การผลิตพลาสติกชีวภาพจาก *Bacillus megaterium* SWU01 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

BIOPLASTIC PRODUCTION FROM *Bacillus megaterium* SWU01 USING MOLASSES AS A CARBON SOURCE

ณัฐกฤตา เรืองเผือก

บุญสิตา พิพัฒนกุล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BIOPLASTIC PRODUCTION FROM *Bacillus megaterium* SWU01 USING MOLASSES AS A CARBON SOURCE

NATTHAKRITTA RUEANGPHUEAK
BOONSITA PIPATTANAKUL

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOTECH, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็น
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแ
งเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตพลาสติกชีวภาพจาก *Bacillus megaterium* SWU01 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน BIOPLASTIC PRODUCTION FROM *Bacillus megaterium* SWU01 USING MOLASSES AS A CARBON SOURCE
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณัฐกฤตา เรืองเผือก รหัสนักศึกษา 62050486 นางสาวบุญสิตา พิพัฒนกุล รหัสนักศึกษา 62050509
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการ	
ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตพลาสติกชีวภาพจาก *Bacillus megaterium* SWU01 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน
ชื่อนักศึกษา นางสาวณัฐกฤตา เรืองเผือก รหัสนักศึกษา 62050486
นางสาวบุญสิตา พิพัฒนกุล รหัสนักศึกษา 62050509
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2565
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

พอลีไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือพีเอชบี คือ พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยพีเอชบีเกิดจากการสะสมคาร์บอนในจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้ ซึ่งพีเอชบีมีประโยชน์หลากหลายที่สามารถนำมาใช้ได้ เช่น ทางการแพทย์ แต่ในการผลิตพีเอชบีมีข้อเสีย คือ แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตยังมีต้นทุนที่สูง จึงต้องการลดต้นทุนการผลิตให้ลดลง โดยการนำวัตถุดิบเหลือใช้จากทางอุตสาหกรรมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โครงงานพิเศษเล่มนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณคาร์บอนและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพีเอชบีจากเชื้อ *Bacillus megaterium* SWU01 โดยใช้อาหาร MSM ที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ พบว่าปริมาณคาร์บอนที่ 24.970 g/L และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 20:1 สามารถผลิตพีเอชบีได้สูงสุดเท่ากับ 1.03 g/L

คำสำคัญ : พอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต, พีเอชบี, กากน้ำตาล, *Bacillus megaterium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title BIOPLASTIC PRODUCTION FROM *Bacillus megaterium* SWU01 USING MOLASSES AS A CARBON SOURCE
Students Miss Natthakritta Rueangphueak Student ID 62050486
Miss Boonsita Pipattanakul Student ID 62050509
Degree Bachelor of Science (Biotechnology)
Department Biology
School Science
University King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year 2565
Advisor Asst. Prof. Dr. Tipachai Vatanavicharn

Abstract

Polyhydroxybutyrate or PHB is a biodegradable plastic. The PHB is formed by carbon accumulation in microorganisms capable of synthesizing polymers. Many benefits of PHB can be used, such as medicine, but in the production of PHB, there are disadvantages, that is the carbon source used in the production still has a high cost. Therefore, it is necessary to reduce production costs to be lower by using waste raw materials from industry to be used as a carbon source. This special project aims to determine the optimal carbon content and C/N ratio for PHB production from *Bacillus megaterium* SWU01 using molasses-based MSM medium as the carbon source. The results were found that a carbon content at 24.970 g/L and C/N ratio of 20:1 had the highest PHB content of 1.03 g/L.

Keywords : polyhydroxybutyrate, PHB, Molasses, *Bacillus megaterium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือ ความเอาใจใส่ ตลอดจนการให้คำปรึกษา คำแนะนำ แนวทางที่เป็นประโยชน์ และยังช่วยตรวจสอบแก้ไขโครงงานพิเศษนี้ให้เสร็จสมบูรณ์จาก ผศ.ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ และ ผศ.ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ประธานกรรมการและกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาเพื่อให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงโครงงานพิเศษนี้ให้สมบูรณ์ถูกต้อง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่คอยให้คำแนะนำวิธีแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เป็นประโยชน์กับโครงงานนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนและปริมาณไนโตรเจนจากกากน้ำตาล

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่คอยให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในการใช้สารเคมี และเครื่องมือต่างๆในการวิจัย

ขอขอบพระคุณนางสาววิสันต์ เชื้อวงศ์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา ตลอดจนคอยให้คำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์กับโครงงานพิเศษนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวที่คอยให้การสนับสนุนทางด้านการศึกษา คอยอบรมสั่งสอน และคอยเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษนี้ คณะผู้จัดทำนั้นหวังว่าโครงงานพิเศษนี้จะเป็นประโยชน์ให้กับผู้ที่สนใจ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้

ณัฐกฤตา เรืองเผือก
บุญสิตา พิพัฒนกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ฌ
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
2.1.1 พลาสติกที่สลายตัวได้ทางชีวภาพ 3
2.1.2 พลาสติกที่ผลิตจากชีวมวล 3
2.2 พอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต 4
2.3 การสังเคราะห์และสะสมพีเอชบีในแบคทีเรีย 4
2.4 *Bacillus megaterium* SWU01 5
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย 6
2.5.1 แหล่งคาร์บอน 6
2.5.2 แหล่งไนโตรเจน 6
2.6 กากน้ำตาล 7
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 9
3.1 เชื้อแบคทีเรีย 9
3.2 อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมี 9
3.2.1 สารเคมี 9
3.2.2 อุปกรณ์ 10
3.2.3 เครื่องมือ 10
3.3 ตรวจสอบการผลิตและสะสมพีเอชบีของ *Bacillus megaterium* SWU01 (TISTR10144) 11
3.4 การเตรียมหัวเชื้อ 11
3.5 การหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี 11
3.6 การหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี 12
3.7 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.8 การสกัดพีเอชบีและหาปริมาณพีเอชบี 13
3.9 การวิเคราะห์โครงสร้างจากหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FT-IR 13
3.10 วิเคราะห์ทางสถิติ 13
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 14
4.1 ตรวจสอบการผลิตและสะสมพีเอชบีของ *Bacillus megaterium* SWU01 14
4.2 การหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี 15
4.3 การหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี 17
4.4 การวิเคราะห์โครงสร้างจากหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FT-IR 19
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 21
5.1 สรุปผลการวิจัย 21
5.2 ข้อเสนอแนะ 21
เอกสารอ้างอิง 22
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 26
ภาคผนวก ข ปริมาณคาร์บอนและปริมาณไนโตรเจนในกากน้ำตาล 28
ภาคผนวก ค คำนวณปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 29
ภาคผนวก ง ผังการดำเนินงาน 33
ภาคผนวก จ การเตรียมกราฟมาตรฐานของพีเอชบี 38
ภาคผนวก ฉ ตารางแสดงผลการทดลอง 39
ภาคผนวก ช การวิเคราะห์ทางสถิติ 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 องค์ประกอบของกากน้ำตาล..... 7
3.1 หาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม (โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1)..... 11
3.2 หาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน..... 12
ค-1 หาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม (โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 16:1)..... 29
ฉ-1 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณพีเอชบีและ %PHB content ของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี..... 39
ฉ-2 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณพีเอชบีและ %PHB content ของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี..... 39
ช-1 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม..... 40
ช-2 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม..... 40
ช-3 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม..... 41
ช-4 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ของปริมาณพีเอชบีของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม..... 42
ช-5 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณพีเอชบีของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม..... 42
ช-6 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณพีเอชบีของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม..... 43
ช-7 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ของ %PHB Content ของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม..... 44
ช-8 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ %PHB Content ของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม..... 44
ช-9 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ %PHB Content ของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม..... 45
ช-10 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี..... 46
ช-11 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี..... 46
ช-12 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี..... 47
ช-13 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ของปริมาณพีเอชบีของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี..... 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ช-14 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณพีเอชบีของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี..... 48
ช-15 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณพีเอชบีของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี..... 49
ช-16 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ของ %PHB Content ของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี..... 50
ช-17 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ %PHB Content ของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี..... 50
ช-18 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ %PHB Content ของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี..... 51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างทางเคมีของพีเอชบี 4
2.2 การสังเคราะห์และการย่อยสลายพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรตในแบคทีเรีย..... 5
2.3 แสดงภายในเซลล์ของ *Bacillus megaterium* SWU01 ติดสีดำของ Sudan Black B 5
4.1 แสดงแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ที่เลี้ยงบนอาหาร NA (ก) และหลังการย้อมด้วย Sudan Black B (ข)..... 14
4.2 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพีเอชบี (g/L) ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร MSM ที่มีปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L, 12.485 g/L และ 24.970 g/L ตามลำดับ 15
4.3 แสดง %PHB Content ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร MSM ที่มีปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L, 12.485 g/L และ 24.970 g/L ตามลำดับโครงสร้างทางเคมีของพีเอชบี..... 16
4.4 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพีเอชบี (g/L) ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและ ammonium sulphate อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1, 20:1 และ 12:1 ตามลำดับ 17
4.5 แสดง %PHB Content ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล และ ammonium sulphate อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1, 20:1 และ 12:1 ตามลำดับ 18
4.6 สเปกตรัมของพีเอชบีมาตรฐาน ช่วงเลขคลื่นที่ 4000-400 cm^{-1} 20
4.7 สเปกตรัมของตัวอย่างพีเอชบีที่สกัดได้ ช่วงเลขคลื่นที่ 4000-400 cm^{-1} 20
ข-1 แสดงผลวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนด้วยเครื่อง CHNS/O analyzer..... 28
จ-1 แสดงกราฟมาตรฐานพีเอชบี 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
°C	Degrees Celsius
CDW	Cell Dry Weight
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectrometer
g/L	Gram/Liter
IR	Infrared
mg	milligram
mL	milliliter
nm	nanometer
µg	Microliter
MSM	Mineral Salt Medium
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
OD	Optical density
rpm	Revolutions per minute

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันแต่ละปีประเทศไทยจะมีขยะพลาสติกเป็นจำนวนมาก โดยในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาประเทศไทยมีปริมาณขยะพลาสติกเกิดขึ้นประมาณ 2 ล้านตัน โดยที่ประมาณ 1.5 ล้านตัน เป็นพลาสติกแบบใช้ครั้งเดียว (กรมควบคุมมลพิษ, 2563) ซึ่งจะเกิดจากของที่ใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น ถุงร้อน แก้วน้ำพลาสติก หลอดพลาสติก หรือกล่องโฟมใส่อาหาร ซึ่งเป็นพลาสติกที่มีอายุการใช้งานสั้นไม่มีการนำไปใช้ซ้ำ จึงก่อให้เกิดขยะสะสม เนื่องจากไม่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ หรือย่อยสลายได้ช้า จึงก่อให้เกิดปัญหาด้านมลพิษตามมา จากปัญหาที่เกิดขึ้นจึงได้มีแนวทางการศึกษาเกี่ยวกับพลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) ที่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ โดยการนำวัตถุดิบเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลมาใช้ในการผลิตพลาสติก ทดแทนพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเลียมที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น พอลีสไตลีน (พีเอส) หรือพอลีเอทธิลีนเทเรพทาเลท (พีอีที) (Evans and Sikdar, 1990) ซึ่งจะเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตและไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม โดยพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (พีเอชบี) เกิดจากการสะสมคาร์บอนในจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้ ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้มีหลายชนิด เช่น *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus* และ *Pseudomonas* (Singh and Parmar, 2011) ซึ่งพีเอชบีจะมีคุณสมบัติที่คล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์ประเภทพอลีโพรพิลีนและพอลีเอทิลีน เช่น ไม่ละลายน้ำ ทนความร้อน (Das et al, 2018) ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหรือทำเป็นภาชนะได้ เช่น ทางการแพทย์ หรือ การเกษตร (Kaynar and Beyatli, 2009) แต่ในการผลิตพีเอชบียังคงมีข้อเสีย คือ แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตมีต้นทุนสูง (Choi and Lee, 1997) จึงต้องลดต้นทุนของวัตถุดิบที่นำมาใช้โดยการเลือกวัตถุดิบที่เป็นของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลนำมาผลิตพีเอชบีได้ เช่น กากน้ำตาลและชานอ้อยที่เป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ (Obruca et al., 2014)

ดังนั้นในโครงงานพิเศษนี้จึงได้ศึกษาหาปริมาณคาร์บอนและอัตราส่วนคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตพลาสติกชีวภาพจาก *Bacillus megaterium* SWU01 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตพีเอชบี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อหาปริมาณคาร์บอนและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ใช้เชื้อ *B. megaterium* SWU01 ในการผลิตพีเอชบี

1.3.2 ใช้ปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L, 12.485 g/L และ 24.970 g/L โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 20:1 โดยปรับปริมาณไนโตรเจนโดยใช้ ammonium sulphate

1.3.3 ใช้ ammonium sulphate อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1, 20:1 และ 12:1

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบปริมาณคาร์บอนและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พลาสติกชีวภาพ

พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) คือ พลาสติกที่ผลิตขึ้นจากวัสดุจากธรรมชาติหรือจากน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งมีกลไกการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และแบคทีเรียในธรรมชาติ และเมื่อสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของน้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ มีเทน และชีวมวล ภายใต้ความชื้น สัมพัทธ์ อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม หรือการผ่านกระบวนการหมักทางชีวภาพ โดยการผลิตพลาสติกชีวภาพจะใช้วัตถุดิบทางการเกษตรหรือจากธรรมชาติ เช่น กากน้ำตาล แป้งจากมันสำปะหลัง โปรตีนจากถั่ว หรือเซลลูโลสจากพืช ซึ่งพลาสติกชีวภาพจะมีคุณสมบัติคล้ายพลาสติกทั่วไป แต่จะแตกต่างกันเมื่อพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพกลายเป็นขยะ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมก็จะเกิดการย่อยสลายได้ ซึ่งพลาสติกชีวภาพสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ (สถาบันพลาสติก , 2013) ดังนี้

2.1.1 พลาสติกสลายตัวได้ทางชีวภาพ (Compostable plastics)

เป็นพลาสติกที่สามารถสลายตัวได้ตามธรรมชาติ ซึ่งวัตถุดิบหลักจะมาจากพืช เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง เป็นต้น โดยที่พลาสติกประเภทนี้เป็นพลาสติกสลายตัวได้ในทางชีวภาพในสภาวะที่เหมาะสม เช่น ในกองปุ๋ยหมักหรือการฝังกลบ โดยสุดท้ายเมื่อย่อยสลายหมดจะไม่เหลือสิ่งตกค้างต่างๆไว้ ตัวอย่างพลาสติกที่สลายตัวได้ทางชีวภาพ ได้แก่ พลาสติกที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบพื้นฐาน พอลีแล็กติกแอซิด (พีแอลเอ) และ พอลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอตส์ (พีเอชเอ) (วชิระ, 2556)

