การผลิตโพลีไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION OF *Bacillus* sp. USING MOLASSES AND REDUCING SUGAR FROM BAGASSE AS A CARBON SOURCE

กตัญญู ชูกลิ่น
กนกพรรณ อนันต์สกุลชัย
ปาณิสรา ลี้เทียน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตโพลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION OF *Bacillus* sp. USING MOLASSES AND REDUCING SUGAR FROM BAGASSE AS A CARBON SOURCE

T149508

กตัญญู ชูกลิ่น
กนกพรรณ อนันต์สกุลชัย
ปาณิสรา ลี้เทียน

b. 12884212
i.
ลงหมู่.....
เลขทะเบียน 149508
วัน,เดือน,ปี - 8 ส.ค. 2561

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION OF *Bacillus* sp. USING MOLASSES AND REDUCING SUGAR FROM BAGASSE AS A CARBON SOURCE

KATANYOO CHUKLIN
KANOKPAN ANANSAKULCHAI
PANISARA LEETIAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(ENVIRONMENTAL CHEMISTRY)
DEPARTMENT OF CHEMISTRY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตโพลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน Polyhydroxybutyrate Production of *Bacillus* sp. By using Molasses and Reducing Sugar from Bagasse as a Carbon Source		
ชื่อนักศึกษา	นายกตัญญู	ชูกลิ่น	รหัสนักศึกษา 56050662
	นางสาวกนกพรรณ	อนันต์สกุลชัย	รหัสนักศึกษา 56050664
	นางสาวปาณิสรา	ลี้เทียน	รหัสนักศึกษา 56050723
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)		
ภาควิชา	เคมี		
ปีการศึกษา	2559		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร. มาลินี ชัยศุภกิจสินธ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร. ดวงกมล เรือนงาม กรรมการ	
ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตโพลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

ชื่อนักศึกษา
นายกตัญญู ชูกลิ่น รหัสนักศึกษา 56050662
นางสาวกนกพรรณ อนันต์สกุลชัย รหัสนักศึกษา 56050664
นางสาวปาณิสรา ลี้เทียน รหัสนักศึกษา 56050723

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา เคมี
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2559
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันขยะพลาสติกเป็นปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งพลาสติกชีวภาพ (bioplastic) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหานี้ได้เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ โดยพลาสติกชีวภาพที่สนใจคือ โพลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) สามารถสังเคราะห์ได้จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย คือ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิส ชานอ้อย และ กากน้ำตาลเจือจาง 2% โดยน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการนำชานอ้อยอบแห้ง มาปรับสภาพด้วย 0.25 M NaOH แล้วนำไปไฮโดรไลซิสต่อด้วยเอนไซม์ Cellulase ความเข้มข้น 22.42 FPU/mL ใช้เวลาการเขย่า 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 32.32 mg/mL นำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อย และกากน้ำตาลเจือจาง 2% มาเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ในอาหาร M9 และสกัด PHB ผลการทดลองการสกัด PHB สกัดได้มากที่สุดเท่ากับ 2.01 g/L เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อนำ PHB ที่ได้จากการสกัดไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR หมู่ฟังก์ชันที่ได้เป็นไปตามมาตรฐานของ PHB และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC พบว่ามี ค่าอุณหภูมิการหลอมเหลวของวัสดุ (T_m) ใกล้เคียงกับพลาสติกชีวภาพชนิด โพลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB)

คำสำคัญ : โพลิไฮดรอกซีบิวทิเรต กากน้ำตาล ชานอ้อย ไฮโดรไลซิส น้ำตาลรีดิวซ์ *Bacillus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Polyhydroxybutyrate Production of *Bacillus* Sp. By using Molasses and Reducing Sugar from Bagasse as a Carbon Source		
Students	Mr. Katanyoo	Chuklin	Student ID 56050662
	Miss Kanokpan	Anansakulchai	Student ID 56050664
	Miss Panisara	Leetain	Student ID 56050723
Degree	Bachelor of Science (Environmental Chemistry)		
Department	Chemistry		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2016		
Advisor	Dr. Tipachai Vatanavicharn		

Abstract

Nowadays, plastic waste is one of the most serious environmental problems. Therefore, bioplastic is one of many alternatives to lessen the harshness of this problem because it can be biodegradable. One of the most interesting bioplastic is Polyhydroxybuterate (PHB) because it can be synthesized from bacteria *Bacillus* sp. This research is conducted by comparing two different kinds of carbon sources in a medium which are reducing sugar from sugarcane bagasse hydrolysis and 2%molasses. The process started with sugarcane bagasses treatment the using 0.25 M NaOH. After that, taking pretreatment bagasse was hydrolyzed by 22.42 FPU/ml cellulase, at 37°C for 48 hours. The maximum quantity of reducing sugar from the process was 32.32 mg/ml. the reducing sugar from the sugar cane hydrolysis or 2% molasses, was mixed M9 media. *Bacillus* sp was inoculated to the medias . The result of PHB extraction showed that the maximum quantity of 2.01 gram PHB per liter was acquired from 48 hour fermentation by using the reducing sugar from sugarcane bagasse hydrolyzate as a carbon source. PHB characterization was done by FT-IR technique. the IR spectrum of standard PHB and the extracted PHB are similar. the physicochemical property of PHB was determined by DSC analysis and the result shows that the melting temperature (T_m) was nearly that of standard PHB.

