of OD600 equal to 1 and at the 24 hours culture period. the highest PHB weight was 11.41 g/litre,

Keywords : Polyhydroxybutyrate PHB *Bacillus megaterium* conditions molasses

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่านที่ให้ความช่วยเหลือแนะนำ ให้ข้อคิดและความเห็นทางวิชาการอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งรวมถึงความร่วมมือของบุคคลหลายฝ่ายที่ต้องกราบขอบพระคุณ ณ ที่นี้

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิตและสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้นเนื่องจากได้รับการสนับสนุน ความช่วยเหลือ คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อผู้จัดทำ คณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ เป็นอย่างยิ่งที่กรุณาให้คำปรึกษาและให้ข้อมูลเกี่ยวกับกระบวนการดำเนินการวิจัยต่าง ๆ จนโครงงานพิเศษสำเร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *Bacillus megaterium* SWU01 และให้ใช้ห้องปฏิบัติการของ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ รวมถึงให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ในการทำโครงงานพิเศษ อีกทั้งให้คำปรึกษาด้านวิชาการเกี่ยวกับกระบวนการดำเนินการวิจัยและให้กำลังใจในการศึกษาตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติๆ ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษ ขอขอบพระคุณพี่ ๆ ปริญญาโท และเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ คอยเป็นกำลังใจสำคัญให้เสมอมา ตลอดจนผู้ที่มิได้กล่าวถึงมา ณ ที่นี้

หากโครงงานพิเศษฉบับนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่อง ทางคณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณความดีที่ปรากฏในโครงงานพิเศษฉบับนี้ ขอยกให้เป็นคุณความดีของผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยด

พชรพร ไชยกูล

ภคพร ตาบประดับ

วรัญญู บุญผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญรูป.....IX

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 พลาสติกชีวภาพ.....3

2.2 ประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้.....3

2.3 พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต.....5

2.4 การสังเคราะห์ PHB ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์.....8

2.5 การสกัดแยก PHB และการทำให้บริสุทธิ์.....9

2.6 การประยุกต์ใช้ PHB ในอุตสาหกรรม.....10

2.7 Bacillus.....11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB 13

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....14

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง.....16

3.1 วัสดุอุปกรณ์.....16

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง.....18

3.3 การสกัด PHB.....21

3.4 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....23

3.5 การหาน้ำหนัก PHB.....23

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....24

3.7 การวิเคราะห์โครงสร้าง PHB โดยใช้เทคนิค FT-IR.....24

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผลการทดลอง.....24

4.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลในอาหารแข็ง.....24

4.2 การศึกษาปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง.....25

4.3 การศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD Starter).....26

4.4 การศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ.....27

4.5 เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนัก PHB และ %PHB Content
จากการศึกษาการผลิต PHB บนอาหารแข็งในสภาวะต่าง ๆ.....28

4.6 การวิเคราะห์โครงสร้าง PHB โดยใช้เทคนิค FT-IR.....29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....31

5.1 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....31

5.2 ข้อเสนอแนะ.....32

เอกสารอ้างอิง.....33

ภาคผนวก.....36

ภาคผนวก ก.....37

ภาคผนวก ข.....40

ภาคผนวก ค.....46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 1 ตารางเปรียบเทียบคุณสมบัติของโพลิโพรพิลิน (PP)
และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต(PHB).....7

ตารางที่ ก-1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร)
ที่ได้จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลในอาหารแข็ง.....37

ตารางที่ ก-2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร)
ที่ได้จากการศึกษาปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ.....38

ตารางที่ ก-3 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร)
ที่ได้จากการศึกผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD Starter).....38

ตารางที่ ก-4 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร)
ที่ได้จากการศึกษาผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ.....39

ตารางที่ ข-1.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน.....40

ตารางที่ ข-1.2 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA.....40

ตารางที่ ข-1.3 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHB
บนอาหารแข็งด้วยความเข้มข้นกากน้ำตาล (ปริมาตร/ปริมาตร).....41

ตารางที่ ข-2.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน.....41

ตารางที่ ข-2.2 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA.....42

ตารางที่ ข-2.3 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHB
บนอาหารแข็งด้วยปริมาตรอาหาร (มิลลิลิตร) ต่าง ๆ.....42

ตารางที่ ข-3.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน.....43

ตารางที่ ข-3.2 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA.....43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ ข-3.3 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHB บนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD Starter) ต่าง ๆ.....44

ตารางที่ ข-4.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน.....44

ตารางที่ ข-4.2 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA.....45

ตารางที่ ข-4.3 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHB บนอาหารแข็งด้วยระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ.....45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ PHB....5

รูปที่ 2.2 ลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีการสะสม PHB....6

รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์ PHB....8

รูปที่ 2.4 สภาวะที่จำกัดออกซิเจนของ PHB....9

รูปที่ 2.5 Bacillus....12

รูปที่ 2.6 *Bacillus megaterium* ที่ย้อมด้วย Sudan Black B และ Safranin....12

รูปที่ 3.1 เทคนิค Streak-Plate Technique....18

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัด PHB เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งและเพื่อหาน้ำหนัก PHB....22

รูปที่ 4.1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) และน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร)
ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาลต่าง ๆ....24

รูปที่ 4.2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) และน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร)
ที่ปริมาตรอาหารต่าง ๆ....25

รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) และน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร)
ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่าง ๆ....26

รูปที่ 4.4 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) และน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร)
ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ....27

รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง, น้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร)
ที่ได้จากการศึกษาแต่ละสภาวะเทียบกับตัวควบคุม....28

รูปที่ 4.6 สเปกตรัมของ PHB ที่สกัดได้จากเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU01....29

รูปที่ 4.7 รูปที่ 4.7 สเปกตรัมของ PHB มาตรฐาน....30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พลาสติกได้เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันเป็นอย่างมาก ปัจจุบันมีปริมาณการใช้พลาสติกสูงตามประชากรโลกที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ปริมาณขยะจากผลิตภัณฑ์พลาสติกก็สูงขึ้นตามไปด้วย ซึ่งส่งผลให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการจัดการของเสียจากพลาสติกที่ย่อยสลายยาก หนึ่งในทางเลือกในการช่วยลดปัญหานี้ คือ การใช้พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ง่าย โดยมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี แต่ขณะเดียวกันก็ย่อยสลายง่ายและรวดเร็วกว่า เช่น พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates, PHA) จัดเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียหลากหลายชนิด PHA เป็นสารกลุ่มพอลิเอสเทอร์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่ใช้กันในปัจจุบัน โดยสาร PHA ที่เชื้อแบคทีเรียผลิตขึ้นที่มีการศึกษากัน มากที่สุดคือ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB) ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่ใช้กันทั่วไปมากที่สุด

พอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate) หรือ PHB เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตได้ จากแบคทีเรีย โดย PHB จะถูกสะสมภายในเซลล์ของแบคทีเรียและมีการสกัด PHB ออกจากเซลล์ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ เช่น ไม่ละลายน้ำ มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส และมีความทนแรงดึง 40 Mpa จึงสามารถหล่อขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ เช่น ภาชนะบรรจุอาหาร ถุงพลาสติก แผ่นฟิล์ม อุปกรณ์ทางการแพทย์ เป็นต้น อีกทั้งการสร้าง PHA เป็นกระบวนการทางชีวภาพ จึงต้องคำนึงปัจจัยหลายประการที่จะส่งผลต่อชนิด คุณสมบัติ และปริมาณของ PHA ที่ผลิตได้ เนื่องจากมีกลไกการสังเคราะห์ที่ซับซ้อนสามารถเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวของในการสร้าง PHA และเมตาบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย โดยเฉพาะแหล่งสารอาหารและสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง

งานวิจัยส่วนใหญ่ทำการทดลองผลิต PHB ในอาหารเหลว ยังไม่ค่อยมีการศึกษาในอาหารแข็งมากนัก ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงใช้แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 มาใช้ผลิต PHB บนอาหารแข็ง นอกจากนี้ยังศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ให้ได้ผลผลิตสูง เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตพลาสติกชีวภาพต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อหาสภาวะที่แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 สามารถผลิต PHB ได้สูงที่สุดบนอาหารแข็ง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) เชื้อแบคทีเรียใช้ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 ในการผลิต PHB บนอาหารแข็ง

2) อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ คือ อาหารแข็ง Nutrient agar (NA) และ Nutrient agar (NA) ผสมกากน้ำตาล

3) หาสภาวะที่เหมาะสมที่เชื้อสามารถผลิต PHB ได้ดีบนอาหารแข็ง โดยมีตัวแปรต่าง ๆ ได้แก่

3.1) อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ได้แก่ NA, NA ผสมกากน้ำตาล 0.5, 1, 2% (ปริมาตร/ปริมาตร)

3.2) ปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อของอาหารแข็ง ได้แก่ 10, 15, 20, 25 มิลลิลิตร

3.3) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร (OD Starter) เจือจางที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ความเข้มข้น ได้แก่ 0.5, 1, 1.5 และ 2%

3.4) ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ 24, 48, 72 ชั่วโมง

3.5) อุณหภูมิการเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ 37 องศาเซลเซียส

4) ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการสกัด PHB ออกจากเซลล์

5) การวิเคราะห์โครงสร้างของ PHB โดยใช้เทคนิค FT-IR

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus megaterium* SWU01 ที่สามารถผลิต PHB ได้สูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลาสติกชีวภาพ

พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) หรือพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ (Biodegradable plastic) หมายถึงพลาสติกที่ผลิตขึ้นจากวัสดุธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นพืช สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ (biodegradable) ช่วยลดปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อม วัสดุธรรมชาติที่สามารถนำมาผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพมีหลายชนิด เช่น cellulose collagen casein polyester แป้ง (starch) โปรตีนจากถั่ว และข้าวโพด เป็นต้น และในบรรดาวัสดุธรรมชาติทั้งหลาย แป้ง นับว่าเหมาะสมที่สุดเพราะมีจำนวนมากและราคาถูก เนื่องจากสามารถหาได้จากพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี มันฝรั่ง มันเทศ มันสำปะหลัง เป็นต้น แต่พลาสติกชีวภาพที่ผลิตจากแป้งโดยตรงจะมีขีดจำกัด เพราะจะเกิดการพองตัวและเสียรูปร่างเมื่อได้รับความชื้น จึงได้มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์เข้าไปย่อยสลายแป้ง แล้วเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นโมโนเมอร์ (monomer) ที่เรียกว่ากรดแลคติก (lactic acid) จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ polymerization ทำให้กรดแลคติกเชื่อมกันเป็นสายยาวที่เรียกว่า พอลิเมอร์ (polymer) พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ โดยขั้นตอนสุดท้ายจะถูกย่อยโดยจุลินทรีย์จนกลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และมวลชีวภาพภายใต้อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม เช่น ความชื้นสัมพัทธ์ 50-60% อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส และจุลินทรีย์ในธรรมชาติ หรือนำไปผ่านกระบวนการหมักทางชีวภาพภายในระยะเวลาไม่เกิน 180 วัน ผลที่ได้จะไม่มีส่วนของพลาสติก และสารพิษหลงเหลืออยู่เลย

2.2 ประเภทของพลาสติย่อยสลายได้

กลไกการย่อยสลายของพลาสติก แบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ คือ

2.2.1 การย่อยสลายได้โดยแสง (Photodegradation)

การย่อยสลายโดยแสงมักเกิดจากการเติมสารเติมแต่งที่มีความว่องไวต่อแสงลงในพลาสติกหรือสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ให้มีหมู่ฟังก์ชันหรือพันธะเคมีที่ไม่แข็งแรง แตกหักง่าย ภายใต้รังสี (UV) เช่น หมู่คีโตน (Ketone group) อยู่ในโครงสร้าง เมื่อสารหรือหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวสัมผัสกับรังสียูวีจะเกิดการแตกของพันธะกลายเป็นอนุมูลอิสระ (Free radical) ซึ่งไม่เสถียร จึงเข้าทำปฏิกิริยาต่ออย่างรวดเร็วที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้เกิดการขาดของสายโซ่ แต่การย่อยสลายนี้จะไม่เกิดขึ้นภายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่อฝังกลบขยะ หรือสภาวะแวดล้อมอื่นที่มืด หรือแม้กระทั่งชิ้นพลาสติกที่มีการด้วยหมึกที่หนามากบนพื้นผิว เนื่องจากพลาสติกจะไม่ได้สัมผัสกับรังสียูวีโดยตรง

2.2.2 การย่อยสลายทางกล (Mechanical Degradation)

โดยการให้แรงกระทำแก่ชิ้นพลาสติกทำให้ชิ้นส่วนพลาสติกแตกออกเป็นชิ้น ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้โดยทั่วไปในการทำให้พลาสติกแตกเป็นชิ้นเล็ก ๆ

2.2.3 การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative Degradation)

