

การสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (พีเอชบี)
จาก *Bacillus megaterium* ด้วยโพรพิลีนคาร์บอเนต

POLYHYDROXYBUTYRATE(PHB) EXTRACTION FROM
Bacillus megaterium USING PROPYLENE CARBONATE



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

POLYHYDROXYBUTYRATE(PHB) EXTRACTION FROM
Bacillus megaterium USING PROPYLENE CARBONATE



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (พีเอชบี) จาก *Bacillus megaterium* ด้วยโพรพิลีนคาร์บอเนต

Polyhydroxybutyrate (PHB) extraction from

Bacillus megaterium using propylene carbonate

ชื่อนักศึกษา

นางสาวศิริพร ใจแสน รหัสนักศึกษา 58050820

นางสาวอรณิชา ไชยลาหงส์ รหัสนักศึกษา 58050842

นางสาวอาริยา วรวงค์ รหัสนักศึกษา 58050848

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา

ปีการศึกษา

2561

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง(สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ	พนา โลหะทรัพย์ทวี
ผศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ กรรมการ	เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์
ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (พีเอชบี) จาก <i>Bacillus megaterium</i> ด้วยโพรพิลีนคาร์บอเนต
ชื่อนักศึกษา	นางสาวศิริพร ใจแสน รหัสนักศึกษา 58050820
	นางสาวอรณิชา ไชลายหงษ์ รหัสนักศึกษา 58050842
	นางสาวอาริยา วรวงค์ รหัสนักศึกษา 58050848
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (พีเอชบี) จัดเป็นพลาสติกทางเลือกที่สามารถนำมาใช้แทนพลาสติกสังเคราะห์ที่ย่อยสลายยากได้ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน วิธีการสกัดพีเอชบีในอุตสาหกรรมส่วนมากนิยมใช้สารละลายที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เช่น สารละลายคลอโรฟอร์มงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษากระบวนการสกัดพีเอชบีจากเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU01 ด้วยสารละลายโพรพิลีนคาร์บอเนต โดยผ่านกระบวนการปรับสภาพเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการสกัดมากขึ้น โดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่แตกต่างกัน ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและนำไปสกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอเนต ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ผ่านชุดรีฟลักซ์ พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ที่นำไปปรับสภาพเซลล์ให้ค่าร้อยละของพีเอชบีเทียบกับ CWD สูงสุด คือ 7.0905 เปอร์เซ็นต์ และการสกัดแบบไม่ผ่านกระบวนการปรับสภาพเซลล์นั้นให้ค่าร้อยละของพีเอชบีต่ำสุด คือ 0.2000 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำพีเอชบีที่สกัดได้มาศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) พบว่า พีคอยู่ในช่วง $1725-1705\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งพีคดังกล่าวเป็นพีคเอกลักษณ์ของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (พีเอชบี) ด้วยสารละลายโพรพิลีนคาร์บอเนตได้

คำสำคัญ : พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต, วิธีการสกัดพีเอชบี, *Bacillus megaterium*, โพรพิลีนคาร์บอเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title Polyhydroxybutyrate (PHB) extraction from
Bacillus megaterium using propylene carbonate

Students Miss Siriporn Jaisan Student ID 58050820
Miss Onnicha Kailaihong Student ID 58050842
Miss Ariya Worawong Student ID 58050848

Degree Bachelor of Science (Biotechnology)

Department Biology

Faculty Science

University King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)

Academic Year 2018

Advisor Asst. Prof. Tipachai Vatanavicharn

Abstract

Polyhydroxybutyrate (PHB) is an alternative plastic that can be used to replace synthetic plastics that are difficult to digest. Which will help reduce current environmental problems. The method of extraction of PHB in large industries is commonly used as a solution that is toxic to the environment such as chloroform solution. This research aims to study the extraction process of PHB from *Bacillus megaterium* strains SWU01 with propylene carbonate by mean of solution through the cell pretreatment process with sodiumhypochlorite solution for more efficient extraction. With a concentration of sodium hypochlorite, incubated at 37 ° C for a specified period of time and then extracted with propylene carbonate at 120 degrees Celsius through the reflux set. It was found that 12.5% sodium hypochlorite concentration was used to adjust the cell condition to produce the highest PHB of 0.0212 g. and the non-cell pretreatment extraction yielded the lowest PHB value of 0.0006 g. When the extraction of PHB was carried out, the chemical structure was studied with the infrared Fourier transform technique (FT-IR) discover Peak in the range 1725-1705 cm⁻¹ which the peak is the unique peak of polyhydroxybutyrate. This research has shown that it can extract polyhydroxybutyrate (PHB) with propylene carbonate solution.

Keywords : Polyhydroxybutyrate, Extraction, *Bacillus megaterium*, Propylene carbonate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการเอื้อเฟื้อข้อมูลที่เป็นประโยชน์ และความร่วมมือต่างๆของหลายคน ซึ่งให้การสนับสนุนคณะผู้จัดทำโครงการพิเศษตั้งแต่เริ่มต้นงานวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาของโครงการพิเศษนี้ที่กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาให้แก่คณะผู้จัดทำโครงการพิเศษ และ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ประจำภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่อนุเคราะห์ให้ใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 และให้ใช้ห้องปฏิบัติการที่มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ซึ่งทั้งสองท่านเสียสละเวลาให้คำแนะนำ ความคิดเห็นที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับแนวทางในการทำโครงการพิเศษโดยเฉพาะคอยชี้แนะ ทำให้คณะผู้จัดทำโครงการพิเศษได้รับข้อมูลที่ครบถ้วนและถูกต้อง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ซึ่งเป็นกรรมการร่วมในโครงการพิเศษฉบับนี้ที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆเพื่อให้โครงการวิจัยนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบิดามารดา และญาติๆที่คอยสนับสนุน ให้กำลังใจจนโครงการพิเศษสำเร็จไปด้วยดี รวมถึงพี่ๆปริญญญาโท และเพื่อนๆที่ให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ทำโครงการพิเศษ

คณะผู้จัดทำหวังว่าโครงการพิเศษฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่มากก็น้อย คุณความดีอันนี้ ขอมอบแต่บิดามารดา ครู อาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ศิริพร ใจแสน

อรณิชา ไชลายหงษ์

อาริยา วรวงค์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญ (ต่อ)	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต.....	3
2.1.1 พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต.....	3
2.1.2 การผลิตพีเอชบีโดยจุลินทรีย์.....	4
2.1.3 กระบวนการสังเคราะห์.....	4
2.1.4 คุณสมบัติของพีเอชบี.....	6
2.1.5 การใช้ประโยชน์จากพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต.....	6
2.2 การศึกษาวิธีการสกัดพีเอชบี.....	7
2.2.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย.....	7
2.2.2 การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์.....	7
2.2.3 การสกัดด้วยเอนไซม์.....	8
2.3 <i>Bacillus</i>	8
2.3.1 แบคทีเรีย <i>Bacillus megaterium</i>	9
2.4 Propylene Carbonate.....	9
2.4.1 ประยุกต์ใช้ Propylene Carbonate.....	10
2.4.2 การจัดเก็บและขนส่ง.....	10
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	13
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	13
3.1.1 เชื้อแบคทีเรีย.....	13
3.1.2 สารเคมี.....	13
3.1.3 อุปกรณ์.....	13
3.2 เตรียม starter.....	14
3.3 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้ในการสกัดพีเอชบี.....	15
3.4 การสกัดพีเอชบีและการหาน้ำหนักพีเอชบี.....	15
3.4.1 สกัดด้วยไซเตียมไฮโปคลอไรท์ (วิธีดั้งเดิม).....	15
3.4.2 การสกัดด้วยโพรพิลีน คาร์บอนेतที่ผ่านการปรับสภาพเซลล์ด้วยไซเตียมไฮโปคลอไรท์.....	15
3.4.3 สกัดด้วยโพรพิลีน คาร์บอนेत.....	16
3.4.4 การหาน้ำหนักพีเอชบี.....	16
3.5 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	16
3.6 การวิเคราะห์โครงสร้างของพีเอชบี.....	16
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	17
4.1 การศึกษาผลการสกัดพีเอชบีด้วยโพรพิลีน คาร์บอนेत.....	17
4.2 การศึกษาน้ำหนักของตะกอนที่กรองได้จากการสกัดพีเอชบี.....	18
4.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของพีเอชบีโดยใช้เทคนิคFT-IR.....	19
4.4 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของเศษเซลล์ โดยใช้เทคนิค FT-IR.....	21
บทที่ 5 วิจารณ์ผล สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	22
5.1 วิจารณ์ผลการวิจัย.....	22
5.2 สรุปผลการวิจัย.....	22
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก.....	27
ภาคผนวก ก.....	28
ภาคผนวก ข.....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 ตารางแสดงข้อมูลทางเคมีฟิสิกส์ของโพรพิลีนคาร์บอนเนต.....	10
ตารางที่ 2 ตารางเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลและความบริสุทธิ์ของ PHB เมื่อพรีทรีทด้วยโซเดียม ไฮโปคลอไรท์.....	11
ตารางที่ ข-1 แสดงค่าน้ำหนักของPHB(g)และ %yield ที่สกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ สกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอนเนตและจากการทรีทด้วยโซเดียม ไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆก่อนนำไปสกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอนเนต.....	29
ตารางที่ ข-2 แสดงค่าน้ำหนักของตะกอนเซลล์(g)ที่ได้จากการสกัดพีเอชบี.....	30