Keywords: Polyhydroxybuterate PHB Molasses sugarcane bagasse Hydrolyzate *Bacillus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ประธานและอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษเป็นอย่างสูง ที่คอยให้ความรู้ ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานพิเศษออกมาสมบูรณ์ และขอขอบคุณ รศ. ดร. มาลินี ชัยศุภกิจสินธ์ และ ดร. ดวงกมล เรือนงามกรรมการโครงงานพิเศษ ที่ช่วยตรวจสอบแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความสำคัญอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ดร. ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการ อีกทั้งเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์รวมถึงพี่ๆ ที่กำลังศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิตคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมถึงได้รับความอนุเคราะห์ชานอ้อยจากคุณอำพล ยศมงคล ร้านขายน้ำอ้อย เลียบทางด่วนวงแหวนบางประอินเพื่อใช้ในการทดลอง และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซึ่งทุกท่านได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษ ทั้งยังช่วยในทางด้านอุปกรณ์ สารเคมีต่างๆ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดระยะเวลาในการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และผู้มีอุปการคุณทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและให้การสนับสนุนทางด้านการศึกษาจึงหวังว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้สนใจงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการผลิตโพลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. โดยใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน หากโครงงานพิเศษนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำงานวิจัยขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กตัญญู ชูกลิ่น
กนกพรรณ อนันต์สกุลชัย
ปาณิสรา ลี้เทียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ประธานและอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษเป็นอย่างสูง ที่คอยให้ความรู้ ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานพิเศษออกมาสมบูรณ์ และขอขอบคุณ รศ. ดร. มาลินี ชัยศุภกิจสินธ์ และ ดร. ดวงกมล เรือนงาม กรรมการโครงงานพิเศษ ที่ช่วยตรวจสอบแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความสำคัญอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ดร. ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการ อีกทั้งเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์รวมถึงพี่ๆ ที่กำลังศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิตคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมถึงได้รับความอนุเคราะห์ชานอ้อยจากคุณอำพล ยศมงคล ร้านขายน้ำอ้อย เลียบทางด่วนวงแหวนบางประอินเพื่อใช้ในการทดลอง และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซึ่งทุกท่านได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษ ทั้งยังช่วยในทางด้านอุปกรณ์ สารเคมีต่างๆ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดระยะเวลาในการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และผู้มีอุปการคุณทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและให้การสนับสนุนทางด้านการศึกษาจึงหวังว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้สนใจงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการผลิตโพลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. โดยใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน หากโครงงานพิเศษนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำงานวิจัยขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กตัญญู ชูกลิ่น
กนกพรรณ อนันต์สกุลชัย
ปาณิสรา ลี้เทียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ปัญหาพลาสติกในปัจจุบัน	3
2.2 พลาสติกชีวภาพ (Biodegradable plastics)	3
2.3 Biodegradation	5
2.4 Polyhydroxybutyrate (PHB)	6
2.5 การสังเคราะห์และสะสม PHB ในแบคทีเรีย	8
2.6 แบคทีเรีย *Bacillus* sp.	10
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus* sp.	12
2.7.1 ความต้องการออกซิเจน	12
2.7.2 อุณหภูมิ	12
2.7.3 สารอาหาร	12
2.8 อ้อย (Sugarcane)	13
2.8.1 เซลลูโลส (Cellulose)	13
2.8.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)	15
2.8.3 ลิกนิน (Lignin)	16
2.9 กากน้ำตาล (Molasses)	18
2.10 การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)	19
2.10.1 วิธีปรับสภาพทางกายภาพ (Physical Pretreatment)	19
2.10.2 วิธีปรับสภาพทางเคมี (Chemical Pretreatment)	19
2.10.3 วิธีปรับสภาพทางชีวภาพ (Biological Pretreatment)	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.11 การย่อยสลายชีวมวล (Hydrolysis of Biomass)	19
2.11.1 การย่อยสลายด้วยสารเคมี	20
2.11.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	20
2.12 Sodium Hypochlorite	22
2.13 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)	23
2.14 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	26
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	26
3.1.1 เชื้อแบคทีเรีย	26
3.1.2 สารเคมี	26
3.1.3 อุปกรณ์	26
3.1.4 ชานอ้อย	27
3.1.5 กากน้ำตาล	27
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	27
3.2.1 อาหาร Nutrient Agar	27
3.2.2 อาหารเอ็มไนน์ มินิมอล มีเดีย (M9 Minimal Media)	28
3.3 การเตรียมชานอ้อย	29
3.4 การปรับสภาพชานอ้อย	29
3.5 การไฮโดรไลซิสชานอ้อย	29
3.5.1 การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก	29
3.5.2 การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	29
3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS	30
3.6 การเตรียมกากน้ำตาล	30
3.7 การเตรียมหัวเชื้อ	30
3.8 การเพาะเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์	30
3.8.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์โดยการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน	30
3.8.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์โดยการใช้แหล่งคาร์บอนที่ย่อยด้วยเอนไซม์	31
3.8.3 วิธีวัดการเจริญเติบโตจากน้ำหนักเซลล์แห้ง	31
3.9 การสกัด PHB	32
3.9.1 ปริมาณของโพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต	33
3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ	34
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	35
4.1 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟิวริก	35
4.2 การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.1 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิส..... 36
4.2.2 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิส..... 36
4.2.3 ศึกษาขนาดอนุภาคของวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิส..... 38
4.3 การผลิต PHB ของเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยและการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน..... 39
4.4 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นด้วยเทคนิค FT-IR..... 41
4.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของ PHB ด้วยเทคนิค DSC..... 44
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 48
5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 48
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 49
เอกสารอ้างอิง..... 50
ภาคผนวก ก ข้อมูลการเตรียมสาร การทดลอง และกราฟมาตรฐาน..... 53
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางสถิติ..... 60
ภาคผนวก ค เทคนิคการวิเคราะห์..... 65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สมบัติของโพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) เปรียบเทียบโพลิโพรพิลีน (PP).....	7
2.2	แสดงแหล่งคาร์บอนและปริมาณ PHB ที่สะสมในแบคทีเรียชนิดต่างๆ.....	10
2.3	องค์ประกอบของชานอ้อย.....	13
2.4	องค์ประกอบของกากน้ำตาล.....	18
2.5	ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับ Sodium Hypochlorite.....	22
4.1	เปรียบเทียบค่า T_m, T_C, ΔH และ %Crystallinity จากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน.	47
ก.1	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) เมื่อทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์.....	55
ก.2	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1%.....	56
ก.3	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ.....	57
ก.4	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นความเข้มข้นต่างๆ.....	58
ก.5	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น ต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยแบบหยาบ.....	59
ข.1	การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสจากชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1% ที่จำนวนชั่วโมงที่แตกต่างกัน.....	60
ข.2	การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสจากชานอ้อยด้วยจำนวนชั่วโมงที่แตกต่างกัน.....	61
ข.3	การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสจากชานอ้อยด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน.....	62
ข.4	การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB ชั่วโมงที่ 24 และ 48 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์และกากน้ำตาล.....	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ภาพแสดงกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ	6
2.2	โครงสร้างพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate)	6
2.3	การสังเคราะห์และการย่อยสลาย PHB ในแบคทีเรีย	9
2.4	โครงสร้างของ PHA ที่มีโปรตีนที่มีความจำเพาะเชื่อมต่อโดยรอบ	10
2.5	*Bacillus* sp.	11
2.6	โครงสร้างภายในของ Microfibril	14
2.7	โครงสร้างของเซลลูโลสแสดงพันธะ Beta-Glucosidic และพันธะไฮโดรเจน	14
2.8	โครงสร้างของ Fiber ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็น Crystalline และ Amorphous	15
2.9	โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส	16
2.10	โครงสร้างของลิกนิน	17
2.11	การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส	21
2.12	ปฏิกริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และสาร 3,5-dinitrosalicylic acid	23
3.1	แผนผังขั้นตอนการทดลอง	28
3.2	การสกัด PHB	32
4.1	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก	35
4.2	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ	36
4.3	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	37
4.4	แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยที่มีขนาดอนุภาคที่แตกต่างกัน	38
4.5	ค่าปริมาณพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรตต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (PHB Content)	40
4.6	น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB	40
4.7	สเปกตรัมของ Standard Polyhydroxybutyrate	41
4.8	สเปกตรัมของการสกัดพลาสติกชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในกากน้ำตาล	42
4.9	สเปกตรัมของการสกัดพลาสติกชีวภาพจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในน้ำตาลรีดิวซ์	43
4.10	เทอร์โมแกรมของพลาสติกชีวภาพทางการค้า Standard Polyhydroxybutyrate	45
4.11	แสดงเทอร์โมแกรมของโพลิเมอร์ชนิด Polyhydroxybutyrate (PHB) ที่สกัดได้จากจุลินทรีย์ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน	46
4.12	เทอร์โมแกรมของโพลิเมอร์ชนิด Polyhydroxybutyrate (PHB) ที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
ก.1	กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS.....	55
ก.2	กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี (DNS) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1%.....	56
ก.3	กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ.....	57
ก.4	กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี (DNS) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	58
ก.5	กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี (DNS) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยไฮโดรไลซิสชานอ้อยแบบหยาบด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 22.42 FPU/mL.....	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
Da	Dalton
J/g	Joule/Grams
g/L	Grams/Liter
KPa	KiloPascals
L	Liter
M	Molar
mg/g	Milligrams/grams
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MPa	Megapascal
rpm	Revolutions per Minute
YPa/s	Yottapascal per Second
µL	Microliter
°C	Degrees Celsius
%V/V	Percent volume by volume

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันพลาสติกมีความจำเป็นในชีวิตประจำวัน ซึ่งพลาสติกส่วนใหญ่จะเป็นพลาสติกประเภท Polyethylene (PE) และ Polypropylene (PP) เพราะพลาสติกประเภทเหล่านี้นำมาทำถุงบรรจุอาหารและเสื้อผ้า ตุ๊กตาเด็กเล่น ดอกไม้พลาสติก ภาชนะบรรจุในครัว ถาดทำน้ำแข็งในตู้เย็น ขวดและภาชนะบรรจุของเหลว พลาสติกคลุมโรงเพาะชำ สายเคเบิล แผ่นกันความชื้นในอาคาร และของใช้ราคาถูกอีกมากมาย และเมื่อทุกคนใช้พลาสติกกันมากจึงทำให้เกิดขยะจากพลาสติกมากขึ้น ทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมาเนื่องจากพลาสติกไม่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ หรือใช้เวลานานมากในการย่อยสลาย แต่มีพลาสติกชนิดที่ผลิตขึ้นจากวัสดุธรรมชาติ หรือพลาสติกชีวภาพ (bioplastic) ซึ่งสามารถย่อยสลายตัวเองได้ในเวลาอันสั้นและไม่ทำลายสิ่งแวดล้อมแต่ยังคงมีราคาสูงอยู่เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์จากสารปิโตรเคมีที่ใช้กันอยู่ทั่วไป

Polyhydroxybutyrate (PHB) เป็นพลาสติกที่ผลิตขึ้นจากวัสดุธรรมชาติชนิดหนึ่ง ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของแบคทีเรียโดยใช้แหล่งวัตถุดิบจากธรรมชาติมาเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรีย การผลิตพลาสติกชนิด PHB นั้นมีแบคทีเรียหลากหลายชนิดที่สามารถผลิตพลาสติกชนิดนี้ได้ ซึ่งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เลือกแบคทีเรียชนิด *Bacillus* sp. ในการผลิต PHB เนื่องด้วยพลาสติกที่ผลิตขึ้นจากวัสดุธรรมชาตินั้นยังคงมีต้นทุนในการผลิตสูงแต่ให้ผลผลิตน้อย ทำให้ต้องค้นหาวิธีที่สามารถลดทุนต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพโดยการเลือกวัตถุดิบจากธรรมชาติที่เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในราคาที่ถูกลงอาจเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร หรือน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น

ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลนั้นจะได้กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ในขั้นตอนการผลิตน้ำตาล และมีวัสดุเหลือทิ้งจากการผลิตคือ ชานอ้อย ใบ และยอดของอ้อย ซึ่งวัสดุเหล่านี้ถ้าปล่อยทิ้งไว้เฉยๆ ก็ไม่ก่อให้เกิดประโยชน์อะไร ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้ทำการวิจัยได้เลือกกากน้ำตาลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาล และชานอ้อยซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสเพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ นำมาใช้แหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHB ทั้งยังเป็นการลดต้นทุนในการผลิต PHB และยังช่วยลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมที่อาจเกิดจากการทิ้งเศษกากที่เหลือจากอุตสาหกรรมทางการเกษตรได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด Polyhydroxybutyrate (PHB) จากแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบระหว่างแหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาลและชานอ้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1) ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ในการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด Polyhydroxybutyrate (PHB)
2) เปรียบเทียบปริมาณพลาสติกจากกากน้ำตาล และชายอ้อยที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.
3) เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ในระบบแบบมีอากาศในฟลาสก์ขนาด 1000 mL
4) นำ PHB ที่สกัดได้มาตรวจสอบสมบัติเคมีทางกายภาพ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้พลาสติกชีวภาพโดยใช้วัสดุเหลือใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรีย
2) เพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมการเกษตรให้มีมูลค่าสูงขึ้น
3) เป็นการลดปริมาณขยะและลดมลภาวะจากการเผาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปัญหาพลาสติกในปัจจุบัน