เป็นปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนลงในโมเลกุลของพอลิเมอร์ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติอย่างช้า ๆ โดยมีออกซิเจน ความร้อน แสงยูวี หรือแรงทางกลเป็นปัจจัยสำคัญ เกิดเป็นสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide, ROOH) ในพลาสติกที่ไม่มีการเติมสารเติมแต่งที่ทำหน้าที่เพิ่มความเสถียร (stabilizing additive) แสงและความร้อนจะทำให้ ROOH แตกตัวกลายเป็นอนุมูลอิสระ RO และ OH ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยาต่อที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้เกิดการแตกหักและสูญเสียคุณสมบัติเชิงกลอย่างรวดเร็ว แต่ด้วยเทคโนโลยีการผลิตที่ได้รับการวิจัยและพัฒนาขึ้นในปัจจุบันทำให้การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนเกิดได้เร็วขึ้นภายในช่วงเวลาที่กำหนด โดยการเติมสารเติมแต่งที่เป็นเกลือของโลหะทรานซิชัน ซึ่งทำหน้าที่คะตะลิสต์เร่งการแตกตัวของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydroperoxpide, ROOH) เป็นอนุมูลอิสระ (Free radical) ทำให้สายโซ่พอลิเมอร์เกิดการแตกหักและสูญเสียคุณสมบัติเชิงกลรวดเร็วยิ่งขึ้น

2.2.4 การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolytic Degradation)

การย่อยสลายของพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์ เช่น แป้ง พอลิเอสเทอร์ พอลิแอนไฮดรายด์ พอลิคาร์บอเนต และพอลิยูริเทน ผ่านปฏิกิริยาก่อให้เกิดการแตกหักของสายโซ่พอลิเมอร์ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้น โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทที่ใช้คะตะลิสต์ (Catalytic hydrolysis) และไม่ใช้คะตะลิสต์ (Non-Catalytic Hydrolysis) ซึ่งประเภทแรกยังแบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือ แบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายนอกโมเลกุลของพอลิเมอร์เร่งให้เกิดการย่อยสลาย (External Catalytic Degradation) และแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากจากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์เองในการเร่งให้เกิดการย่อยสลาย (Internal catalytic degradation) โดยคะตะลิสต์จากภายนอกมี 2 ชนิด คือ คะตะลิสต์ที่เป็นเอนไซม์ต่างๆ (Enzyme) เช่น Depolymerase lipase esterase และ glycohydrolase ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางชีวภาพ และคะตะลิสต์ที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Non-enzyme) เช่น โลหะแอลคาไลด์ (alkaline metal) เบส (base) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรด(acid) ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมในธรรมชาติ ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางเคมี สำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์นั้นใช้หมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl Group) ของหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์บริเวณปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายผ่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

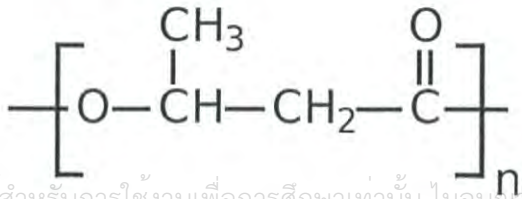
2.2.5 การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation)

การย่อยสลายของพอลิเมอร์จากการทำงานของจุลินทรีย์โดยทั่วไปมีกระบวนการ 2 ขั้นตอน เนื่องจากขนาดของสายพอลิเมอร์ยังมีขนาดใหญ่และไม่ละลายน้ำ ในขั้นตอนแรกของของการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นภายนอกเซลล์โดยการปลดปล่อยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ซึ่งเกิดได้ทั้งแบบใช้ endo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะภายในสายโซ่พอลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบ และแบบ exo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะทีละหน่วยจากหน่วยซ้ำที่เล็กที่สุดที่อยู่ด้านปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ เมื่อพอลิเมอร์แตกตัวจนมีขนาดเล็กพอจะแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ และเกิดการย่อยสลายต่อในขั้นตอนที่ 2 ได้ผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย (ultimate biodegradation) คือ พลังงาน และสารประกอบขนาดเล็กที่เสถียรในธรรมชาติ (Mineralization) เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สมีเทน น้ำ เกลือ แร่ธาตุต่าง ๆ และมวลชีวภาพ (biomass)

2.3 พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB)

2.3.1 ข้อมูลทั่วไป

PHB ถูกค้นพบโดย Maurice Lemoigne นักจุลชีววิทยาชาวฝรั่งเศส เมื่อปี ค.ศ.1926 ใน เซลล์ของแบคทีเรีย Bacillus megaterium PHB เป็นอนุพันธ์ของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งจัดได้ว่าเป็นพอลิเมอร์ ประเภทอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (Aliphatic polyester) มีโครงสร้างเป็นสายยาว (รูปที่ 2.1) และมีคุณสมบัติต่างๆ คล้ายกับพลาสติกทั่วไปเช่น พอลิโพรไพลีน (Polypropylene, PP) จากคุณสมบัติข้างต้นทำให้ PHB มีความยืดหยุ่นและสามารถนำมาหลอมเพื่อขึ้นรูปและใช้ใหม่ได้อีกครั้ง (ตริตาภรณ์ และพรเทพ, 2553)



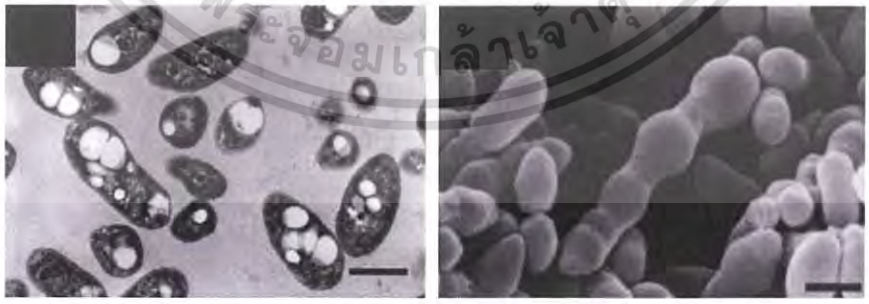
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ PHB (Polimerek, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเรียกชื่อ PHB สามารถเรียกได้หลายแบบทั้งชื่อทางเคมี คือ Polyhydroxybutyrate, Poly (betahydroxybutyrate), Poly (3-hydroxybutyric acid), Poly-3-hydoxybutyrate และชื่อทางการค้า ซึ่งขึ้นกับ บริษัทผู้ผลิต เช่น Biopol® , ENMATTM, ENMATTM

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) เกิดจากการสะสมสารประกอบคาร์บอนในเซลล์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้ เช่น *Alcaligenes, Azobacter, Bacillus, Pseudomonas* และ *Alcaligenes eutrophus* ในขั้นตอนแรกจะใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์สำหรับผลิต PHB ซึ่งมีต้นทุนในการผลิตสูงกว่าการผลิตพอลิเมอร์จากปิโตรเคมี ทำให้ PHB ยังไม่ถูกใช้งานอย่างแพร่หลายนัก ปัจจุบันได้มีการพัฒนาโดยใช้แหล่งสารประกอบคาร์บอนจากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าว อ้อย มัน สำปะหลัง และผลผลิตพลอยได้ในอุตสาหกรรม เช่น กากน้ำตาล กลีเซอรอล คาร์บอนไดออกไซด์ หางนม เป็นต้น มาใช้ในการสังเคราะห์ PHB เพื่อลดต้นทุนการผลิตให้ต่ำลง ทำให้ PHB ถูกนำมาใช้งานอย่างกว้างขวางมากขึ้น

จากการทดลองที่ผ่านมา พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เอื้ออำนวยต่อการสะสม PHB จำนวน PHB จะอยู่ในช่วง 8-12 แกรนูลต่อเซลล์ และทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 0.24 เป็น 0.50 ไมโครเมตร มีผลทำให้เซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนไปจากเดิม โดยในหนึ่งแกรนูลจะประกอบด้วยสายพอลิเมอร์ PHB อย่างน้อย 1,000 สาย หากเซลล์มีการสะสม PHB ในปริมาณมาก จะทำให้รูปร่างมีการเปลี่ยนแปลงไป (รูปที่ 2.2) อย่างไรก็ตาม การสะสม PHB จะหยุดที่ปริมาณหนึ่งแม้ว่าเอนไซม์และสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHB จะยังคงมีอยู่ก็ตาม ทั้งนี้ เนื่องมาจากเนื้อที่ภายในเซลล์ที่มีอยู่จำกัด (Luengo *et al.*, 2003)



รูปที่ 2.2 ลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีการสะสม PHB
(a) ลักษณะของ PHB ที่สะสมอยู่ภายในแกรนูลของเซลล์ Pseudomonas putida ส่องโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) และ (b) ลักษณะของเซลล์ที่มีรูปร่างเปลี่ยนไป เมื่อมีการสะสม PHB ในปริมาณมาก ส่องโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (SEM) (Luengo *et al.*, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 คุณสมบัติทั่วไป

1) PHB ไม่สามารถละลายน้ำได้และต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำให้ PHB ต่างจากพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ชนิดอื่น ๆ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้หรือมีความไวต่อความชื้น

2) PHB ละลายได้ในคลอโรฟอร์มและสารประกอบคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนอื่น ๆ

3) PHB สามารถต้านทานต่อรังสีอัลตราไวโอเลตและออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้ดี แต่มีความต้านทานต่อกรดและเบสต่ำ PHB มีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (Biocompatible) ทำให้สามารถนำไปใช้ผลิตพลาสติกที่ใช้ในทางการแพทย์ได้

4) PHB มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิทรานซิสชัน15 องศาเซลเซียส และมีความทนแรงดึง 40 Mpa ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์

5) PHB สามารถจมน้ำได้ทำให้ถูกย่อยสลายในสภาวะที่ไม่ใช้อากาศได้ นอกจากคุณสมบัติต่าง ๆ ของสาร PHB ข้างต้นนี้ ยังมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิโพรไพลีนซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์

ตารางที่ 1 ตารางเปรียบเทียบคุณสมบัติของโพลิโพรพิลีน (PP) และโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต (PHB)

(ดัดแปลงจาก Khanna and Srivastava, 2005)

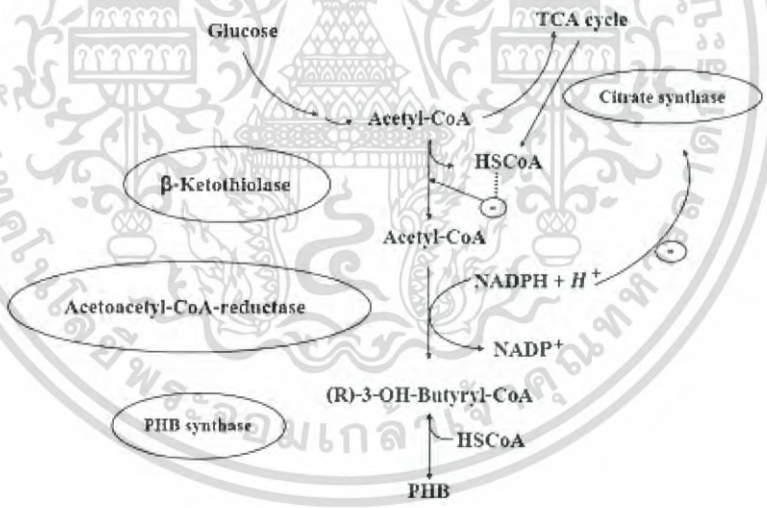
Parameter	Polypropylene (PP)	P(3HB)
Melting point Tm [°C]	171-186	171-182
Glass Transition Temperature Tg [°C]	-15	5-10
Crystallinity [%]	65-70	65-80
Density [g.cm^{-3}]	0.905 - 0.94	1.23 - 1.25
Molecular weight Mw (x10^{5})	2.2 - 7	1 - 8
Molecular weight distribution	5 - 12	2.2 - 3
Flexural modulus [GPa]	1.7	3.5 - 4
Tensile strength [MPa]	39	40
Extension to break [%]	400	6 - 8
UV resistance	poor	good
Solvent resistance	good	poor
Oxygen permeability [cm^{3}m^{-2}atm^{-1}d^{-1}]	1700	45
Biodegradability	-	good
Other	due to low density floats in aquatic system	due to more density goes to the sediment in aquatic system.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แม้ PHB จะมีคุณสมบัติที่มีประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน แต่มีข้อเสีย คือ มีความเสถียรของการหลอมเหลวต่ำเนื่องจากเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลว นอกจากนี้ PHB มีความสามารถในการต้านทานต่อตัวทำละลายต่ำกว่าพอลิโพรไพลิน แต่ทนต่อรังสีอัลตราไวโอเลตได้ดีกว่า และจะเปราะเมื่อเวลาผ่านไปเพียงไม่กี่วันภายใต้สภาวะปกติ แต่ทั้งนี้สามารถลดความเปราะบางของ PHB ได้โดยการทำเป็นโคพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์ตัวอื่น หรือการผสมกับพอลิเมอร์ตัวอื่น