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของพีเอชบี.....	3
รูปที่ 2.2 แกรนูลที่สะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตภายในเซลล์แบคทีเรีย.....	4
รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์พีเอชบี.....	5
รูปที่ 2.4 สภาพที่จำกั้ดออกซิเจนของพีเอชบี.....	5
รูปที่ 2.5 <i>Bacillus megaterium</i> ที่ย้อมด้วย Sudan Black B และ Safranin.....	9
รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างโพรพิลีน คาร์บอนเนต.....	9
รูปที่ 4.1 ค่าผลได้เฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักพีเอชบี ที่สกัดได้จากเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> สายพันธุ์ SWU01.....	17
รูปที่ 4.2 ค่าของตะกอนที่กรองได้หลังจากการสกัดพีเอชบี ด้วยเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> สายพันธุ์ SWU01 โดย สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้นต่างๆและ สกัดด้วยโพรพิลีน คาร์บอนเนต.....	18
รูปที่ 4.3 สเปกตรัมของพีเอชบีที่สกัดได้จากเชื้อ <i>Bacillus megaterium</i> สายพันธุ์ SWU01 โดยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์และโพรพิลีน คาร์บอนเนต.....	19
รูปที่ 4.4 สเปกตรัมของพีเอชบีทางการค้า.....	20
รูปที่ 4.5 สเปกตรัมของเศษเซลล์ที่ได้หลังจากการสกัดพีเอชบีด้วยโพรพิลีน คาร์บอนเนต.....	21
รูปที่ ก-1 เทคนิค Streak-Plate Technique.....	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันพลาสติกได้มีบทบาทต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์ซึ่งส่งผลให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่สำคัญคือปัญหาการย่อยสลายได้ยาก เนื่องจากโครงสร้างของพลาสติกที่มีความแข็งแรงและทนทานต่อการย่อยสลายจึงทำให้การกำจัดทำได้ยากและส่งผลให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม รวมถึงการจัดการของเสียที่เกิดจากพลาสติก ทางเลือกในการแก้ปัญหาเรื่องนี้คือ การใช้พลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้เหล่านี้ เมื่อย่อยสลายหมดแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำ มวลชีวภาพ ก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ใช้ในการเจริญเติบโตของพืช วัตถุประสงค์สำหรับการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของวัตถุดิบต่าง ๆ จึงไม่ก่อให้เกิดปัญหาขยะตกค้างที่จะกลายเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อม

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ พีเอชบี (Polyhydroxybutyrate; PHB) จัดเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Ralstonia eutropha* *Bacillus megaterium* และ *Alcaligenes eutrophus* มีการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตออกจากเซลล์เพื่อนำออกมาใช้ประโยชน์คุณสมบัติของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต คือ มีความสามารถทนอุณหภูมิสูง มีความเหนียวสามารถหล่อขึ้นรูปเป็นรูปร่างต่างๆ ได้ตามต้องการ มีคุณสมบัติเป็นฟิล์มกั้นน้ำและความชื้นได้ดี ทนทานต่อการซึมผ่านของน้ำและออกซิเจน ประยุกต์ใช้งานด้านบรรจุภัณฑ์อาหาร ชิ้นส่วนรถยนต์ และอุปกรณ์การแพทย์

สารละลายส่วนใหญ่ที่ใช้ในการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตนิยมใช้คลอโรฟอร์ม ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเทียบกับสารละลายโพรพิลีนคาร์บอเนตที่เป็นสารละลายที่เป็นพิษน้อยกว่า โดยงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษากระบวนการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 ด้วยสารละลายโพรพิลีนคาร์บอเนต และเพิ่มกระบวนการปรับสภาพเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการสกัดมากขึ้น โดยมีความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่างกันออกไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 ด้วยสารละลายโพรพิลีนคาร์บอเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 ในการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตบนอาหารแข็ง
- 2) การใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 1%, 4%, 8% และ 12.5% ในการปรับสภาพเซลล์
- 3) ใช้โพรพิลีนคาร์บอนेटในการสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตออกจากเซลล์
- 4) ตรวจสอบโครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สกัดได้โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถสกัดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยใช้โพรพิลีนคาร์บอนेटได้
- 2) ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการปรับสภาพเซลล์ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ก่อนที่จะนำมาสกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอนेट
- 3) ได้พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ด้วยวิธีการทางชีวภาพเพื่อใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

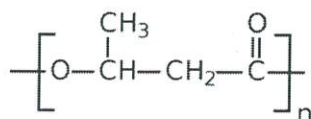
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB)

2.1.1 พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB)

เป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastic) เกิดจากการสะสมสารประกอบคาร์บอนในเซลล์ของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้ เช่น *Alcaligenes ssp.*, *Azobacte ssp.*, *Bacillus ssp.*, *Pseudomonas ssp.* และ *Alcaligenes eutrophus ssp.* ในขั้นตอนแรกจะใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์สำหรับผลิต PHB ซึ่งมีต้นทุนในการผลิตสูงกว่าการผลิตพอลิเมอร์จากปิโตรเคมี ทำให้ PHB ยังไม่ถูกใช้งานอย่างแพร่หลายนัก ปัจจุบันได้มีการพัฒนาโดยใช้แหล่งสารประกอบคาร์บอนจากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าว อ้อย มันสำปะหลัง และผลผลิตพลอยได้ในอุตสาหกรรม เช่น กากน้ำตาล กลีเซอรอล คาร์บอนไดออกไซด์ ทางนม เป็นต้น มาใช้ในการสังเคราะห์ PHB เพื่อลดต้นทุนการผลิตให้ต่ำลง ทำให้ PHB ถูกนำมาใช้งานอย่างกว้างขวางมากขึ้น เช่น ภาชนะบรรจุอาหาร ชิ้นส่วนรถยนต์ พลาสติกคลุมดิน และอุปกรณ์ทางการแพทย์ เนื่องจากมีความยืดหยุ่น ทนทานต่อการซึมผ่านของน้ำและออกซิเจน และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

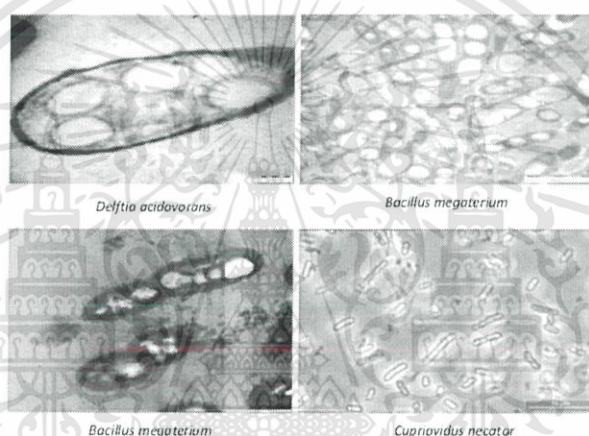
พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นโฮโมโพลิเมอร์ของ 3-hydroxybutyrate และเป็นสารในกลุ่ม PHAs ที่สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด PHB ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นมาถูกเก็บไว้ในแกรนูลภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์แกรนูลของ PHB ถูกห่อหุ้มด้วยเมมเบรนที่มีไขมันและโปรตีนหนาประมาณ 2 นาโนเมตร PHB ที่แยกได้จากเซลล์แบคทีเรียมีน้ำหนักสูงมากประมาณ 10^5 - 10^6 และมีระดับความเป็นผลึก (degree of crystallinity) สูง (>50%) มีอุณหภูมิหลอมละลายประมาณ 180 องศาเซลเซียส PHB เป็นพอลิเมอร์ที่มีลักษณะคล้ายผลึกและมีโมเลกุลขนาดใหญ่สะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ ประกอบด้วยหมู่คาร์บอนิล เมทิล และออกซิเจนโดยที่มอนอเมอร์จะต่อกันเป็นสาย PHB ด้วยพันธะเอสเทอร์ จำนวนมอนอเมอร์ที่ประกอบกันเป็นสาย PHB มีประมาณ 23,000-35,000 ซึ่งความยาวของสาย PHB ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ คือวิธีการสกัด PHB ออกจากเซลล์ ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ผลิตระยะเวลาของเพาะเลี้ยงเซลล์ ชนิดของสารอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับรูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ PHB ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่าที่มาจาก commons.wikimedia.org/wiki/File:Polyhydroxybutyrate_structure. [2 June 2019]

2.1.2 การผลิต PHB โดยจุลินทรีย์

การสังเคราะห์ PHB จะเกิดเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีอาหารไม่สมบูรณ์และมีปริมาณคาร์บอนมากเกินไป (Sayyedznd Gangurde, 2009) จุลินทรีย์จะเปลี่ยนสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งกำเนิดคาร์บอนให้เป็นอะซิติลโคเอ หากจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีสารอาหารต่างๆสมบูรณ์ อะซิติลโคเอที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนให้เป็นแหล่งพลังงาน และชีวมวล แต่ถ้าอยู่ในสภาวะที่อาหารไม่สมดุลและมีปริมาณคาร์บอนมากเกินไป อะซิติลโคเอจะถูกเปลี่ยนให้เป็น PHB (Byrom,1987) โดยที่ปัจจัยการผลิต PHB ขึ้นอยู่กับอัตราการเติบโต สารอาหารคาร์บอน และภาวะจำกัดของสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส หรือออกซิเจน (Dawes and Senior,1973) แกรนูลที่สะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในเซลล์แบคทีเรีย แสดงในรูปที่ 2.2

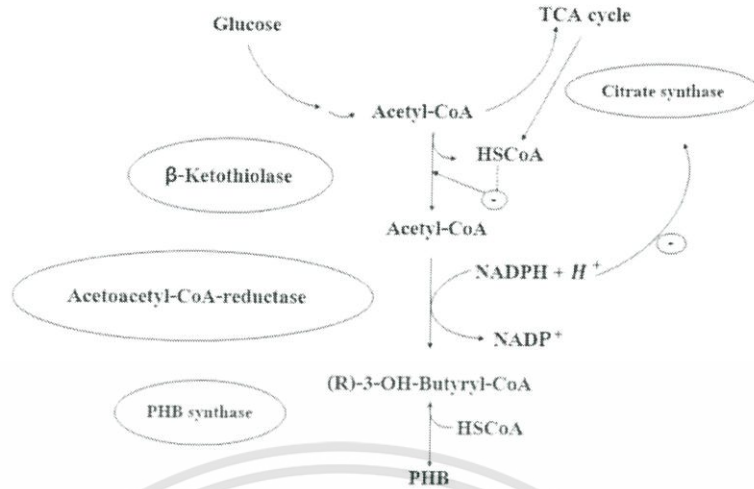


รูปที่ 2.2 แกรนูลที่สะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตภายในเซลล์แบคทีเรีย
ที่มา: [slideshare.net/shanthanukgowda/phb-production-by-bacteria-and-itsapplications](https://www.slideshare.net/shanthanukgowda/phb-production-by-bacteria-and-itsapplications). [2 June 2019]