พลาสติกเป็นวัสดุที่ถูกนำมาใช้งานได้อย่างกว้างขวาง และมีปริมาณการใช้งานในด้านต่าง ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนอาจกล่าวได้ว่าพลาสติกเป็นวัสดุที่มีบทบาทสำคัญในชีวิตประจำวันไปแล้ว ปัจจุบันการผลิตพลาสติกมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำอีกทั้งยังมีเทคโนโลยีสมัยใหม่ที่สามารถผลิตพลาสติกให้มีสมบัติตามความต้องการได้อย่างหลากหลายเช่น ถุงใส่อาหาร บรรจุภัณฑ์ใส่อาหารและเครื่องดื่ม ฟิล์มถนอมอาหาร ของเล่นเด็ก อุปกรณ์ก่อสร้าง และเฟอร์นิเจอร์ เป็นต้น อย่างไรก็ตามการผลิตพลาสติกจะมีการเพิ่มสารเติมแต่งบางชนิดลงไปซึ่งสารเหล่านี้อาจปนเปื้อนสู่อาหาร หากมีการใช้งานพลาสติกที่ไม่ถูกวิธีหรือใช้ไม่เหมาะสมกับประเภทของพลาสติก อาจนำมาซึ่งผลกระทบต่อการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ได้จากรายงานของ International Agency for Research on Cancer (IARC) กล่าวว่าสารเติมแต่งในการผลิตพลาสติก เช่น Vinylchloride และ Formaldehyde จัดเป็นสารก่อมะเร็งกลุ่ม 1คือเป็นสารที่มีหลักฐานยืนยันได้ว่าสามารถก่อให้เกิดโรคมะเร็งในคนในแง่ของสิ่งแวดล้อมการใช้งานพลาสติกที่เพิ่มมากขึ้นนำมาสู่ปริมาณขยะพลาสติกที่เพิ่มขึ้นตามไปด้วย จากรายงานของกรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมพบว่าในปี 2555 มีขยะพลาสติกจากภาคอุตสาหกรรมทั่วประเทศประมาณ 2.1 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจากปีพ.ศ. 2554 ประมาณ 0.3 ล้านตัน จากการที่พลาสติกมีคุณสมบัติยากต่อการสลายตัวและเสื่อมสภาพทำให้ขยะมูลฝอยประเภทพลาสติกคงอยู่ในสภาพแวดล้อมได้เป็นเวลานาน ก่อให้เกิดเป็นภาระในการจัดการและกำจัดเป็นอย่างมาก ส่งผลให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมาอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้อีกทั้งพลาสติกยังอาจปนเปื้อนสู่ห่วงโซ่อาหารและเป็นอันตรายต่อสุขภาพมนุษย์ได้ เช่น พลาสติกบางชนิดเมื่อหมดอายุการใช้งานจะถูกย่อยสลายกลายเป็นขยะชิ้นเล็กๆ ซึ่งสามารถแทรกในชั้นดินหรือปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำพลาสติกบางชนิดหากเกิดการเผาไหม้จะทำให้เกิดควันพิษในอากาศหรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นสาเหตุภาวะโลกร้อน

พลาสติกถือเป็นวัสดุที่กลายเป็นส่วนหนึ่งของชีวิตมนุษย์ยุคปัจจุบันแต่การใช้งานพลาสติกมีทั้งคุณและโทษ ดังนั้นจึงควรเพิ่มความระมัดระวังและศึกษาการใช้พลาสติกแต่ละชนิดอย่างถูกวิธีเพื่อป้องกัน สารพิษที่อาจปนเปื้อนเข้าสู่ร่างกายตลอดจนสร้างจิตสำนึกลดปริมาณการผลิตและการใช้พลาสติกลงเพื่อลดปัญหามลภาวะของสิ่งแวดล้อม (วารสารพิษวิทยาไทย, 2556)

2.2 พลาสติกชีวภาพ (Biodegradable plastics)

พลาสติกนั้นมาจากภาษากรีกว่า “Plastikos” ซึ่งมีความหมายว่า สามารถขึ้นรูปในรูปร่างต่างๆ ได้ โดยพลาสติกที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันสังเคราะห์ได้จากทั้งวัตถุดิบที่เป็นสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ เช่น คาร์บอน ซิลิกอนไฮโดรเจน ออกซิเจน และคลอไรด์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสติกสังเคราะห์ถูกนำ มาใช้ในประโยชน์ด้านต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือการนำมาผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ของอาหาร ยารักษาโรค เครื่องสำอางค์ สารเคมี แทนที่การใช้กระดาษหรือเซลลูโลสที่ได้จากพืช เนื่องจากพลาสติกสังเคราะห์มีสมบัติพิเศษที่ดีกว่า

พลาสติกสังเคราะห์มีสมบัติทางโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า high molecular weight คือในหนึ่งโมเลกุลมีจำนวนอะตอมมากกว่าสารชนิดอื่นมากมาย จึงทำให้มีสมบัติที่ดีในหลายด้านพร้อมกันไป เช่น สมบัติทางกายภาพ เช่น มีความแข็งแรง เหนียว ยืดหยุ่น ทนต่อการสึกกร่อน ทนน้ำ ทนความร้อน และ สมบัติทางเคมีเช่น ทนกรด ทนด่างทนทานต่อการกัดกร่อนด้วยสารเคมีหลายชนิด นอกจากนั้นยังทนทานต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ทางธรรมชาติอีกด้วยเนื่องจากพลาสติกสังเคราะห์จะต่อต้านการเกาะติดของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติไม่สามารถที่จะสร้างเอนไซม์ชนิดใหม่ขึ้นมาเพื่อย่อยสลายพลาสติกสังเคราะห์ได้

จากความต้องการในการใช้พลาสติกที่เพิ่มมากขึ้นรวมกับสมบัติที่มีความคงทนมากและไม่สามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ ส่งผลให้เกิดการสะสมของขยะพลาสติกเป็นจำนวนมากและหากต้องการกำจัดขยะพลาสติกเหล่านี้ด้วยวิธีการเผาก็จะส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของมลพิษไปในอากาศ ดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นผลิตพลาสติกรูปแบบใหม่ที่มีสมบัติแตกต่างไปจากพลาสติกสังเคราะห์ ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมตามที่กล่าวมาข้างต้น โดยพลาสติกรูปแบบใหม่ที่กล่าวถึงนั้นมีชื่อเรียกว่า พลาสติกชีวภาพ หรือ พลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หรือ “Biodegradable plastic”

ตามข้อกำหนด ISO 472:1988 พลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หมายถึง พลาสติกที่ได้รับการออกแบบมาเพื่อรองรับการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีบางประการภายใต้สภาพแวดล้อมที่กำหนด โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีนั้นเป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ

ตามข้อกำหนด ASTM D20.96 กล่าวว่า พลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้ คือ พลาสติกที่สามารถถูกตัดพันธะของสายโพลิเมอร์ได้ผ่านทางปฏิกิริยาเคมี ชีวภาพ และกายภาพ ภายใต้สภาวะที่ส่งเสริมให้เกิดการย่อยสลายโครงสร้างของพลาสติกพลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพถูกจำแนกออกเป็น 4 ประเภท โดยใช้หลักเกณฑ์การจำแนกจากกระบวนการสังเคราะห์และแหล่งของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตที่แตกต่างกันดังนี้

2.2.1 โพลิเมอร์ที่ได้มาจากวัตถุดิบที่เป็นมวลชีวภาพ (biomass) ได้แก่ วัตถุดิบที่เป็นโพลิแซคคาไรด์ที่ได้จากแป้งข้าวสาลี แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด หรือ วัตถุดิบที่เป็นผลิตภัณฑ์ลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟาง ไม้ เป็นต้น นอกจากนั้นยังรวมไปถึงวัตถุดิบในกลุ่มของไคโตซานและไคติน ซึ่งเมื่อนำมาละลายในกรดอินทรีย์จะมีลักษณะเป็นสารละลายเหนียวใสคล้ายวุ้น และสามารถนำมาขึ้นรูปเป็นพลาสติกได้ หรือวัตถุดิบในกลุ่มคอลลาเจนและเจลาตินที่สกัดได้จากโปรตีนพืชและสัตว์ก็สามารถนำมาขึ้นรูปเป็นพลาสติกได้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 โพลิเมอร์ที่ได้มาจากการผลิตจากจุลินทรีย์ ได้แก่โพลิเมอร์ในกลุ่ม PHAs เช่น Polyhydroxybutyrate (PHB) และ Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) เป็นต้น

2.2.3 โพลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการทางเคมี ที่ใช้วัตถุดิบที่เป็นโมโนเมอร์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรเช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง อ้อย เป็นต้น โดยเมื่อผ่านกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพแล้วจะเปลี่ยนแป้งที่ได้จากวัตถุดิบไปเป็นน้ำตาลและเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นโมโนเมอร์ซึ่งก็คือ กรดแลคติก (lactic acid) และนำกรดแลคติกที่ได้มาต่อเชื่อมเป็นโพลิเมอร์สายยาว ซึ่งโพลิเมอร์ประเภทนี้คือ Polylactic acid (PLA)