2.4 การสังเคราะห์ PHB ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์

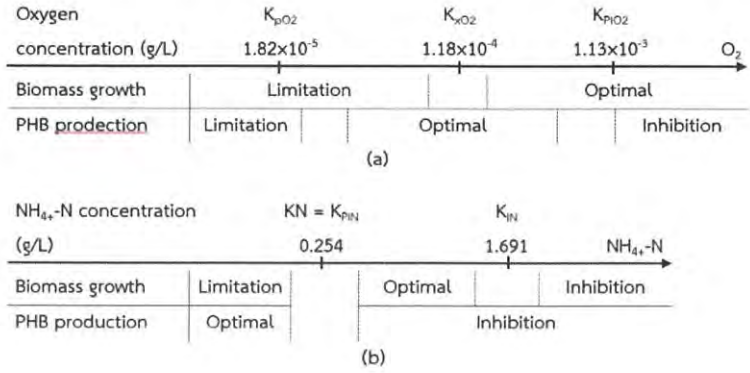
PHB เป็นสารที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ดังนั้น การสังเคราะห์ PHB ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์จะมีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle, TCA cycle) และมีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้องในปฏิกิริยาทั้งหมด 3 ชนิด คือ เอนไซม์ 3-Ketothiolase จะเร่งให้เกิดการรวมตัวกันของ Acetyl CoA ได้เป็น Acetoacetyl-CoA, เอนไซม์ Acetoacetyl-CoA reductase จะทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ Acetoacetyl-CoA ไปเป็น (R)-3-Hydroxybutynl-CoA และเอนไซม์ PHA synthase จะมาเร่งปฏิกิริยา Polymerizes สาร(R)-3-Hydroxybutynl-CoA ได้เป็นพอลิเมอร์ PHB ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์ PHB (Davies S., 2001)

การสังเคราะห์และการสะสมของพอลิเมอร์ PHB ภายในจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นเมื่อเข้าสู่การเจริญในระยะ คงที่ของจุลินทรีย์หรือในอีกกรณี คือ มีการสร้างพอลิเมอร์ PHB ไปพร้อมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ซึ่ง จะต้องอยู่ในสภาวะจำกัดสารอาหาร เช่น ฟอสฟอรัส ออกซิเจน ไนโตรเจน เป็นต้น เพื่อให้เซลล์ของจุลินทรีย์ สามารถสังเคราะห์และสะสมพอลิเมอร์ PHB ได้ ในขณะเดียวกันหากจุลินทรีย์มีสารอาหารที่เพียงพอ เซลล์จะ ใช้สารอาหารในการเจริญเติบโตทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ PHB ได้ ดังรูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 สภาวะที่จำกัดออกซิเจนของ PHB (Plastics Instiute Of Thailand, 2015)

2.5 การสกัดแยก PHB และการทำให้บริสุทธิ์

PHB เป็นสารที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นการแยกพอลิเมอร์ของ PHB จึงต้องมีการทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ก่อน ซึ่งในกระบวนการสกัดต้องไม่ทำให้คุณสมบัติของพอลิเมอร์เปลี่ยนแปลง และภายหลังการสกัดต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติของ PHB ที่สกัดได้ก่อนนำไปใช้ต่อไป วิธีการสกัด PHB แบ่งได้ 3 วิธีคือ (จารุวรรณ และคณะ, 2555)

2.5.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

การสกัด PHB ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เมทิลคลอไรด์ (Methyl chloride) เป็นวิธีที่ทำให้ผลผลิตของพอลิเมอร์ที่สกัดออกมามีมวลโมเลกุลสูง PHB ที่สกัดได้ด้วยวิธีนี้จะมีสีขาว สามารถทำเป็นผลึกได้และมีมวลโมเลกุลสูง แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรม เพราะต้องใช้สารสกัดในปริมาณมาก แต่มีข้อดีคือสกัดได้ง่ายและสามารถควบคุมความบริสุทธิ์ของพอลิเมอร์ให้สูงได้

2.5.2 การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Sodium hypochloride extraction)

การสกัดวิธีนี้เป็นวิธีที่ Williamson and Wikinson ใช้ในการแยกพอลิเมอร์ชนิด PHB ในปี 1958 จากเชื้อ *Bacillus cereus* โดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรด์ย่อยสลายผนังเซลล์นาน 30 – 60 นาที จากนั้นนำพอลิเมอร์ที่สกัดได้มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการล้างด้วยไดเอทธิลอีเทอร์ (Diestyl ether) หรือ เมธานอล (Methanol) เพื่อกำจัดไขมันออก และยังพบอีกว่าการสกัดในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูงจะทำให้สายพอลิเมอร์ของ PHB ถูกทำลายซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติทางด้านพื้นผิวและโมเลกุลของสายพอลิเมอร์ และการแช่เซลล์ในสารลดแรงตึงผิวก่อนการสกัดจะช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลของสารถึง 95% แต่การสกัดด้วยวิธีนี้จะมีโซเดียมไฮโปคลอไรด์หลงเหลืออยู่กับพอลิเมอร์ ซึ่งสามารถก่อให้เกิดมลพิษกับสิ่งแวดล้อมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 การสกัดด้วยเอนไซม์ (Enzymatic extraction)

กระบวนการสกัดพอลิเมอร์โดยการย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ว่าเป็นกระบวนการที่ นิยมใช้ในอุตสาหกรรม โดยสามารถให้ผลผลิตต่อน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพในปริมาณที่สูง ซึ่งมีการใช้เอนไซม์หลายชนิดรวมกัน เช่น อัลคาเลส (Alcalase) ฟอสโฟไลเปส (Phospholipase) แลคซิเตส (Lacitase) และไลโซไซม์ (Lysozyme) เป็นต้น

2.6 การประยุกต์ใช้ PHB ในอุตสาหกรรม

จากคุณสมบัติของ PHB ดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีการนำ PHB มาประยุกต์ใช้งานในระดับอุตสาหกรรม ทั้งอุตสาหกรรมการเกษตร อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ ได้แก่ ฟิล์มห่อหุ้มอาหาร กล่องใส่อาหาร ขวดน้ำ กล่องโฟม เม็ดโฟมกันกระแทก อุตสาหกรรมทางการแพทย์ ได้แก่ ที่วัสดุปิดแผล ไหมเย็บแผล อุตสาหกรรมยานยนต์ และอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น

2.6.1 อุตสาหกรรมการเกษตร

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงมีศักยภาพเพียงพอที่จะผลิตพลาสติกชีวภาพ เนื่องจากมีแหล่งวัตถุดิบ ผลผลิตทางการเกษตรปริมาณมาก ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้สามารถส่งต่อยังภาคอุตสาหกรรมเกษตรหลากหลายด้าน รวมถึงอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพที่สามารถนำวัตถุดิบเหล่านี้มาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตพลาสติกชีวภาพได้ เช่น ภาชนะปลูกพืช วัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืชหรือปุ๋ยตามช่วงเวลาที่กำหนด ถุงเพาะชำกล้าไม้ ถุงห่อผลไม้ ข้อดี คือ เป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรที่มีอยู่ในประเทศ อีกทั้งยังช่วยลดปริมาณการนำเข้าวัตถุดิบหรือสารตั้งต้น เพื่อใช้ในการผลิตพลาสติกจากต่างประเทศ

2.6.2 อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์

พลาสติกชีวภาพเป็นที่นิยมอย่างมากในอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ เพื่อทดแทนการใช้พลาสติกที่ได้จาก แหล่งปิโตรเคมี เช่น พอลิเอทิลีน (Polyethylene : PE) พอลิพรอพิลีน เนื่องจากบรรจุภัณฑ์พลาสติกไม่นิยม นำกลับมารีไซเคิลหรือนิยมการใช้งานครั้งเดียวเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากมีการปนเปื้อนสูง ทำให้ไม่สะดวกต่อการ เก็บและทำความสะอาด ซึ่งก่อให้เกิดขยะปริมาณมาก ดังนั้น พลาสติกชีวภาพที่ผลิตได้จากวัตถุดิบทาง ธรรมชาติ มีความปลอดภัย ไร้สารเคมีหรือย่อยสลายได้ทางชีวภาพจึงได้รับความนิยมอย่างมากที่จะนำมา ทดแทนการใช้พลาสติกจากแหล่งปิโตรเคมี โดย PHB สามารถผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ได้หลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบ เช่น ขวดน้ำ ถุงพลาสติก กล่องโฟม ถาดย่อยสลายได้สำหรับอาหารสำเร็จรูปและอาหารจานด่วน พลาสติกเคลือบ ภาชนะกระดาษ

2.6.3 อุตสาหกรรมทางการแพทย์

พลาสติกชีวภาพสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบหรือสารตั้งต้นสำหรับผลิตวัสดุทางการแพทย์ นอกจากจะช่วยลดอัตราการนำเข้าวัตถุดิบจากต่างประเทศแล้ว ยังเป็นการส่งเสริมการพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมของอุตสาหกรรมชีวการแพทย์จากพลาสติกชีวภาพในประเทศไทยอีกด้วย วัสดุชีวการแพทย์ที่ผลิตจากพลาสติกชีวภาพ เช่น ไหมเย็บแผล (Sutures), วัสดุปิดแผล (Wound dressing), ตัวเย็บแผล (Staples), อุปกรณ์ฝังในร่างกาย (Surgical implants), อุปกรณ์สำหรับยึดกระดูก (Orthopedic fixation devices), วัสดุสำหรับพาหรือปลดปล่อยตัวยา ซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

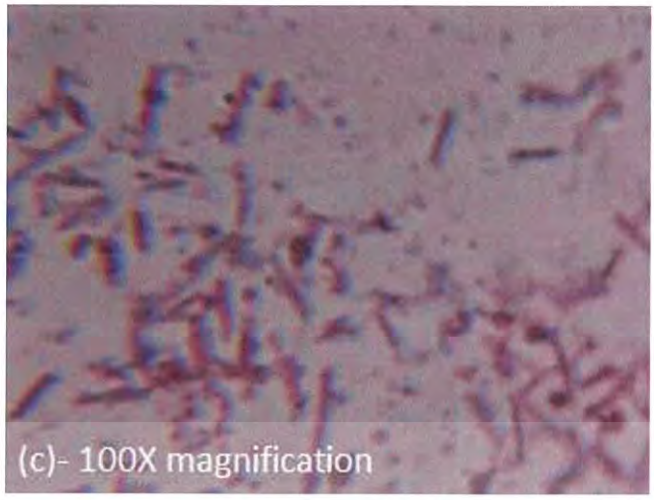
2.6.4 อุตสาหกรรมสิ่งทอ

สารตั้งต้นสำหรับอุตสาหกรรมสิ่งทอหรือหัตถกรรม คือ เส้นใยจากการสังเคราะห์ เช่น เส้นใยไนลอน เส้นใยแก้ว เส้นใยพอลิเอสเทอร์ หรือเส้นใยที่ได้จากธรรมชาติ เช่น เส้นใยฝ้าย เส้นใยลินิน ดังนั้น ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเส้นใยจากพลาสติกชีวภาพเพื่อทดแทนการใช้ไหมหรือเส้นใยที่มีราคาแพงและยังสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย เช่น ผลิตภัณฑ์อนามัย ผ้าอ้อมสำเร็จรูป เสื้อผ้า เครื่องนุ่งห่ม เส้นใยสำหรับบรรจุในเครื่องนอน

2.7 *Bacillus*

Bacillus คือ แบคทีเรียรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive bacteria) (รูปที่ 2.5) อยู่ในวงศ์ Bacillaceae ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับ *Clostridium* และ *Desulfotomaculum Bacillus* เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) แต่บางชนิดเป็น facultative anaerobe

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

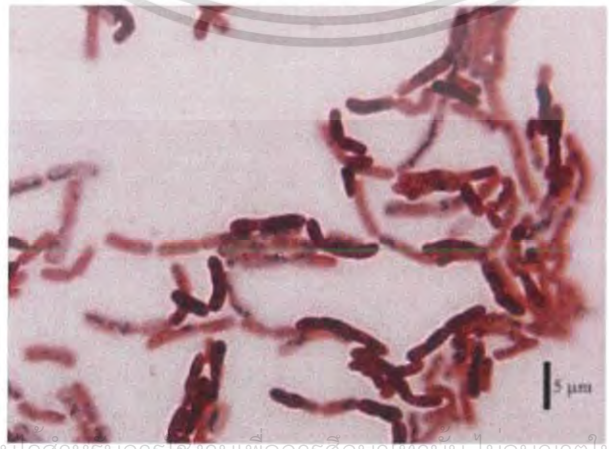


รูปที่ 2.5 *Bacillus* sp. (John Poonga Preetam Raj *et al*.,2014)

Bacillus เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน (thermoduric bacteria) ที่สร้างเอนโดสปอร์ (spore forming bacteria) สปอร์แบคทีเรีย (bacterial spore) ของ Bacillus จะทนต่อความร้อน ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ดี และ *Bacillus* เป็น protiolytic bacteria มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารให้เป็นกรดอะมิโน เป็นจุลินทรีย์สาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย และทำให้อาหารที่เน่าเสียเกิดกลิ่นเหม็น

2.7.1 แบคทีเรีย *Bacillus Megaterium*

Bacillus megaterium มีรูปร่างเป็นท่อน (Rod) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) ส่วน ใหญ่เป็นแบคทีเรียแอโรบิคที่สร้างสปอร์ พบในแหล่งที่อยู่อาศัยที่มีความหลากหลายมีความยาวของ เซลล์ถึง 4 ไมโครเมตร และ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ไมโครเมตร เติบโตที่อุณหภูมิตั้งแต่ 3 - 45 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิจะอยู่ที่ประมาณ 30 องศาเซลเซียส



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.6 *Bacillus megaterium* ที่ย้อมด้วย Sudan Black B และ Safranin (Bary, 1884)