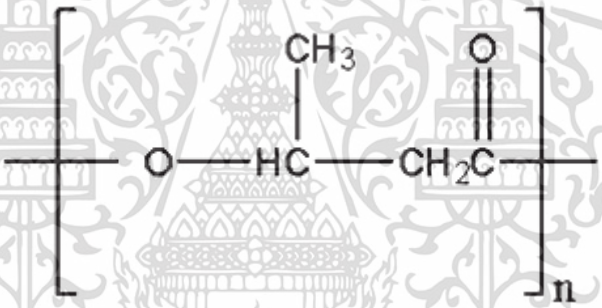
2.1.2 พลาสติกที่ผลิตจากชีวมวล (Biobased-plastics)

เป็นพลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบทางการเกษตรที่เป็นทรัพยากรที่ใช้แล้วไม่หมดไป สามารถปลูกขึ้นมาทดแทนได้ (Renewable Resources) พลาสติกชนิดนี้ผลิตจากวัตถุดิบ เช่น น้ำตาล แป้ง น้ำมันหรือเซลลูโลสที่ได้จากพืช ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์พอลีเอสเทอร์ที่ใช้วัตถุดิบจากโพรเพนไดออลที่มาจากพืช (bio-propanediol, bio-PDO) โดยพลาสติกชีวภาพที่น่าจับตามองในกลุ่มนี้ คือ พอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างทางเคมีเหมือนกับพอลิเมอร์ที่ได้จากปิโตรเคมี แต่มีสัดส่วนของชีวมวลอยู่ด้วย เช่น พอลีเอธิลีน (bio-polyethylene, bio-PE) พีวีซี (bio-polyvinylchloride, bio-PVC) หรือ เพท (bio-PET) ที่ผลิตจากเอทานอลที่ได้มาจากอ้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 พอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate : PHB)

พอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ พีเอชบี คือ พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable Plastic) โดยที่พีเอชบีเกิดจากการสะสมคาร์บอนในจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้ เช่น *Alcaligenes, Azotobacter, Bacillus* และ *Pseudomonas* (Singh and Parmar, 2011) พีเอชบีจัดเป็นพอลิเมอร์ที่อยู่ในกลุ่ม Polyhydroxyalkanoates (พีเอชเอ) ที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นหมู่เอสเทอร์ (Ester) หมู่คาร์บอนิล (Carbonyl) และหมู่เมทิล (Methyl) ซึ่งจัดเป็นสารประเภทอะลิฟาติกพอลีเอสเทอร์ (Aliphatic Polyester) มีโครงสร้างเป็นสายยาว โดยพีเอชบีทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอน และเป็นแหล่งพลังงานให้จุลินทรีย์ โดยจะสะสมอยู่ในแกรนูลภายในเซลล์จุลินทรีย์ โดยพีเอชบีได้เป็นที่สนใจในด้านอุตสาหกรรมพลาสติกเนื่องจากพีเอชบีมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่ใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ โดยเฉพาะพอลีโพรพิลีน (พีพี) (Braunegg et al., 1998) ในปัจจุบันพีเอชบีได้มีการนับวัตถุดิบเหลือใช้จากอุตสาหกรรมมาใช้ในการสังเคราะห์พีเอชบี เช่น น้ำตาล แป้ง น้ำมัน เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต จึงทำให้พีเอชบีถูกนำไปใช้มากขึ้น เช่น ภาชนะบรรจุอาหาร หรืออุปกรณ์ทางการแพทย์ เนื่องจากมีความยืดหยุ่นทนทานต่อการซึมของน้ำและออกซิเจน และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Marang et al., 2013)



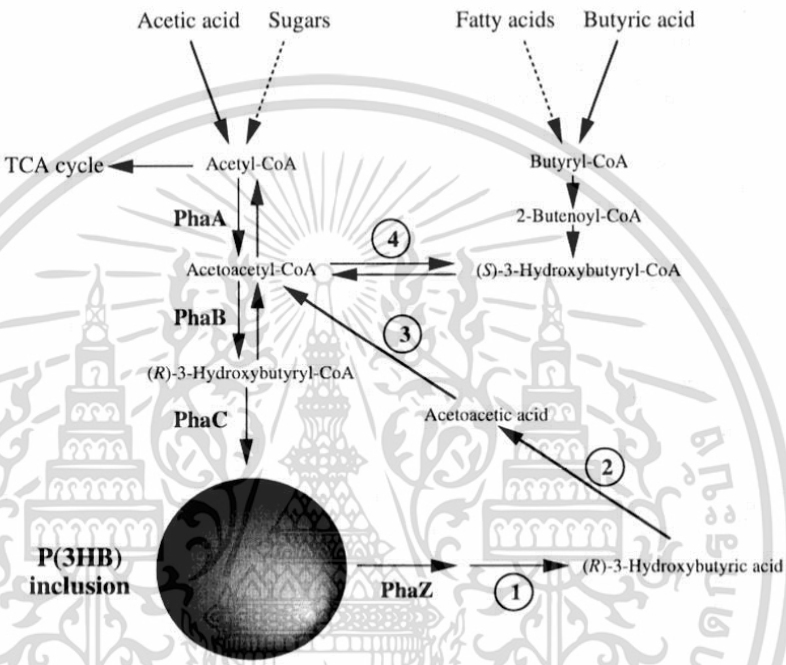
รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของพีเอชบี
ที่มา : Daris and Knez (2019)

2.3 การสังเคราะห์และสะสมพีเอชบีในแบคทีเรีย

พีเอชบีสามารถสะสมได้ตามธรรมชาติ โดยที่พบได้ในแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยส่วนใหญ่จะสะสมในแกรนูลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานเมื่อสารอาหารไม่สมดุล ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งพลาสติกที่ผลิตจากพีเอชบีภายหลังการใช้งาน จะมีการย่อยสลายได้โดยอาศัยการทำงานของแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยมีการพบพีเอชบีครั้งแรกใน *Bacillus Megaterium* (Lemoigen, 1926) การศึกษาต่อมาพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นนั้นสามารถผลิตพีเอชบีได้สูง เช่น *Alcaligenes*, *Azotobacter* และ *Pseudomonas* เป็นต้นการสังเคราะห์พีเอชบีในแบคทีเรีย เริ่มจากแหล่งคาร์บอนจะถูกกลายสภาพเป็น acetyl-coA และเปลี่ยนต่อไปเป็น acetoacetyl-coA ด้วยเอนไซม์ β-ketothiolase จากนั้นเอนไซม์ acetoacetyl-coA reductase จะเปลี่ยน acetoacetyl-coA เป็น 3-hyroxylbutyryl-coA ซึ่งต่อมาจะเกิดการสร้างสายพอลิเมอร์เป็นพีเอชบี ด้วยเอนไซม์ polyhydroxybutyrate synthase ดังแสดงในภาพประกอบ 3 ในการสังเคราะห์พีเอชบี ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญ 3 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ เอนไซม์ β-ketothiolase ทำหน้าที่เปลี่ยน acetyl-coA ให้เป็น acetoacetyl-coA,

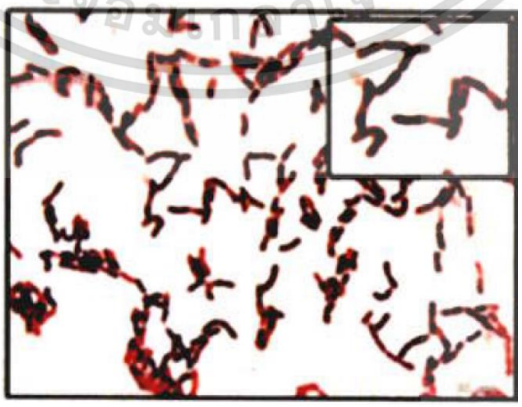
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase ทำหน้าที่เปลี่ยน acetoacetyl-coA ให้เป็น 3hyroxylbutyryl-coA และเอนไซม์ PHB synthase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการเกิดพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของโมเลกุลหนึ่งไปยังปลายคาร์บอนิลของอีกโมเลกุลหนึ่ง ทำให้เกิดการสร้างสายพอลิเมอร์ของพอลีไฮดรอกซีบิวทีเรต ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดถูกควบคุมด้วยยีน3-ketothiolase (PhaA), acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) และ PHB synthase (PhaC) โดยยีน PhaC ควบคุมการสร้างเอนไซม์ PHB synthase ยีน PhaB ควบคุมการสร้างเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase และ PhaA ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-ketothiolase (Verliden et al., 2007)



รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์และการย่อยสลายพอลีไฮดรอกซีบิวทีเรตในแบคทีเรีย
ที่มา : Sudesh et al., (2000)

2.4 *Bacillus megaterium* SWU01



รูปที่ 2.3 แสดงภายในเซลล์ของ *B. megaterium* SWU01 ติดสีดำของ Sudan Black B
ที่มา : วิสันต์ (2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B. megaterium SWU01 เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก ที่คัดแยกและพบได้จากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานปลาทูน่ากระป๋อง จังหวัดสมุทรสาคร จากผลการทดลองพบว่าในการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีโดยนำจานอาหารเพาะเชื้ออาหารที่มีเชื้อมาย้อมด้วย Sudan Black B ซึ่งจะพบว่าแบคทีเรียที่มีการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์จะติดสีดำของ Sudan Black B จากนั้นจะนำมายืนยันการผลิตพีเอชบีโดยการย้อมด้วย Nile blue A จะพบการเรืองแสงสีส้มแดงและสังเกตการสะสมพีเอชบีในเซลล์โดยการนำแบคทีเรียมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน จะพบพีเอชบีสะสมอยู่ในลักษณะแกรนูลภายในเซลล์ และเมื่อนำแบคทีเรียมาระบุสายพันธุ์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *16s rDNA* จากไฟโลเจเนติกทรี จะพบว่า *B. megaterium* SWU01 อยู่ในจีนัส *Bacillus* spp. โดยที่สายพันธุ์ SWU01 มีบรรพบุรุษร่วมกับ *B. megaterium* IAM13418 (accession number: D16273) (วิสันต์, 2561)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

2.5.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญต่อกระบวนการการสังเคราะห์และสะสมพีเอชบี โดยที่การสังเคราะห์จะเกิดขึ้นสูงหลังจากแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเกิดแบบทวีคูณ (log phase) ภายใต้สภาวะสารอาหารที่ไม่สมดุล ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีแหล่งคาร์บอนมากพอ และต้องจำกัดปัจจัยอื่นๆ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และออกซิเจน เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันนั้นธรรมชาติยังมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์พีเอชบีได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน (ปิยะรัตน์, 2552) โดยที่แหล่งคาร์บอนที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตพีเอชบีจะเป็นกลุ่มของคาร์โบไฮเดรต เช่น glucose, sucrose และ fructose และเนื่องจากในปัจจุบันการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพมีต้นทุนในการผลิตที่สูง ซึ่งมีสาเหตุเกิดจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต (Choi and Lee,1997) จึงได้มีแนวทางการแก้ปัญหา คือ การลดต้นทุนการผลิตให้ต่ำลง โดยการนำวัตถุดิบเหลือใช้จากทางอุตสาหกรรมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น กากน้ำตาลที่เป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ (Obruca et al., 2014)

2.5.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จุลินทรีย์สามารถผลิตพีเอชบีได้เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากพอ แต่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด คือ มีอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนมีค่าสูง (เมทินี, 2561) โดยเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการใช้ไนโตรเจนที่ต่างกัน เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดจะสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนในรูปของสารอนินทรีย์ บางชนิดจะสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่ไนโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์ ในการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจะต้องเลือกให้เหมาะกับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ (Boze et al., 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 กากน้ำตาล (Molasses)

กากน้ำตาล (molasses) เป็นของเหลวที่มีลักษณะหนืดข้น มีสีดำอมน้ำตาล เป็นผลผลิตหนึ่งที่เกิดในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย โดยมีอ้อยเป็นวัตถุดิบ โดยในการผลิตน้ำตาลทราย 1 ตัน จะใช้อ้อยดิบ 10 ตัน และเกิดผลพลอยได้ของกากน้ำตาลประมาณ 50 กิโลกรัม โดยกากน้ำตาลเกิดจากกระบวนการผลิตน้ำตาลดิบ ซึ่งจะได้กากน้ำตาลจากขั้นตอนการเคี่ยวที่นำน้ำอ้อยเข้มข้นไปเคี่ยวจนน้ำตาลตกผลึกเป็นเกล็ด รวมกับกากน้ำตาลที่ไม่ตกผลึก แล้วนำเกล็ดน้ำตาลกับกากน้ำตาลที่ได้ไปปั่นแยกออก จะได้เป็นน้ำตาลทรายดิบและกากน้ำตาลในที่สุด โดยในกากน้ำตาลนั้นมีองค์ประกอบซับซ้อนที่ประกอบไปด้วย glucose, sucrose และ fructose แร่ธาตุต่างๆ และสารอื่นที่ไม่ใช่น้ำตาล ซึ่งองค์ประกอบของกากน้ำตาลได้แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกากน้ำตาล (Olbrich, 2006)

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์ (%)
sucrose	32
glucose	14
fructose	16
น้ำ	20
K_2O	3.5
CaO	1.5
MgO	0.1
Na_2O, Fe_2O_3, Al_2O_3	0.2
SiO_2	0.5
SO_3	1.6
P_2O_5	0.2
Chlorides	0.4
Non-sugar	10

โดยในกากน้ำตาลมีระดับพลังงานระดับต่ำไปถึงระดับปานกลาง ซึ่งจะขึ้นกับปริมาณของน้ำที่มีอยู่ในกากน้ำตาล และมีแร่ธาตุต่างๆที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม (Songsri et al., 2009) จึงได้มีการนำกากน้ำตาลไปเป็นส่วนผสมของปุ๋ยหมักหรือสารปรับปรุงดิน และนอกจากนั้นกากน้ำตาลยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมได้หลายประเภท ได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล, อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์และสุรา, อุตสาหกรรมการผลิตยีสต์และขนมปัง, อุตสาหกรรมการผลิตกรดมะนาว หรืออุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ (พืชเกษตร, 2560) โดยกากน้ำตาลนั้นมีหลายชนิด เช่น กากน้ำตาลจากอ้อย กากน้ำตาลจากหัวบีท หรือกากน้ำตาลจากส้ม เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการผลิตพีเอชบีนิยมใช้แหล่งคาร์บอนกลุ่มของคาร์โบไฮเดรต เช่น glucose, sucrose และ fructose โดยงานวิจัยของ Faccin et al. (2009) ได้มีการใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพีเอชบี ซึ่งได้ทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพื่อการผลิตพีเอชบีของ *Bacillus megaterium* ในอาหาร Mineral Salt Medium โดยใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และ ammonium sulphate เป็นแหล่งไนโตรเจน และได้ทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนหลายอัตราส่วนในการทดลองแบบขวดทดลองและทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพีเอชบีเท่ากับ 8 โดยใช้ sucrose 16 g/L และ ammonium sulphate 2 g/L โดยสามารถสะสมพีเอชบีได้ประมาณ 70%