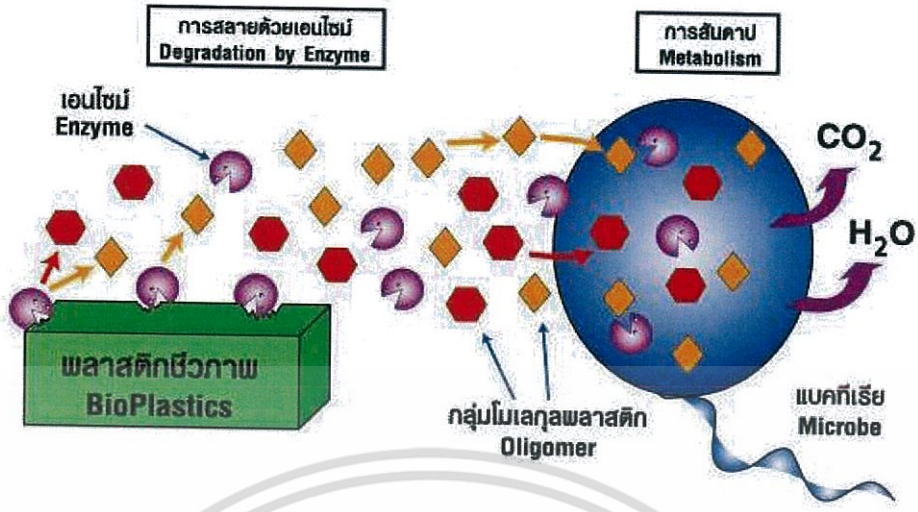
2.2.4 โพลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากโมโนเมอร์หรือโพลิเมอร์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักคือ กลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นโซ่สายตรง เช่น Polybutylene succinate (PBS) ที่ได้จากโมโนเมอร์คือกรดซัคซินิคและ 1,4–บิวเทนไดออล และกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติก เช่น Polybutyleneadipate/tetraphthalate (PBAT) เป็นต้น

จากการจำแนกประเภทตามที่กล่าวมาข้างต้นจะสังเกตเห็นได้ว่าพลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพเฉพาะประเภทที่ 4 เท่านั้นที่ไม่ได้สังเคราะห์ขึ้นจากวัตถุดิบที่เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สามารถสร้างทดแทนใหม่ได้ หรือที่เรียกว่า “Renewable resources” แต่ทั้ง 4 ประเภท สามารถถูกย่อยสลายได้ภายใต้กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพหรือที่เรียกว่า “Biodegradation” กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพดังแสดงรูปที่ 2.1 เป็นกระบวนการย่อยสลายที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ เช่นแบคทีเรีย รา ยีสต์ แอคติโนมัยซิส เป็นต้น ดังนั้นกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพจึงนำไปสู่การหมุนเวียนของคาร์บอนและหากมีการย่อยสลายต่อไปได้อย่างสมบูรณ์ จะได้ผลผลิตสุดท้ายเป็น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ สารอินทรีย์ และมวลชีวภาพ

2.3 Biodegradation

กระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ เริ่มจากการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์และปัจจัยภายนอกที่ส่งผลให้พลาสติกชีวภาพแตกออกเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย ขั้นตอนนี้เรียกว่า “Biodeterioration” หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสายโพลิเมอร์ของพลาสติกชีวภาพ ขั้นตอนนี้เรียกว่า “Depolymerisation” กลายเป็นโมเลกุลเล็กๆ ซึ่งโมเลกุลที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเหล่านี้จะถูกซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์และส่งเข้าสู่กระบวนการสันดาปเพื่อนำไปใช้ในการสร้างพลังงานและมวลชีวภาพ ขั้นตอนนี้เรียกว่า “Assimilation”

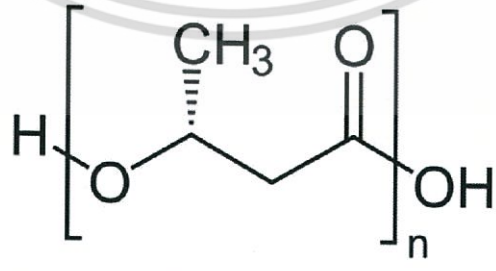
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ภาพแสดงกระบวนการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ (Npcse, 2016)

2.4 Polyhydroxybutyrate (PHB)

โพลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate) หรือ PHB เป็นอนุพันธ์ของโพลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและจัดเป็นโพลิเมอร์ประเภทอะลิฟาติกโพลิเอสเตอร์ (Aliphatic polyester) มีโครงสร้างเป็นสายยาวแสดงดังภาพที่ 2 โพลิเอสเตอร์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Khanna and Srivastava, 2005) มีสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมีเช่น โพลิโพรพิลีน (PP) (Reddy *et al*., 2003 ; Arun*et al*., 2006) ดังแสดงในตารางที่ 1 พลาสติก PHB ซึ่งมีสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์โพลิโพรพิลีน (PP) สามารถนำมาผลิตผลิตภัณฑ์ในรูปของกลุ่มบรรจุภัณฑ์เครื่องใช้ในครัวเรือน เครื่องใช้ไฟฟ้า รวมถึงเครื่องมือแพทย์ได้ (Zhang *et al*., 2004) ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถผลิตและสะสม PHB ได้ในปริมาณสูงมีเพียงไม่กี่ชนิด เช่น *Ralstonia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Aeromonas* และ *Pseudomonas* เป็นต้น (Suriyamonkol*et al*., 2007 ; Volova*et al*., 2007)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างโพลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate) (Wikimedia, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Polyhydroxybutyrate (PHB) ค้นพบครั้งแรกในปี 1926 จากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* ใน Polyhydroxyalkanoates (PHAs) ที่มีจำนวน 125 ชนิดโดยสมบัติทั่วไปของ PHB สามารถสรุปได้ดังนี้ (Jogdand, 2004)

1) PHB ไม่สามารถละลายน้ำและต้านทานปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำให้ PHB แตกต่างจากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้หรือมีความไวต่อความชื้น
2) PHB มีความสามารถในการต้านทานต่อรังสีอัลตร้าไวโอเลตและมีความสามารถให้ออกซิเจนซึมผ่านได้ดี แต่มีความต้านทานต่อกรดและเบสต่ำ
3) PHB มีความสามารถในการละลายในคลอโรฟอร์มและสารประกอบคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ
4) PHB มีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (biocompatible) และปัจจุบันได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์
5) PHB มีจุดหลอมเหลว 175°C มีอุณหภูมิเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วทรานซิสชั่น -15°C และมีความทนแรงดึง 40 MPa
6) PHB สามารถจมน้ำในขณะที่โพลีโพรพิลีน (PP) ลอยตัวแต่การจมตัวของ PHB ก่อให้เกิดการย่อยสลายโดยไม่ใช้อากาศในการตกตะกอนและไม่มีความเป็นพิษ

นอกจากสมบัติต่างๆของสาร PHB ที่กล่าวมาข้างต้นยังมีสมบัติทางเคมีและทางกายภาพใกล้เคียงกับโพลิโพรพิลีน (PP) ซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สมบัติของโพลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) เปรียบเทียบโพลิโพรพิลีน (PP) (Jogdand, 2004)

พารามิเตอร์	โพลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB)	โพลิโพรพิลีน (PP)
จุดหลอมเหลว (T_m) (°C)	171 - 182	171 – 186
อุณภูมิที่มีสภาวะคล้ายแก้ว (T_g) (°C)	5 - 10	-15
ค่าความเป็นผลึก (%)	65 - 80	65 – 70
ความหนาแน่น (g/m^3)	1.23 – 1.25	0.91 – 0.94
น้ำหนักโมเลกุล (M_w) ($\times 10^{-5}$)	1.0 – 8.0	2.2 – 7.0
การกระจายน้ำหนักโมเลกุล	2.2 – 3.0	5.0 – 12.0
ความต้านทานต่อการดัดงอ (kPa)	3.5 – 4.0	1.7
ความต้านทานแรงดึง (MPa)	40	39
สภาพการยืดหยุ่น (%)	6 – 8	400