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB

2.8.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิต จากการรายงานพบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันแต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กันจะทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกัน ออกไปด้วย โดยจุลินทรีย์บางชนิดผลิตพอลิเมอร์ในรูปโฮโมพอลิเมอร์ (Homopolymer) และบางชนิดผลิตในรูปโคพอลิเมอร์ (Copolymer)

2.8.2 อุณหภูมิ

1) แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophilic bacteria)

2) แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic bacteria)

3) แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic bacteria)

2.8.3 พีเอช

พีเอชเริ่มต้นมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อพบว่า การผลิตพอลิเมอร์จะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อควบคุมพีเอช เริ่มต้นที่ 7.0

2.8.4 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ในการสร้างพลังงานและสร้างส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ซึ่งแหล่งคาร์บอนอยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และสารอินทรีย์ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต

2.8.5 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8–10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น เกลือไนไตรท์ ไนเตรท หรือแอมโมเนียม แต่บางชนิดต้องการ ไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ โปรตีน โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญใน อาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.6 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHB ของจุลินทรีย์ โดยในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซิเตรทซินเทส (Citrase synthase) และไอโซซิเตรทดีไฮโดรจิเนส (Isocitrase dehydrogenase) จะถูกยับยั้ง การทำงานโดยการสะสม nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) ทำให้ Acetyl-CoA ไม่สามารถเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ ได้ Acetyl-CoA จึงถูกเปลี่ยนไปเป็น Acetoacetyl CoA และเข้าสู่การสังเคราะห์ PHB นอกจากนี้การมีปริมาณออกซิเจนจำกัด ยังทำให้กระบวนการหายใจลดลง จุลินทรีย์จึงไม่สามารถย่อยสลายแหล่งคาร์บอนได้อย่างสมบูรณ์ จึงเกิดการสะสม PHB ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำรองในสภาวะที่มีอาหารไม่สมบูรณ์ (Luengo *et al.*, 2003)

2.8.7 ไอออนของโลหะหนัก

ไอออนของโลหะหนักมีความจำเป็นต่อการเจริญตามปกติของแบคทีเรีย เช่น K^+, $Mg2^+$, $Ca2^+$, $Fe2^+$ เป็นต้น ซึ่งบางชนิดอาจทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ที่สำคัญของเอนไซม์ต่าง ๆ

2.8.8 ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส และเกลือแร่

แหล่งของซัลเฟอร์อาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ ซัลเฟอร์มีความจำเป็นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด แหล่งของฟอสฟอรัสอาจอยู่ในรูปของฟอสเฟตที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ ฟอสโฟลิพิด กรดไทโคอิก และสารอื่น ๆ ส่วนเกลือแร่นั้นจุลินทรีย์ต้องการในปริมาณที่น้อย แต่เกลือแร่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตและการเจริญมาก โดยทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่าง ๆ

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาการผลิต PHB โดยเชื้อ *Bacillus megaterium* ของ Gouda *et al.*, (2001) พบว่าเมื่อใช้ Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *B. megaterium* สามารถผลิต PHB ได้ 32.7% ของน้ำหนักเซลล์ และเมื่อใช้ กากน้ำตาล ความเข้มข้น 2% โดยปริมาตร จะทำให้ *B. megaterium* ผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้นเป็น 46.2% ของน้ำหนักเซลล์ ต่อมา Uğur และ Şahin (2002) ได้ทดลองเปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจน พบว่า ไกลซีน (Glycine) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพหารผลิต PHB ของเชื้อ *Streptomyces anulatus* MU117 จาก 0.3% เป็น 7.6% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และจากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสามารถในการผลิต PHA (ตั้งชื่อว่า INT005) จากดิน บริเวณทุ่งหญ้า พบว่า เชื้อ INT005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถผลิต PHA ได้มากกว่า *Bacillus megaterium* และ *Ralstonia eutropha* เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส และ PHA ที่ผลิตได้ยังมีคุณสมบัติ Thermostable อีกด้วย (Gouda *et al.*, 2001)

พอลิเมอร์สังเคราะห์ไม่สามารถย่อยสลายได้และตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ดังนั้น นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามคิดค้นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้นั่นก็คือ Polyhydroxyalkanoates (PHAs) รวมทั้ง Polyhydroxybutyrate (PHB) ซึ่งเป็นกลุ่มของพลาสติกชีวภาพที่น่าสนใจที่มีการนำมาประยุกต์ทางการแพทย์ PHAs เป็นโมเลกุลชีวภาพขนาดเล็กสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ ในการศึกษานี้ได้มีการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากดินในประเทศอียิปต์เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิต PHB โดยใช้การย้อมสีไนล์เรด จำนวนทั้งหมด 44 ไอโซเลท ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง Mineral salt medium (MSM) พบว่ามี 19 ไอโซเลทที่สามารผลิต PHB ได้ ตามความสามารถของการเรืองแสง และมีการทดสอบทางชีวเคมีของการผลิต PHB ของ *Bacillus sp* N2 ซึ่งจำกัดปริมาณของแหล่งไนโตเจน โดยใช้อาหาร MSM ที่เติมกลูโคสมากเกินพอเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว พบว่าการสะสม PHB มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักเซลล์แห้ง ประมาณ 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์พอลิเมอร์ชีวภาพที่ได้ด้วยเทคนิค NMR, FT-IR, TGA และ DSC เพื่อเป็นการยืนยันความบริสุทธิ์ของ PHB (Hassan *et al.*, 2016)

PHB เป็นพอลิเมอร์ที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่ใช้ในชีวิตประจำวัน เพราะสามารถย่อยสลายได้ อย่างไรก็ตาม การผลิตในอุตสาหกรรมนั้นเป็นไปได้ยากเนื่องจากต้นทุนการผลิตนั้นสูง ในการทดลองนี้ได้มีการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียจากแหล่งเกษตรกรรม โดยคัดเอาสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิต PHB ได้เยอะอีกทั้งยังพัฒนาการผลิต PHB เพื่อลดต้นทุนการผลิต แบคทีเรีย *Acinetobacter baumannii* P39 เป็นแบคทีเรียที่ถูกพบและทำการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลของลำดับเบส 16S ribosomal gene แบคทีเรียชนิดนี้ผลิต PHB 24% ต่อน้ำหนักแห้ง ในเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลองหลาย ๆ ครั้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียที่คัดเลือกมา ทำให้ทราบว่าการให้อากาศ 60% อุณหภูมิในการบ่ม 28% และพีเอชที่ 7.5 นั้นมีประสิทธิภาพที่สุด นอกจากนี้ น้ำมันข้าวโพด 0.7% และ เปปโตน 0.1 g/L เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดตามลำดับ การแทนที่กลูโคสด้วยน้ำมันข้าวโพดทำให้ต้นทุนการผลิตรวมลดลง 23% และราคาประเมินของ PHB อยู่ที่ 20.5 ต่อลิตร (Noha Salah Elsayed *et al.*, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อแบคทีเรีย

ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 จาก ผศ.ดร. ศิริขวัญ พลประทีป ห้องปฏิบัติการสังกัดภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทำการถ่ายเชื้อเก็บในอาหาร Nutrient Agar (NA) ที่อุณหภูมิห้อง

3.1.2 สารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Nutrient broth บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.ประเทศ อินเดีย

2) อะการ์ (Agar) เกรด Bacteriological บริษัท TITAN BIOTECH LTD. ประเทศอินเดีย

3) กากน้ำตาล (Molasses) บริษัท อี เอ็ม เอ็กซ์ตร้า จำกัด ประเทศไทย

4) PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X

5) โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10% (NaOCl)

6) เอธิลแอลกอฮอล์ 95% (C_2H_5OH) เกรด commercial บริษัท CARLO ERBA ประเทศฝรั่งเศส

7) อะซิโตน (CH_3COCH_3)

3.1.3 อุปกรณ์

1) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer) รุ่น UH5300 บริษัท Hitachi High-Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา

2) หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) รุ่น GIT Series บริษัท Zealway Instrument Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา

3) ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet) รุ่น JSCB-1200SB บริษัท JS Research Inc ประเทศเกาหลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 อุปกรณ์ (ต่อ)

4) ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaking Incubator) รุ่นJSSI-100 บริษัท JS Research Ins ประเทศเกาหลี

5) เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

6) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น HET-1c1406 บริษัท Hettich Zentrifugen ประเทศเยอรมนี

7) เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น ML204/01 บริษัท Meter Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

8) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น UN55 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี

9) เครื่อง FT-IR spectrometer รุ่น IRTracer-100 AH (EN230V) บริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

10) ไมโครปิเปต (Micro Pipette) ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร

11) ทิป (Tip) ขนาด ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร

12) หลอดเซนตริฟิวก์พลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร

13) หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

14) ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

15) บีกเกอร์ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร

16) กระบอกตวงขนาด 25 และ 100 มิลลิลิตร

17) ตะเกียงแอลกอฮอล์

18) ห่วงเขี่ยเชื้อ

19) ช้อนตักสารสแตนเลส (Spatula)

20) คิวเวตต์

21) แท่งคนสาร

22) จานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 การ streak plate โดยเทคนิค Streak-Plate Technique

เผาไฟห่วงเขี่ยเชื้อให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อ รอให้เย็นลง ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 นำไปลากหรือขีด (streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (Nutrient agar, NA) อยู่ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น หลังจากเสร็จในระนาบแรกซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุดให้นำห่วงเขี่ยเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดให้หมด จากนั้นจึงขีดเชื้อจากส่วนของรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้งแล้วลากเป็นระนาบที่สอง 4-5 เส้นติดกันโดยรอยขีดของเชื้อ จะไม่ทับกับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สองจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อ (รูปที่ 3.1) เมื่อ Streak เสร็จนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รูปที่ 3.1 เทคนิค Streak-Plate Technique

(ก) การขีดเชื้อในแนวระนาบทั้ง 4 แนว (ข) โคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนแนวระนาบทั้ง 4 แนว

3.2.2 เตรียม Starter

ทำการเขี่ยโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งมา 1-2 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดเซนตริฟิวจ์พลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลในอาหารแข็ง

1) นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จาก Starter มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) โดยใช้ NB เป็นแบลงค์

2) เจือจางเชื้อ ให้ได้ค่า OD600 เท่ากับ 1

3) เทเชื้อที่เจือจางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ใส่ NA, NA ผสมกากน้ำตาล 0.5, 1, 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) ในปริมาณ 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 จาน และเอียงอาหารให้ไหลทั่วจานอาหาร

4) จากนั้นตากจานอาหารให้แห้ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่าง ดังรูปที่ 3.2

3.2.4 การศึกษาปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อของอาหารแข็ง

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.2.3 และเทลงบนจานอาหาร ปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 มิลลิลิตร

2) นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จาก Starter มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) โดยใช้ NB เป็นแบลงค์

3) เจือจางเชื้อ ให้ได้ค่า OD 600 เท่ากับ 1

4) เทเชื้อที่เจือจางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 จาน และเอียงอาหารให้ไหลทั่วจานอาหาร

5) จากนั้นตากจานอาหารให้แห้ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่าง ดังรูปที่ 3.2

3.2.5 การศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD Starter)

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.2.3 และปริมาตรอาหารที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.2.4 เทลงบนจานอาหาร

2) นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จาก Starter มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) โดยใช้ NB เป็นแบลงค์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) เจือจางเชื้อ OD600 เท่ากับ 0.5, 1, 1.5 และ 2

4) เทเชื้อที่เจือจางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 จาน และเอียงอาหารให้ไหลทั่วจานอาหาร

5) จากนั้นตากจานอาหารให้แห้ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่าง ดังรูปที่ 3.2

3.2.6 ศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.2.3, ปริมาตรอาหารที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.2.4 เทลงบนจานอาหาร

2) นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จาก Starter มาวัดค่า OD600 โดยใช้ NB เป็นแบลงค์

3) เจือจางเชื้อ ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.5

4) เทเชื้อที่เจือจางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 จาน และเอียงอาหารให้ไหลทั่วจานอาหาร