แต่เนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตมีต้นทุนที่สูง จึงต้องการลดต้นทุนการผลิตให้ต่ำลง โดยการนำวัตถุดิบเหลือใช้จากทางอุตสาหกรรมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน (Obruca et al., 2014) จึงได้มีการนำแหล่งคาร์บอนที่เป็นวัตถุดิบเหลือใช้ในทางอุตสาหกรรมมาทดแทน เช่น งานวิจัยของ Gouda et al. (2001) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ *Bacillus megaterium* ที่คัดแยกได้จากโรงงานบำบัดน้ำเสีย มาใช้เลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลจากอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อลดต้นทุนในการผลิตพีเอชบี โดยในการศึกษานี้ ได้ใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5% เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ากากน้ำตาลความเข้มข้น 2% จะได้ผลผลิตสูงสุดของพีเอชบี 46.3% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ต่อมาได้ทำการศึกษาโดยใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 2% และได้เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่หลากหลายโดยใช้ ammonuim chloride 0.05% เป็นตัวควบคุม โดยพบว่าน้ำแช่ข้าวโพดได้ผลผลิตสูงสุดคือ 32.68% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ต่อมา Zhang et al. (2013) ได้ศึกษาการผลิตพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *Bacillus megaterium* R11 ในอาหาร Mineral Salt Medium ที่ประกอบไปด้วยสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเส้นใยทะลายปาล์มน้ำมันเปล่า โดยปรับความเข้มข้นน้ำตาลของทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าให้เป็น 45 g/L และเติม tryptone 9 g/L เพื่อคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนให้เป็น 15:3 พบว่าการผลิตพีเอชบีจากทะลายปาล์มน้ำมันเปล่าให้ปริมาณพีเอชบีสูงสุดถึง 58.5% และยังมีกลีเซอรอลที่เป็นของเสียจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อลดต้นทุนการผลิตได้ โดย Wendy et al. (2022) ได้นำกลีเซอรอลที่เป็นของเสียมาใช้ในการผลิตพีเอชบีโดยนำ *Burkholderia cepacia* BPT1213 มาเลี้ยงในอาหาร Mineral Salt Medium ที่ประกอบไปด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้นที่ 2, 4, 6และ 9% พบว่ากลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 2% ให้ปริมาณพีเอชบีสูงสุดถึง 66.4%

และนอกจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นวัตถุดิบเหลือใช้ในทางอุตสาหกรรมที่กล่าวมาข้างต้นภัครจิราและคณะ (2564) ได้ศึกษาการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต โดยใช้อาหาร Minimal medium ที่ประกอบด้วยน้ำของกล้วยสุกงอมที่ผ่านการแยกกากออกมา 3 ชนิด ได้แก่ กล้วยไข่, กล้วยหอมและกล้วยน้ำว้าเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Alcaligenes latus* โดยให้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเท่ากับ 20 g/L เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าในอาหาร Minimal medium ที่มีน้ำกล้วยไข่ผลิตพีเอชเอได้มากที่สุด สะสมพีเอชเอเท่ากับ 46.60% รองลงมาคือน้ำกล้วยหอม และน้อยที่สุดคือน้ำกล้วยน้ำว้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อแบคทีเรีย

Bacillus megaterium SWU01 (TISTR10144)

3.2 อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมี

3.2.1 สารเคมี

1. กากน้ำตาล ยี่ห้อ M Molasses
2. Nutrient agar
3. Nutrient broth
4. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
5. di-Sodium hydrogen phosphate dodecahydrate ($Na_2HPO_4.12H_2O$)
6. Magnesium sulfate-7-hydrate ($MgSO_4.7H_2O$)
7. Calcium chloride-dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)
8. Iron (II) sulfate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$)
9. Manganese (II) chloride-4-hydrate
10. Boric acid (H_3BO_3)
11. Copper (II) sulfate -5-hydrate ($CuSO_4.5H_2O$)
12. Cobalt (II) chloride ($CoCl_2.6H_2O$)
13. Ammonium molydate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.H_2O$)
14. Zinc sulfate-7-hydrate ($ZnSO_4.7H_2O$)
15. Nickel (II) Sulfate ($NiSO_4.7H_2O$)
16. di-Sodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4.12H_2O$)
17. phosphoric acid
18. Ammonium sulphate $(NH_4)_2SO_4$
19. Sudan Black B
20. 95% Ethanol
21. 10% Sodium hypochlorite
22. Acetone
23. Sulfuric acid
24. Chloroform
25. Potassium Bromide (KBr)
26. Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid บริษัท Sigma-Aldrich

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 อุปกรณ์

1. กระบอกตวงขนาด 100 mL
2. filter 0.45 µm
3. ขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 50 mL และ 500 mL
4. คิวเวตควอต
5. จานเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสติก
6. ช้อนตักสาร
7. ชุดไมโครปิเปต
8. ทิปขนาดต่างๆ
9. ห่วงเขี่ยเชื้อ
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์
11. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
12. บีกเกอร์
13. หลอดแก้วทดลอง
14. หลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 mL
15. หลอดเซนติฟิวก์ขนาด 50 mL
16. พาราฟิล์ม
17. ปากคีบ
18. หลอดหยดสาร
19. ครกบด

3.2.3 เครื่องมือ

1. ตู้ปลอดเชื้อ ยี่ห้อ Microtech รุ่น V3-T
2. ตู้ดูดควัน
3. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ยี่ห้อ Zhicheng
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Hettich รุ่น UNIVERSAL 320R
5. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler-Toledo รุ่น ME 2014
6. เครื่องวัดกรด-ด่าง ยี่ห้อ Suntex รุ่น SP-2100
7. เครื่องผสมสาร ยี่ห้อ Scientific Industries รุ่น Vortex Genie 2
8. ตู้อบลมร้อน ยี่ห้อ Memmert
9. โถดูดความชื้น
10. หม้อนึ่งอัดไอน้ำ ยี่ห้อ Zealway รุ่น GI54TW
11. เครื่อง Spectrophotometer ยี่ห้อ MAPADA รุ่น UV-1200
12. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Bioevopeak รุ่น WB-1R2H-7
13. เครื่องอัดไฮโดรลิค
14. เครื่อง Fourier transform infrared spectrophotometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น IRTracer-100
15. เครื่อง CHNS/O analyzer ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Flash Smart

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ตรวจสอบการผลิตและสะสมพีเอชบีของ *Bacillus megaterium* SWU01 (TISTR10144)

นำเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* SWU01 (TISTR10144) (Chuavong et al., 2022) มาทำการ Steak plate ลงบนอาหาร NA แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นตรวจสอบโดยการย้อมด้วยสารละลาย 0.5% Sudan Black B ใน 95% Ethanol โดยเทสารละลาย Sudan Black B ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีเชื้อแบคทีเรียขึ้น ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างออกด้วย 95% Ethanol ซึ่งแบคทีเรียที่มีการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์จะติดสีดำของ Sudan Black B

3.4 การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อ *B. megaterium* SWU01 มาทำการ Steak plate ลงบนอาหาร NA นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน แล้วทำการเขี่ยเชื้อโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งมา 4-5 โคโลนี ใส่ลงในอาหาร NB ปริมาตร 50 mL ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวน

3.5 การหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี

ทำการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี โดยใช้กากน้ำตาลที่ได้จากการส่งวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนที่ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ข) ให้ได้ปริมาณคาร์บอนความเข้มข้น 6.243 g/L, 12.485 g/L และ 24.970 g/L ปรับปริมาณไนโตรเจนโดยใช้ ammonium sulphate และคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนให้ได้ 20:1 (ดูวิธีการคำนวณปริมาณคาร์บอนได้ที่ภาคผนวก ค) โดยทำการเตรียมอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและ ammonium sulphate ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 หาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม (โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1)

ปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน	กากน้ำตาล (g/L)	ammonium sulphate (g/L)
6.243 g/L : 0.30 g/L	19.51	0.5
12.485 g/L : 0.60 g/L	39.01	1.0
24.970 g/L : 1.20 g/L	78.03	2.0

แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 20 นาที โดยเติม trace elements และ $MgSO_4.7H_2O$ ที่ผ่านการกรองด้วย filter 0.45 µm ทีหลังเพื่อป้องกันการตกตะกอน จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* SWU01 ประมาณ 5% inoculum โดยกำหนดให้ความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย คือ 0.1 (OD_{600} = 0.1) ใส่ในอาหารในสภาวะตามตารางที่ 3.1 ปริมาตร 85 mL ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 mL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบแล้วทำการเก็บตัวอย่างแล้วนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้ง 5 mL ต่อหลอด เก็บซ้ำจำนวน 5 หลอด และปริมาณพีเอชบี 10 mL ต่อหลอด เก็บซ้ำจำนวน 5 หลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี

ทำการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบีโดยใช้ ammonium sulphate เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้ปริมาณคาร์บอนที่ดีที่สุดจากการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี ให้ได้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1, 20:1 และ 12:1 (ดูวิธีการคำนวณอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนได้ที่ภาคผนวก ค) โดยทำการเตรียมอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล และ ammonium sulphate ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 หาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	กากน้ำตาล (g/L)	ammonium sulphate (g/L)
32:1	78.03	0.0
20:1	78.03	2.0
12:1	78.03	6.0

แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 20 นาที โดยเติม trace elements และ $MgSO_4.7H_2O$ ที่ผ่านการกรองด้วย filter 0.45 µm ทีหลังเพื่อป้องกันการตกตะกอน จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* SWU01 ประมาณ 5% inoculum โดยกำหนดให้ความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย คือ 0.1 (OD_{600} = 0.1) ใส่ในอาหารในสภาวะตามตารางที่ 3.2 ปริมาตร 85 mL ในขวดรูปชมพูขนาด 500 mL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบแล้วทำการเก็บตัวอย่างแล้วนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้ง 5 mL ต่อหลอด เก็บซ้ำจำนวน 5 หลอด และปริมาณพีเอชบี 10 mL ต่อหลอด เก็บซ้ำจำนวน 5 หลอด

3.7 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างเชื้อมาตัวอย่างละ 5 mL ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 5 mL ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ซ้ำด้วยน้ำกลั่น 5 mL ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาแบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำจนครบปริมาตร 5 mL เมื่อแบ่งจนครบจะนำตะกอนเซลล์ที่ได้อบที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลาข้ามคืน จนเซลล์แห้งและน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำเซลล์แห้งไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การสกัดพีเอชบีและหาปริมาณพีเอชบี

นำตัวอย่างเชื้อมาตัวอย่างละ 10 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 10 mL ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ซ้ำด้วยน้ำกลั่น 10 mL ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง สกัดพีเอชบีโดยดัดแปลงวิธีการสกัดของ Han และคณะ นำตะกอนเซลล์ที่ปั่นเหวี่ยงแล้วมาเติม 10% Sodium hypochlorite 10 mL ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตก นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 10 mL ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง และเติม Acetone 10 mL ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และจากนั้นเทส่วนใสทิ้ง และเติม 95% Ethanol 10 mL ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาแบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำจนครบปริมาตร 10 mL เมื่อแบ่งจนครบจะนำตะกอนพีเอชบีที่สกัดได้อบที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลาข้ามคืน จนตะกอนพีเอชบีแห้งและน้ำหนักคงที่ นำตะกอนพีเอชบีที่สกัดได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักพีเอชบี (วิสันต์, 2561) หลังจากนั้นตักตะกอนพีเอชบีที่สกัดได้มาทำกรดโครโตนิก (Crotonic acid) เพื่อหาปริมาณพีเอชบี โดยชั่งตัวอย่างพีเอชบีที่สกัดได้มาละลายด้วย Chloroform ในหลอดทดลองให้ได้ความเข้มข้น 5,000 µg/ml ปิดหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 °C จน Chloroform ละลายใส จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้เท่าเดิม และนำมาเจือจางด้วย Chloroform ให้ได้ความเข้มข้น 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12.5 µg/mL และ 6.25 µg/ml โดยให้แต่ละความเข้มข้นมีปริมาตรสุทธิ 5 mL แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 °C จน Chloroform ระเหยหมด จากนั้นเติม Sulfuric acid ปริมาตร 5 ml แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 °C เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 nm โดยใช้ Sulfuric acid เป็น Blank และนำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของพีเอชบี (ภาคผนวก จ) แล้วคำนวณเป็นปริมาณพีเอชบี (g/L)

3.9 การวิเคราะห์โครงสร้างจากหมู่ฟังก์ชั่นด้วยเทคนิค FT-IR

วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) โดยใช้เป็นการยืนยันเกี่ยวกับโครงสร้างของพีเอชบี หลังจากการสกัดด้วย Sodium hypochlorite เปรียบเทียบกับพีเอชบีมาตรฐาน โดยนำตัวอย่างพีเอชบีที่สกัดได้มาประมาณ 2 mg มาบดผสมกับ Postassium Bromide ประมาณ 100-200 mg ในครกบด จากนั้นนำตัวอย่างไปอัดเป็นแผ่นด้วยเครื่องอัดไฮโดรลิค และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR ที่ช่วงเลขคลื่น 4000-400 cm^{-1}

3.10 วิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพีเอชบีมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26 โดย One-Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เพื่อพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ตรวจสอบการผลิตและสะสมพอลีไฮดรอกซีบิวทีเรตแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01

จากการนำเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* SWU01 มาทำการเลี้ยงลงบนอาหาร NA แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำมาตรวจสอบโดยการย้อมด้วยสารละลาย 0.5% Sudan Black B ใน 95% Ethanol พบว่าโคโลนีของแบคทีเรียติดสีดำของ Sudan Black B อย่างชัดเจน

(ก) (ข)

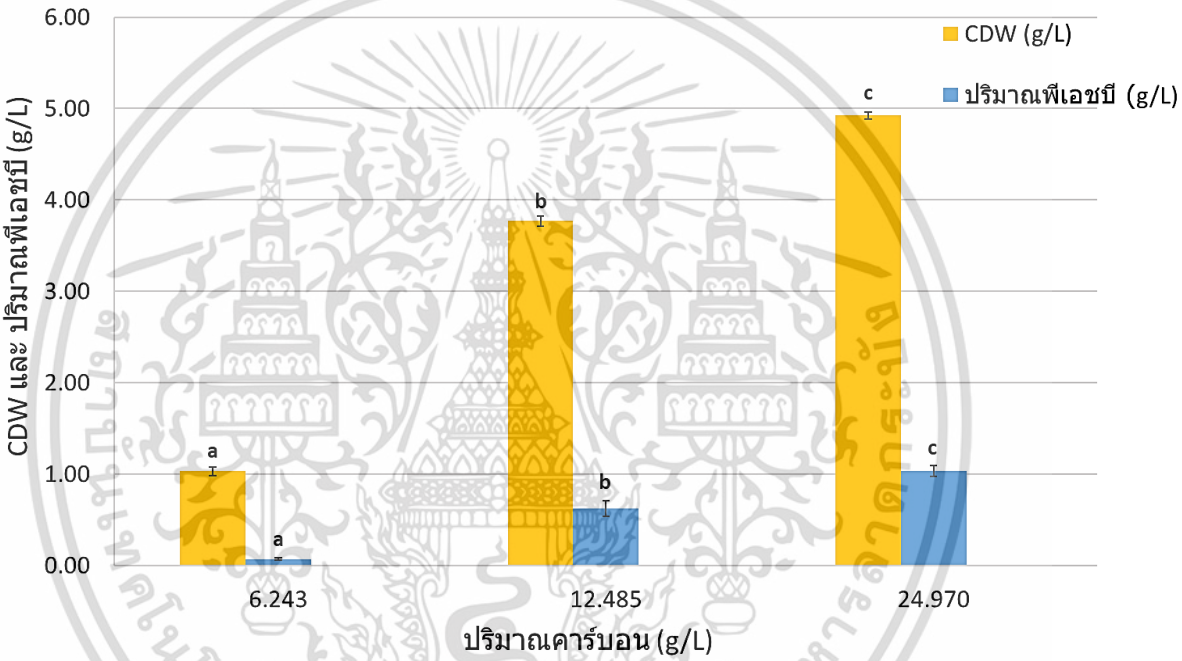
รูปที่ 4.1 แสดงแบคทีเรีย *B. megaterium* SWU01 ที่เลี้ยงบนอาหาร NA (ก) และหลังการย้อมด้วย Sudan Black B (ข)