2.1.3 กระบวนการสังเคราะห์

PHB เป็นสารที่สะสมอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นการสังเคราะห์ PHB ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ จะมีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle, TCA cycle) และมีเอนไซม์เข้ามา เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาทั้งหมด 3 ชนิด คือ เอนไซม์ 3-Ketothiolase จะเร่งให้เกิดการรวมตัวกันของ Acetyl CoA ได้เป็น Acetoacetyl-CoA, เอนไซม์ Acetoacetyl-CoA reductase จะทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ Acetoacetyl-CoA ไปเป็น (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA และเอนไซม์ PHA synthase จะมาเร่งปฏิกิริยา Polymerizes สาร (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA ได้เป็นพอลิเมอร์ PHB ดังรูปที่ 2.3

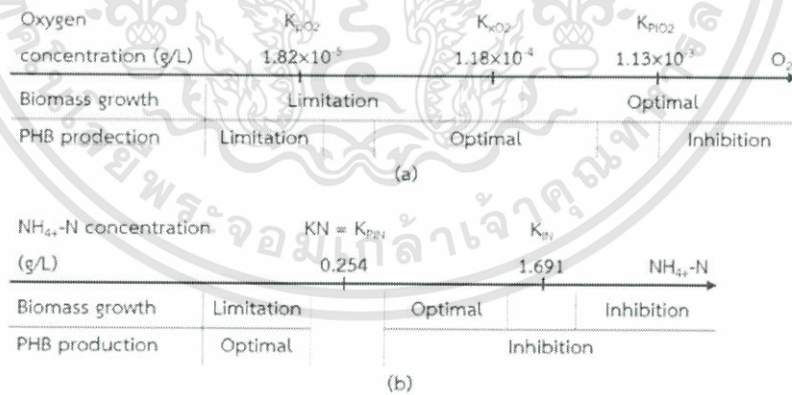
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์ PHB

ที่มา: http://asp.plastics.or.th:8001/files/article_file/20180624234918u.pdf [2 June 2019]

การสังเคราะห์และการสะสมของพอลิเมอร์ PHB ภายในจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นเมื่อเข้าสู่การเจริญในระยะคงที่ของจุลินทรีย์ หรือในอีกกรณีคือ มีการสร้างพอลิเมอร์ PHB ไปพร้อมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ซึ่งอยู่ในสภาวะจำกัดสารอาหาร เช่น ฟอสฟอรัส ออกซิเจน ไนโตรเจน เป็นต้น เพื่อให้เซลล์ของจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์และสะสมพอลิเมอร์ PHB ได้ ในขณะเดียวกัน หากจุลินทรีย์มีสารอาหารที่เพียงพอ เซลล์จะใช้สารอาหารในการเจริญเติบโตทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ PHB ได้ ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 สภาวะที่จำกัดออกซิเจนของ PHB

ที่มา: http://asp.plastics.or.th:8001/files/article_file/20180624234918u.pdf

[2 June 2019]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 คุณสมบัติของPHB

สมบัติของโคพอลิเมอร์ PHB ขึ้นอยู่กับปริมาณ hydroxyvalrrate (HV) ที่เป็นองค์ประกอบ และการเติมสารเสริมสร้างพลาสติกโคพอลิเมอร์ของ PHB ที่มีปริมาณ HV ร้อยละ 5-12 มีอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature หรือ Tm) ในช่วง 173-180 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิทรานสิชันแก้ว(glass transition temperature หรือ Tg) ประมาณ 5 องศาเซลเซียส เนื่องจากหมู่เอทิลซึ่งเป็นสายโซ่ด้านข้างของ HV ทำให้สายพอลิเมอร์มีการเรียงตัวกันอย่างไม่แน่นอน ส่งผลให้จุดหลอมเหลว ความทนต่อแรงดึง (tensile strength) และความแข็งแรงมอดูลัส (modulus strength) มีค่าลดลง ในขณะที่ความสามารถในการยืดหยุ่น (flexibility) ความทนต่อการกระแทก (impact strength) มีค่าเพิ่ม และสามารถทำให้เป็นเส้นหรือแผ่นบางได้ นอกจากนี้โคพอลิเมอร์ของ PHB ยังมีความเสถียรในน้ำ น้ำมัน และแอลกอฮอล์ แต่ไม่ทนหรือทนต่อกรดและด่างได้น้อยและสามารถย่อยสลายได้เร็วกว่า PHB คุณสมบัติทางกายภาพของ PHB จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม และไดคลอโรมีเทน (Cortes *et al.*, 2008) ตกตะกอนด้วยอีเทอร์ จุดหลอมเหลว 160-180 องศาเซลเซียส ไม่ละลายในเอทานอลร้อน เป็นฟิล์มเมื่อระเหยคลอโรฟอร์มออกไม่ละลายในสารละลายมีขี้ เช่น น้ำ เมทานอล การละลายได้ของ PHB ในสารละลายต่างๆและเป็นโฮโมพอลิเมอร์ประกอบด้วยกรดไฮดรอกซีที่มีคาร์บอน 4 อะตอม เป็นโพลิเมอร์ที่มีอะตอมขนาดใหญ่สะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ ประกอบด้วยหมู่คาร์บอนิล ออกซิเจน และหมู่เมทิล (wallen and Rohwedder, 1974) สามารถย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อม มีคุณสมบัติเหมือนเทอร์โมพลาสติก (thermoplastics) (Holmas, 1985) และ PHB จัดเป็นพลาสติกชีวภาพ (Bioplastics) ซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพใกล้เคียงกับ โพลีโพรไพลีน (Polypropylene,PP) ที่เป็นพลาสติกสังเคราะห์ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหรือนำมาหลอมเป็นภาชนะต่างๆ เช่นทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรมต่างๆ (Kaynar and Beyatli, 2009)

2.1.5การใช้ประโยชน์จากพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

จากคุณสมบัติของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่สามารถย่อยสลายได้ง่าย จึงมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆมากมาย เช่น

- 1) ด้านการแพทย์ เช่น ไหมเย็บแผล (sutures) ตัวเย็บแผล (staples) วัสดุปิดแผล (wound dressing) อุปกรณ์ฝังในร่างกาย (surgical implants) อุปกรณ์สำหรับยึดกระดูก (orthopedic fixation devices) และ วัสดุสำหรับนำพาหรือปลดปล่อยตัวยา ซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- 2) ด้านการเกษตร เช่น ภาชนะปลูกพืช วัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช หรือปุ๋ยตามช่วงเวลาที่กำหนด
- 3) ด้านบรรจุภัณฑ์ เช่น บรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ถังพลาสติก กล่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการเรียนการสอน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4) ด้านเส้นใย และแผ่นผ้าแบบ non-woven เช่น ผลิตภัณฑ์อนามัย ผ้าอ้อมสำเร็จรูป เสื้อผ้าและเครื่องนุ่งห่ม เส้นสำหรับบรรจุในเครื่องนอน

2.2 การศึกษาวิธีการสกัดพีเอชบี

PHB เป็นสารที่สะสมอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์ดังนั้นการแยกพอลิเมอร์ของ PHB จึงต้องมีการทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ก่อนซึ่งในกระบวนการสกัดต้องไม่ทำให้คุณสมบัติของพอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงและภายหลังการสกัดต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติของ PHB ที่สกัดได้ก่อนนำไปใช้ต่อไป วิธีการสกัด PHB แบ่งได้ 3 วิธีคือ (จารุวรรณและคณะ, 2555)

2.2.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

การสกัด PHB ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เช่นคลอโรฟอร์ม (Chloroform) เมทิลคลอไรด์ (Methyl chloride) เป็นวิธีที่ทำให้ผลผลิตของพอลิเมอร์ที่สกัดออกมามีมวลโมเลกุลสูง PHB ที่สกัดได้ด้วยวิธีนี้จะมีสีขาวสามารถทำเป็นผลึกได้และมีมวลโมเลกุลสูงแต่วิธีนี้ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพราะต้องใช้สารสกัดในปริมาณมากแต่มีข้อดีคือสกัดได้ง่ายและสามารถควบคุมความบริสุทธิ์ของพอลิเมอร์ให้สูงได้

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพีเอชบี (Zhaolin and Xuenan., 2000)

1. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) โดยใส่คลอโรฟอร์มในเซลล์แบคทีเรีย แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3-4 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่เย็น ระยะเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายทั้งหมด และตกตะกอนด้วยเมทานอลและอบให้แห้ง
2. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) โดยใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ SDS และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น ปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยน้ำกลั่นและอบให้แห้ง
3. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ร่วมกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (NaClO-SDS) ซึ่งมีคุณสมบัติในการกำจัดสารอื่นที่ไม่ใช่ PHB และช่วยละลายไขมันได้ดี

2.2.2 การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochloride extraction)

การสกัดวิธีนี้เป็นวิธีที่ Williamson and Wikinson ใช้ในการแยกพอลิเมอร์ชนิด PHB ในปี 1958 จากเชื้อ *Bacillus cereus* โดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรด์ย่อยสลายผนังเซลล์นาน 30 – 60 นาที จากนั้นนำพอลิเมอร์ที่สกัดได้มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการล้างด้วยไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether) หรือเมทานอล (Methanol) เพื่อกำจัดไขมันออกและยังพบอีกว่าการสกัดในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูง จะทำให้สายพอลิเมอร์ของ PHB ถูกทำลายซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติทางด้านพื้นผิวและโมเลกุลของสายพอลิเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูผู้สอนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า 95% แต่การสกัดด้วยวิธีนี้จะมีโซเดียมไฮโปคลอไรด์หลงเหลืออยู่กับพอลิเมอร์ซึ่งสามารถก่อให้เกิดไม่วางกรรมได้จูงพิษอื่น อีกทั้งยังมีให้ติดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มลพิษกับสิ่งแวดล้อมได้