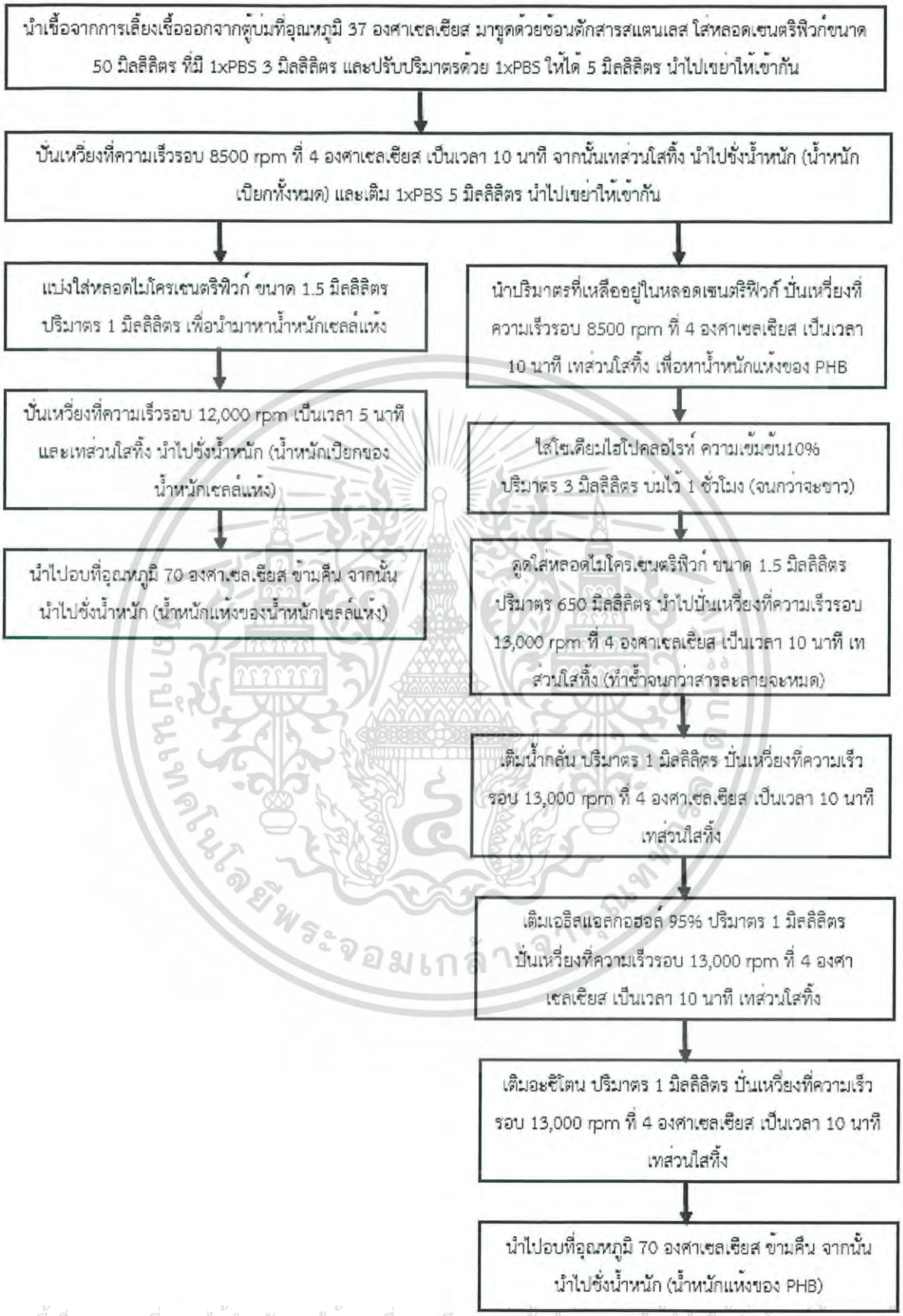
5) จากนั้นตากจานอาหารให้แห้ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงและทำการเก็บตัวอย่างตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ศึกษา ดังรูปที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การสกัด PHB

เมื่อบ่มครบตามเวลาที่กำหนด นำเชื้อออกจากตู้บ่มมาขูดด้วยช้อนตักสารสแตนเลส ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี 1xPBS อยู่แล้ว 3 มิลลิลิตร หลังจากขูดเสร็จแล้วปรับปริมาตรอีกครั้งด้วย 1xPBS ให้ได้ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และนำไปชั่งน้ำหนักจะได้เป็น น้ำหนักเปียกทั้งหมด จากนั้นเติม 1xPBS 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร หลังจากนี้แบ่งสารละลายออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยดูดสารละลายจากหลอดเซนตริฟิวจ์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและนำไปชั่งน้ำหนัก จะได้เป็นน้ำหนักเปียกของน้ำหนักเซลล์แห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำไปชั่งน้ำหนักได้เป็น น้ำหนักแห้งของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนที่สองที่เหลือจากการแบ่งไปทำส่วนแรกจะอยู่ในหลอดเซนตริฟิวจ์เดิม ใช้สำหรับหาน้ำหนัก PHB โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง บ่มด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร เพื่อย่อยผนังเซลล์ บ่มไว้ 1 ชั่วโมงหรือจนกว่าสารละลายจะเป็นสีขาว เมื่อขาวแล้วดูดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 650 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (เติมสารละลายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์และทำซ้ำจนกว่าสารละลายจะหมด) เทส่วนใสทิ้งและเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์และตะกอน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเติมเอธิลแอลกอฮอล์ 95% เพื่อล้างไขมัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเติมอะซิโตน เพื่อล้างไขมันและกำจัดน้ำออกจากสารละลาย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักจะได้เป็นน้ำหนักแห้งของ PHB นำค่าน้ำหนักที่ได้ไปคำนวณค่า น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) และน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ทั้งนี้ขั้นตอนการทำสกัด PHB แสดงดังรูปที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัด PHB เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งและเพื่อหาน้ำหนัก PHB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

หลังจากนำหลอดไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำมาชั่งน้ำหนักและหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) ดังแสดงในสูตรที่ (3.1)

$$\text{น้ำหนัก CDW} = \frac{\text{น้ำหนักแห้ง (กรัม)}}{\text{ปริมาตรอาหาร (มล.)}} \times 1000\ (\text{มล.}) \qquad (3.1)$$

3.5 การหาน้ำหนัก PHB

หลังจากนำหลอดไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำมาชั่งน้ำหนักและหาน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ดังแสดงในสูตรที่ (3.2)

$$\text{น้ำหนัก PHB} = \frac{\text{น้ำหนักแห้ง (กรัม)}}{\text{ปริมาตรอาหาร (มล.)}} \times 1000\ (\text{มล.}) \qquad (3.2)$$

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Statistics base 22.0 โดย One-Way ANOVA ที่ความเชื่อมั่นที่ 95%

3.7 การวิเคราะห์โครงสร้าง PHB โดยใช้เทคนิค FT-IR

วิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR spectrometer รุ่น IRTracer-100 AH (EN230V) ของบริษัท Shimadzu โดยใช้เป็นการยืนยันเกี่ยวกับโครงสร้างของ PHB Fourier transform infrared Spectroscopy (FT-IR) ที่ช่วงการวิเคราะห์ที่ 4,000 – 400 cm-1 ค่า Resolution 4 cm-1 โดยทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับโครงสร้างของ PHB มาตรฐาน

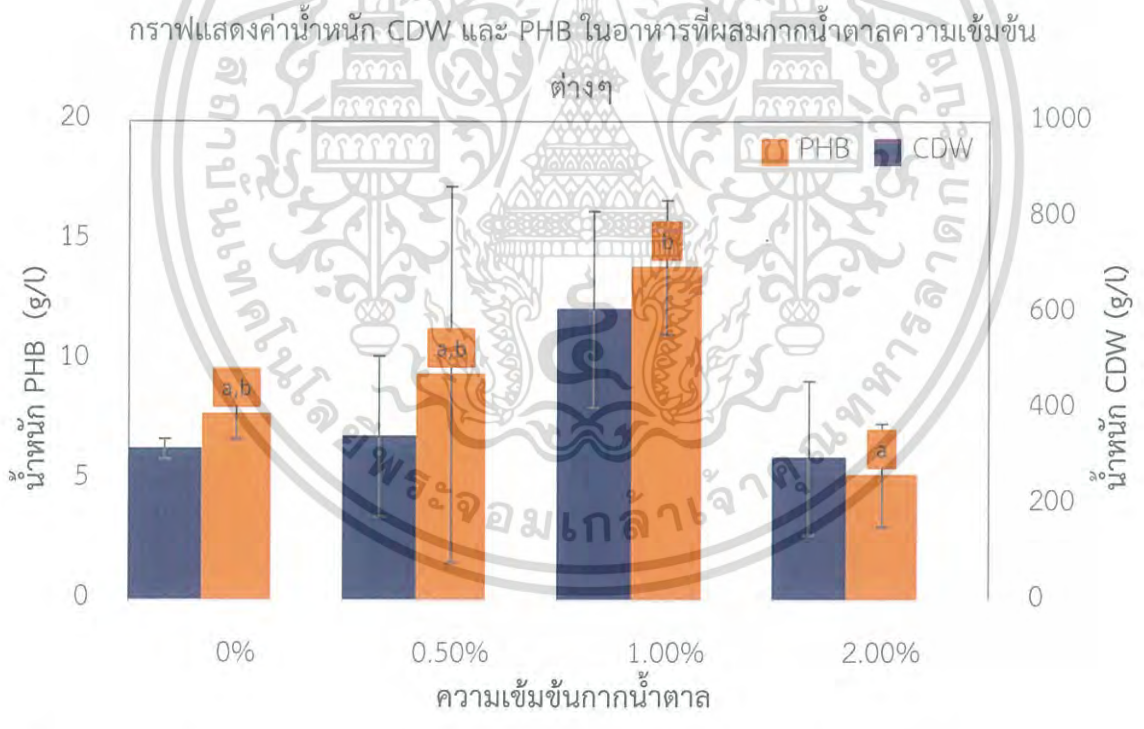
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลในอาหารแข็ง

ศึกษาผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลในอาหารแข็ง โดยเติมกากน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ NA (ไม่เติมกากน้ำตาล), NA ผสมกากน้ำตาลความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น OD600 เท่ากับ 1.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นกากน้ำตาลที่เหมาะสมหรือให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงที่สุด คือ NA ผสมกากน้ำตาล 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 607 กรัม/ลิตร และน้ำหนัก PHB เท่ากับ 13.89 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.1) ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yilmaz และคณะในปี 2005 ทำการทดลองศึกษาพบว่าแบคทีเรียจะสามารถผลิต PHB ในอาหาร NB ที่เติมแหล่งคาร์บอนได้สูงกว่าอาหารที่ไม่เติม



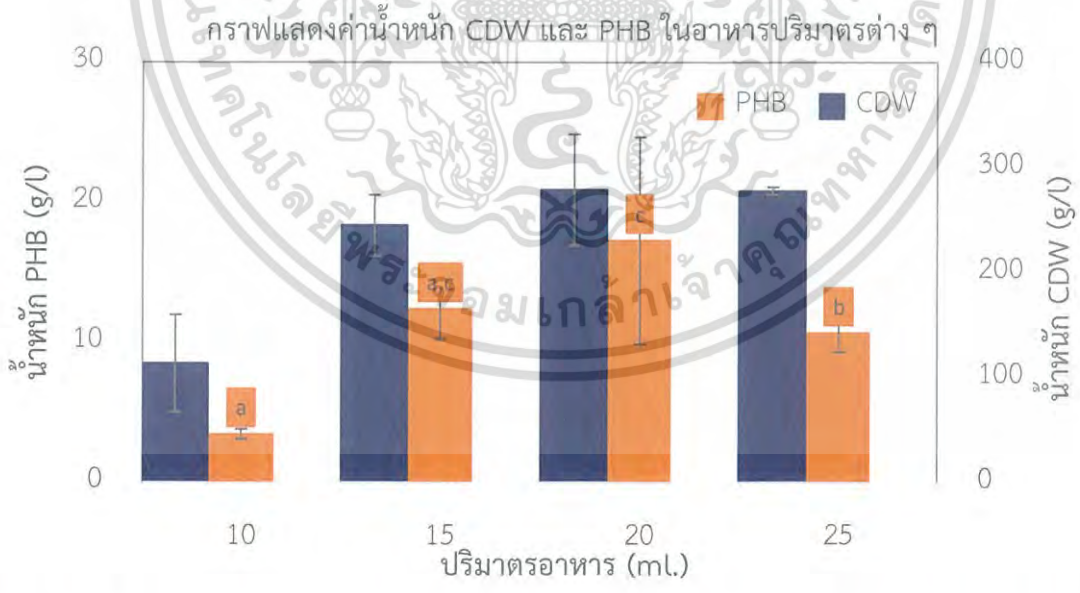
รูปที่ 4.1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) และน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่ไม่เติมกากน้ำตาลและเติมกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณเชื้อเริ่มต้น OD600 เท่ากับ 1.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 22.0 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าความเข้มข้นกากน้ำตาลที่แตกต่างกันในอาหารได้น้ำหนัก PHB แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ข-1.3 ภาคผนวก ข) และเมื่อพิจารณาสัดส่วนความเข้มข้นกากน้ำตาลในอาหารต่าง ๆ ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ให้น้ำหนัก PHB ที่แตกต่างกัน ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติจึงเลือกความเข้มข้นกากน้ำตาลที่ 1% ปริมาตร/ปริมาตร เนื่องมาจากปริมาณน้ำหนักจริงของ PHB มีค่าสูงที่สุด

4.2 การศึกษาปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อของอาหารแข็ง

ศึกษาปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง โดยใช้ปริมาตรอาหาร ปริมาตร 10, 15, 20 และ 25 มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น OD600 เท่ากับ 1.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาตรอาหารที่เหมาะสมหรือให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงที่สุด คือ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 244.87 กรัม/ลิตร และน้ำหนัก PHB เท่ากับ 12.39 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.2) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาตรอาหารที่มากขึ้นไม่ทำให้ปริมาณ PHB มากขึ้น อาจเนื่องมาจากระยะเวลาการบ่มเชื้อที่ใช้ คือ 24 ชั่วโมง ทำให้ปริมาตรอาหารเพียงพอต่อความต้องการของเชื้อ อีกทั้งเชื้อเจริญแค่บริเวณผิวหน้าอาหาร จากรูปที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าที่ 15 และ 20 มิลลิลิตร ได้ปริมาณน้ำหนัก PHB ใกล้เคียงกัน จึงนำไปวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อแยกกลุ่มให้ชัดเจน