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

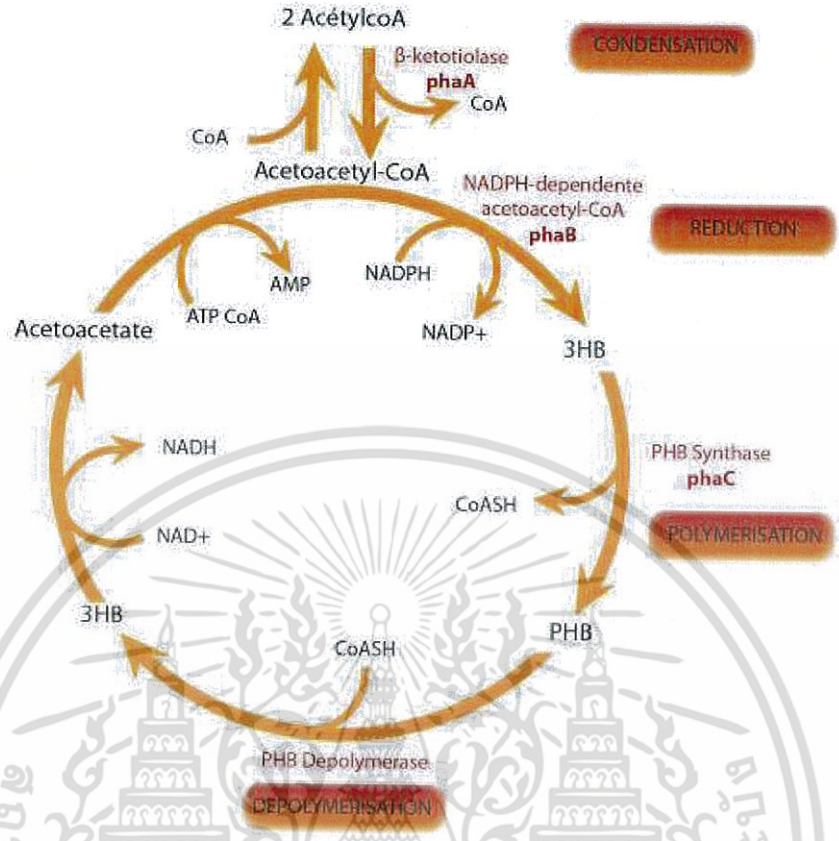
พารามิเตอร์	โพลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB)	โพลิโพรพิลีน (PP)
ความต้านทานต่อรังสีอัลตร้าไวโอเลต	ต่ำ	สูง
ความต้านทานต่อตัวทำละลาย	ต่ำ	สูง
คุณสมบัติในการซึมผ่านออกซิเจน	ดี	ต่ำ
การย่อยสลายทางชีวภาพ	ดี	-
อื่นๆ	เนื่องจากมีความหนาแน่นสูงจึงจมน้ำก่อให้เกิดการย่อยสลายโดยไม่ใช้อากาศ	เนื่องจากความหนาแน่นต่ำจึงทำให้สามารถลอยน้ำได้

2.5 การสังเคราะห์และสะสม PHB ในแบคทีเรีย

การสะสม PHB พบในแบคทีเรียหลายชนิด ทั้งแกรมบวกและแกรมลบแบคทีเรียส่วนใหญ่สะสมไว้ในแกรนูลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเมื่อสารอาหารไม่สมดุล ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรียมีการค้นพบ PHB ครั้งแรกใน *Bacillus megaterium* การศึกษาต่อมาก็พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นสามารถผลิต PHB ได้สูงเช่น *Ralstonia, Alcaligenes, Bacillus, Aeromonas* และ *Pseudomonas* เป็นต้น

การสังเคราะห์ PHB ในแบคทีเรียเริ่มจาก Acetyl-CoA เปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-CoA ด้วยเอนไซม์ β-ketothiolase จากนั้นเอนไซม์ Acetoacetyl-CoA reductase จะเปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-CoA เป็น 3-hyroxylbutyryl-CoA ต่อมาเกิดการ Polymerization เป็น PHB ด้วยเอนไซม์ PHB Synthase ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ในการสังเคราะห์ PHB ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญ 3 ชนิดด้วยกันได้แก่ β-ketothiolase, Acetoacetyl-CoA reductase และ PHB Synthase ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *phaCBA* Cluster

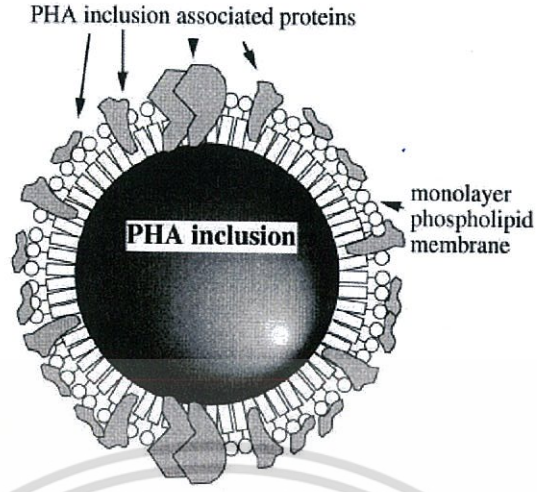
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์และการย่อยสลาย PHB ในแบคทีเรีย (igem, 2010)

ซึ่งประกอบด้วยยีน *phaC phaB phaA* โดยยีน *phaC* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ PHB Synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการ Polymerization ของ PHB ยีน *phaB* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Acetoacetyl-CoA Reductase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน Acetoacetyl-CoA เป็น 3-hyroxylbutyryl-CoA และ *phaA* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-Ketothiolase เพื่อเปลี่ยน Acetyl-CoA เป็น Acetoacetyl-CoA นอกจากยีนทั้ง 3 ชนิดนี้ในการสะสม PHB ยังมียีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *phaZ* ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ PHB Depolymerase เพื่อสลาย PHB ที่สะสมในแกรนูลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเซลล์ ส่วนยีน *phaP* ทำหน้าที่ผลิตโปรตีน Phasine ซึ่งเกี่ยวกับขนาดแกรนูล จำนวนอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวและปริมาตรของ PHB เป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวของ PHB พบ P(3HB) ของ B. *megaterium* ประกอบด้วย P(3HB) 97.7% โปรตีน 1.87% ไขมัน 0.46% แสดงว่า PHB ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ที่ประกอบด้วย phospholipid monolayer (รูปที่ 2.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของ PHA ที่มีโปรตีนที่มีความจำเพาะเชื่อมต่อโดยรอบ (Sudesh *et al.*, 2000)

ตารางที่ 2.2 แสดงแหล่งคาร์บอน และปริมาณ PHB ที่สะสมในแบคทีเรียชนิดต่างๆ (Jogdand, 2004)

เชื้อจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	การสะสมของ PHB (%น้ำหนักเซลล์แห้ง)
Alcaligeneseutrophus	กลูโคส, ฟรุกโตส, กรดอะซิติก, กรดโปรปิโอนิก	96
Alcaligeneslatus	กลูโคส, ซูโครส, โมลาส	96
Azotobacterchroococcum	สตาร์ช	75
Bacillus megaterium	กลูโคส	73
Methylobacterium sp.	เมทานอล	57
Protomonascepacia	เมทานอล, เอมิลแอลกอฮอล์	67
Pseudomonas cepacia	แลคโตส, ไซโลส	70
Recombinant *Esherichai coli*	หางนม	67
Rhizobium meliloti	ซูโครส	57
Rhodococusruber	กลูโคส	80

2.6 แบคทีเรีย *Bacillus* sp.

Bacillus คือ แบคทีเรีย (bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ย้อมติดสีแกรมบวก (gram positive bacteria) อยู่ในวงศ์ Bacillaceae ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับ Clostridium และ Desulfotomaculum

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Bacillus*

เชื้อ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน

อาณาจักร Bacteria

ไฟลัม Firmicutes

คลาส Bacilli

แฟมิลี่ Bacillaceae

จีนัส Bacillus

Bacillus เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า (flaggella) *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน (thermoduric bacteria) ที่สร้างเอนโดสปอร์ (spore forming bacteria) สปอร์แบคทีเรีย (bacterial spore) ของ *Bacillus* จะทนต่อความร้อน ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ดี *Bacillus* เจริญได้ในค่า pH ช่วงกว้าง ตั้งแต่ 2 ถึง 11 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ จากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าในสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญ *Bacillus* หลายสายพันธุ์ มีระยะเวลาการแบ่งตัว (generation time) ประมาณ 25 นาที

Bacillus เป็น Proteolytic bacteria มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารให้เป็นกรดอะมิโน เป็นแบคทีเรียสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilage) และทำให้อาหารที่เน่าเสียเกิดกลิ่นเหม็น

รูปที่ 2.5 *Bacillus* sp. (Terefe *et al.*, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (Metinee, 2016)

2.7.1 ความต้องการออกซิเจน

2.7.1.1 แบคทีเรียที่เจริญได้ในที่มีอากาศเท่านั้น (obligate aerobic bacteria หรือ obligate aerobe)

2.7.1.2 แบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobic bacteria หรือ facultative anaerobe)

2.7.2 อุณหภูมิ

2.7.2.1 แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria)

2.7.2.2 แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria)

2.7.2.3 แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria)

2.7.3 สารอาหาร

2.7.3.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source) แหล่งคาร์บอนอยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และสารอินทรีย์ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต

2.7.3.2 แหล่งของอิเล็กตรอน (electron source) แบคทีเรียต้องการอิเล็กตรอนเพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม พวกที่ใช้สารอนินทรีย์ เป็นแหล่งอิเล็กตรอน เรียก Lithotroph ส่วนพวกที่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอน เรียก Organotroph

2.7.3.3 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) แหล่งของไนโตรเจนมีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ แหล่งที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ โปรตีน แหล่งที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น เกลือไนไทรต์ ไนเทรต หรือแอมโมเนียม

2.7.3.4 แหล่งของออกซิเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส ออกซิเจนได้มาจากหลายแหล่ง เช่น น้ำ และสารอาหาร แหล่งของซัลเฟอร์อาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ซัลเฟอร์มีความจำเป็น ในการสังเคราะห์กรดแอมิโนบางชนิดแหล่งของฟอสเฟตอาจอยู่ในรูปของฟอสเฟตที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ ฟอสโฟลิพิด กรดไทโคอิก และสารอื่นๆ