2.2.3 การสกัดด้วยเอนไซม์ (Enzymatic extraction)

กระบวนการสกัดพอลิเมอร์โดยการย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ว่าเป็นกระบวนการที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมโดยสามารถให้ผลผลิตต่อน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพในปริมาณที่สูงซึ่งมีการใช้เอนไซม์หลายชนิดรวมกันเช่นอัลคาเลส (Alcalase) ฟอสโฟไลเปส (Phospholipase) แลคซิเตส (Lacitase) และไลโซไซม์ (Lysozyme) เป็นต้น

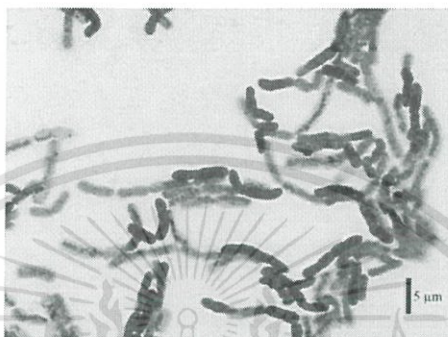
2.3 *Bacillus*

Bacillus คือ แบคทีเรีย (bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive bacteria) อยู่ในวงศ์ *Bacillaceae* ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับ *Clostridium* และ *Desulfotomaculum* *Bacillus* เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า (flagella) ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) แต่บางชนิดเป็น facultative anaerobe *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน (thermoduric bacteria) ที่สร้างเอนโดสปอร์ (spore forming bacteria) สปอร์แบคทีเรีย (bacterial spore) ของ *Bacillus* จะทนต่อความร้อน ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ดี *Bacillus* เป็น protolytic bacteria มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารให้เป็นกรดแอมิโน เป็นจุลินทรีย์สาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilage) และทำให้อาหารที่เน่าเสียเกิดกลิ่นเหม็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) อุณหภูมิที่เจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 30-45 องศาเซลเซียส แต่บางสายพันธุ์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) ซึ่งเป็นสาเหตุการเสื่อมเสียของอาหารกระป๋อง (canned food spoilage) และยังพบบางสายพันธุ์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria) เจริญได้ในค่า pH ช่วงกว้าง ตั้งแต่ 2 ถึง 11 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ จากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าในสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญ *Bacillus* หลายสายพันธุ์ มีระยะเวลาการแบ่งตัว (generation time) ประมาณ 25 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 แบคทีเรีย *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium มีรูปร่างเป็นท่อน (Rod) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแอโรบิกที่สร้างสปอร์ พบในแหล่งที่อยู่อาศัยที่มีความหลากหลายมีความยาวของเซลล์ถึง 4 ไมโครเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ไมโครเมตร เติบโตที่อุณหภูมิตั้งแต่ 3 - 45 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิจะอยู่ที่ประมาณ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2.5 *Bacillus megaterium* ที่ย้อมด้วย Sudan Black B และ Safranin
ที่มา: Bary, 1884 [3 June 2019]

2.4 Propylene Carbonate



รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างโพรพิลีนคาร์บอเนต

ที่มา: merckmillipore.com/TH/en/product/Propylene-carbonate [3 June 2019]

โพรพิลีนคาร์บอเนตคือ Cyclic propylene carbonate, Propylene Glycol Cyclic Carbonate สูตรโมเลกุล $C_4H_6O_3$ เป็นของเหลวที่ไม่มีสีเป็นตัวทำละลายมีขั้ว มีจุดเดือดและจุดวาบไฟสูง ความเป็นพิษต่ำ มีกลิ่นคล้ายอีเทอร์และไม่รุนแรง สามารถใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับการชะละลายคาร์บอเนตในปิโตรเลียมก๊าซในบ่อน้ำมันและก๊าซปิโตรเลียมไพโรไลซิสรวมทั้งก๊าซพีดีในการสังเคราะห์ นอกจากนี้ยังใช้ในกาวและเครื่องสำอางค์และสามารถใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับพอลิเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทางเคมีฟิสิกส์ของ Propylene Carbonate

จุดเดือด	243°C (1013 hPa)
ความหนาแน่น	1.20 g/cm ³ (20°C)
จุดวาบไฟ	123°C
อุณหภูมิสูงสุด	435°C DIN 51794
จุดหลอมเหลว	-49°C
ค่า pH	7.0 (200 g/L, H ₂ O, 20°C)
ความดัน	0.04 hPa(20°C)
ความหนืด	1.4 mm ² /s (43.°C)
การละลาย	240 g/l

ที่มา: merckmillipore.com/TH/en/product/Propylene-carbonat [2019 June 3]

2.4.1 การประยุกต์ใช้ Propylene Carbonate

- 1) อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ โพรพิลีนคาร์บอเนตสามารถใช้เป็นอิเล็กทรอนิกส์ที่ตีในเซลล์และคอนเดนเซอร์พลังงานสูง
- 2) อุตสาหกรรมโมเลกุลขนาดใหญ่ โพรพิลีนคาร์บอเนตสามารถใช้เป็นตัวทำละลายและ plasticizer สำหรับโพลิเมอร์
- 3) อุตสาหกรรมเคมี โพรพิลีนคาร์บอเนตสามารถใช้เป็นวัสดุหลักในการผสม Dimethyl Carbonate และใช้กันอย่างแพร่หลายในการกำจัด CO₂ และ H₂S จากก๊าซธรรมชาติก๊าซปิโตรเลียม
- 4) สาขาอื่น ๆ โพรพิลีนคาร์บอเนตสามารถใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและการพิมพ์และย้อมสี

2.4.2 การจัดเก็บและขนส่ง

โพรพิลีนคาร์บอเนตเป็นสารที่ติดไฟได้ หากสัมผัสกับการออกซิไดซ์จะเผาผลาญ ควรเก็บไว้ในคลังสินค้าพิเศษที่เย็นและมีลมแรงห่างไกลจากไฟและขนส่งเป็นสารเคมีที่ติดไฟได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hahn *et al.* (1994) รายงานว่าพีเอชบีที่สะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์สามารถสกัดออกมาได้โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite, NaOCl) ที่มีต่างผสมอยู่ ซึ่งจะช่วยกำจัดสารเปปติโดไกลแคนและสารอื่นที่ไม่ใช่ PHB ได้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลและความบริสุทธิ์ของ PHB เมื่อฟรียูทด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์

ฟรียูทเมนต์	น้ำหนักโมเลกุล(MW)	ความบริสุทธิ์(%Purity)
ไม่ได้ฟรียูทด้วยไฮโปคลอไรท์	1,200,000	50
ฟรียูทเฉพาะสารลดแรงตึงผิวอย่างเดียว		
-SDS(1%)	810,000	87
-Triton X-100 (1%)	800,000	87
ฟรียูทสารลดแรงตึงผิวตามด้วยไฮโปคลอไรท์		
-SDS(1%)	730,000	97
-Triton X-100(1%)	790,000	98
ฟรียูทเฉพาะไฮโปคลอไรท์ระยะเวลา 1นาท	680,000	87

ที่มา: Ramsay *et al.*(1990) อ้างโดย Kanokphorn (2007)

การหาค่าที่เหมาะสมเพื่อให้ได้การนำกลับมาใช้ใหม่ของจุลินทรีย์ poly(3-hydroxyalkanoate) จากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* กระบวนการนี้เกี่ยวข้องกับการใช้การกระจายตัวของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และคลอโรฟอร์ม การกระจายตัวทำให้เราสามารถใช้ประโยชน์จากการย่อยที่ต่างกันโดยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และการสกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม เปอร์เซ็นต์ recovery พีเอชบีจากผงเซลล์ถูกขยายให้ใหญ่ที่สุดโดยให้ความเข้มข้นโซเดียม ไฮโปคลอไรท์ 30% เป็นเวลา 90 นาที อัตราส่วนของคลอโรฟอร์มเป็น 1:1 (v/v) ภายใต้ข้อกำหนดนั้นคือการ recovery ได้ 91% และความบริสุทธิ์ของการ recovery พีเอชบีสูงกว่า 97% น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (Mn) ของการ recovery พีเอชบีอยู่ที่ประมาณ 300,000 และน้ำหนักมวลโมเลกุล(Mw)เฉลี่ยอยู่ที่ 1,020,000 เมื่อเทียบกับ Mn และ Mw เดิม คือ 530,000 และ 1,272,000 ตามลำดับ ค่าที่ลดลงของ Mn และ Mw อาจมาจากการใช้คลอโรฟอร์มและการที่ผลของค่า Mw ลดลงค่อนข้างน้อยอาจเป็นผลมาจากโซลของพีเอชบีที่สั้น ซึ่งอาจจะละลายน้ำได้ ค่าความเป็นผลึกพีเอชบีที่ recovery อยู่ในช่วง 60-65% แม้ว่าพบค่าความเป็นผลึกสูงขึ้นเมื่อทำให้เกิดการกระจายตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fiorese *et al.* (2009) ได้ศึกษาการสกัดพีเอชบีจาก *Cupriavidus necator* โดยสกัดด้วย สารละลาย 1,2-propylene carbonate พบว่า อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดคือ อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที และระยะเวลาในการตกตะกอนที่เวลา 48 ชั่วโมง และพบว่าการพรีทรีทเซลล์โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ร่วมกับการใช้ความร้อนก่อนการสกัด มีผลทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการสกัดพีเอชบีได้ดี ได้ผลผลิตของการสกัดเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ และได้ PHB ที่มีความบริสุทธิ์ถึง 84 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสภาวะดังกล่าวได้ PHB ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 7.4×10^5 และได้ PHB ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 2.2×10^5 ถ้าใช้อุณหภูมิในการสกัดที่ 145 องศาเซลเซียส จะได้ผลผลิตของการสกัดเพียง 45-54 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง 1,2-propylene carbonate มีประสิทธิภาพช่วยในการสกัด PHB ได้ดี นอกจากนี้ การปรับพีเอชร่วมกับการใช้ความร้อนในการสกัด PHB มีผลช่วยปรับปรุงการสกัด PHB ให้ดียิ่งขึ้น