จากผลการทดลองการตรวจสอบการผลิตและสะสมพอลีไฮดรอกซีบิวทีเรตของแบคทีเรีย *B. megaterium* SWU01 พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของแพรวสุภา (2562) และวิสันต์ (2561) ที่นำ *B. megaterium* SWU01 มาเลี้ยงบนอาหาร NA และจากนั้นตรวจสอบแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีโดยการย้อมด้วยสารละลาย 0.5 % Sudan Black B ใน 70% Ethanol ซึ่งแบคทีเรียที่มีการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์จะติดสีดำของ Sudan Black B แต่ในงานวิจัยของวิสันต์ (2561) จะมีการยืนยันการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์โดยย้อมด้วยสี Nile Blue A อีกครั้ง เนื่องจากส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ในโมเลกุลของ Sudan Black B จะติดสีดำกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำทั้งหมดภายในเซลล์ของแบคทีเรียรวมทั้งพีเอชบีด้วย ซึ่ง Nile Blue A จะมีความจำเพาะต่อแกรนูลของพีเอชบีมากกว่า Sudan Black B จึงได้มีการนำ Nile Blue A มาย้อมอีกครั้ง โดยการย้อม Nile Blue A พบว่าแบคทีเรียมีการเรืองแสงสีส้มแดงของ Nile Blue A จึงสามารถยืนยันได้ว่าแบคทีเรีย *B. megaterium* SWU01 มีการสะสมพีเอชบี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

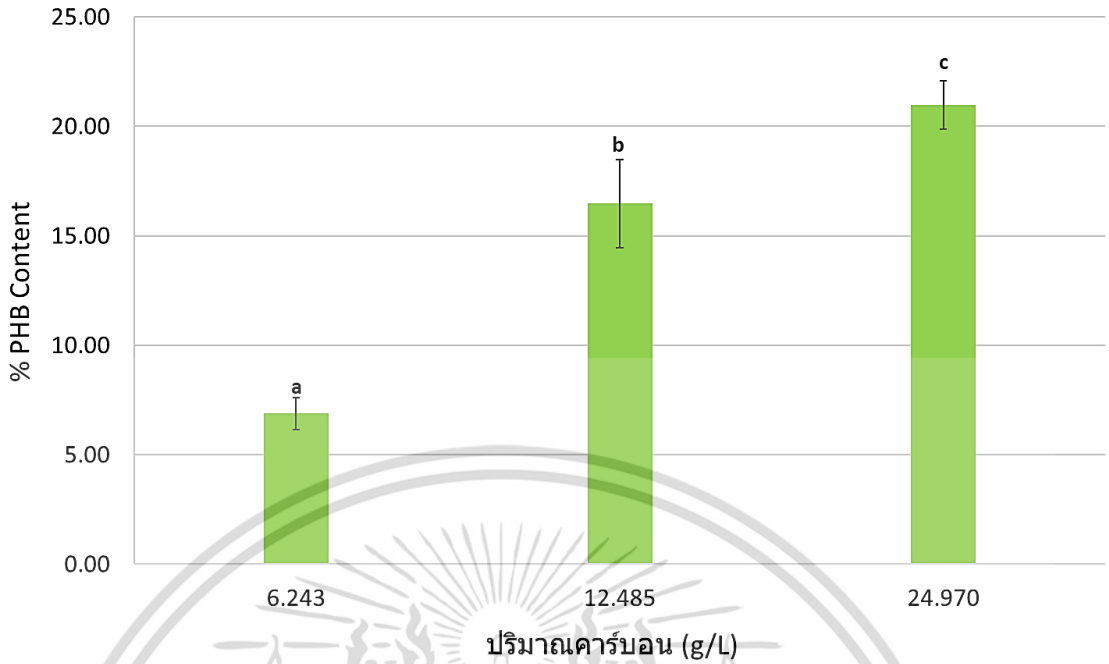
4.2 การหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี

จากการทดลองหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลที่มีปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L, 12.485 g/L และ 24.970 g/L ตามลำดับ และทำการปรับปริมาณไนโตรเจนในอาหารด้วย ammonium sulphate โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 20:1 และทำการเติมหัวเชื้อ *B. megaterium* SWU01 ประมาณ 5% inoculum โดยกำหนดให้ความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย คือ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 nm แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอาหาร MSM ที่มีปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 20:1 สามารถผลิตพีเอชบีได้มากที่สุด 1.03 g/L มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.92 g/L (รูปที่ 4.2) และได้ %PHB Content 20.98 (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.2 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพีเอชบี (g/L) ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร MSM ที่มีปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L, 12.485 g/L และ 24.970 g/L ตามลำดับ โดย a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มของ CDW และปริมาณพีเอชบี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



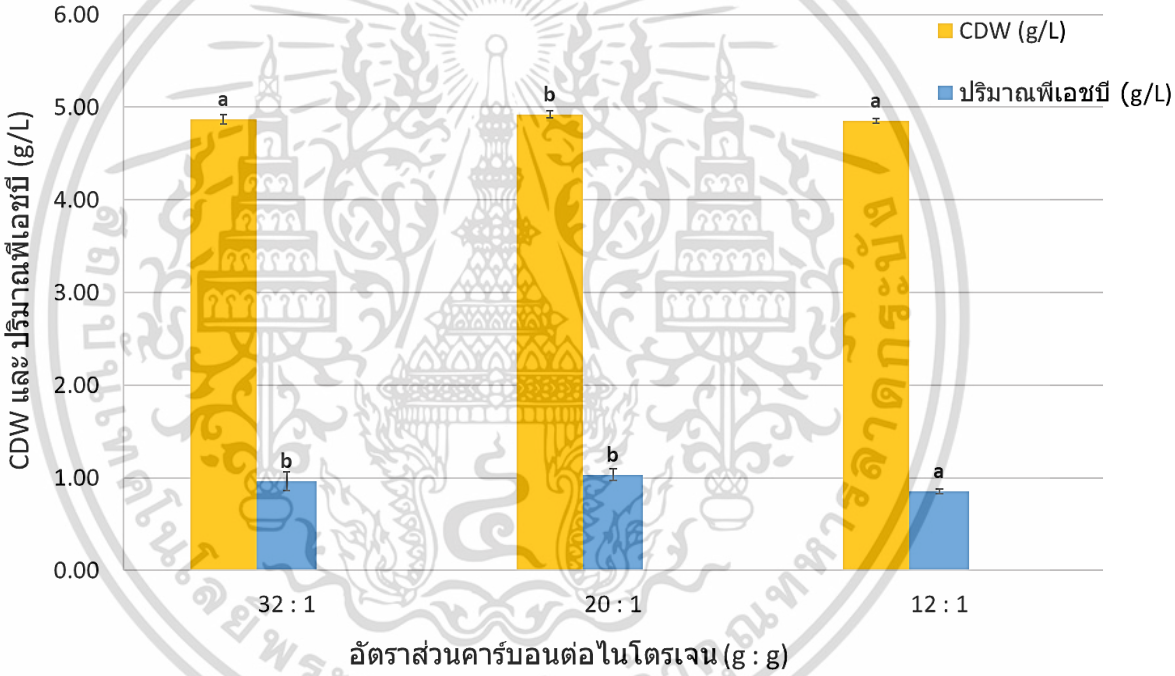
รูปที่ 4.3 แสดง %PHB Content ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร MSM ที่มีปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L, 12.485 g/L และ 24.970 g/L ตามลำดับ โดย a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

พบว่าปริมาณคาร์บอนที่แตกต่างกัน ในอาหาร MSM มีน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณพีเอชบี และ %PHB Content แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณคาร์บอนที่ 24.970 g/L มีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพีเอชบีมากที่สุด รองลงมาคือ 12.485 g/L และ 6.243 g/L ตามลำดับ จึงสามารถสรุปได้ว่าอาหาร MSM ที่มีปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L ให้ปริมาณพีเอชบีมากที่สุด สามารถผลิตพีเอชบีได้ 1.03 g/L มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.92 g/L และได้ %PHB Content 20.98 % ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงเลือกปริมาณคาร์บอนที่ 24.970 g/L โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 20:1 เป็นปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี เพื่อใช้ในการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

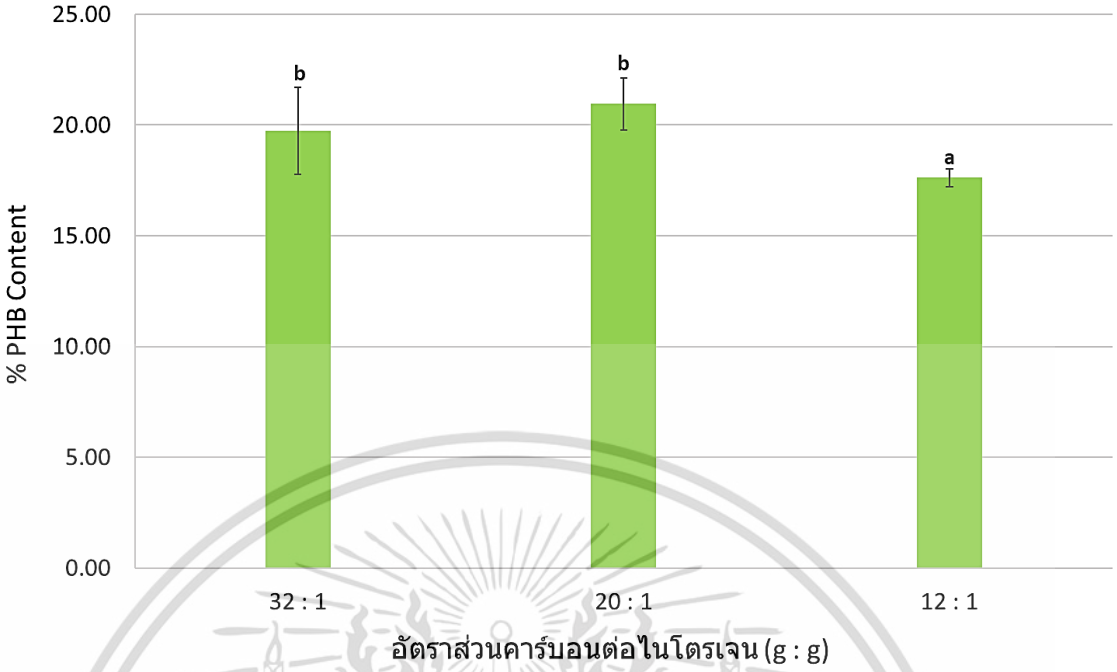
4.3 การหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี

จากผลการทดลองหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี พบว่าปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 20:1 เป็นปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี จึงเลือกปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L มาหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบีในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและ ammonium sulphate โดยมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1, 20:1 และ 12:1 ตามลำดับ โดยทำการเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *B. megaterium* SWU01 ประมาณ 5% inoculum โดยกำหนดให้ความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย คือ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 nm แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอาหาร MSM ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1 สามารถผลิตพีเอชบีได้มากที่สุด 1.03 g/L มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.92 g/L (รูปที่ 4.4) และได้ %PHB Content 20.95% (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.4 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพีเอชบี (g/L) ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและ ammonium sulphate อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1, 20:1 และ 12:1 ตามลำดับ โดย a, b และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของ CDW และปริมาณพีเอชบี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดง %PHB Content ที่ได้จากการผลิตพีเอชบีในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและ ammonium sulphate อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1, 20:1 และ 12:1 ตามลำดับ โดย a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ ในอาหาร MSM มีน้ำหนักเซลล์แห้งที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 20:1 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด แต่เมื่อพิจารณาปริมาณพีเอชบีของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของ 32:1 และ 20:1 พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณพีเอชบีที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 12:1 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 20:1 มีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพีเอชบีมากที่สุด จึงสามารถสรุปได้ว่าอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและ ammonium sulphate โดยมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1 ให้ปริมาณพีเอชบีมากที่สุด สามารถผลิตพีเอชบีได้ 1.03 g/L มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.92 g/L และได้ %PHB Content 20.95%

จากผลการทดลองการหาอัตราส่วนคาร์บอนในการผลิตพีเอชบี โดยการเติม ammonium sulphate เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์จากน้ำหนักเซลล์แห้งมีการเจริญเติบโตมากกว่าการสะสมปริมาณพีเอชบี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dslsasso et al. (2019) ที่ใช้น้ำกากส่าและกากน้ำตาลในการผลิตพีเอชบี โดยใช้ *Cupriavidus necator* ที่มีการตั้งสมมติฐานของงานวิจัยว่ากากน้ำตาลอาจมีไนโตรเจนเพียงพอที่จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ โดยเมื่อปริมาณไนโตรเจนมาก NADPH ที่เกิดขึ้นในกระบวนการสะสมคาร์บอนโดยผ่านวิถี Entner-Doudoroff จะถูกใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่เมื่อปริมาณไนโตรเจนถูกจำกัด NADPH จะถูกใช้ในการผลิตพีเอชบีแทน ซึ่งในโครงงานพิเศษนี้ได้มีการเติม ammonium sulphate เพิ่มลงไปในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล ซึ่งอาจทำให้มีปริมาณไนโตรเจนมากเกินไป จึงทำให้ NADPH ถูกใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งมีการเจริญเติบโตมากกว่าการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