2.7.3.5 ไอออนของโลหะหนัก ไอออนของโลหะหนักมีความจำเป็นต่อการเจริญตามปกติของแบคทีเรีย เช่น K^{+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+} เป็นต้น ซึ่งบางชนิดอาจทำหน้าที่เป็น cofactor ที่สำคัญของเอนไซม์ต่างๆ

2.7.3.6 วิตามิน แบคทีเรียต้องการวิตามินในปริมาณน้อย แต่วิตามินมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตและการเจริญมาก โดยทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 อ้อย (sugarcane)

อ้อยเป็นพืชตระกูล Saccharum มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharumofficinarum* L. มีชื่อทางการค้าว่า Sugarcane ถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นพืชเขตร้อนชื้น (tropical) จำพวกหญ้า ลำต้นแข็งแรง มีข้อปล้องเห็นได้ชัดเจน สูง 2-4 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-5 เซนติเมตร ไม่แตกกิ่งก้าน ผิวด้านนอกสีเขียวออกเหลือง หรือสีแดงเข้มออกม่วง มีขี้ผึ้งเป็นฝ้าขาวๆ เคลือบอยู่ ใบแคบ ผิวใบมีขนสั้นๆ ทั้งสองด้าน เมื่อลูบรู้สึกสากมือ เส้นกลางใบใหญ่สีขาวมีขน ดอกออกที่ยอดเป็นช่อ ดอกออกสีขาว ก้านช่อดอกไม่มีขน แตกแขนงเป็นช่อดอกย่อยมากมาย ออกดอกในฤดูหนาว มีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (vegetative) ถึงแม้จะมีดอกแต่ดอกที่เห็นเป็นดอกเพศเมียไม่มีเพศผู้ Saccharum เป็นพืชที่จีโนม (genome) ซับซ้อน มีจำนวนชุดของโครโมโซมในเซลล์ (ploidy) สูง ตั้งแต่ 40 ขึ้นไปจนมากกว่า 140 อ้อยที่ปลูกในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นลูกผสมระหว่าง*officinarum* และ *spontaneum* โดยโครโมโซมส่วนใหญ่มาจาก *officinarum* นอกจากนี้อ้อยยังเป็นพืชที่ปลูกง่าย และเมื่อปลูกครั้งหนึ่งแล้ว สามารถเก็บเกี่ยวได้หลายครั้ง อ้อยชอบอากาศอบอุ่นและร้อนชื้นดังนั้นประเทศที่ปลูกอ้อย ซึ่งมีประมาณ 70 ประเทศจึงอยู่ในแถบร้อนและชุ่มชื้นในระหว่างเส้นรุ้งที่ 35 องศาเหนือ และ 35 องศาใต้ ประเทศผู้ปลูกอ้อยที่สำคัญ ได้แก่ บราซิล คิวบา จีน ไทย ปากีสถาน เม็กซิโก และอินเดีย

ชานอ้อย หมายถึง ส่วนของเส้นใยของลำต้นอ้อยหลังจากผ่านกระบวนการบีบสกัดน้ำออกแล้ว ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำตาล

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของชานอ้อย (Wikimedia, 2015)

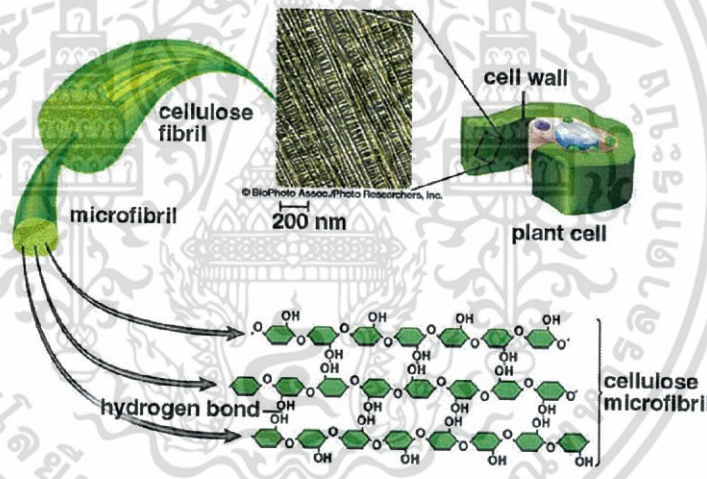
ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์ (%)
1) cellulose	45 - 55
2) hemicelluloses	20 - 25
3) lignin	18 - 24
4) ash	1 - 4
5) waxes	< 1

2.8.1 เซลลูโลส (cellulose)

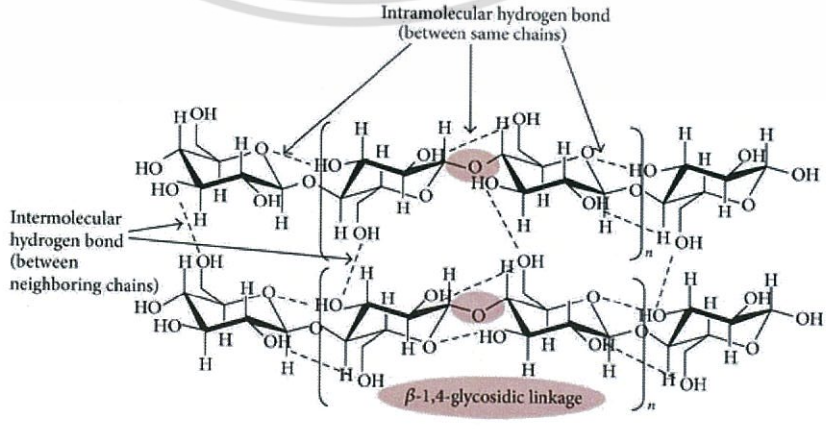
เซลลูโลสเป็นสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ ที่มีประมาณ 40-50% ในผนังเซลล์พืช ลักษณะเป็นโพลิเมอร์สายตรง ไม่มีกิ่งก้านสาขา และเป็นโฮโมโพลิเมอร์ของ β-D-glucose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-glucosidic linkage โดยมีค่า degree of polymerization อยู่ในช่วงประมาณ 100 ถึงมากกว่า 10,000 เกาะรวมกันภายใน crystalline microfibrils เซลลูโลสมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20,000 ถึง 75,000 Dalton ซึ่งเท่ากับ 100 - 4,000 หน่วยกลูโคส โมเลกุลของเซลลูโลสเรียงตัวกันเป็นมัดเรียกว่า fibril โดยมีพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลกลูโคสที่อยู่ใกล้กันของเซลลูโลสสายหนึ่ง กับเซลลูโลสอีกสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนึ่งเชื่อมต่อกันเป็น fibril นอกจากนี้เซลลูโลสที่พบในเนื้อไม้อ่อน และเนื้อไม้แข็งมีความทนต่อกรดได้มากกว่าเฮมิเซลลูโลสซึ่งเซลลูโลสไม่ละลายน้ำหรือสารอินทรีย์ใดๆ และไม่ละลายในเบสอ่อนหรือกรดอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในเบสแก่หรือกรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลฟิวริก เป็นต้น โดยเซลลูโลสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในสารละลายกรดที่อุณหภูมิห้อง และปฏิกิริยาจะหยุดลงที่อุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลลูโลสเกิดการพองตัวในสารละลายด่างเข้มข้นบางชนิด เช่น สารละลายอัลคาไลไฮดรอกไซด์ (alkali hydroxide) ซึ่งทำให้เซลลูโลสละลายในตัวทำละลายได้ดีขึ้น (TAPPI, 2000 ; 2001) โดยโครงสร้างของเซลลูโลสบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสอย่างเป็นระเบียบเรียกว่า คริสตัลไลน์ (crystalline) ส่วนบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบหรือเป็นระเบียบน้อยกว่า เรียกว่า อะมอฟัส (amorphous) โดยแต่ละบริเวณจะแสดงสมบัติการยอมรับต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างกัน โดยที่บริเวณอะมอฟัสยอมให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายง่ายกว่าบริเวณคริสตัลไลน์ (McMillan, 1994)

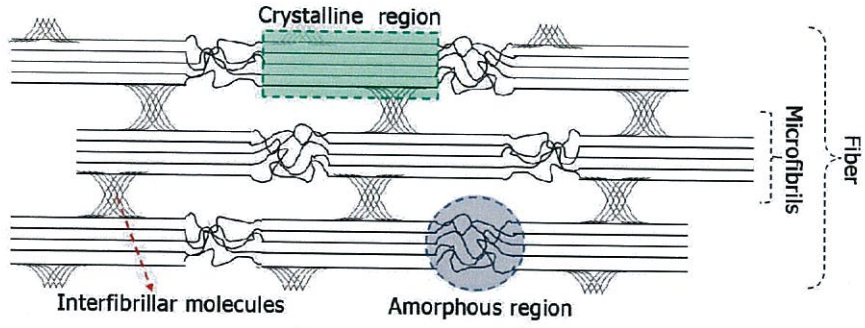


รูปที่ 2.6 โครงสร้างภายในของ microfibril (The McGraw-Hill Companies, 2016)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของเซลลูโลสแสดงพันธะ β-glucosidic และพันธะไฮโดรเจน (Ncbi, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของ fiber ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็น crystalline และ amorphous (Mikaela and Gunnar, 2015)