ธารา และสรินญา. (2553) รายงานว่า ของการปรับสภาพตัวทำละลาย: เซลล์แห้ง (0.40 กรัม) ถูกแช่ในเมทานอล 10 มิลลิลิตร เอทานอลไอโซโพรพานอลหรือน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องสำหรับหนึ่ง ชั่วโมง หลังจากหมุนเหวี่ยง 15 นาทีที่ 6,500 รอบต่อนาที การตกตะกอนถูกถ่ายโอนไปยังหลอด กระจกทรงกรวยที่ทำจากเส้นใยเซลลูโลสและสอดเข้าไปในเครื่องสกัดของ Soxhlet คลอโรฟอร์ม 150 มิลลิลิตร ใช้เป็นตัวทำละลายสกัดหลังจากการสกัด 5 ชั่วโมง ตัวทำละลายจะระเหยไปภายใต้ สูญญากาศเพื่อให้ได้ประมาณ 1 มิลลิลิตรของสารตกค้าง จากนั้น 2 มิลลิลิตรของเมทานอลเย็นถูกเพิ่ม เข้าไปอีกครั้งในการตกตะกอน PHA และได้รับของแข็งสีขาวหมองคล้ำกรองแห้งซึ่งน้ำหนักและอยู่ ภายใต้การวิเคราะห์เพิ่มเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อแบคทีเรีย

ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 จาก ดร. ศิริขวัญ พลประทีป ห้องปฏิบัติการสังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ทำการถ่ายเชื้อเก็บในอาหาร Nutrient Agar (NA) ที่อุณหภูมิห้อง

3.1.2 สารเคมี

- 1) อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Nutrient broth บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. ประเทศอินเดีย
- 2) อะการ์ (Agar) เกรด Bacteriological บริษัท TITAN BIOTECH LTD. ประเทศอินเดีย
- 3) PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X
- 4) โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 12.5% (NaOCl)
- 5) เอทิลแอลกอฮอล์ 95% (C₂H₅OH) เกรด commercial บริษัท CARLO ERBA ประเทศฝรั่งเศส
- 7) อะซิโตน (CH₃COCH₃)
- 8) โพฟอสฟอรัสไตรบอเนต (C₄H₆O₃)
- 9) ซิลิโคน ออยล์

3.1.3 อุปกรณ์

- 1) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer) รุ่น UH5300 บริษัท Hitachi High-Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2) หม้อนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave) รุ่น GIT Series บริษัท Zealway Instrument Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3) ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet) รุ่น JSCB-1200SB บริษัท JS Research Inc ประเทศเกาหลี
- 4) ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaking Incubator) รุ่น JSSI-100 บริษัท JS Research Ins ประเทศเกาหลี
- 5) เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
สหรัฐอเมริกา

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 อุปกรณ์(ต่อ)

- 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 1000 ไมโครลิตร
- 11) ทิป (Tip) ขนาด 1000 ไมโครลิตร
- 12) หลอดเซนตริฟิวก์พลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร
- 13) หลอดไมโครเซนตริฟิวก์พลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 14) ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร
- 15) บีกเกอร์ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร
- 16) กระบอกตวงขนาด 10 และ 25 มิลลิลิตร
- 17) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 18) ห่วงเขี่ยเชื้อ
- 19) ช้อนตักสาร
- 20) คิวเวตต์
- 21) แท่งคนสาร
- 22) ถาดสแตนเลส
- 23) เทอร์โมมิเตอร์ 200 องศาเซลเซียส
- 24) แท่งแม่เหล็กกวนสาร
- 25) เครื่องกวนสารพร้อมให้ความร้อน (Hotplate Stirrer)
- 26) ชุดกรองสูญญากาศ
- 27) กระจกทรง
- 28) ชุดรีฟลักซ์
- 29) ปากคีบ (Forceps)

3.2 เตรียม starter

ทำการเชื้อโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งมา 1-2 โคโลนีใส่ลงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทั้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้น

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียเพื่อใช้ในการสกัดพีเอชบี

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จาก Starter มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD600) โดยใช้อาหารเหลว (Nutrient broth หรือ NB) เป็น Blank นำไปเจือจางเชื้อให้ได้ค่า OD600 ที่ 0.5 ปิเปตเชื้อที่เจือจางปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนภาตอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่อาหารแข็ง (Nutrient agar หรือ NA) 50 มิลลิลิตร จากนั้นตากภาตอาหาร 30 นาทีจนหน้าอาหารแห้งก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากบ่มเชื้อครบเวลาที่กำหนดแล้วนำไปขูดด้วยไม้พายใส่หลอดเซนติฟิวก์พลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตรที่มี 1X PBS 5 มิลลิลิตรและเขย่าให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีและเทส่วนใส่ออกทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกรอบที่ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีและเทส่วนใส่ออกและนำมาซึ่งแบ่งใส่หลอดเซนติฟิวก์พลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร หลอดละ 2 กรัม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4 การสกัดพีเอชบี และการหาน้ำหนักพีเอชบี

3.4.1 สกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์แบบวิธีดั้งเดิม (วิสันต์, 2561)

นำเซลล์แบคทีเรีย 2 กรัม ที่ได้จาก 3.3 มาเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เซลล์แตก และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10-15 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบเท่าเดิม และเทส่วนใส่ออกเติมอะซิโตน 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10-15 นาทีและเทส่วนใส่ออกเติมเอทานอล 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10-15 นาทีและเทส่วนใส่ออก นำหลอดไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่

3.4.2 สกัดด้วยโพรพิลินคาร์บอนเนตที่ผ่านการปรับสภาพเซลล์ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์

นำเซลล์แบคทีเรีย 2 กรัม ที่ได้จาก 3.3 มาปรับสภาพเซลล์ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่มีความเข้มข้น 1%, 4%, 8% และ 12.5% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เซลล์แตก และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10-15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิมและเทส่วนใส่ออก ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นเช่นเดิมซ้ำอีก 1 รอบ และเทส่วนใส่ออกเติมโพรพิลินคาร์บอนเนต 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อน 120 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำมันผ่านชุดรีฟลักซ์ ขณะให้ความร้อนต้องปั่นกวนตลอด เป็นเวลา 90 นาทีเมื่อครบเวลาจึงนำไปกรองด้วยชุดกรองแบบสุญญากาศเพื่อแยกเศษเซลล์นำสารละลายที่กรองได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อน

เอกสารนี้ นำมาตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็น 20 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิมและเทส่วนใส่ออก นำมาตากแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักเอกสารที่ได้ออกมา เปรียบเทียบกับน้ำหนักของเอกสารที่ได้ออกมาจากการสกัดด้วยวิธีดั้งเดิม

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นเช่นเดิมซ้ำอีก 1 รอบ และเทส่วนใสที่จางนั้นนำหลอดไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนเซลล์แห้งและน้ำหนักคงที่

3.4.3 สกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอเนต

นำเซลล์ 2 กรัม มาเติมโพรพิลีนคาร์บอเนต 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อน 120 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำมันผ่านชุดรีฟลักซ์ ขณะให้ความร้อนต้องปั่นกวนตลอดเป็นเวลา 90 นาทีเมื่อครบเวลาจึงนำไปกรองด้วยชุดกรองแบบสูญญากาศเพื่อแยกเศษเซลล์นำสารละลายที่กรองได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำมาตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็น 20 มิลลิลิตรนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิมและเทส่วนใสที่จาง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นเช่นเดิมซ้ำอีก 1 รอบ และเทส่วนใสที่จางนั้นนำหลอดไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนเซลล์แห้งและน้ำหนักคงที่

3.4.4 การหาน้ำหนักพีเอซีบี

หลังจากนำหลอดที่ได้จากการสกัดไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสข้ามคืนนำมาชั่งน้ำหนักและหาน้ำหนัก PHB (กรัม)

3.5 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ชุดเชื้อใส่ในหลอดเซนต์ปีฟว์พลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตรที่มี 1XPBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เมื่อชุดเสร็จให้เขย่าให้เข้ากันจากนั้นนำหลอดปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10-15 นาทีแล้วเทส่วนใสออกล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 15 มิลลิลิตรและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10-15 นาทีอีกครั้งและนำมาชั่งแบ่งใส่หลอดเซนต์ปีฟว์พลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร หลอดละ 2 กรัม (Cell Wet Weight) ตามน้ำหนักเซลล์ที่นำไปสกัดจากนั้นนำหลอดไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนเซลล์แห้งและน้ำหนักคงที่จากนั้นนำเซลล์แห้งไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)