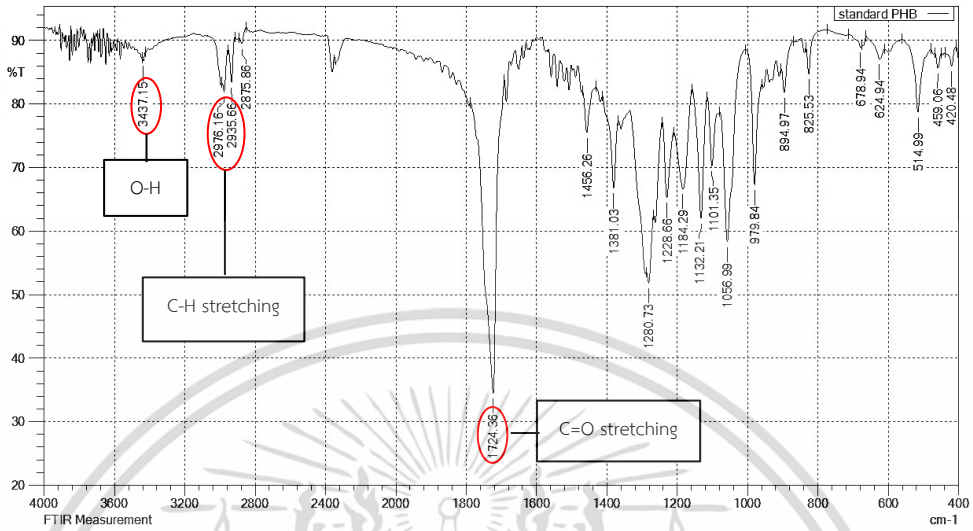
สะสมปริมาณพีเอชบี และเมื่อนำผลการทดลองอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 20:1 ของโครงงานพิเศษนี้มาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Faccin et al. (2009) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตพีเอชบีโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและมี ammonium sulphate เป็นแหล่งไนโตรเจน (sucrose 16 g/L ammonium sulphate 2 g/L) โดยที่ sucrose 16 g/L มีปริมาณคาร์บอน 6.72 g/L และ ammonium sulphate 2 g/L มีปริมาณไนโตรเจน 0.42 g/L โดยจากผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพีเอชบี เท่ากับ 16:1 ซึ่งไม่สอดคล้องกับโครงงานพิเศษนี้ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 20:1 โดยมีปริมาณคาร์บอน 12.485 g/L และมีปริมาณไนโตรเจน 0.60 g/L แต่ในโครงงานพิเศษนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ สมคิด และ อรุณี (2554) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีโดยใช้เชื้อ *Exiguobacterium* sp. WT24 เลี้ยงในอาหาร Medium 2 ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 1 g/L, Na_2HPO_4 2.5 g/L แล้วทำการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตพีเอชบี โดยการนำอาหาร Medium 2 มาเติมแหล่งคาร์บอนที่เป็นของเหลือทิ้งชนิดต่างๆ คือ กากน้ำตาล, น้ำแป้งข้าวโพด, หางน้ำนม, น้ำมันพืชที่ใช้แล้ว, น้ำทิ้งจากโรงอาหารกลางมหาวิทยาลัยแม่โจ้, กลีเซอรอล และสารละลายน้ำตาลจากการไฮโดรไลซิสฟางข้าว โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเท่ากับ 10 g/L และใช้ Urea 10 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 1:1 จากการทดลองพบว่ากากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นจึงนำกากน้ำตาลมาทำการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพีเอชบี โดยการนำอาหาร Medium 2 ที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 10 g/L และเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ Urea, ammonium sulphate และ yeast extract โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดเท่ากับ 10 g/L โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 1:1 จากการทดลองพบว่า ammonium sulphate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งเมื่อทราบแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดแล้ว จึงได้ศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพีเอชบี โดยนำกากน้ำตาลและ ammonium sulphate มาใช้ โดยกำหนดให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 1:1, 10:1, 20:1 และ 30:1 จากการทดลองพบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 20:1 เป็นอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพีเอชบี ซึ่งเป็นอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่สอดคล้องกับโครงงานพิเศษนี้

4.4 การวิเคราะห์โครงสร้างจากหมู่ฟังก์ชั่นด้วยเทคนิค FT-IR

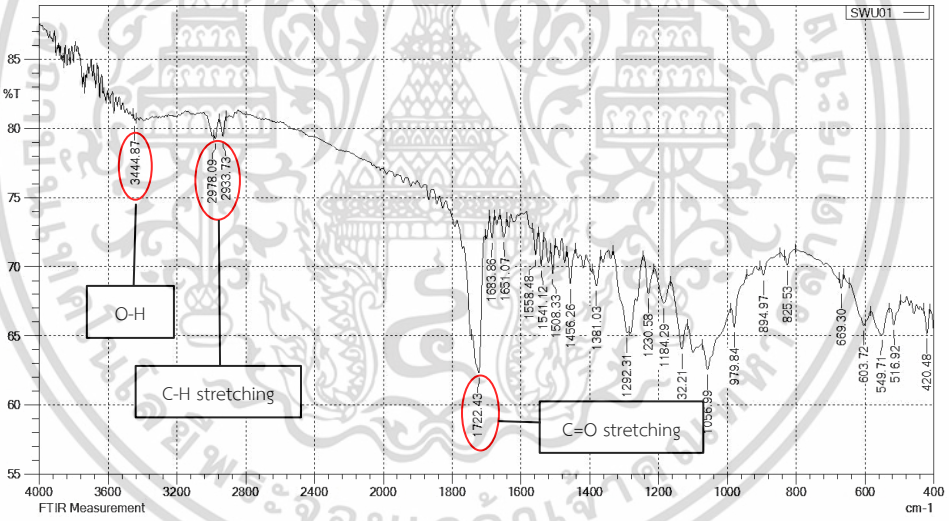
จากการนำตัวอย่างพีเอชบีที่สกัดได้หลังจากการสกัดด้วย Sodium hypochlorite มาวิเคราะห์โครงสร้างจากหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) ที่ช่วงเลขคลื่นที่ 4000 - 400 cm^{-1} เพื่อเป็นการยืนยันโครงสร้างของพีเอชบี โดยทำการเปรียบเทียบกับพีเอชบีมาตรฐาน ซึ่งจะพบหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญของพีเอชบีมาตรฐาน ได้แก่ หมู่ฟังก์ชัน C=O stretching ที่ช่วงเลขคลื่น 1724.36 cm^{-1}, O-H ที่ช่วงเลขคลื่น 3437.15 cm^{-1} และ C-H stretching ที่ช่วงเลขคลื่น 2976.16-2935.66 cm^{-1} แสดงดังรูปที่ 4.6 แต่จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของตัวอย่างพีเอชบีที่สกัดได้จะพบหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ ได้แก่ C=O stretching ที่ช่วงเลขคลื่น 1722.43 cm^{-1}, หมู่ฟังก์ชัน C-H stretching ที่ช่วงเลขคลื่น 2978.09-2933.73 cm^{-1} และหมู่ฟังก์ชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้นำเนื้อหาไปเผยแพร่ต่อ

O-H ที่ช่วงเลขคลื่น 3444.87 cm^{-1} แสดงดังรูปที่ 4.7 ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันที่ใกล้เคียงกับพีเอชบีมาตรฐาน จึงสามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างพีเอชบีที่สกัดได้เป็นพีเอชบี



รูปที่ 4.6 สเปกตรัมของพีเอชบีมาตรฐาน ช่วงเลขคลื่นที่ 4000-400 cm^{-1}



รูปที่ 4.7 สเปกตรัมของตัวอย่างพีเอชบีที่สกัดได้ ช่วงเลขคลื่นที่ 4000-400 cm^{-1}

จากผลการทดลองตัวอย่างพีเอชบีที่สกัดได้มีหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญใกล้เคียงกับพีเอชบีที่สกัดได้จากงานวิจัยของอนุตรา และคณะ (2560) ได้แก่ หมู่ฟังก์ชัน C=O stretching ที่ช่วงเลขคลื่น 1730.15 cm^{-1}, O-H 3439.08 cm^{-1} และ C-H stretching ที่ช่วงเลขคลื่น 2981.95-2935.66 cm^{-1} และตัวอย่างพีเอชบีที่สกัดได้อาจมีพีคอื่นแทรกมาเนื่องจากขั้นตอนการสกัดพีเอชบีไม่บริสุทธิ์พอ และมี Background ที่กว้างกว่าเมื่อเทียบกับของพีเอชบีมาตรฐาน ซึ่งอาจเกิดจากการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ดี ทำให้ IR ที่ส่องผ่านตัวอย่างนั้นเจอทั้งส่วนที่ใสและขุ่น จึงทำให้เกิดการรบกวนจากส่วนที่ขุ่น ซึ่งทำให้ Background ของพีเอชบีที่สกัดได้เกิดพีคและจุดบอดที่เป็นส่วนเสริมในช่วงคลื่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีโดยเชื้อ *Bacillus megaterium* SWU01 ในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลที่มีปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L, 12.485 g/L และ 24.970 g/L และทำการปรับปริมาณไนโตรเจนในอาหารด้วย ammonium sulphate โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 20:1 พบว่าอาหาร MSM ที่มีปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L สามารถผลิตพีเอชบีได้มากที่สุด และได้นำปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L มาหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบีในอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและ ammonium sulphate โดยมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1 20:1 และ 12:1 พบว่าอาหาร MSM ที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและ ammonium sulphate ที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1 สามารถผลิตพีเอชบีได้มากที่สุด 1.03 g/L มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.92 g/L และได้นำตัวอย่างพีเอชบีที่สกัดได้มาวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FT-IR พบว่าตัวอย่างพีเอชบีที่สกัดได้มีหมู่ฟังก์ชันที่ใกล้เคียงกับพีเอชบีมาตรฐาน จึงสามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างพีเอชบีที่สกัดได้เป็นพีเอชบี

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดลองหาวิธีการสกัดพีเอชบีเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มคุณภาพของพีเอชบีที่สกัดได้
2. ควรใช้ biomass ชนิดอื่นเพื่อไม่ให้เกิดตะกอนในอาหารที่ทำการเลี้ยงเชื้อ
3. ควรเปลี่ยนการปั่นเหวี่ยงเซลล์เป็นการกรองเซลล์ เพื่อให้เซลล์แห้งและลดความคลาดเคลื่อนของผลน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กตัญญู ชูกลิ่น, กนกพรรณ อนันต์สกุลชัย และปาณิสรา ลี้เทียน. 2560. “การผลิตโพลีไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ *Bacillus megaterium* บนอาหารแข็ง.” ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต. ภาควิชาเคมีสิ่งแวดล้อม. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กรมควบคุมมลพิษ. 2563. **การจัดการขยะพลาสติก พ.ศ.2561 – 2573.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : https://www.pcd.go.th

บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2523. “การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์เพื่อหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลและน้ำอ้อย.” ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พืชเกษตร. 2560. **กากน้ำตาล ประโยชน์ และวิธีการทำกากน้ำตาล**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : https://puechkaset.com

แพรวสุภา เหล่าศิริ. 2562. “การพัฒนากระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตในแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง.” ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเคมี. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

ภัคจิรัตน์ สิงหะบุตร, พรรณี อภิวันท์, ผกากรอง ปั้นทอง และภัทรพงษ์ เกริกสกุล. 2564. “การผลิตพลาสติกชีวภาพจากกล้วยโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน.” *แก่นเกษตร* 49(3) : 668-678

เมทินี อมรชัยสิน. 2561. “การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในรูปโฮโมพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์จากแบคทีเรีย *Alcaligenes latus*.” ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยบูรพา.

วิสันต์ เชื้อวงศ์. 2561. “การคัดแยกและการระบุชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีจากตะกอนโรงงานทูน่ากระป๋องและการเพิ่มการผลิตพีเอชบีโดยใช้ของเสียชีวภาพ.” ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเคมี. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมคิด ดีจริง และอรุณี ดงดี. 2554. “การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทจากของเหลือทิ้งเพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพ.” สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

อนุตรา แสนนอก, อภิสิทธิ์ วารินทร์ และอาภาภรณ์ คำบุฟผา. 2560. “การผลิตโพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต ของเชื้อ *Bacillus sp.* โดยใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน.” ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต. ภาควิชาเคมีสิ่งแวดล้อม. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Ai, H., Liu, M., Yu, P., Zhang, S., Luo, P., Li, S. and Wang, J. 2015. **“**Improved welan gum production by *Alcaligenes sp*. ATCC31555 frompretreated cane molasses**.”** *Carbohydrate Polymers*. 87 : 1363–1368

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Choi, J. and Lee, SY. 1997. "Structural identification of polyhydroxyalkanoic acid (PHA) containing 4-hydroxyalkanoic acids by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and its application to bacteriascreening." *Biotechnology Techniques*, 11(3) : 167-170.

Chuavong, W. Ponprateep, S. Ajawatanawong, P. and Vatanavicharn, T. 2022. "Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by Novel Bacillus megaterium SWU01 Isolate from Active Sludge." Chiang Mai J. Sci. 49(6) : 1483-1499

Dslsasso, R.R. Pavan, A.F. Bordignon, E.S. Aragão, F.M.G and Poletto, P. 2019. "Polyhydroxybutyrate (PHB) production by Cupriavidus necator from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate." *Process Biochemistry*. 85 : 12-18

Das, S., Majumder, A., Shukla, V., Suhazsini, P. and Radha, P. 2018. "Biosynthesis of Poly(3)-hydroxybutyrate) from Cheese Whey by *Bacillus megaterium* NCIM 5472." *Journal of Polymers and the Environmen*. 26 : 4176–4187

Faccin, DJL., Martins, I., Cardozo, N. and Rech, R. 2009. "Optimization of C:N ratio and Minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*." *J Chem Technol Biotechnol*. 84 : 1756 – 1761

Gouda, K.M. Swellam, E.A. Sanaa and Omar, H.S. 2001. "Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources." *Microbiol. Res*. 156 : 201–207

Hahn, SK. Chang, YK. Kim, BS. and Chang, HN. 1994. "Optimization of microbial poly -3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform." *Biotechnology and Bioengineering*, 44 : 256-261.

Kaynar, P. and Beyatli, Y. 2009. "Determination of poly-b-hydroxybutyrate productionby *Bacillus spp*. isolated from the intestines of various fishes." *Fish Sci*. 75 : 439–443

Law, JH. and Slepecky, RA. 1960. "Assay of poly-β-hydroxybutyrate acid." *Journal of Bacteriology*. 82(1) : 33-36.

Mangwanda, T., Johnson, J., Mani, J. and Jackson, S. 2021. "Processes, Challenges and Optimisation of Rum Production from Molasses." *Fermentation.* 7 : 2-21

Merck Millipore. 2023. **IR Spectrum Table & Chart.** [Online]. Available : https://www.sigmaaldrich.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Obruca, S., Petrik, S., Benesova, P., Svobada, Z., Eremka, L. and Marova, I. 2014. "Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates." *Appl Microbiol Biotechnol.* 98 : 5883–5890

Olbrich, H. 2006. "The Molasses." *Biotechnologie-Kempe GmbH.* : 6-7

Prangtong, J. Somyoonsap, P. Samsorn, S. Chansiri, K. and Sriyapai, T. 2014. **Isolation and production by polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacterial from soil.** [Online]. Available : https://tsb2014.mfu.ac.th

Saratale, G.R. Saratale, D.G. Cho, K.S. Kim, S.D. Ghodake, S.G. Kadama, A. Kumar, G. Bharagava, N.R. Banu, R. and Shin, S.H. 2019. "Pretreatment of kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*) biomass feedstock for polyhydroxybutyrate (PHB) production and characterization." *Bioresource Technology*. 282 : 75-80

Singh, S. and Parmar, S., 2011. "Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate (PHB)-producing bacteria." *J. Biotechnol*. 10 : 4907–4919.