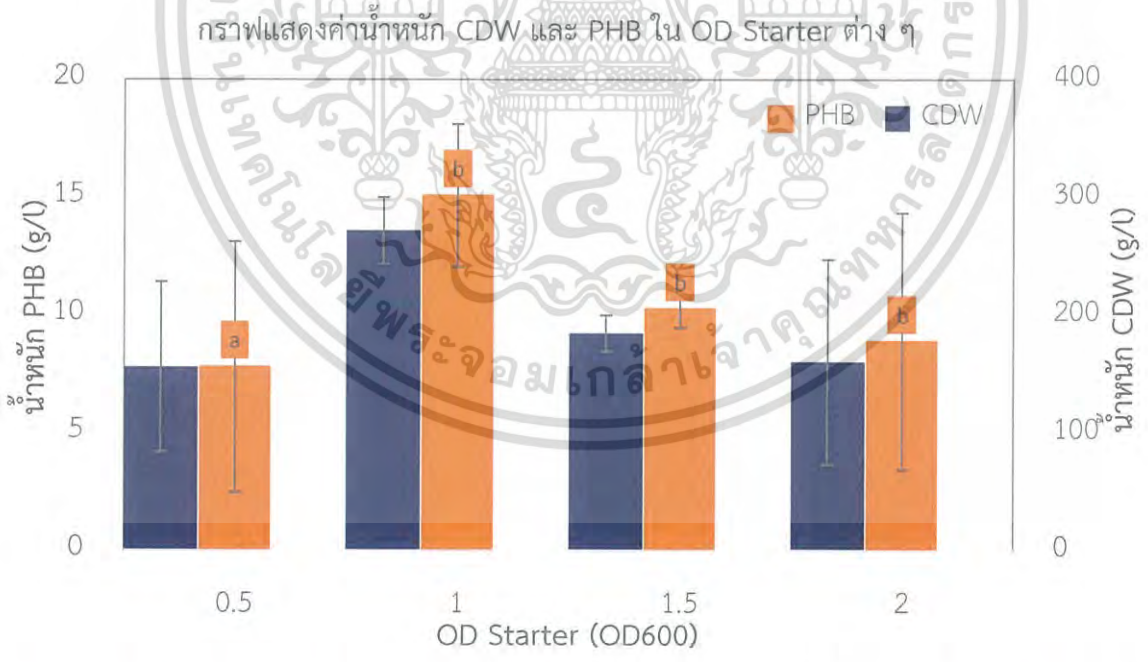
รูปที่ 4.2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) และน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อที่ปริมาตรต่าง ๆ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น OD600 เท่ากับ 1.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 22.0 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าปริมาตรอาหารที่แตกต่างกันได้น้ำหนัก PHB ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ข-2.3 ภาคผนวก ข) จากการทดลองสรุปได้ว่า ปริมาตรอาหารต่าง ๆ ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ให้น้ำหนัก PHB ที่แตกต่างกัน ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติจึงเลือกปริมาตรอาหาร 15 มิลลิลิตรเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตลง

4.3 การศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD Starter) โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2% ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาตรอเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมหรือให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงที่สุด คือ OD600 เท่ากับ 1 ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 271.88 กรัม/ลิตร และน้ำหนัก PHB เท่ากับ 15.08 กรัม/ ลิตร (รูปที่ 4.3) โดยจะเห็นได้ว่าที่ OD600 เท่ากับ 1, 1.5 และ 2 ได้ปริมาณน้ำหนัก PHB ใกล้เคียงกัน จึงนำไปวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป และในปี 2552 ศิริวรรณและคณะทำการทดลองศึกษาพบว่าแบคทีเรียจะสามารถผลิต PHA ในอาหารที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10% หรือที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นหนึ่ง ๆ เมื่อทำการเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นก็ไม่มีผลต่อการผลิต PHA



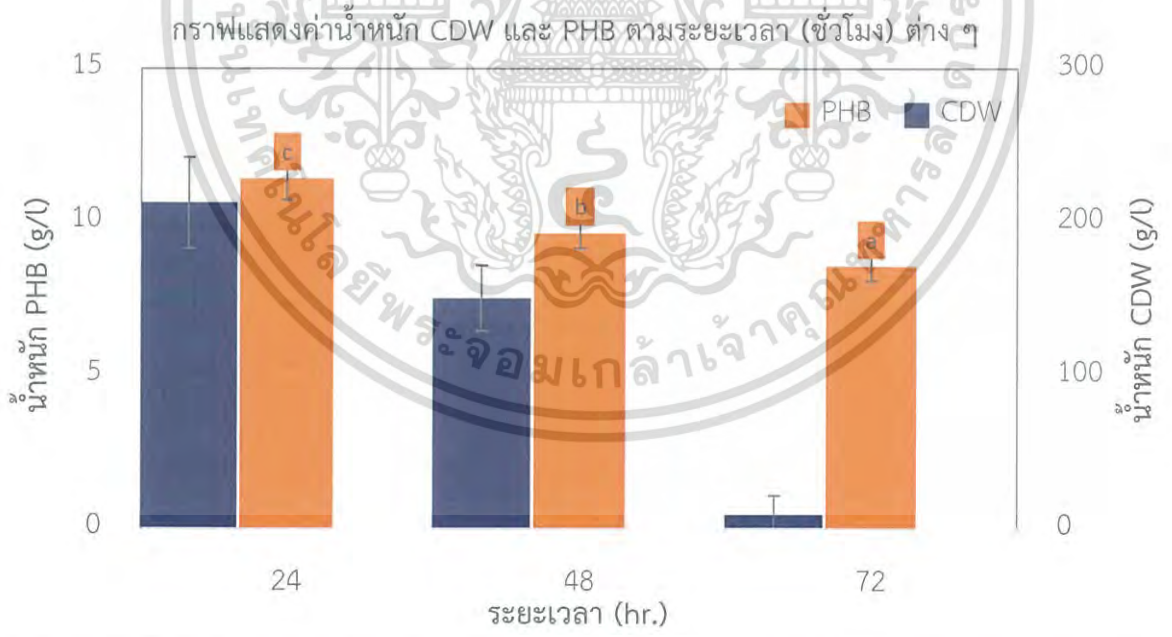
รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) และน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (OD600) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 22.0 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกันได้น้ำหนัก PHB ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ข-3.2 ภาคผนวก ข) จากการทดลองสรุปได้ว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่าง ๆ ที่ทำการทดลองให้น้ำหนัก PHB ที่แตกต่างกัน ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติจึงเลือกปริมาณเชื้อเริ่มต้น OD600 เท่ากับ 1 เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตลง

4.4 การศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมหรือให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงที่สุด คือ 24 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 212.63 กรัม/ลิตร และน้ำหนัก PHB เท่ากับ 11.41 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.4) และเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อมากขึ้น ปริมาณ PHB ไม่ได้เพิ่มขึ้นตามไปด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยของดุษฎีและคณะ ในปี 2017 ที่รายงานว่า เชื้อมีการสร้าง PHA ระหว่างการเจริญในระยะ log phase และจะคงที่เมื่อเข้าสู่ระยะ Stationary phase อาจเนื่องมาจากแหล่งคาร์บอนเริ่มหมดหรือเซลล์ไม่มีเนื้อที่พอที่จะเก็บแกรนูล PHA (Luengo และคณะ, 2003)



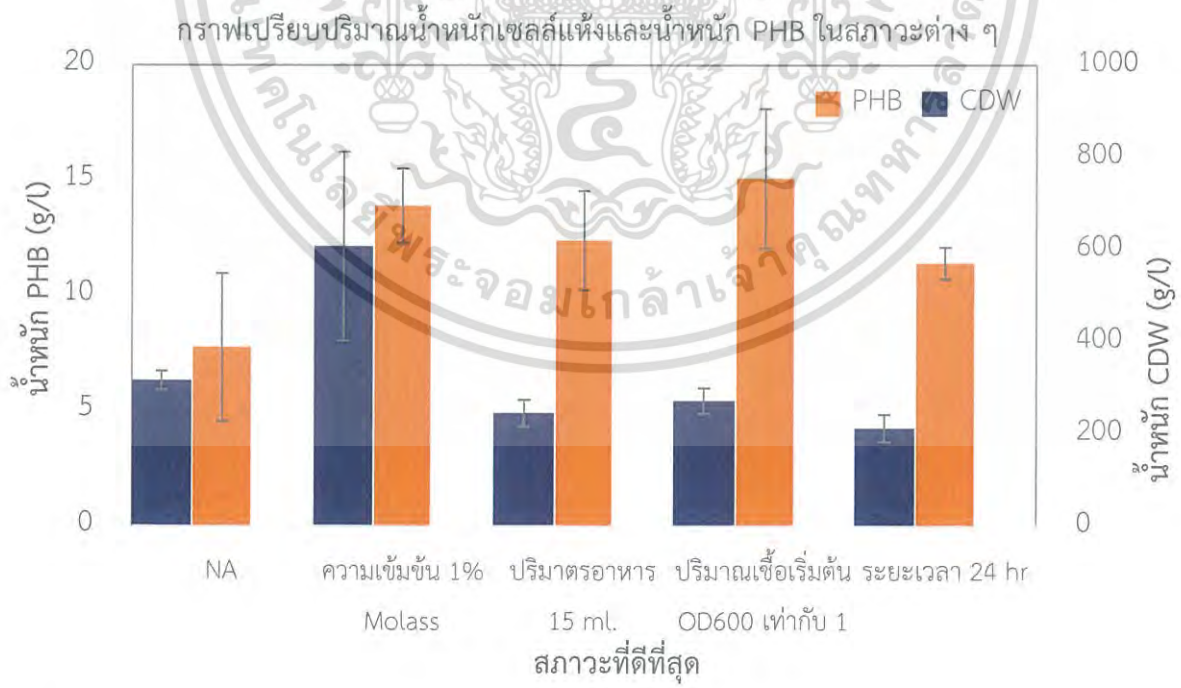
รูปที่ 4.4 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) และน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 22 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันได้น้ำหนัก PHB ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ข-2.3 ภาคผนวก ข) จากการทดลองสรุปได้ว่า ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง) ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ให้น้ำหนัก PHB ที่แตกต่างกัน ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติจึงเลือกระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง เนื่องจากใช้เวลาการเพาะเลี้ยงน้อยที่สุดและได้ค่าน้ำหนัก PHB ใกล้เคียงกับระยะเวลาการเพาะเลี้ยงอื่น ๆ

4.5 เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนัก PHB จากการศึกษาการผลิต PHB บนอาหารแข็งในสภาวะต่าง ๆ

จากการศึกษาแต่ละสภาวะ ได้แก่ ความเข้มข้นกากน้ำตาล, ปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ, ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD Starter) และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 บนอาหารแข็ง ใช้อาหาร Nutrient Agar (NA) นำผลน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักPHB ที่คัดเลือกมาจากแต่ละสภาวะนำมาเปรียบเทียบกับตัวควบคุม คือ อาหาร NA ไม่ผสมกากน้ำตาล ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น OD600 เท่ากับ 1 และระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ผลการเปรียบเทียบค่าน้ำหนัก CDW และน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) แสดงดังรูปที่ 4.5

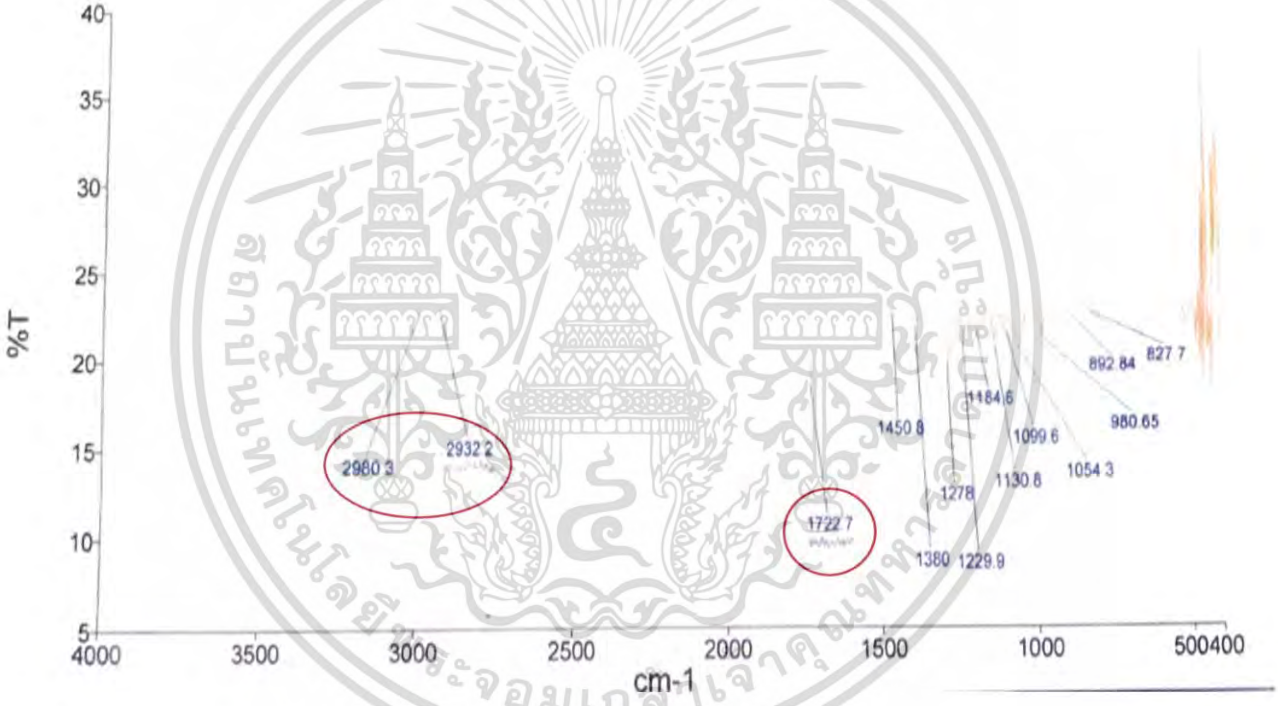


รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง, น้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการศึกษาแต่ละสภาวะเปรียบเทียบกับตัวควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