2.8.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลส เป็นโพลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลายชนิดประกอบด้วยสายโพลิเมอร์ของน้ำตาลที่เป็นทั้งสายโซ่ตรงและสายกิ่ง ซึ่งมีทั้งชนิดน้ำตาลเพนโทส (pentose, C5) ได้แก่ ไซโลส (Xylose) และอะราบิโนส (Arabinose) และน้ำตาลเฮกโซส (hexose, C6) ได้แก่ กาแลคโตส (Galactose) กลูโคส (Glucose) แมนโนส (Mannose) และกรดยูโรนิค (Uronic acid) ที่เรียงต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-glucosidic linkage และ β-1,6-glucosidic linkage เฮมิเซลลูโลสพบในเนื้อเยื่อของพืชโดยอยู่รวมกับสารอื่นๆ เช่น ลิกนิน และเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ มีสูตรทางเคมีคือ $(C_6H_{12}O_5)_{2n}$ เมื่อผ่านการย่อยเฮมิเซลลูโลสจากไม้เนื้อแข็ง จะปลดปล่อยไซโลสเป็นจำนวนมาก ส่วนเฮมิเซลลูโลสจากไม้เนื้ออ่อนจะปลดปล่อยน้ำตาลเฮกโซส ดังนั้นการแบ่งเฮมิเซลลูโลสจึงแบ่งตามชนิดของน้ำตาล เช่น Xylan, Mannan, Glucan, Arabinan เป็นต้น (เบญจวรรณ, 2534) โดยส่วนใหญ่สายตรงของเฮมิเซลลูโลส จะเป็นไซโลสที่เชื่อมต่อกันที่พันธะ β-1,4 ส่วนกิ่งก้านสาขาจะเป็นหน่วยของ Arabinose, Glucose, Mannose, Uronic acid และน้ำตาลเพนโทสอื่นๆ ซึ่งเชื่อมต่อกันที่พันธะ β-1,4 ยกเว้น Galactose เท่านั้น ที่มีลักษณะเฉพาะเชื่อมต่อกันที่พันธะ β-1,3 (อรุณวรรณ, 2547)

สายโพลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเฮทเทอร์โรจีนัส (heterogenous) ประกอบด้วยโพลิแซคคาไรด์หลายชนิดปนกัน คือ

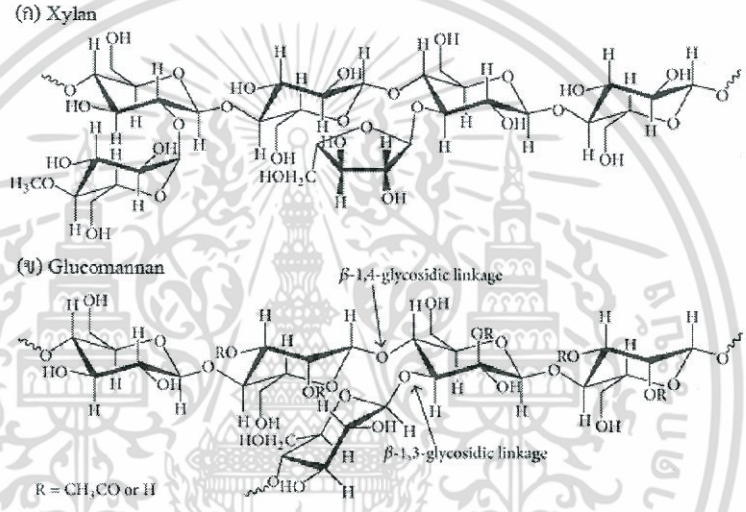
2.8.2.1 แพนโตแซน (Pentosan) ส่วนใหญ่เป็นไซเลน (Xylan) และอะราแบน (Araban) เมื่อนำไปย่อยจะได้น้ำตาลไซโลส (Xylose) และอะราบิโนส (Arabinose) ไซแลนเป็นสารที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลสมากกว่าสารอื่น

2.8.2.2 เฮกโซแซน (Hexosan) ส่วนใหญ่เป็นแมนแนน (Mannan) กาแลคแทน (Galactan) และกลูแคน (Glucan) เมื่อถูกย่อยจะได้น้ำตาลแมนโนส (Mannose) กาแลคโตส (Galactose) และกลูโคส (Glucose) ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2.3 โพลิยูโรไนด์ (Polyuronides) ส่วนมากเป็นสารประกอบของกรดโพลิยูโรนิค (Polyuronic acid) และยังพบกรดยูโรนิค (Uronic acid) ปนอยู่ด้วย

ข้อแตกต่างระหว่างเฮมิเซลลูโลสกับเซลลูโลสคือ เฮมิเซลลูโลสสามารถถูกย่อยด้วยสารละลายกรดเจือจาง และสามารถละลายได้ดีในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5% (w/v) นอกจากนี้สายโพลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขามากกว่าและมีความยาวของสายโซ่สั้นกว่า โดยมีความยาวประมาณ 40 หน่วยกลูโคส (TAPPI, 2000 ; 2001)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (ก) โครงสร้างของไซเลน (ข) โครงสร้างของกลูโคแมนแนน (Ncbi, 2016)

2.8.3 ลิกนิน (lignin)

ลิกนินเป็นสารประกอบที่มีอยู่ในพืชรองจากเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ลิกนินพบได้ในส่วนของผนังเซลล์ชั้นที่สอง และ middle lamella ของพืชชั้นสูง โดยในพืชที่อ่อนอยู่จะมีลิกนินเพียงเล็กน้อย และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อพืชมีอายุมากขึ้น ลิกนินถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยกระบวนการที่เรียกว่า Ligninfication โดยโมเลกุลของลิกนินจะแทรกอยู่ในช่องว่างระหว่าง cellulose fibrils และสายของเฮมิเซลลูโลส ลิกนินที่พบในส่วนผนังเซลล์จะทำหน้าที่เสมือนเกราะป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ และเกราะป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยอีกด้วย (Stephen and Carlton, 1992)

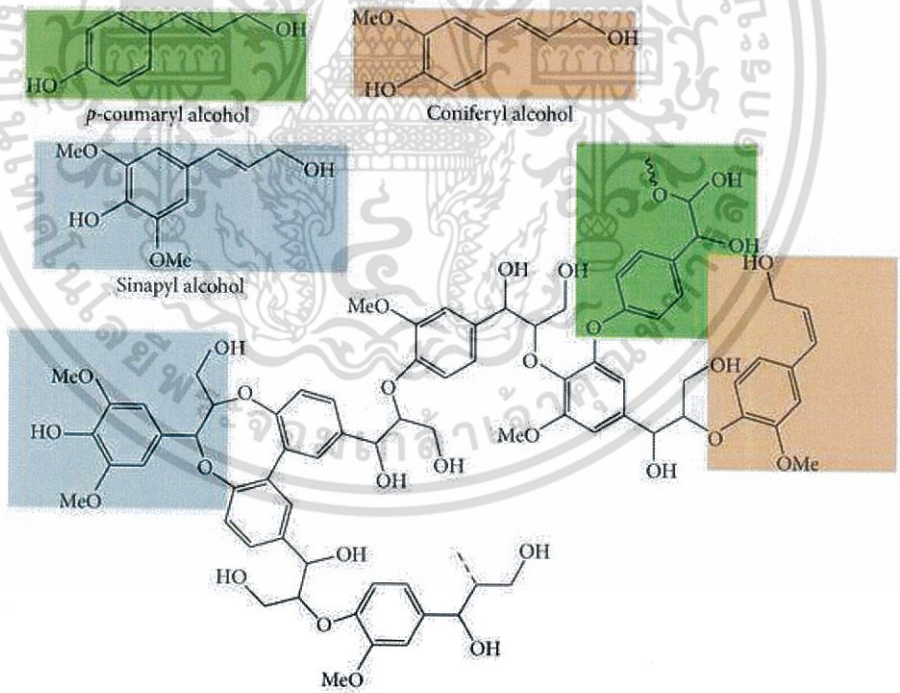
ลิกนินเป็นโพลิเมอร์ของสารละลายอะโรมาติกหลายชนิด หรือเรียกว่าฟีโนลิกโพลิเมอร์ (Phenolic Polymer) โดยมีหน่วยฟีนิลโพรเพน (Phenylpropane Unit) เรียงต่อกันแบบสุ่มที่หน่วยฟีนอล อาจเป็นกัวอิเอซิล (Guaiacyl) หรือ ไซรินกิล (Syringyl) ที่ตำแหน่งแอลฟา และเบต้าของโมเลกุลลิกนิน อาจเกิดการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุลหรือคาร์บอนในหน่วยฟีนอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

อาจเกิดพันธะกับคาร์บอนในอีกหน่วยหนึ่งภายในสายโพลิเมอร์ที่ประกอบกันเป็นโมเลกุลลิกนิน ทำให้ลิกนินมีความแข็งแรง ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น ในเอทานอล หรือเมทานอลที่ร้อน และในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และมีบทบาทสำคัญต่อลักษณะทางกายภาพของไม้ คือ ลิกโนเซลลูโลสจะป้องกันการย่อยสลายทางชีวภาพ เช่น ต่อต้านการย่อยสลายเซลลูโลสของจุลินทรีย์ หน่วยย่อยของโครงสร้างนี้คือ ฟีนิลโพรเพน ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ C-O-C หรือ C-C ประสานต่อกันเป็นโพลิเมอร์ขนาดใหญ่