Zhang, Y. Sun, W. Wang, H. and Geng, A. 2013. "Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11." *Bioresource Technology*. 147 : 307-314

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหาร NA

ประกอบด้วยอาหาร NA 23 g แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 mL จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปเทลงเพลท โดยในขั้นตอนการเทลงเพลทนั้นต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

2. อาหาร NB

ประกอบด้วยอาหาร NB 13 g แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 mL จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียมกากน้ำตาลเจือจาง 10 เท่า

ตวงกากน้ำตาลให้ได้ปริมาตร 100 mL นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 900 mL จากนั้นใช้แท่งแก้วคนสารคนให้กากน้ำตาลและน้ำกลั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

4. อาหาร MSM (Mineral Salt Medium)

4.1 MSM ประกอบด้วย

KH_2PO_4	1.50	g/L
$Na_2HPO_4.12H_2O$	9.00	g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0.20	g/L
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	g/L
Citric acid	0.10	g/L
1000X trace elements	1.00	mL/L

4.2 1000X trace elements ประกอบด้วย

$FeSO_4.7H_2O$	20.00	g/L
$MnCl_2.4H_2O$	0.03	g/L
H_3BO_4	0.30	g/L
$CuSO_4.5H_2O$	0.01	g/L
$CoCl_2.6H_2O$	0.20	g/L
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.H_2O$	0.03	g/L
$ZnSO_4.7H_2O$	0.03	g/L
$NiSO_4.7H_2O$	0.03	g/L

โดยจะทำการใส่กากน้ำตาลเจือจางและ ammonium sulphate ตามที่คำนวณดังตารางที่ 3.1 และ 3.2 จากนั้น จะนำไปปรับ pH ให้เป็น 7 แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

110 °C เป็นเวลา 20 นาที รอให้เย็น แล้วเติม trace elements และ $MgSO_4.7H_2O$ ที่ผ่านการกรองด้วย filter 0.45 µm ทีหลังเพื่อป้องกันการตกตะกอน

5. สารละลาย Sudan Black B 0.5%

ชั่งสีย้อม Sudan Black B 0.125 g ละลายใน 95% Ethanol 25 mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ปริมาณคาร์บอนและปริมาณไนโตรเจนในกากน้ำตาล

ปริมาณคาร์บอนและปริมาณไนโตรเจนของกากน้ำตาลที่ได้จากการส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังด้วยเครื่อง CHNS/O analyzer มีผลที่ได้เป็น %w/w

EagerSmart Summarize Results

Date : 10/03/2022 at 13:24:52
Method Name : CHNS
Method Filename : CHNS.mth

Group No : 1 Sample Name	Element % Nitrogen	Carbon	Hydrogen	Sulphur
65_032 Sample_2	1.023798943	31.52929115	6.314702034	0.5403372049
65_032 Sample_3	1.026977658	31.56938553	6.302334785	0.5434111357

2 Sample(s) in Group No : 1

Component Name	Average	Std. Dev.	% Rel. S. D.	Variance
Nitrogen	1.0253883	0.00225	0.2192	0.0000
Carbon	31.54933834	0.02835	0.0899	0.0008
Hydrogen	6.30851841	0.00874	0.1386	0.0001
Sulphur	0.5418741703	0.00217	0.4011	0.0000

รูปภาคผนวก ข-1 แสดงผลวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนด้วยเครื่อง CHNS/O analyzer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

คำนวณปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

1. คำนวณปริมาณคาร์บอน

ในงานวิจัยก่อนหน้าพบว่ามีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 8:1 (Sucrose 16 g/L และ ammonium sulphate 2 g/L) (Faccin et at., 2009) โดยที่ Sucrose 16 g/L มีปริมาณคาร์บอน 6.72 g/L และ ammonium sulphate 2 g/L มีปริมาณไนโตรเจน 0.42 g/L จึงได้คำนวณปริมาณคาร์บอนของกากน้ำตาลให้มีปริมาณคาร์บอน 3.36 g/L, 6.72 g/L และ 13.44 g/L และใช้ ammonium sulphate ปรับปริมาณไนโตรเจน โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 16:1 ซึ่งปริมาณคาร์บอนของกากน้ำตาลที่ได้จากการส่งวิเคราะห์มีผลที่ได้เป็น %w/w โดยมี Carbon Content ของกากน้ำตาลเท่ากับ 320 g/L และมี Nitrogen Content ของกากน้ำตาลเท่ากับ 10 g/L แต่ในการคำนวณมีความผิดพลาดที่ได้คำนวณเป็น %w/v โดยมีปริมาณกากน้ำตาลและ ammonium sulphate ดังตารางที่ ค-1

ตารางที่ ค-1 หาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม (โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 16:1)

ปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน	ปริมาณกากน้ำตาลที่เจือจาง 10 เท่า (mL/L)	ammonium sulphate (g/L)
3.36 g/L : 0.21 g/L	105.0	0.5
6.72 g/L : 0.42 g/L	210.0	1.0
13.44 g/L : 0.84 g/L	420.0	2.0

จึงได้คำนวณปริมาณคาร์บอนของปริมาณกากน้ำตาลอีกครั้ง เพื่อเปลี่ยนกากน้ำตาลจาก %w/v ให้เป็น %w/w ซึ่งใช้ความหนาแน่นของกากน้ำตาลในการคำนวณ โดยทำการชั่งกากน้ำตาลปริมาตร 100 mL ได้ค่าเท่ากับ 185.79 g แล้วนำมาหาความหนาแน่นของกากน้ำตาล

จากสูตร $$D = \frac{m}{V}$$

$$D = \frac{185.79\ g}{100\ mL}$$

$$D = 1.8579\ g/mL$$

เมื่อได้ความหนาแน่นของกากน้ำตาลแล้ว จึงนำมาคำนวณหามวลของกากน้ำตาลที่เจือจาง 10 เท่า เพื่อหาปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อไป โดยในการเจือจางกากน้ำตาล 10 เท่า

1. ถ้าเจือจางกากน้ำตาลให้มีปริมาณ 1000 mL จะมีกากน้ำตาล 100 mL
   นำปริมาณกากน้ำตาลที่เจือจางมาใช้ 105 mL จะมีกากน้ำตาล $\frac{(105\ mL)(100\ mL)}{1000\ mL} = 10.5\ mL$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นกากน้ำตาล 10.5 mL มีมวลเท่ากับ (10.5 mL)(1.8579 g/mL) = 19.50795 g

แล้วนำมาคำนวณ Carbon content ของกากน้ำตาล

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$(320\ g/L)(19.50795\ g) = C_2(1000\ g)$

$$C_2 = \frac{(320\ g/L)(19.50795\ g)}{1000\ g}$$

$C_2 = 6.243\ g/L$

คำนวณ Nitrogen content ของกากน้ำตาล

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$(10\ g/L)(19.50795\ g) = C_2(1000\ g)$

$$C_2 = \frac{(10\ g/L)(19.50795\ g)}{1000\ g}$$

$C_2 = 0.195\ g/L$

และนำมาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน โดยปริมาณไนโตรเจน คือ Nitrogen content ของกากน้ำตาลรวมกับ Nitrogen content ของ ammonium sulphate 0.5 g

โดยปริมาณไนโตรเจน = 0.195 g/L + 0.105 g/L = 0.30 g/L

ดังนั้นกากน้ำตาล 19.51 g มีปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L ปริมาณไนโตรเจน 0.30 g/L และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1

2. ถ้าเจือจางกากน้ำตาลให้มีปริมาณ 1000 mL จะมีกากน้ำตาล 100 mL

นำปริมาณกากน้ำตาลที่เจือจางมาใช้ 210 mL จะมีกากน้ำตาล $\frac{(210\ mL)(100\ mL)}{1000\ mL} = 21\ mL$

ดังนั้นกากน้ำตาล 21 mL มีมวลเท่ากับ (21 mL)(1.8579 g/mL) = 39.0159 g

แล้วนำมาคำนวณ Carbon content ของกากน้ำตาล

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$(320\ g/L)(39.0159\ g) = C_2(1000\ g)$

$$C_2 = \frac{(320\ g/L)(39.0159\ g)}{1000\ g}$$

$C_2 = 12.485088\ g/L$

คำนวณ Nitrogen content ของกากน้ำตาล

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$(10\ g/L)(39.0159\ g) = C_2(1000\ g)$

$$C_2 = \frac{(10\ g/L)(39.0159\ g)}{1000\ g}$$

$C_2 = 0.390\ g/L$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และนำมาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน โดยปริมาณไนโตรเจน คือ Nitrogen content ของกากน้ำตาลรวมกับ Nitrogen content ของ ammonium sulphate 1.0 g

โดยปริมาณไนโตรเจน = 0.390 g/L + 0.210 g/L = 0.60 g/L

ดังนั้นกากน้ำตาล 39.01 g มีปริมาณคาร์บอน 12.485 g/L ปริมาณไนโตรเจน 0.60 g/L และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1

3. ถ้าเจือจางกากน้ำตาลให้มีปริมาณ 1000 mL จะมีกากน้ำตาล 100 mL

นำปริมาณกากน้ำตาลที่เจือจางมาใช้ 420 mL จะมีกากน้ำตาล $\frac{(420\ mL)(100\ mL)}{1000\ mL} = 42\ mL$

ดังนั้นกากน้ำตาล 42 mL มีมวลเท่ากับ (42 mL)(1.8579 g/mL) = 78.0318 g

แล้วนำมาคำนวณ Carbon content ของกากน้ำตาล

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$(320\ g/L)(78.0318\ g) = C_2(1000\ g)$

$C_2 = \frac{(320\ g/L)(78.0318\ g)}{1000\ g}$

$C_2 = 24.970\ g/L$

คำนวณ Nitrogen content ของกากน้ำตาล

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$(10\ g/L)(78.0318\ g) = C_2(1000\ g)$

$C_2 = \frac{(10\ g/L)(78.0318\ g)}{1000\ g}$

$C_2 = 0.780\ g/L$

และนำมาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน โดยปริมาณไนโตรเจน คือ Nitrogen content ของกากน้ำตาลรวมกับ Nitrogen content ของ ammonium sulphate 2.0 g

โดยปริมาณไนโตรเจน = 0.780 g/L + 0.420 g/L = 1.20 g/L

ดังนั้นกากน้ำตาล 78.03 g มีปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L ปริมาณไนโตรเจน 1.20 g/L และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1

2. คำนวณอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ทำการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบีโดยใช้ ammonium sulphate เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้ปริมาณคาร์บอนที่ดีที่สุดจากการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี คือ 24.970 g/L มาคำนวณหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ซึ่งหาได้จากปริมาณไนโตรเจนที่รวมกับ Nitrogen content ของ ammonium sulphate โดยจากเดิมที่การคำนวณมี

เอกสารนี้ ผลิตพีเอชบี ให้คำนวณ ให้คำนวณหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ไม่ว่ากรณีใดๆ ให้คำนวณ ให้คำนวณ

ความผิดพลาดที่ได้คำนวณเป็น %w/v ทำให้จะเติม ammonium sulphate 0 g/L, 2.0 g/L และ 6.0 g/L ตามลำดับ

โดยถ้าเจือจางกากน้ำตาลให้มีปริมาณ 1000 mL จะมีกากน้ำตาล 100 mL

นำปริมาณกากน้ำตาลที่เจือจางมาใช้ 420 mL จะมีกากน้ำตาล (420 mL)(100 mL) = 42 mL
1000 mL

ดังนั้นกากน้ำตาล 42 mL มีมวลเท่ากับ (42 mL)(1.8579 g/mL) = 78.0318 g

แล้วนำมาคำนวณ Carbon content ของกากน้ำตาล

จากสูตร $C1V1 = C2V2$

$(320\ g/L)(78.0318\ g) = C2\ (1000\ g)$

$C2 = \frac{(320\ g/L)(78.0318\ g)}{1000\ g}$

$C2 = 24.970\ g/L$

คำนวณ Nitrogen content ของกากน้ำตาล

จากสูตร $C1V1 = C2V2$

$(10\ g/L)(78.0318\ g) = C2\ (1000\ g)$

$C2 = \frac{(10\ g/L)(78.0318\ g)}{1000\ g}$

$C2 = 0.780\ g/L$

1. นำมาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน โดยปริมาณไนโตรเจน คือ Nitrogen content ของกากน้ำตาลรวมกับ Nitrogen content ของ ammonium sulphate 0 g

   โดยปริมาณไนโตรเจน = 0.780 g/L + 0 g/L = 0.780 g/L

   ดังนั้นปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L มีปริมาณไนโตรเจน 0.780 g/L และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1

2. นำมาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน โดยปริมาณไนโตรเจน คือ Nitrogen content ของกากน้ำตาลรวมกับ Nitrogen content ของ ammonium sulphate 2.0 g

   โดยปริมาณไนโตรเจน = 0.780 g/L + 0.42 g/L = 1.200 g/L

   ดังนั้นปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L มีปริมาณไนโตรเจน 1.200 g/L และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1

3. นำมาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน โดยปริมาณไนโตรเจน คือ Nitrogen content ของกากน้ำตาลรวมกับ Nitrogen content ของ ammonium sulphate 6.0 g

   โดยปริมาณไนโตรเจน = 0.780 g/L + 0.1.26 g/L = 2.010 g/L

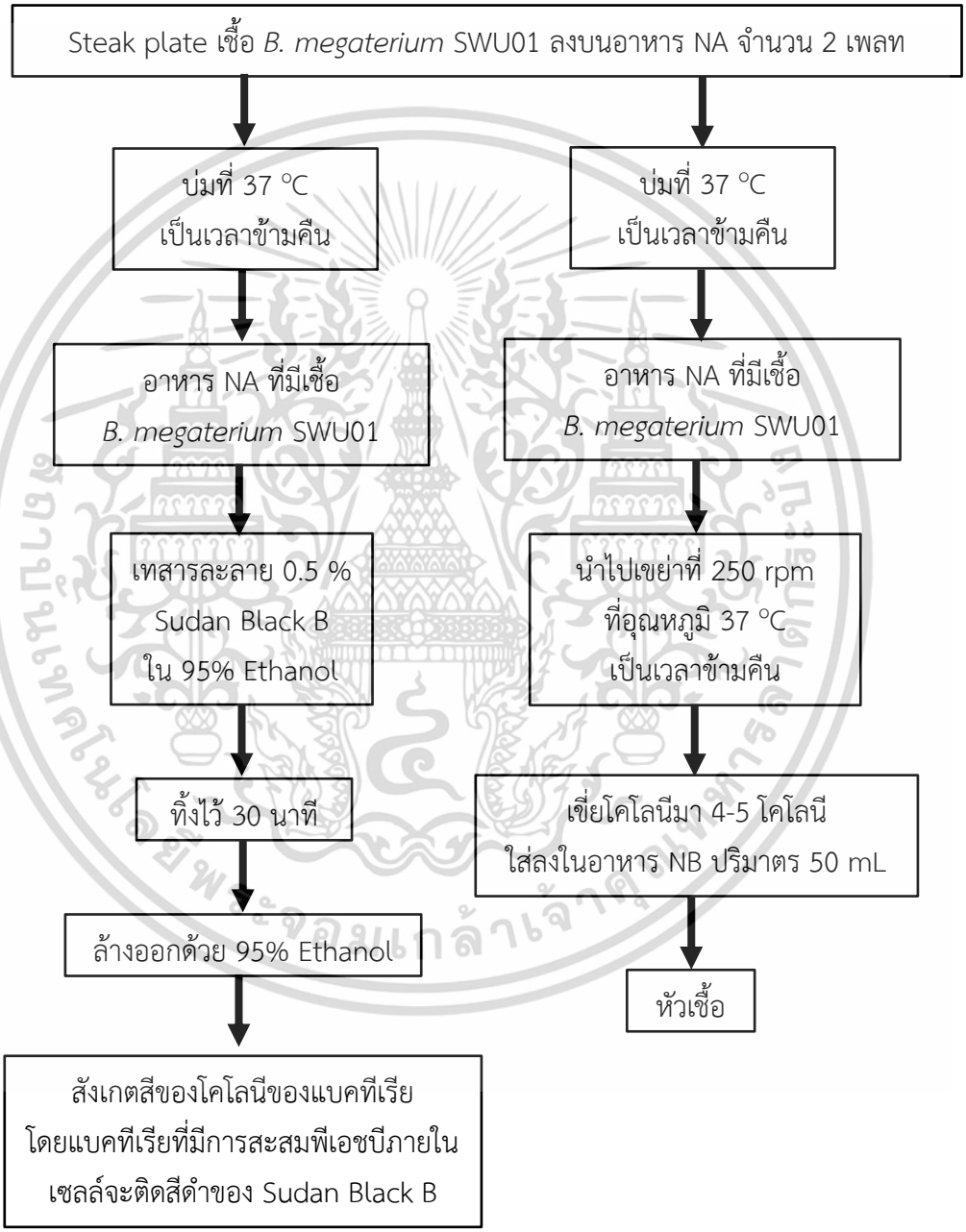
   ดังนั้นปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L มีปริมาณไนโตรเจน 2.010 g/L และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 12:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