3.6 การวิเคราะห์โครงสร้างของพีเอซีบี

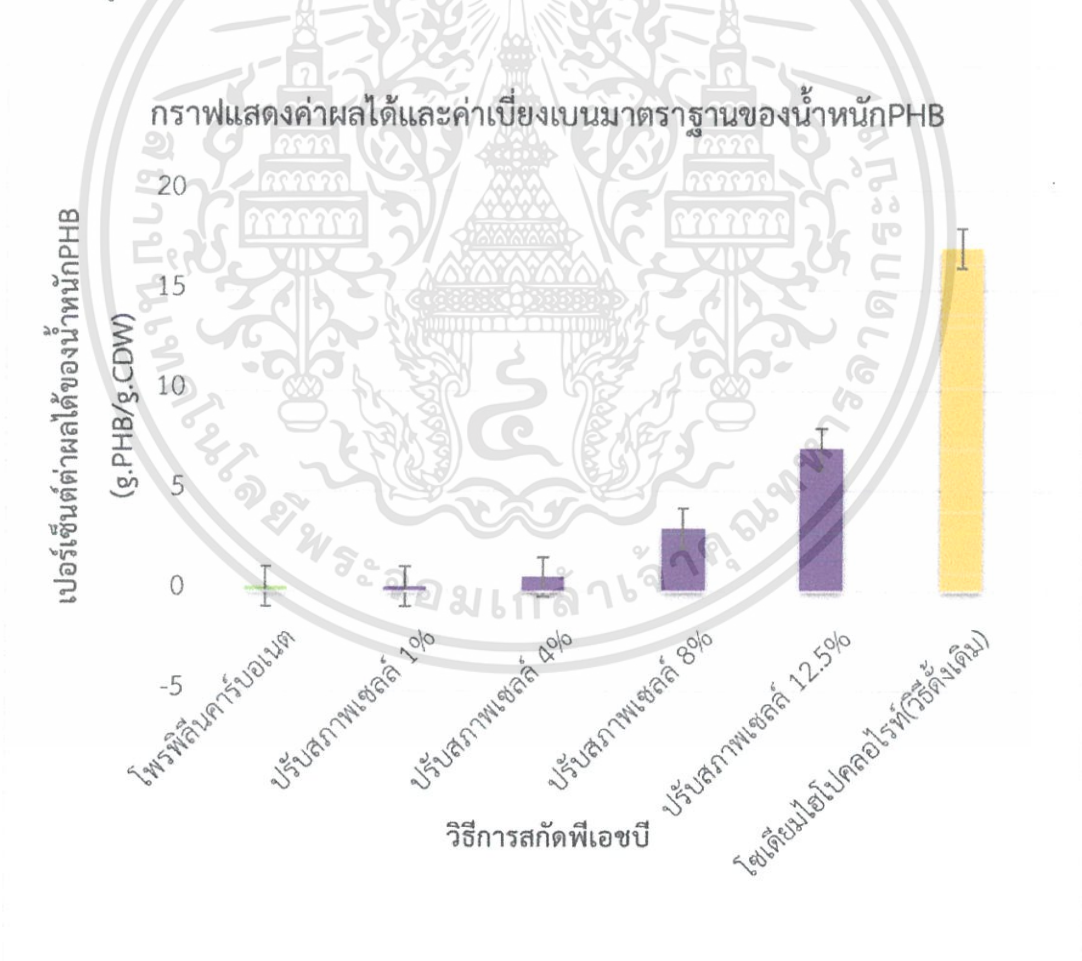
วิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR spectrometer รุ่น IRTracer-100 AH (EN230V) ของบริษัท Shimadzu โดยใช้เป็นการยืนยันเกี่ยวกับโครงสร้างของ PHB หลังจากการสกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอเนต โดยเปรียบเทียบกับ PHB ทางการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาผลการสกัดพีเอชบีด้วยโพรพิลีนคาร์บอเนต

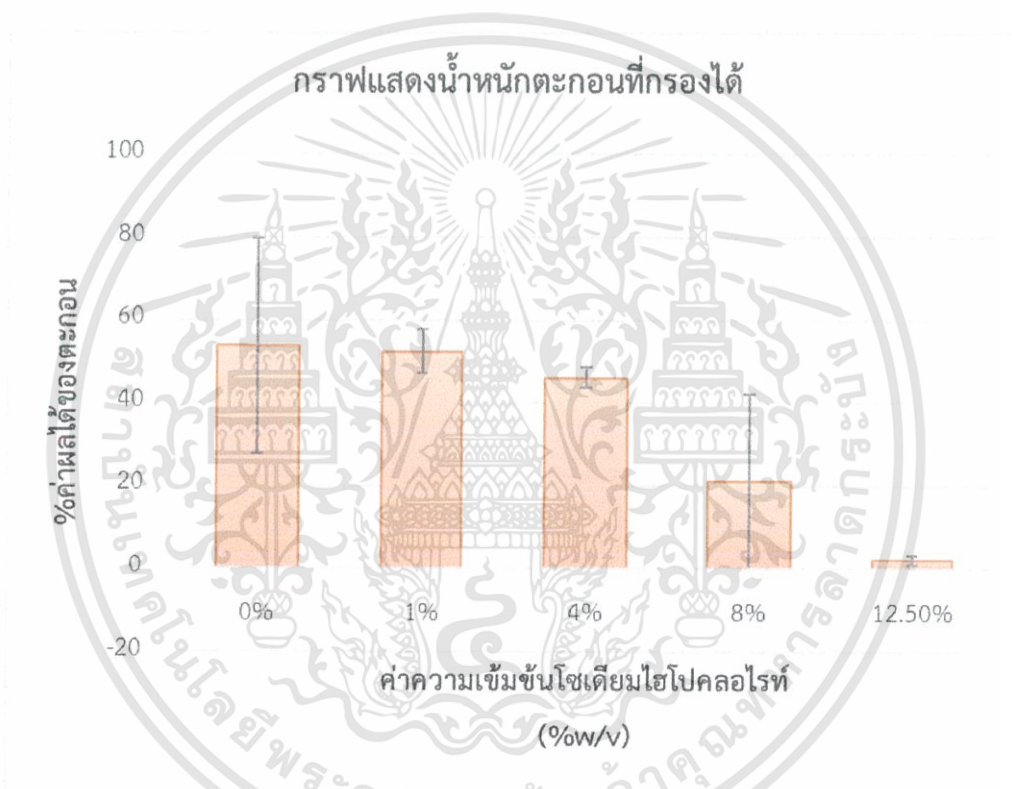
ผลการสกัดพีเอชบีด้วยโพรพิลีนคาร์บอเนตให้ร้อยละของพีเอชบีที่สกัดได้เทียบกับ CWD ได้เท่ากับกับ 0.2% และผลการสกัดพีเอชบีด้วยโพรพิลีนคาร์บอเนตโดยการปรับสภาพเซลล์ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันเพื่อทำให้เซลล์แตกตัวก่อนที่จะนำไปสกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอเนต ได้แก่ ความเข้มข้นที่ 1%, 4%, 8% และ 12.5% ได้เท่ากับ 0.3%, 0.7%, 3.1% และ 7.1% ของน้ำหนักพีเอชบีที่สกัดได้ ตามลำดับ และผลของการสกัดพีเอชบีด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์แบบวิธีดั้งเดิม (วิสันต์, 2561) ให้ร้อยละของพีเอชบีที่สกัดได้เทียบกับ CDW เท่ากับ 17.2% (แสดงดังรูป 4.1)



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงร้อยละของ PHB และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักพีเอชบีที่สกัดได้จากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า เชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU01 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาน้ำหนักของตะกอนที่กรองได้จากการสกัดพีเอชบี

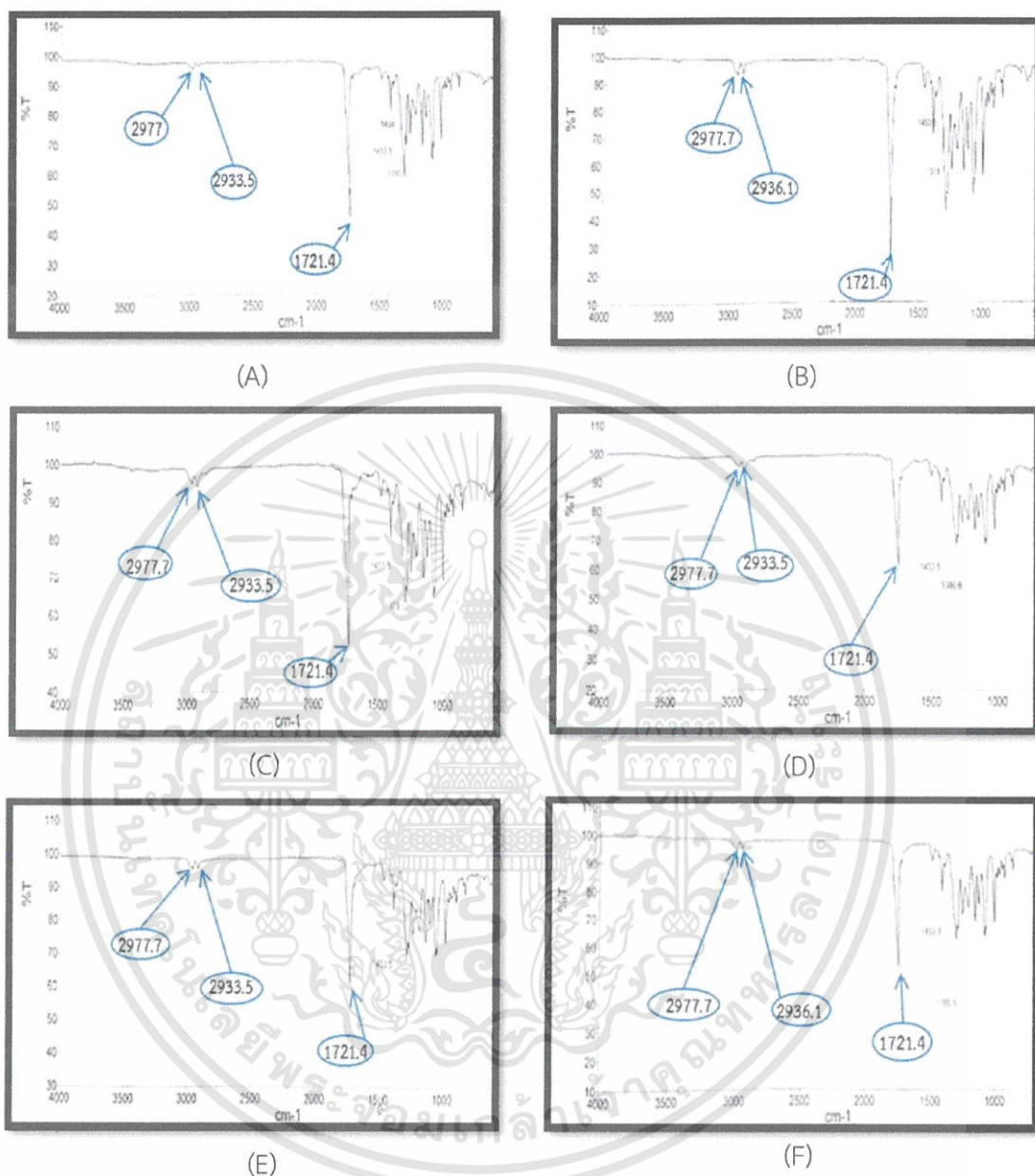
ผลการกรองเศษเซลล์หลังจากสกัดพีเอชบีด้วยโพรพิลีนคาร์บอนेटให้ผลเท่ากับ 53.7249% และผลการกรองเศษเซลล์หลังจากสกัดพีเอชบีด้วยโพรพิลีนคาร์บอนेटโดยการปรับสภาพเซลล์ด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันได้แก่ ความเข้มข้นที่ 1%, 4%, 8% และ 12.5% เพื่อให้เซลล์แตกตัวก่อนที่จะนำไปสกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอนेट ได้เท่ากับ 52.5%, 46.2%, 21.1% และ 8.8% ของน้ำหนักตะกอนที่กรองได้ตามลำดับ (แสดงดังรูป 4.2)