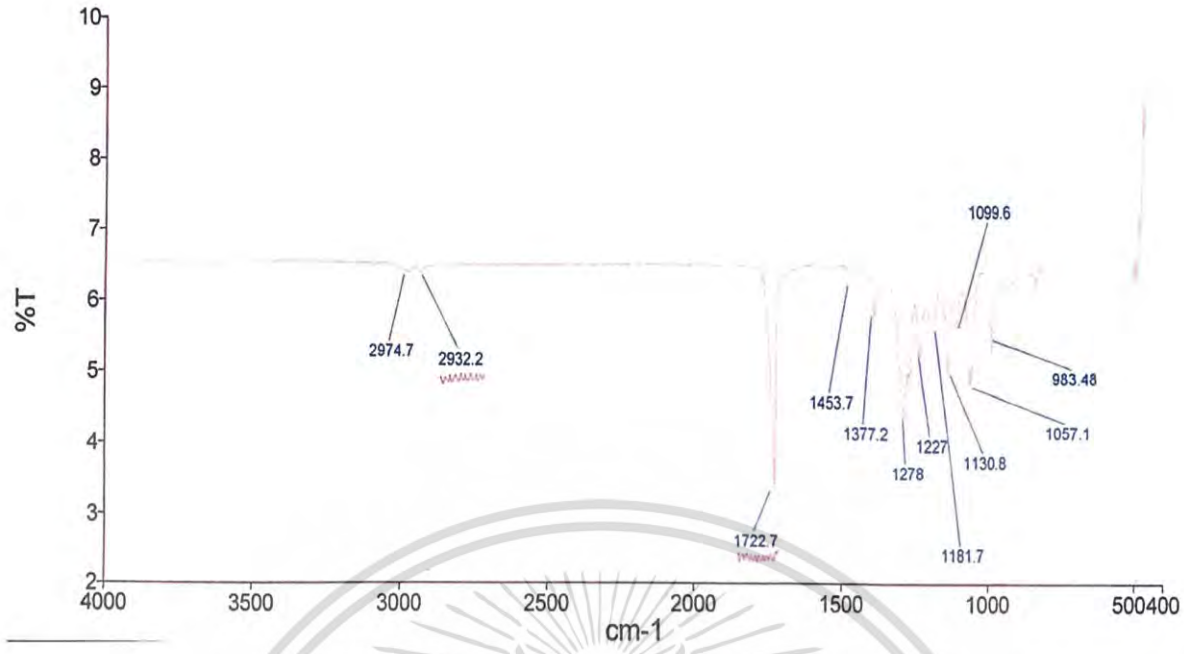
4.6 การวิเคราะห์โครงสร้าง PHB โดยใช้เทคนิค FT-IR

พอลิเมอร์ที่สกัดได้โดยเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 ผลิต PHB บนอาหารแข็งที่มี กากน้ำตาล 1% เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD 600) 1.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งและ PHB นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรืออบจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared Spectroscopy (FT-IR) ที่ช่วงการวิเคราะห์ที่ 4,000 – 400 cm-1 ค่า Resolution 4 cm-1 โดยทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับโครงสร้างของ PHB มาตรฐาน จากการทดลองพบว่า PHB บริสุทธิ์ที่สกัดได้ พบพีคที่เลขคลื่น 1722.7 cm-1 แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretching ,พีคที่เลข คลื่น 2,980.3 cm-1 และ 2,932.2 cm-1 แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของหมู่ฟังก์ชัน C-H Stretching (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.6 สเปกตรัมของ PHB ที่สกัดได้จากเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU01 จากสภาวะที่ดีที่สุดจากการศึกษา คือ อาหารแข็งผสมกากน้ำตาล 1% ปริมาตรอาหาร 15 มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD600) เท่ากับ 1.0 ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 สเปกตรัมของ PHB มาตรฐาน

จากสเปกตรัมของ PHB มาตรฐานที่นำมาวิเคราะห์ พบพีคลักษณะกว้างมีเลขคลื่นประมาณ 2500 – 3300 cm-1 ซึ่งเป็นพีคของหมู่ฟังก์ชัน O-H Stretching, พีคของหมู่ฟังก์ชัน C-H Stretching ที่ช่วงเลขคลื่น 2835–3000 cm-1 และพีคหลักคือพีคที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชัน C=O Stretching ที่เลขคลื่น 1725 cm-1 (รูปที่ 4.7) เมื่อทำการเปรียบเทียบ PHB ที่สกัดจากการทำการทดลองกับ PHB มาตรฐาน พบว่า PHB ที่สกัดได้มีหมู่ฟังก์ชันใกล้เคียงกันเหมือนกัน จึงสามารถยืนยันได้ว่าพอลิเมอร์ที่สกัดได้เป็น PHB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นกากน้ำตาลในอาหารแข็ง เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU 01 พบว่า NA ผสมกากน้ำตาล 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ดีที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHB โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 607 กรัม/ลิตร น้ำหนัก PHB เท่ากับ 13.89 กรัม/ลิตร แสดงว่าแบคทีเรียสามารถผลิต PHB ในอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนได้สูงกว่าในอาหารที่ไม่เติม

การศึกษาปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง พบว่าที่ปริมาตรอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHB คือ 15 มิลลิลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 244.87 กรัม/ลิตร น้ำหนัก PHB เท่ากับ 12.39 กรัม/ลิตร

การศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD Starter) พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิต PHB คือ ความเข้มข้น 1.0% น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ เท่ากับ 271.88 กรัม/ลิตร น้ำหนัก PHB เท่ากับ 15.08 กรัม/ลิตร

การศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง) พบว่าระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญเติบของเซลล์และการผลิต PHB คือ 24 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 212.63 กรัม/ลิตร น้ำหนัก PHB เท่ากับ 11.41 กรัม/ลิตร จะเห็นได้ว่าน้ำหนัก PHB ที่สกัดได้จากสภาวะที่ดีที่สุดของการศึกษาครั้งนี้มีน้ำหนัก PHB มากกว่าน้ำหนัก PHB ของตัวควบคุม คือ NA ซึ่งได้น้ำหนัก PHB เท่ากับ 7.7 กรัม/ลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 316 กรัม/ลิตร ถึงแม้ว่าน้ำหนัก CDW ของตัวควบคุมจะได้ปริมาณน้ำหนักมากกว่าผลการศึกษา แต่การศึกษาครั้งนี้ให้ความสำคัญที่น้ำหนักของ PHB (กรัม/ลิตร) เป็นสำคัญ

จากการนำตัวอย่าง PHB ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU 01 บนอาหารแข็งมาวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Fourier transform infrared Spectroscopy (FT-IR) พบว่า PHB บริสุทธิ์ที่สกัดได้ พบพีคที่เลขคลื่น 1,722.7 cm-1 แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretching ,พีคที่เลขคลื่น 2,980.3 cm-1 และ 2,932.2 cm-1 แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของหมู่ฟังก์ชัน C-H Stretching ซึ่งเลขคลื่นที่ได้ใกล้เคียงกับ PHB มาตรฐาน จึงสามารถยืนยันได้ว่าพอลิเมอร์ที่สกัดได้เป็น PHB แต่อาจมีพีคอื่นแทรกมาเนื่องจากขั้นตอนการสกัด PHB ออกมาไม่บริสุทธิ์เพียงพอ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษาครั้งถัดไปอาจมีการคัดเลือกหาสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ได้เป็นสายพันธุ์อื่นที่ไม่สร้างสปอร์ เนื่องจากการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียทำให้เกิดการยับยั้งการสร้าง PHB ของเซลล์ นอกจากนี้อาจเปลี่ยนอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเป็นอาหารชนิดอื่น ๆ เช่น LB (Luria-Bertani Medium) หรือเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนที่ใช้จากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ ที่เชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนผลิต PHB ได้ปริมาณสูงขึ้น เช่น ของเสียทางการเกษตรต่าง ๆ อาจมีการควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยง เช่น ควบคุม pH หรือควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และควรให้ความสำคัญกับการชั่งน้ำหนักเป็นอย่างมาก เนื่องจากปริมาณตัวอย่างที่ได้จากการทดลองมีปริมาณน้อย ซึ่งส่งผลต่อการคำนวณที่อาจคลาดเคลื่อนได้ หากชั่งน้ำหนักไม่แม่นยำ นอกจากนี้ควรเปลี่ยนภาชนะที่ใช้เลี้ยงเชื้อให้มีพื้นที่หน้าตัดมากขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณ PHB

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จารุวรรณ มารุจกล้า, สุกัญญา ศรีนอก และสุวรรณี แก้วล้อม. (2555). **การผลิตพลาสติกชีวภาพจากน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วย *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095.** กรุงเทพมหานคร: สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, 6-11.

โครงการเพิ่มศักยภาพฐานข้อมูลอุตสาหกรรมฐานชีวภาพ. **รายละเอียดขอ้มูลพลาสติกชีวภาพประเภทพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate).** กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, 1-4.

ดุษฎี มูลดา, สุดารัน์ต แซ่โจว, สุทธิชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์ และอานนท์ ธรรมสิทธิรงค์. (2560). **การคัดแยกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากเชื้อบาซิลลัส.** วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 22(ฉบับพิเศษ), 288-298

พรเทพ ถนนแก้ว และตริตาภรณ์ จันทร์เทศ. (2553). โพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต พลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้. **วารสารศูนย์บริการวิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 18**(1), 27-30.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. **Bacillus/บาซิลลัส.** ค้นเมื่อ 20 เมษายน 2562, จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1226/bacillus-บาซิลลัส

พูนศักดิ์ สักกทัตติยกุล. (2551). **พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic).** ค้นเมื่อ 20 เมษายน 2562, จาก http://www.thaigoodview.com/node/17034

สาธิตา ผลอินทร์. (2554). **การคัดแยกและการผลิต พอลิ-บีต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยจุลินทรีย์จากทะเล.** นครปฐม: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 8-15.

ศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด. (2552). **สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-ไฮดรอกซีวาเลอเรตจากน้ำเสียโรงงานอาหารทะเล โดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากระบบเอสบีอาร์.** สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 50-54.

Cavalheiro, J. M. B. T., de Almeida, M. C. M. D., Grandfils, C. and da Fonseca. (2009). **Poly (3-hydroxybutyrate) production by Cupriavidus necator using waste glycerol.** Process Biochemistry. 44, 509-515.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Davies, S., Tighe, B. (1995). **Cell attachment to gel-spun polyhydroxy butyrate fibers.** Polymer preprints, 36, 103-104

De Vos, P. et al. (2009). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**: Volume 3: The Firmicutes. Springer

Mona K. Gouda, Azza E. Swellam, Sanaa H. Omar. (2001). **Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources.** Egypt: Faculty of Science, Alexandria University.

Ian Levett, Greg Birkett, Nick Davies, Aidan Bell, Alexandra Langford, Bronwyn Laycock, Paul Lant, Steven Pratt. (2016). **Techno-economic assessment of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from methane—The case for thermophilic**

John Poonga Preetam Raj, Khusro A and PanickerSG. (2014). **Adaptational Changes in Cellular Morphology of Bacillus subtilis strain KPA in Response to certain Antimicrobials.** Retrieved May 17, 2019, form https://www.researchgate.net/publication/264057781_Adaptational_Changes_in_Cellular_Morphology_of_Bacillus_subtilis_strain_KPA_in_Response_to_certain_Antimicrobials

Khanna, S. and Srivastava, A.K. (2005). **Recent advances in microbial Polyhydroxy alkanoates.** Process Biochemistry. 40, 607-619.

Luengo, J.M., Garcia, B., Sandoval, A., Noharro, G. and Olivera, E.R. (2003). **Bioplastics from microorganisms.** Curr. Opin Microbiol. 6 : 250-260

Mohamed A. Hassan, Elsayed K. Bakhiet, Salah G. Ali, Hussien R. Hussien. (2016). **Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by *Bacillus* sp. isolated from Egypt.** Egypt: Faculty of Science, Al-Azhar University.

Noha Salah Elsayed, Khaled Mohamed Aboshanab, Mohammad Mohammad Aboulwafa, Nadia Abdelhaleem Hassouna. (2016). **Cost-effective production of the Bio-Plastic Poly-β- hydroxybutyrate using *Acinetobacter Baumannii* ISOLATE P39.** Egypt:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, Ain Shams University

bioprocessing. Journal of Environmental Chemical Engineering. Australia: School of Chemical Engineering, The University of Queensland, 8.