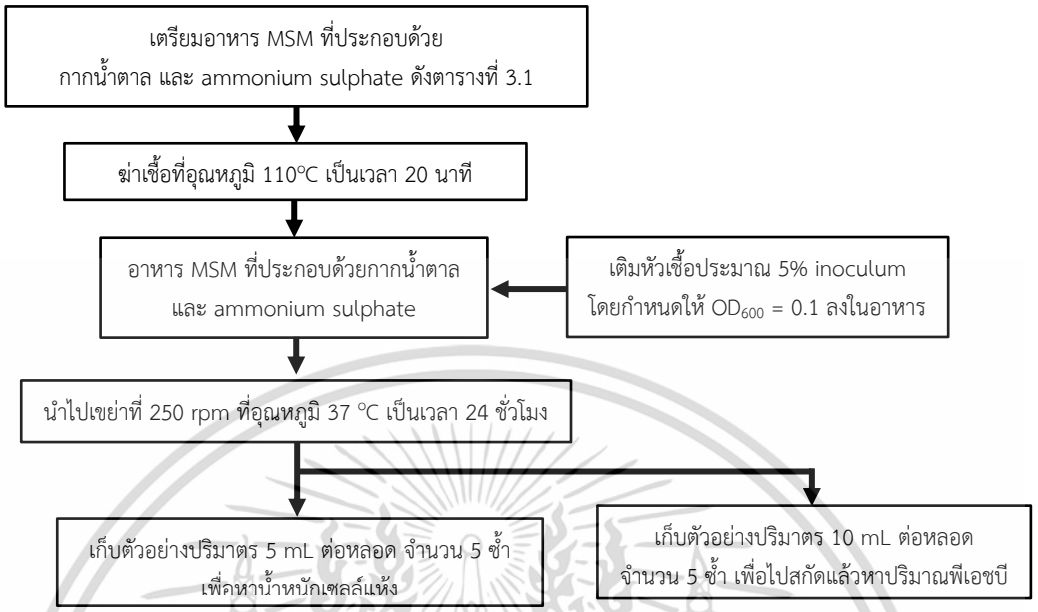
ผังการดำเนินงาน

1. ตรวจสอบการผลิตและสะสมพีเอชบีของเชื้อ *Bacillus megaterium* SWU01 และนำมาเตรียมหัวเชื้อ

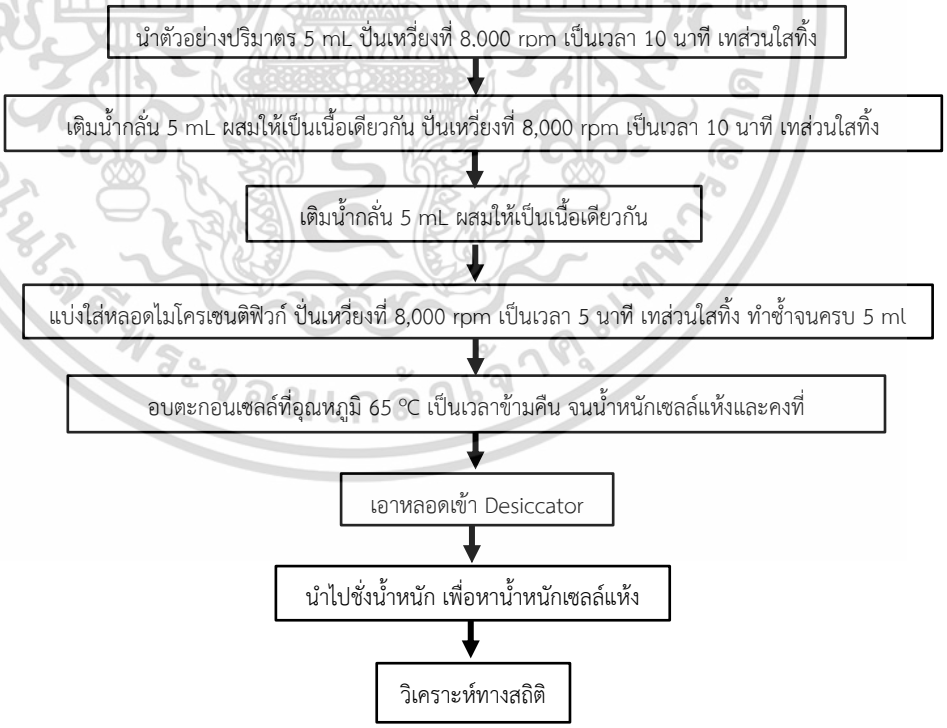


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี

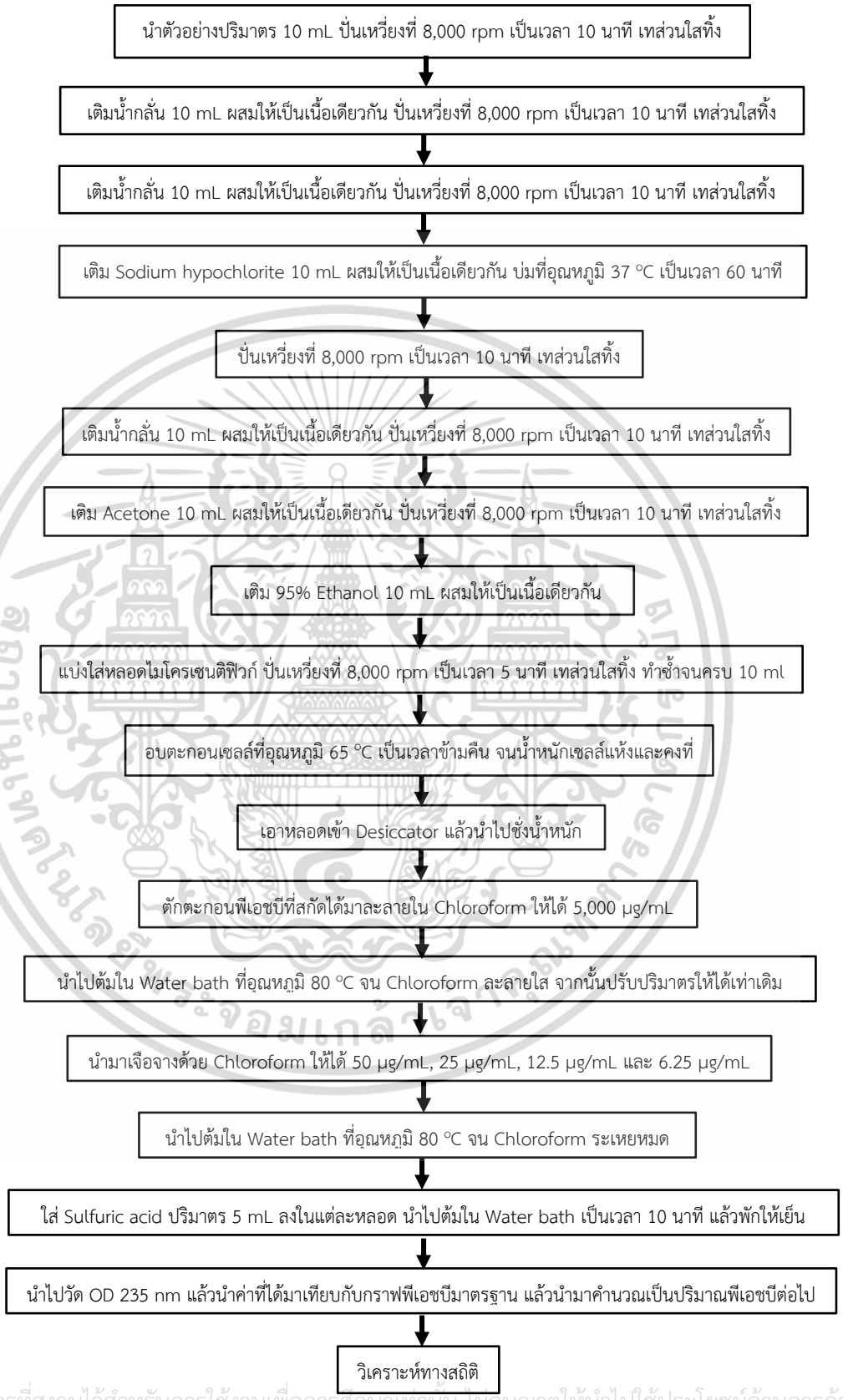


2.1 หาน้ำหนักเซลล์แห้ง



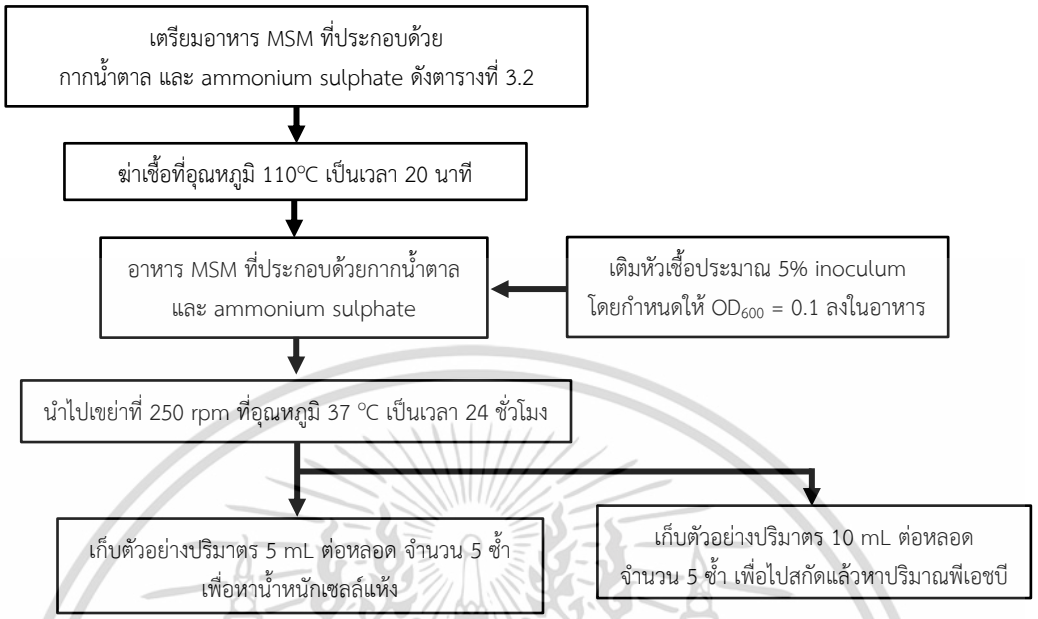
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การสกัดพีเอชบีและหาปริมาณพีเอชบี

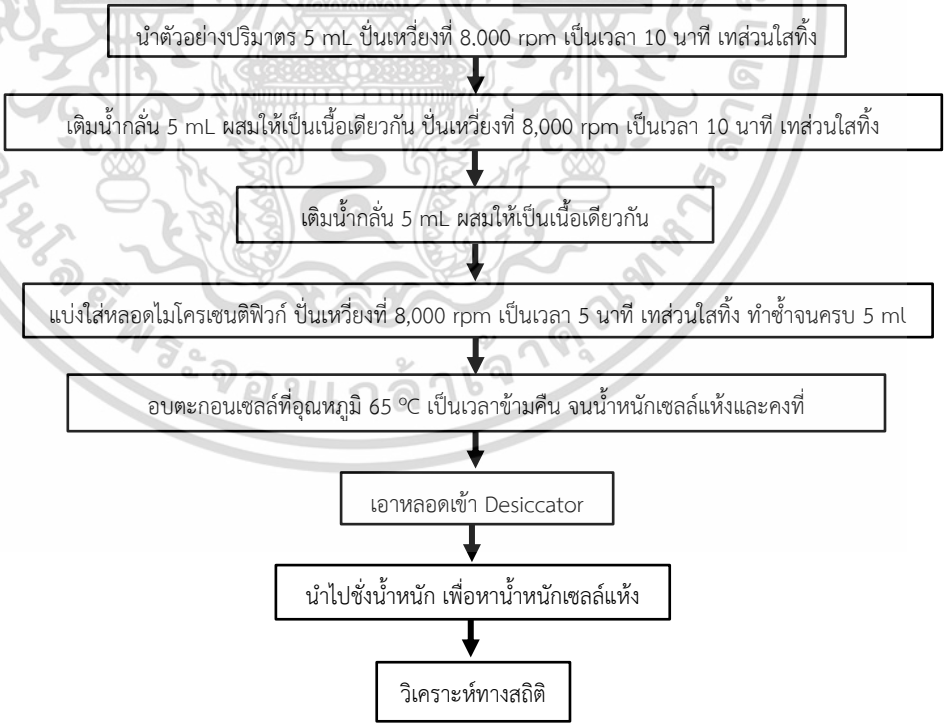


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี

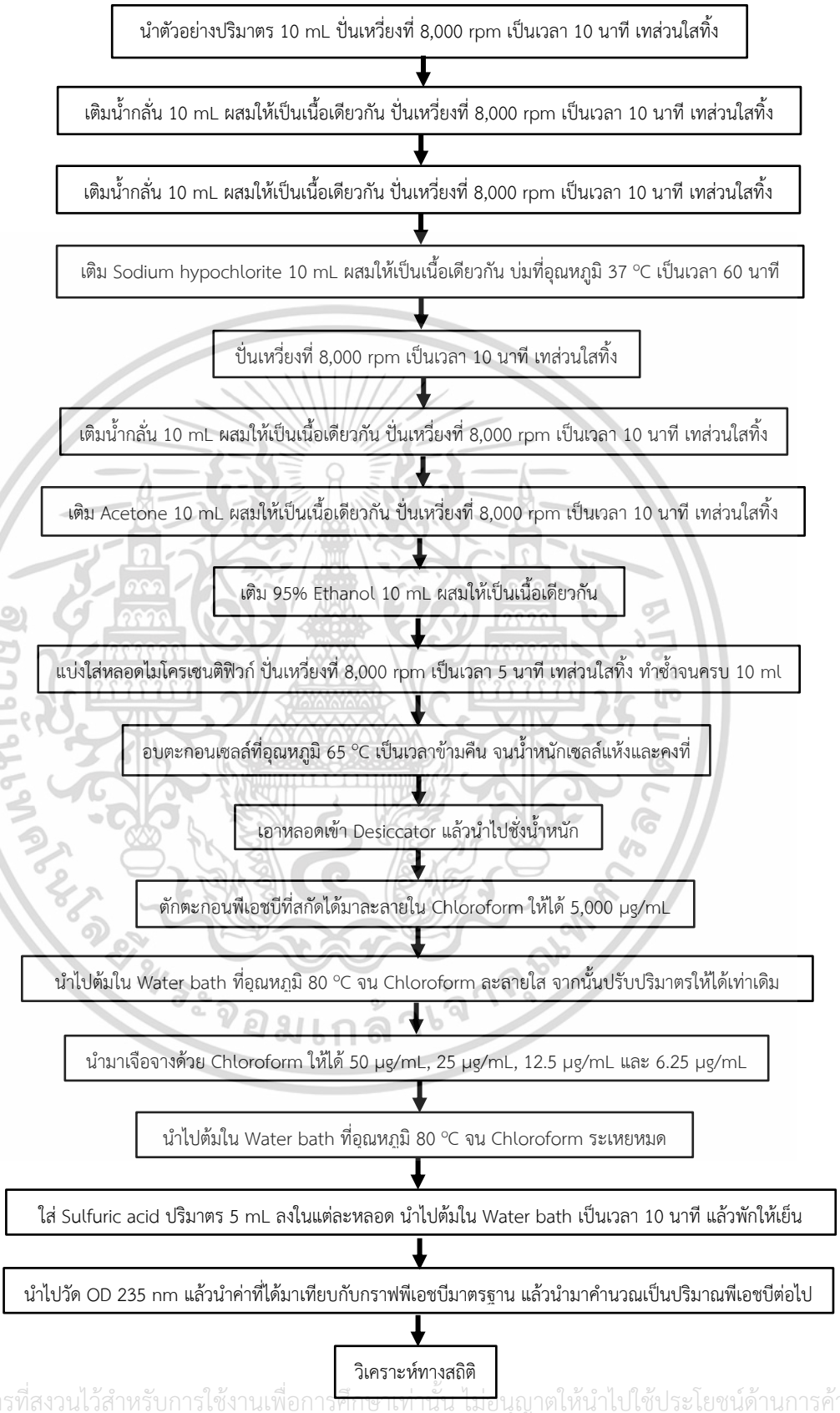


3.1 หาน้ำหนักเซลล์แห้ง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การสกัดพีเอชบีและหาปริมาณพีเอชบี