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงค่าของตะกอนที่กรองได้หลังจากการสกัดพีเอชบีด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU01 โดยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ และสกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอนेट

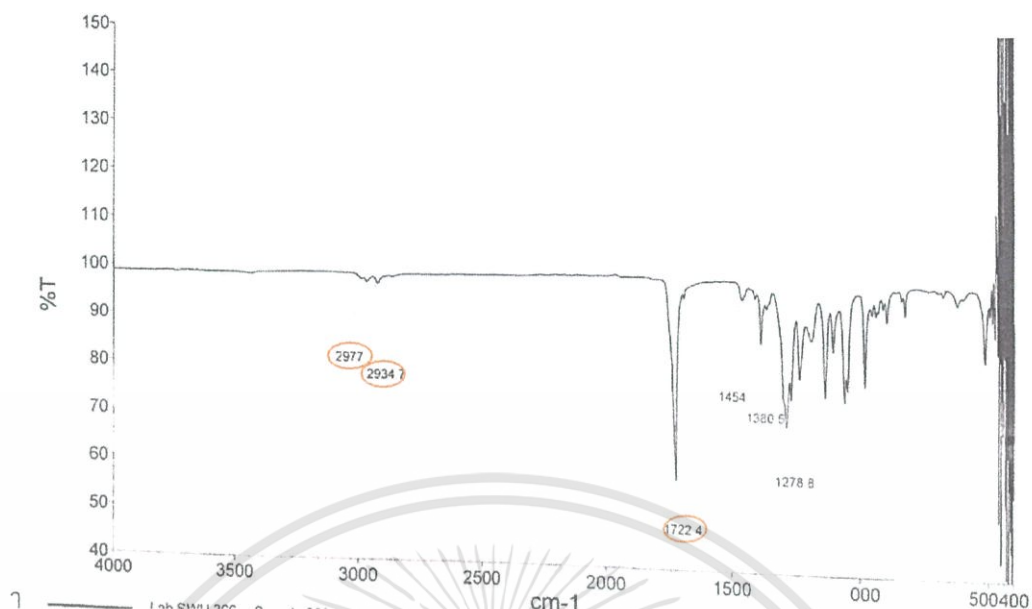
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของพีเอชบีโดยใช้เทคนิค FT-IR



รูปที่ 4.3 สเปกตรัมของพีเอชบีที่สกัดได้จากเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU01 โดยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์และโพแทสเซียมคาร์บอเนต เมื่อ (A) สกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ดั้งเดิม) , (B) สกัดโพแทสเซียมคาร์บอเนต และ (C, D, E, F) ฟัรฟัรฟัรด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1%, 4%, 8% และ 12.5% ตามลำดับ ก่อนนำไปสกัดด้วยโพแทสเซียมคาร์บอเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 สเปกตรัมของพีเอชบีทางการค้า

จากสเปกตรัมพีเอชบีทางการค้าที่ถูกวิเคราะห์โดยเครื่อง FT-IR พบพีคที่มีเลขคลื่นอยู่ที่ $3,000-2,840\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชัน C-H stretching และ O-H stretching นอกจากนี้ยังพบพีคหลักของพีเอชบี ที่มีหมู่ฟังก์ชัน C=O stretching ที่เลขคลื่น $1,722.4\text{ cm}^{-1}$ จากรูปที่ 4.4 มีการพบพีคที่อยู่ในช่วง $3,000-2,840\text{ cm}^{-1}$ และพีคหลักของพีเอชบีในช่วง $1,725-1,705\text{ cm}^{-1}$ เช่นเดียวกับสเปกตรัมของพีเอชบีทางการค้า นั่นคือการพบฟังก์ชันที่บ่งบอกว่า เป็นพีเอชบี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของเศษเซลล์ โดยใช้เทคนิค FT-IR



รูปที่ 4.5 สเปกตรัมของเศษเซลล์ที่ได้หลังจากการสกัดพีเอชบีด้วยโพรพิลีนคาร์บอนเนต เมื่อ (A) สกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอนเนต, (B, C, D, E) ฟรีทด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1%, 4%, 8% และ 12.5% ตามลำดับ ก่อนนำไปสกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอนเนต

สเปกตรัมของเศษเซลล์ที่ได้หลังจากผ่านการสกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอนเนตจากรูปที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าไม่พบพีคในช่วง $1,725-1,705\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นพีคเอกลักษณ์ของพีเอชบี แสดงให้เห็นว่าไม่มีพีเอชบีหลงเหลืออยู่ในเซลล์หรือหลงเหลืออยู่น้อยมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผล สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 วิจารณ์ผลการวิจัย

สาเหตุที่ทำให้พีเอชบีที่เราสกัดได้ ได้ปริมาณที่น้อย อาจเกิดมาจาก เชื้อแบคทีเรียของเรามา การสะสมหรือผลิตพีเอชบีได้น้อย ซึ่งสาเหตุเหล่านี้ อาจเกิดมาจากขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อที่เราละเลย เราแค่คำนึงถึงปริมาณเชื้อที่ต้องการเท่านั้น เราทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิด NA (Nutrient Ager) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทราบส่วนประกอบที่แน่นอน งานวิจัยหลายๆงานได้ทำการตรวจเชื้อหาปริมาณพีเอชบีก่อนนำมาสกัดรวมถึงศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพีเอชบีของเชื้อ เช่น งานวิจัยของ Dawes และ Senior (1973) พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพีเอชบีขึ้นกับ อัตราการเติบโต สารอาหารคาร์บอน และภาวะจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส และ ออกซิเจน งานวิจัยของคุณดุขุณี มูลคา และคณะ (2017) ได้ศึกษาการคัดเลือกและศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จากบาร์ซิลลัส พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nitrogen deficient ที่มีน้ำตาลซูโคสความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทรูปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.30 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร pH 7.0 ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีการสะสมของพีเอชบีเพิ่มขึ้น จากร้อยละ 34.31 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เพิ่มเป็น 50.86 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้ยังมีการหาวิธีการสกัดพีเอชบีจากแบคทีเรียที่เหมาะสม อย่างเช่นงานวิจัยของ Hahn *et al.* (1994) มีรายงานว่า ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เหมาะสมในการสกัดพีเอชบีคือ 30% v/v เมื่อใช้ระยะเวลาในการสกัด 90 นาที ได้ปริมาณพีเอชบี 91% ได้ค่าความบริสุทธิ์ 97% เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มีความเข้มข้น 15%, 20%, 25% และ 35% v/v หากเทียบกับงานวิจัยนี้ซึ่งใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นเพียง 12.5% อาจจะเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ได้ปริมาณของพีเอชบีน้อย

5.2 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการสกัดพีเอชบีด้วยโพรพิลีนคาร์บอนเนต โดยการปรับสภาพเซลล์ด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันเพื่อทำให้เซลล์ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 แตกตัวก่อนที่จะนำไปสกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอนเนตพบว่า การปรับสภาพเซลล์ด้วยความเข้มข้นโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เหมาะสมหรือได้ค่าผลได้ของน้ำหนักพีเอชบีมากที่สุดคือ การปรับสภาพเซลล์ด้วยความเข้มข้นโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 12.5% ได้ค่าผลได้เท่ากับ 7.0905% และผลการสกัดพีเอชบีด้วยโพรพิลีนคาร์บอนเนตที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ให้ค่าผลได้เท่ากับ 0.2000%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสเปกตรัมพีเอชบีทางการค้า ที่ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR พบพีคที่มีเลขคลื่นอยู่ที่ $3,000-2,840\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชัน C-H stretching และ O-H stretching นอกจากนี้ยังพบพีคหลักของพีเอชบี ที่มีหมู่ฟังก์ชัน C=O stretching ที่เลขคลื่น $1,722.4\text{ cm}^{-1}$ และจากการนำพีเอชบีที่สกัดได้จากเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR มีการพบพีคที่อยู่ในช่วง $3,000-2,840\text{ cm}^{-1}$ และพีคหลักของพีเอชบีในช่วง $1,725-1,705\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งตรงกับสเปกตรัมของพีเอชบีทางการค้า

5.3 ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษาในครั้งถัดไป ควรหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมกับการใช้โพรพิลีนคาร์บอนเนต ควบคุมนำโพรพิลีนคาร์บอนเนตที่ผ่านการสกัดพีเอชบีแล้วมาผ่านกระบวนการ recovery เพื่อนำกลับมาใช้อีกครั้งควรปรับอุณหภูมิ พีเอช และเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนให้แก่อาหารเพื่อให้เชื้อเจริญได้ดีขึ้น และควรนำพีเอชบีที่สกัดได้ไปตรวจสอบหาเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกียรติคุณ, นิตยา รัตน์ปนนธ์และพิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2010. Bacillus/บาซิลลัส. [Online].
เข้าถึงจาก: <http://foodnetwork.com/>(สืบค้นเมื่อวันที่ 1 มิถุนายน 2562)

ดุขฎี มูลคา และคณะ. 2017. “การคัดแยกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต” .หน้า 288-298. ใน วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 22 (ฉบับพิเศษ) การประชุมวิทยาระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9”.

ธารา พานงาม และ สริณญาชวพันธ์. 2010. การศึกษากระบวนการสกัดและหาคุณสมบัติเฉพาะของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตจากเชื้อ *Alcaligenes latus* study of extraction process and characterization of poly-3-hydroxyalkanoate produced from *Alcaligenes latus*. KKU Res J15(9):809-817.