Polimerek. (2008) . **Polyhydroxybutyrate structure**. Retrieved May 17, 2019, form https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polyhydroxybutyrate_structure.svg

Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. and Sha, S.H. (2007). **Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants**. Biotechnology Advances, 25, 148-175.

UĞUR, A., ŞAHİN, N., BEYATLI, Y. (2002). **Accumulation of Poly-\ betaHydroxybutyrate in Streptomyces Species During Growth with Different Nitrogen Sources**. Turkish Journal of Biology, 26(3), 171-174.

Vary, S. P. *et al.* (2007). ***Bacillus megaterium* — from simple soil bacterium to industrial protein production host**. *Appl Microbial Biotechnol* 76:957–967

Yilmaz1, M.; Soran, H. and Beyatli, Y. (2005). **Determination of poly-b-hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus spp***. World J. Microbiol. Biotechnol., 21, 565-566.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี ตารางและกราฟ

1. Nutrient Agar

- Nutrient broth 13 กรัม/ลิตร และ Agar 15 กรัม/ลิตร

โดยละลายส่วนผสมเข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อเสร็จนำไปเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วรอให้เย็นด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

2. กากน้ำตาล (Molasses)

เตรียมโดยเจือจางกากน้ำตาล ความเข้มข้นจาก 77% เป็น 38.5% ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3. PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X

เตรียมโดยเจือจางจาก PBS 10X ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

ตาราง

ตารางที่ ก-1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ด้วยความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่าง ๆ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น OD600 เท่ากับ 1.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นกากน้ำตาล (ปริมาตร/ปริมาตร)	CDW (กรัม/ลิตร)	PHB (กรัม/ลิตร)
0%	316	7.76
0.5%	342	9.42
1.0%	607	13.89
2.0%	296.5	5.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ด้วยปริมาตรอาหารต่าง ๆ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น OD600 เท่ากับ 1.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ปริมาตรอาหาร (มิลลิลิตร)	CDW (กรัม/ลิตร)	PHB (กรัม/ลิตร)
10	113.5	3.45
15	244.87	12.39
20	278.5	17.26
25	277.5	10.66

ตารางที่ ก-3 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น OD600 เท่ากับ 1.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD600)	CDW (กรัม/ลิตร)	PHB (กรัม/ลิตร)
0.5	156	7.79
1.0	271.87	15.08
1.5	184.5	10.26
2	160.12	8.88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-4 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ด้วยระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงต่าง ๆ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น OD600 เท่ากับ 1.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	CDW (กรัม/ลิตร)	PHB (กรัม/ลิตร)
24	212.62	11.40
48	150.37	9.63
72	9.18	8.54

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ผลการทดสอบทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ข-1 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนัก PHB บนอาหารแข็งด้วยความเข้มข้นกากน้ำตาล (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ข-1.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	(I) Molasses	(J) Molasses	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	.00	.50	-.00166	.00307	.599	-.0083	.0050
		1.00	-.00613	.00307	.069	-.0128	.0006
		2.00	.00255	.00307	.422	-.0041	.0092
	.50	.00	.00166	.00307	.599	-.0050	.0083
		1.00	-.00447	.00307	.170	-.0112	.0022
		2.00	.00421	.00307	.195	-.0025	.0109
	1.00	.00	.00613	.00307	.069	-.0006	.0128
		.50	.00447	.00307	.170	-.0022	.0112
		2.00	.00868	.00307	.015	.0020	.0154
	2.00	.00	-.00255	.00307	.422	-.0092	.0041
		.50	-.00421	.00307	.195	-.0109	.0025
		1.00	-.00868	.00307	.015	-.0154	-.0020

ตารางที่ ข-1.2 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	3	.000	2.834	.083
Within Groups	.000	12	.000		
Total	.000	15			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-1.3 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHB บนอาหารแข็งด้วย**ด้วย**ความเข้มข้นกากน้ำตาล (ปริมาตร/ปริมาตร) ต่าง ๆ

	Molasses	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan[a]	2.00	4	.0052	
	.00	4	.0078	.0078
	.50	4	.0094	.0094
	1.00	4		.0139
	Sig.		.216	.081

ข-2 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนัก PHB บนอาหารแข็งด้วยปริมาตรอาหาร (มิลลิลิตร) ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ข-2.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	(I) media volume	(J) media volume	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	10	15	-.00895*	.00277	.007	-.0150	-.0029
		20	-.01382*	.00277	.000	-.0199	-.0078
		25	-.00721*	.00277	.023	-.0133	-.0012
	15	10	.00895*	.00277	.007	.0029	.0150
		20	-.00487	.00277	.105	-.0109	.0012
		25	.00174	.00277	.543	-.0043	.0078
	20	10	.01382*	.00277	.000	.0078	.0199
		15	.00487	.00277	.105	-.0012	.0109
		25	.00661*	.00277	.035	.0006	.0126
	25	10	.00721*	.00277	.023	.0012	.0133
		15	-.00174	.00277	.543	-.0078	.0043
		20	-.00661*	.00277	.035	-.0126	-.0006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-2.2 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	3	.000	8.528	.003
Within Groups	.000	12	.000		
Total	.001	15			

ตารางที่ ข-2.3 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHB บนอาหารแข็งด้วยปริมาตรอาหาร (มิลลิลิตร)

			Subset for alpha = 0.05		
	mediavolume	N	1	2	3
Duncan[a]	10	4	.0034		
	25	4		.0107	
	15	4		.0124	.0124
	20	4			.0173
	Sig.		1.000	.543	.105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-3 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนัก PHB บนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD Starter) ที่แตกต่างกัน ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ตารางที่ ข-3.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	(I) OD	(J) OD	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	.50	1.00	-.00988*	.00363	.019	-.0178	-.0020
		1.50	-.00849*	.00363	.038	-.0164	-.0006
		2.00	-.00961*	.00363	.021	-.0175	-.0017
	1.00	.50	.00988*	.00363	.019	.0020	.0178
		1.50	.00139	.00363	.708	-.0065	.0093
		2.00	.00028	.00363	.941	-.0076	.0082
	1.50	.50	.00849*	.00363	.038	.0006	.0164
		1.00	-.00139	.00363	.708	-.0093	.0065
		2.00	-.00112	.00363	.763	-.0090	.0068
	2.00	.50	.00961*	.00363	.021	.0017	.0175
		1.00	-.00028	.00363	.941	-.0082	.0076
		1.50	.00112	.00363	.763	-.0068	.0090

ตารางที่ ข-3.2 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	3	.000	3.353	.055
Within Groups	.000	12	.000		
Total	.001	15			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-3.3 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHB บนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่าง ๆ

	OD	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan[a]	.50	4	.0052	
	1.50	4		.0137
	2.00	4		.0148
	1.00	4		.0151
	Sig.		1.000	.721

ข-4 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนัก PHB บนอาหารแข็งด้วยระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง) ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ข-4.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	(I) Molasses	(J) Molasses	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	24.00	48.00	.00226*	.00064	.006	.0008	.0037
		72.00	.00448*	.00064	.000	.0030	.0059
	48.00	24.00	-.00226*	.00064	.006	-.0037	-.0008
		72.00	.00222*	.00064	.007	.0008	.0037
	72.00	24.00	-.00448*	.00064	.000	-.0059	-.0030
		48.00	-.00222*	.00064	.007	-.0037	-.0008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-4.2 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	2	.000	24.903	.000
Within Groups	.000	9	.000		
Total	.000	11			

ตารางที่ ข-4.3 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHB บนอาหารแข็งด้วยระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)

	Molasses	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan[a]	72.00	4	.0123		
	48.00	4		.0145	
	24.00	4			.0168
	Sig.		1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

เทคนิคการวิเคราะห์

1. การประเมินการเจริญของจุลินทรีย์โดยการวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer

Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณแสงที่ผ่านทะลุตัวอย่างที่เป็นของเหลว ซึ่งในที่นี้คือ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Liquid medium) ที่ความยาวคลื่นของแสงที่กำหนด และปริมาณแสงจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของตัวอย่างเพิ่มขึ้น (เมื่อจำนวนเซลล์ในอาหารเหลวเพิ่มขึ้น) องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่อง มีดังต่อไปนี้

1) แหล่งกำเนิดแสง เป็นแสงจากหลอดไฟ ซึ่งอาจจะเป็นทังสเตน (W) หรือ ดิวทีเรียม (D, H12)

2) เกรตติงเลี้ยวเบน (Diffraction grating) หรือปริซึม (Prism) เพื่อแยกแสงจากแหล่งกำเนิดออกเป็นความยาวคลื่นต่าง ๆ เช่น ความยาวคลื่น 100-400 นาโนเมตร อยู่ในช่วงของอัลตรา - ไวโอเลต และความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร อยู่ในช่วงที่ตามองเห็นได้ เป็นต้น

3) ช่องแสง (Slit) แยกแสงเฉพาะที่มีความยาวคลื่นเหมาะสมกับตัวอย่างที่สุด

4) คิวเวท (Cuvette) เป็นหลอดหรือภาชนะที่ใช้ใส่ตัวอย่างที่จะวัด อาจทำด้วยแก้วหรือควอทซ์ โดยความกว้างของ Cuvette เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งต่อปริมาณแสงที่ผ่านทะลุตัวอย่างออกมา

5) โฟโตทิวบ์ (Phototube) จะรวบรวมแสงที่ผ่านทะลุคิวเวท

6) กัลวานอมิเตอร์ (Galvanometer) เปลี่ยนแสงที่รวบรวมจาก phototube ให้เป็นพลังงานไฟฟ้าและแสดงบนหน้าปัดในหน่วยสากล

เมื่อใส่ตัวอย่างลงคิวเวทและนำไปใส่ในช่องวางตัวอย่าง (Sample holder) แสงจากแหล่งกำเนิดจะถูกแยกเฉพาะความยาวคลื่นที่เหมาะสมกับตัวอย่างโดยปริซึม ซึ่งความยาวคลื่นที่เรียกใช้จะต่างกันตามสีของของเหลวตัวอย่าง เช่น ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ใช้สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Nutrient broth เพราะแสงที่ความยาวคลื่นนี้จะผ่านทะลุอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีนี้ได้เกือบทั้งหมดและมากที่สุด แสงที่ทะลุผ่าน cuvette และตัวอย่างจะถูกรวบรวมโดยโฟโตทิวบ์และกัลป์วานอมิเตอร์จะทำหน้าที่เปลี่ยนปริมาณแสงทั้งหมดเป็นพลังงานไฟฟ้า และแสดงบนหน้าปัดในหน่วยสากล คือ Transmittance (%) และ Optical density (OD) ทั้งนี้ อาจจะขยายสัญญาณให้อ่านค่าได้ดีขึ้นโดยใช้ตัวขยายสัญญาณ (Amplifier) เนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ของจุลินทรีย์ เป็นตัวปิดกั้นแสง ดังนั้นแสงที่ผ่านปริซึมมาแล้วบางส่วนอาจไม่ผ่านเซลล์ของจุลินทรีย์ในตัวอย่างได้และกระจัดกระจายหรือสะท้อนออกไป ทำให้เหลือปริมาณแสงที่ทะลุผ่านน้อยลงและค่า Ttransmittance ก็ต่ำลงด้วยหรือกล่าวอีก อย่างหนึ่งว่า “ความขุ่น” เพิ่มขึ้น

การวัดความขุ่นหรือวัดค่า OD เป็นวิธีที่นิยมใช้วัดการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่าค่า Transmittance เพราะความเข้มข้นของเซลล์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความขุ่น ดังนั้นถ้าเขียนกราฟระหว่างค่า OD กับน้ำหนักเซลล์แห้งหรือกับจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์จะได้กราฟเส้นตรง นอกจากนี้ค่า OD ที่อยู่ในช่วง 0.1-0.5 จะเป็นช่วงที่มีความแม่นยำมากที่สุดและจะได้กราฟเส้นตรง แม้ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่ก็เป็นวิธีการวัดที่ไม่อาจแยกเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายได้

2. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Attenuated total reflection Fourier transforms infrared Spectroscopy (FT-IR)

หลักการ

เทคนิค IR เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาหมู่ฟังก์ชันของสาร โดยใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าช่วง รังสีอินฟาเรด (Infrared, IR) ที่มีความยาวคลื่น (λ) 0.8-200 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นรังสีที่มีเลขคลื่น หรือจำนวนคลื่น (Wave Number) 12500 - 50 cm-1 เมื่อโมเลกุลดูดกลืนแสง IR พันธะจะเกิดการเปลี่ยนแปลง ในแบบต่าง ๆ เช่น สั่น ยืด หรือ งอ พันธะต่างชนิดจะดูดกลืนแสง IR ช่วงความยาวคลื่นหรือความถี่ต่างกัน โดยทั่วไปแสดงคลื่น IR ที่ถูกดูดกลืนในรูปของคลื่น

การเตรียมสารตัวอย่าง

นำสาร PHB ที่สกัดได้บดเป็นผงละเอียด ตักสารมา 2-3 มิลลิกรัม ใส่ลงในที่บรรจุตัวอย่าง ใช้แรงกดประมาณ 80 หลังจากนั้นรอให้กระบวนการครบ 100% จะได้ peak แสดงบนหน้าจอคอมพิวเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้