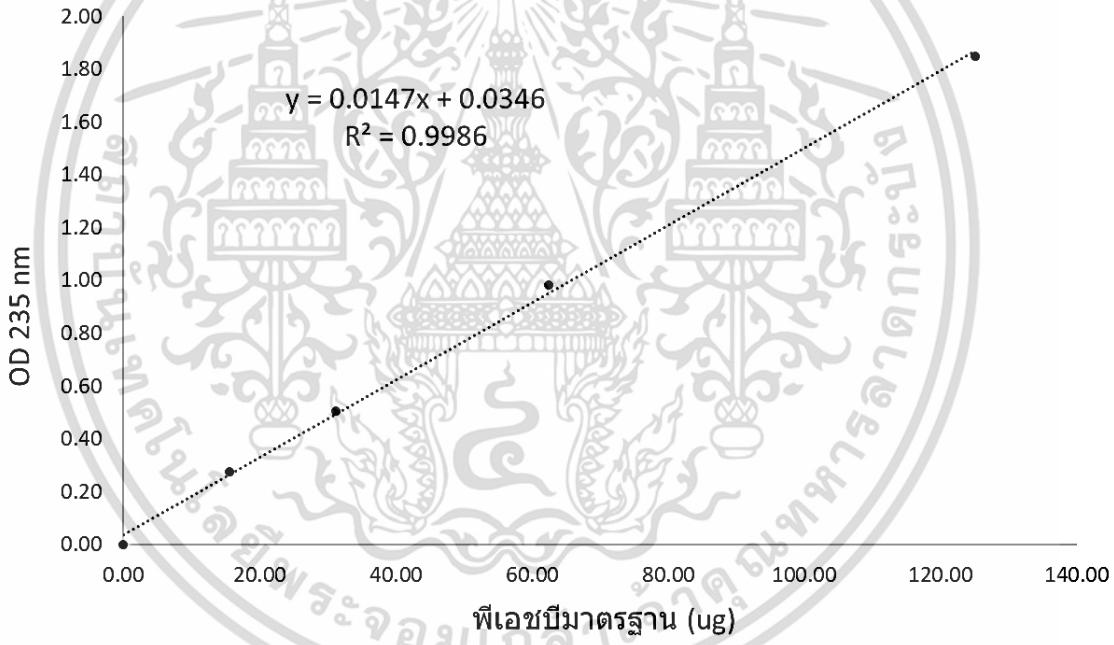
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การเตรียมกราฟมาตรฐานของพีเอชบี

การเตรียมกราฟมาตรฐานของพีเอชบี

เตรียมสารละลายพีเอชบีมาตรฐานโดยชั่งพีเอชบีมาตรฐานมาละลายด้วย Chloroform ในหลอดทดลองให้ได้ความเข้มข้น 5,000 µg/mL ปิดหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 °C จน Chloroform ละลายใส จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้เท่าเดิม และนำมาเจือจางด้วย Chloroform ให้ได้ความเข้มข้น 0–25 µg/mL โดยให้แต่ละความเข้มข้นมีปริมาตรสุทธิ 5 mL แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 °C จน Chloroform ระเหยหมด จากนั้นเติม Sulfuric acid ปริมาตร 5 mL แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 °C เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 nm โดยใช้ Sulfuric acid เป็น blank แล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในภาพภาคผนวก ข-1



รูปภาคผนวก จ-1 แสดงกราฟมาตรฐานพีเอชบี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ ฉ-1 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณพีเอชบีเฉลี่ยและ %PHB content ของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี

ปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน	CDW (g/L)	ปริมาณพีเอชบี (g/L)	% PHB content
6.243 g/L : 0.30 g/L	1.03±0.05	0.07±0.01	6.88±0.73
12.485 g/L : 0.60 g/L	3.77±0.06	0.62±0.09	16.47±2.02
24.970 g/L : 1.20 g/L	4.92±0.04	1.03±0.06	20.98±1.12

ตารางที่ ฉ-2 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณพีเอชบีและ %PHB content ของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน	CDW (g/L)	ปริมาณพีเอชบี (g/L)	% PHB content
32:1	4.87±0.05	0.96±0.10	19.75±1.96
20:1	4.92±0.04	1.03±0.06	20.95±1.17
12:1	4.85±0.02	0.86±0.02	17.62±0.41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี โดยใช้อาหาร MSM ที่มีปริมาณคาร์บอนแตกต่างกัน โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 20:1

ตารางที่ ช-1 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	39.949	2	19.975	8416.326	.000
Within Groups	.028	12	.002		
Total	39.978	14			

ตารางที่ ช-2 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	1.032000	.0460435	.0205913	.974829	1.089171	.9600	1.0800
2	5	3.768000	.0593296	.0265330	3.694333	3.841667	3.7000	3.8600
3	5	4.924000	.0384708	.0172047	4.876232	4.971768	4.8800	4.9800
Total	15	3.241333	1.6898430	.4363156	2.305529	4.177137	.9600	4.9800

หมายเหตุ : 1 = ปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L
2 = ปริมาณคาร์บอน 12.485 g/L
3 = ปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ช-3 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม

	Conc.	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Student-Newman-Keuls[a]	1	5	1.032000		
	2	5		3.768000	
	3	5			4.924000
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Tukey HSD[a]	1	5	1.032000		
	2	5		3.768000	
	3	5			4.924000
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Duncan[a]	1	5	1.032000		
	2	5		3.768000	
	3	5			4.924000
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

หมายเหตุ : 1 = ปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L

2 = ปริมาณคาร์บอน 12.485 g/L

3 = ปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณพีเอชบีของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี โดยใช้อาหาร MSM ที่มีปริมาณคาร์บอนแตกต่างกัน โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 20:1

ตารางที่ ช-4 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ของปริมาณพีเอชบีของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.330	2	1.165	306.818	.000
Within Groups	.046	12	.004		
Total	2.375	14			

ตารางที่ ช-5 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณพีเอชบีของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	.071280	.0104863	.0046896	.05826	.084300	.0556	.0807
2	5	.621600	.0857703	.0383576	.51510	.728098	.5318	.7346
3	5	1.03334	.0626428	.028014	.955559	1.11112	.9643	1.0988
Total	15	.575407	.411917	.1063567	.347294	.803519	.0556	1.0988

หมายเหตุ : 1 = ปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L
2 = ปริมาณคาร์บอน 12.485 g/L
3 = ปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ช-6 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณพีเอชบีของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม

	Conc.	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Student-Newman-Keuls[a]	1	5	.071280		
	2	5		.621600	
	3	5			1.033340
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Tukey HSD[a]	1	5	.071280		
	2	5		.621600	
	3	5			1.033340
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Duncan[a]	1	5	.071280		
	2	5		.621600	
	3	5			1.033340
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

หมายเหตุ : 1 = ปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L

2 = ปริมาณคาร์บอน 12.485 g/L

3 = ปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ %PHB Content ของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี โดยใช้อาหาร MSM ที่มีปริมาณคาร์บอนแตกต่างกัน โดยคงอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ที่ 20:1

ตารางที่ ช-7 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ของ %PHB Content ของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	518.564	2	259.282	131.995	.000
Within Groups	23.572	12	1.964		
Total	542.136	14			

ตารางที่ ช-8 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ %PHB Content ของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	6.879700	.7349028	.3286585	5.967198	7.792202	5.7889	7.6103
2	5	16.472640	2.0240040	.9051621	13.959507	18.98577	14.3739	19.0308
3	5	20.979440	1.1208540	.5012612	19.587716	22.37116	19.7607	22.1497
Total	15	14.777260	6.2228609	1.6067358	11.331154	18.223366	5.7889	22.1497

หมายเหตุ : 1 = ปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L
2 = ปริมาณคาร์บอน 12.485 g/L
3 = ปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ช-9 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ %PHB Content ของการหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม

	Conc.	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Student-Newman-Keuls[a]	1	5	6.879700		
	2	5		16.472640	
	3	5			20.979440
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Tukey HSD[a]	1	5	6.879700		
	2	5		16.472640	
	3	5			20.979440
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Duncan[a]	1	5	6.879700		
	2	5		16.472640	
	3	5			20.979440
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

หมายเหตุ : 1 = ปริมาณคาร์บอน 6.243 g/L

2 = ปริมาณคาร์บอน 12.485 g/L

3 = ปริมาณคาร์บอน 24.970 g/L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี โดยใช้อาหาร MSM ที่มีปริมาณ ammonium sulphate แตกต่างกัน

ตารางที่ ช-10 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.016	2	.008	5.788	.017
Within Groups	.017	12	.001		
Total	.033	14			

ตารางที่ ช-11 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	4.86800	.0481664	.0215407	4.808194	4.927806	4.8000	4.9200
2	5	4.92800	.03663318	.0162481	4.882888	4.973112	4.8800	4.9800
3	5	4.85200	.0228035	.0101980	4.823686	4.880314	4.8200	4.8800
Total	15	4.882667	.0483243	.0124773	4.855906	4.909428	4.8000	4.9800

หมายเหตุ : 1 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1
2 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1
3 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 12:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ช-12 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี

	ratio	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Student-Newman-Keuls[a]	3	5	4.852000	
	1	5	4.868000	
	2	5		4.928000
	Sig.		.510	1.000
Tukey HSD[a]	3	5	4.852000	
	1	5	4.868000	4.868000
	2	5		4.928000
	Sig.		.780	.062
Duncan[a]	3	5	4.852000	
	1	5	4.868000	
	2	5		4.928000
	Sig.		.510	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

หมายเหตุ : 1 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1

2 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1

3 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 12:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณพีเอชบีของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี โดยใช้อาหาร MSM ที่มีปริมาณ ammonium sulphate แตกต่างกัน

ตารางที่ ช-13 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ของปริมาณพีเอชบีของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.080	2	.040	8.025	.006
Within Groups	.060	12	.005		
Total	.141	14			

ตารางที่ ช-14 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณพีเอชบีของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	.961980	.1027460	.0459494	.834404	1.08955	.8981	1.1440
2	5	1.03334	.0626428	.0280147	.955559	1.111121	.9643	1.0988
3	5	.855080	.0237779	.0106338	.825556	.884604	.8206	.8788
Total	15	.95133	.1002422	.0258824	.894621	1.005646	.8206	1.1440

หมายเหตุ : 1 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1
2 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1
3 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 12:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ช-15 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณพีเอชบีของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี

	ratio	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Student-Newman-Keuls[a]	3	5	.855080	
	1	5		.961980
	2	5		1.033340
	Sig.		1.000	.137
Tukey HSD[a]	3	5	.855080	
	1	5	.961980	.961980
	2	5		1.033340
	Sig.		.081	.286
Duncan[a]	3	5	.855080	
	1	5		.961980
	2	5		1.033340
	Sig.		1.000	.137

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

หมายเหตุ : 1 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1

2 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1

3 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 12:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์และความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ %PHB Content ของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี โดยใช้อาหาร MSM ที่มีปริมาณ ammonium sulphate แตกต่างกัน

ตารางที่ ช-16 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ของ %PHB Content ของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28.367	2	14.184	7.906	.006
Within Groups	21.529	12	1.794		
Total	49.896	14			

ตารางที่ ช-17 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ %PHB Content ของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	5	19.751320	1.9629854	.8778738	17.31395	22.18868	18.7108	23.2530
2	5	20.947320	1.1659061	.5214091	19.499656	22.39498	19.6001	22.1497
3	5	17.622180	.4119328	.1842219	17.110698	18.133662	17.0252	18.0091
Total	15	19.440273	1.8878628	.4874441	18.394810	20.48573	17.0252	23.2530

หมายเหตุ : 1 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1
2 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1
3 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 12:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ช-18 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ %PHB Content ของการหาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการผลิตพีเอชบี

	ratio	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Student-Newman-Keuls[a]	3	5	17.622180	
	1	5		19.751320
	2	5		20.947320
	Sig.		1.000	.183
Tukey HSD[a]	3	5	17.622180	
	1	5	19.751320	19.751320
	2	5		20.947320
	Sig.		.065	.366
Duncan[a]	3	5	17.622180	
	1	5		19.751320
	2	5		20.947320
	Sig.		1.000	.183

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

หมายเหตุ : 1 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 32:1

2 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 20:1

3 = อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 12:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ

วันที่ 19 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาว ณัฐกฤตา เรืองเผือก รหัสประจำตัว 62050486

นางสาว บุญสิตา พิพัฒนกุล รหัสประจำตัว 62050509

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การผลิตพลาสติกชีวภาพจาก *Bacillus megaterium* SWU01 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

ชื่อภาษาอังกฤษ Bioplastic Production from *Bacillus megaterium* SWU01 using molasses as a carbon source

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 1.41 %

ลงชื่อ ณัฐกฤตา เรืองเผือก
(ณัฐกฤตา เรืองเผือก)
นักศึกษา

ลงชื่อ บุญสิตา พิพัฒนกุล
(บุญสิตา พิพัฒนกุล)
นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ ธิปชัย วัฒนวิจารณ์
(ผศ.ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้