วิสันต์ เชื้อวงศ์. 2561. “การคัดแยกและการระบุชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีจากกากตะกอนโรงงานท่อน้ำกรองและการเพิ่มการผลิตพีเอชบีโดยใช้ของเสียชีวภาพ.” ปริญญาวิทยามหาบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สถาบันพลาสติก. 2558. พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต. [Online]. เข้าถึงจาก:<http://asp.plastics.or.th>. (สืบค้นเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2562)

สมคิด ดิจจริง และ อรุณี คงดี. 2555. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรตจากของเหลือทิ้ง เพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพ. เชียงใหม่: หอสมุดมหาวิทยาลัยแม่โจ้. 12-26.

Bary. 1884. *Bacillus megaterium*. [Online]. เข้าถึงจาก: <http://gbif.org/species/5428097>. (สืบค้นเมื่อ วันที่ 2 มิถุนายน 2562)

Beyatli.Y. and P. Kaynar. 2009. Determination of poly- β -hydroxybutyrate production by *Bacillus spp.* Isolated from the intestines of various. Fish Sci 75: 493-443.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Byrom. D. 19987. Polymer Synthesis by Microoeganisms.Technology and Economics. TIBTECH 5: 246-250.

ChistopherW.J.McChalicher and FriedichSrienc. 2009. Solubillty and Degradation of Polyhydroxyalkanoate Biopolymers in Propylene Carbonate. AlchEJuornal 56(6):1617-1625.

Cortes, A.L. , A.L. Landazuri , J.Q. Garcia and J.Q. Maldonado. 2008. Scrcening and Isolation of PHB-producing bacteria in polluted marine microbial mat. Microbial Ecology. 56: 112-120.

Daws A. Edwin and Senior J. Peter. 1973. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. Biochem J. 134(1): 225-238.

Fiorese,M.L, F.Freitas, J.Pais, A.Maria. 2009. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. Engineer.LiftSci.9(6):454-461.

Hahn, S.K., Y.K. Chang, B.S. Kim and H.N.Chang. 1994. Communication to the Editor Optimization of Microbial Poly(3-hydroxybutyrate) Recovery Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform. Biotechnology and Bioengineering 44:256-261.

Knokphorn. S. 2007. Production and characterization of poly- β -hydroxybutyrate(PHB) from *Phodubacter sphaeroides*.Thsis for degree of doctor.Songklana Karin University: Songkla.

Meack. 2019. Propylenecarbonate. [Online]. เข้าถึงจาก: <http://merckmilipore.com/propylene carbonate>. (สืบค้นเมื่อวันที่ 3 มิถุนายน 2562)

Sayyed, R.Z. , N.S. Gangured and S.D. Chincholkar. 2009. Hypochlorite digestion

method for efficient recovery of PHB from *Alcoligenes faecalis*. Indian J,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนด้านการค้า Microbiol. 49: 230-232

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Shanthanu and K.Cowda. 2015. PHB production by Bacteria and its application. [Online]. เข้าถึงจาก :<http://sldeshare.net/shanthanukguwda/phbproductionbybacteriaanditsapplication>. (สืบค้นเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2562)
- Wallen , L.L. and W.K. Rohwedde. 1974. Poly- β -hydroxyalkanoate from Activated Sludge. *Environ. Sci. Technol.* 8: 576-579.
- Wikimedia commons. 2017. Polyhydroxybutyrate structure. [Online]. เข้าถึงจาก:http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polyhydroxybutyrate_structure.svg. (สืบค้นเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2562)
- Williamson and Wikinson. 1958. การแยกพอลิเมอร์ชนิด PHB จากเชื้อ *Bacillus cereus* โดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์. [Online]. เข้าถึงจาก:<http://doi.nrct.go.th/index.php?/ListDoi/Download/308011/8c1797a844ffa2f66236086eead9c122>. (สืบค้นเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2562)
- Zhaolin and Xuenan. 2000. A new method of recovingpolyhydroxyalkanoate from *Azotobacer chrococum*. *Chines Sci. Bulletin.* 45(3) : 252-256.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี และกราฟผลการทดลอง

1. การเตรียม Nutrient Agar

การเตรียมอาหาร NA 1ลิตร

ใช้อาหาร Nutrient broth 13 กรัม และ Agar 15 กรัม ปรับปริมาตรโดยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องหม้อนึ่งอัดไอ(Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ก่อนนำไปเทลงเพลท ซึ่งขั้นตอนการเทลงเพลทจะต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

ส่วนประกอบของ Nutrient Agar

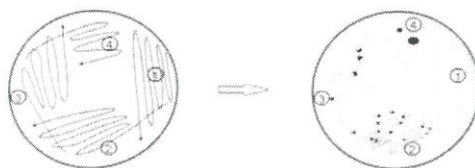
- Peptone	5.0	g
- Beef extract	3.0	g
- Agar	15.0	g

2. PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X

เตรียมโดยการเจือจางจาก PBS 10X เจือจางให้เป็น PBS 1X นั่นคือการใช้ PBS 10X 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร

3. การ streak plate โดยเทคนิค Streak-Plate Technique

เผาไฟห่วงเช็ยเชื้อให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อและรอให้เย็นลง และใช้ห่วงเช็ยเชื้อแตะเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 นำไปลากหรือขีด (streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (Nutrient agar, NA) อยู่ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น หลังจากเสร็จในระนาบแรก ซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุดให้นำห่วงเช็ยเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดให้หมด จากนั้นจึงขีดเชื้อจากส่วนของรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้งแล้วลากเป็นระนาบที่สอง 4-5 เส้นติดกันโดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สองจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณสี่ระนาบ (รูปที่ ก-1) เมื่อ Streak เสร็จนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ ก-1 เทคนิค Streak-Plate Technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับซึ่งมีลิขสิทธิ์และสงวนสิทธิ์ในเนื้อหา (ก) การขีดเชื้อในแนวระนาบทั้ง 4 แนว (ข) โคลนีน้องเชื้อที่ขึ้นบนแนวระนาบทั้ง 4 แนว ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตาราง ข-1 แสดงค่าน้ำหนักของ PHB(g) และ ร้อยละของ PHB ที่สกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ สกัดด้วยโพพพิลีนคาร์บอเนต และจากการทรีทด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆก่อน นำไปสกัดด้วยโพพพิลีนคาร์บอเนต

ชนิด	น้ำหนักเซลล์ (g)	เซลล์แห้ง (g)	น้ำหนักหลอด (g)	น้ำหนักหลอด + PHB (g)	PHB (g)	%yield	
เซลล์แห้ง	2.2651	0.3354	13.3914	13.7268	-	-	
สกัดด้วยไฮโปคลอไรท์							
12.5%	2.0035	0.2967	13.4752	13.5361	0.0509	17.1700	
12.5%	2.0078	0.2973	13.6719	13.7208	0.0489		
12.5%	2.0063	0.2971	13.2469	13.3001	0.0532		
สกัดด้วยโพพพิลีนคาร์บอเนต							
ซ้ำที่1	2.0740	0.3071	1.0358	1.0359	0.0001	0.2000	
ซ้ำที่2	2.0143	0.2983	1.0329	1.0344	0.0015		
ซ้ำที่3	2.0890	0.3093	1.0318	1.0320	0.0002		
ปรับสภาพเซลล์ด้วยไฮโปคลอไรท์ก่อนนำมาสกัดด้วยโพพพิลีนคาร์บอเนต							
1%	ซ้ำที่1	2.0081	0.2973	1.0503	1.0515	0.0012	0.2044
	ซ้ำที่2	2.0041	0.2968	1.0217	1.0218	0.0001	
	ซ้ำที่3	2.0163	0.2986	1.0307	1.0323	0.0016	
4%	ซ้ำที่1	2.0112	0.2978	12.6965	12.6997	0.0032	0.7373
	ซ้ำที่2	2.0453	0.3029	1.0353	1.0363	0.0010	
	ซ้ำที่3	2.0079	0.2973	13.2285	13.2309	0.0024	
8%	ซ้ำที่1	2.0227	0.2995	2.0516	2.0584	0.0068	3.1457
	ซ้ำที่2	2.0240	0.2997	12.7044	12.7163	0.0119	
	ซ้ำที่3	2.0495	0.3035	12.5878	12.5975	0.0097	
12.5%	ซ้ำที่1	2.0359	0.3015	1.0284	1.0421	0.0137	7.0905
	ซ้ำที่2	2.0172	0.2987	1.0206	1.0378	0.0172	
	ซ้ำที่3	2.0129	0.2981	1.0314	1.0641	0.0327	

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้ใช้สำหรับการเรียนการสอน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข-2 แสดงค่าน้ำหนักของตะกอนเซลล์ (g) หลังจากการทรีตด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนนำไปสกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอนเนต

ชนิด	เซลล์แห้ง (g)	น้ำหนักกระดาศกรอง (g)	น้ำหนักกระดาศกรอง + ตะกอน (g)	ตะกอน (g)	%yield	
สกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอนเนต						
ซ้ำที่1	0.3071	0.5561	0.8044	0.2493	53.7249	
ซ้ำที่2	0.2983	0.5541	0.7040	0.1499		
ซ้ำที่3	0.3093	0.5478	0.6398	0.0920		
ปรับสภาพเซลล์ด้วยไฮโปคลอไรท์ก่อนนำมาสกัดด้วยโพรพิลีนคาร์บอนเนต						
1%	ซ้ำที่1	0.2973	0.5536	0.7262	0.1726	52.4986
	ซ้ำที่2	0.2968	0.5596	0.7127	0.1531	
	ซ้ำที่3	0.2986	0.5528	0.6957	0.1429	
4%	ซ้ำที่1	0.2978	0.5701	0.6994	0.1293	46.1777
	ซ้ำที่2	0.3029	0.5534	0.6953	0.1419	
	ซ้ำที่3	0.2973	0.5510	0.6945	0.1435	
8%	ซ้ำที่1	0.2995	0.5621	0.6980	0.1359	21.1166
	ซ้ำที่2	0.2997	0.5474	0.5673	0.0199	
	ซ้ำที่3	0.3035	0.5589	0.5933	0.0344	
12.5%	ซ้ำที่1	0.3015	0.5587	0.5622	0.0035	2.2864
	ซ้ำที่2	0.2987	0.5649	0.6284	0.0065	
	ซ้ำที่3	0.2981	0.5628	0.5743	0.0105	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้