ลิกนินพบได้ในพืชที่มีท่อลำเลียง โดยทำหน้าที่เสริมสร้างความแข็งแรง และเชื่อมจับเส้นใยของผนังเซลล์ไว้ด้วยกัน ลิกนินยังช่วยลดการผ่านเข้าออกของน้ำผ่านผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อไซเลม ทำให้เนื้อไม้มีความต้านทานต่อการทำงานของจุลินทรีย์ได้ จึงทำให้ลิกนินเป็นอุปสรรคต่อการเกิดน้ำตาล และเอทานอลของเชื้อจุลินทรีย์ (Erikkson et al., 1990) ลิกนินทำหน้าที่เชื่อมต่อเซลลูโลสกับเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะโควาเลนท์เกิดเป็นสารประกอบเซลลูโลสที่มีกิ่งก้านสาขามากมายมีโมเลกุลขนาดใหญ่ตั้งแต่ 80,000–100,000 Dalton (Kirk and Frrel, 1987)



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของลิกนิน (Ncbi,2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

149508

2.9 กากน้ำตาล (molasses)

กากน้ำตาล (molasses) กากน้ำตาลเป็นของเหลวลักษณะเหนียวข้นสีน้ำตาลดำ ที่เป็นผลพลอยจากการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งไม่สามารถจะตกผลึกน้ำตาลได้อีก เป็นเนื้อของสิ่งที่ไม่ใช่น้ำตาลที่ละลายปนอยู่ในน้ำอ้อย ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวิร์ท (invert sugar) และสารเคมี เช่น ปูนขาว ที่ใช้ในการตกตะกอนให้น้ำอ้อยใสกากน้ำตาลมีระดับพลังงานระดับต่ำถึงปานกลางขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำที่มีอยู่ในกากน้ำตาล มีโพแทสเซียม และมีปริมาณน้ำในระดับสูง ทำให้เกิดเชื้อราได้ง่าย กากน้ำตาลแบ่งได้ 5 ชนิด ดังนี้

2.9.1 กากน้ำตาลจากอ้อย : เกิดจากกรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย โดยเริ่มจากการนำอ้อยเข้าหีบได้น้ำอ้อย กรองเอากากออกจากน้ำอ้อยแล้วเคี่ยวน้ำอ้อยจนได้ผลึกของน้ำตาลทรายตกตะกอนออกมา แยกผลึกน้ำตาลทรายด้วยหม้อปั่นผลพลอยได้จะมี ขี้ตะกอน กากอ้อย และ กากน้ำตาล

2.9.2 กากน้ำตาลจากหัวบีท : เป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลจากหัวบีท

2.9.3 กากน้ำตาลจากส้ม : น้ำตาลที่ได้จากส้มมีกลิ่นและรสต่างจากกากน้ำตาลอ้อย

2.9.4 กากน้ำตาลจากข้าวโพด : กากน้ำตาลจากข้าวโพด มีน้ำตาลมากกว่า 48% หวานและหอมกว่าน้ำตาลอ้อย

2.9.5 กากน้ำตาลจากไม้ : เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมกระดาษ

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของกากน้ำตาล (Biotechnologie-Kempe, 2006)

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์ (%)
1) Saccharose	32
2) Glucose	14
3) Fructose	16
4) Water	20
5) K_2O	3.5
6) CaO	1.5
7) MgO	0.1
8) Na_2O, Fe_2O_3, Al_2O_3	0.2
9) SiO_2	0.5
10) SO_3	1.6
11) P_2O_5	0.2
12) Chlorides	0.4
13) Non-sugar	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment)

มีจุดประสงค์เพื่อที่จะนำเฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกจากเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลสลง ทำให้อนุภาคภายในเกิดรูและเกิดการพองตัวเพื่อเป็นการเพิ่มพื้นที่สำคัญหลีกเลี่ยงจากการทำลายโครงสร้างของน้ำตาลให้น้อยที่สุด เพื่อป้องกันการเกิดผลพลอยได้ ซึ่งจะไปยับยั้งกระบวนการย่อยสลาย โดยทั่วไปการปรับสภาพวัตถุดิบ สามารถทำได้ 3 วิธี คือ วิธีทางกายภาพ, ทางเคมี และทางชีวภาพ

2.10.1 วิธีการปรับสภาพทางกายภาพ (physical pretreatment)

เป็นวิธีทางกายรูปที่เกิดจากการ หั่น ตัด หรือบด เพื่อลดขนาดผลึกของเซลลูโลส โดยตัดให้มีขนาด 10-20 mm บดให้มีขนาด 0.2-2 mm โดยการปรับสภาพพืชโดยวิธีการทางกายภาพจะต้องการพลังงานหรือไม่ขึ้นอยู่กับขนาดและลักษณะของวัตถุดิบที่ใช้ (Sun and Cheng, 2002)

2.10.2 วิธีปรับสภาพทางเคมี (chemical pretreatment)

2.10.2.1 Acid hydrolysis วิธีนี้ใช้กรดเข้มข้น เช่น ซัลฟิวริก และไฮโดรคลอริกในการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส กรดนั้นจะมีความแรงต่อการย่อยเซลลูโลส มีความเป็นพิษกัดกร่อน ดังนั้นอุปกรณ์ที่ใช้ต้องทนทานต่อการกัดกร่อน และเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการย่อยสลายแล้ว ต้องทำการกำจัด หรือนำกรดนั้นออกจากระบบ เพื่อให้ระบบนั้นสามารถดำเนินต่อไปได้ (Sivers and Zacchi, 1995)

2.10.2.2 Alkaline hydrolysis การปรับสภาพ lignocellulosic materials ด้วยเบสที่เจือจางจะทำให้ lignocellulosic materials เกิดการพองตัว เพิ่มพื้นที่ผิวภายใน ลดผลึก เกิดการแยกพันธะที่เชื่อมระหว่างลิกนินกับคาร์โบไฮเดรต และทำให้เกิดการแยกลิกนิน (Fan *et al*., 1987; Sun and Cheng, 2002)

2.10.3 วิธีการปรับสภาพทางชีวภาพ (biological pretreatment)

ในการปรับสภาพ lignocellulosic materials โดยใช้จุลินทรีย์ เช่น brown-, white- และ soft-rot fungi ในการย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลส brown rots จะย่อยสลายเซลลูโลสเป็นหลัก ส่วน white and soft rots จะย่อยสลายทั้งเซลลูโลสและลิกนิน (Hatakka, 1983)

2.11 การย่อยสลายชีวมวล (hydrolysis of biomass)

เมื่อนำชีวมวลมาทำการปรับสภาพแล้วนำมาย่อยสลายจะได้น้ำตาลออกมาโดยถ้าทำการย่อยสลายเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกันคือกลูโคสแต่ถ้าการย่อยสลายเกิดไม่สมบูรณ์จะได้ทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส และพวกโอลิโกแซคคาไรด์ปนกัน ส่วนเฮมิเซลลูโลสเมื่อย่อยสลายจะได้น้ำตาลหลายชนิดปนกันขึ้นกับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลสการได้สลายสามารถทำได้ 2 วิธี ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.1 การย่อยสลายด้วยสารเคมี

สามารถทำได้โดยใช้กรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง ซึ่งเป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคสโดยตรง แต่ได้ผลผลิตค่อนข้างน้อยเพราะมีการทำลายน้ำตาลที่เกิดขึ้น โดยน้ำตาลจะทำปฏิกิริยาต่อไปทำให้ได้ผลพลอยได้อื่นๆ เช่น furfural และกรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลสทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ สำหรับกรดที่ใช้ในวิธีนี้ได้แก่กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 70% ขึ้นไป กรดไฮโดรคลอริก 40% ขึ้นไป กรดซัลฟิวริกเจือจาง 1% เป็นต้น และในการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 140-160°C ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดรุนแรงและไม่เฉพาะเจาะจง โดยภาชนะที่ใช้ต้องทนทานต่อการกัดกร่อน จึงมีราคาแพง นอกจากนี้น้ำทิ้งจากการย่อยจะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมเพราะมีกรดเจือปน (อรุณวรรณ, 2547)

2.11.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์จะทำให้เกิดปฏิกิริยาย่อยสลายกับเซลลูโลสให้ผลผลิตน้ำตาลการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงและไม่รุนแรงแต่ใช้ระยะเวลานานเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางเคมีถึงแม้ว่าเอนไซม์ยังมีราคาสูงกว่าสารเคมีประเภทกรดหรือเบสแก่การย่อยโดยเอนไซม์จะมีต้นทุนโดยรวมต่ำกว่าการย่อยโดยกรดหรือเบส ในแง่ของการลดปัญหาเรื่องอุปกรณ์เนื่องจากการใช้เอนไซม์เป็นสภาวะที่ไม่รุนแรง pH 4.8 และอุณหภูมิ 45-50°C (Duff and Murray, 1996) และต่อการการเก็บเกี่ยวผลผลิตที่เกิดขึ้นดังรูปที่ 2.10

เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำงานร่วมกันกลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจะทำงานร่วมกันแบบ synergistic เริ่มจากเซลลูโลสจะเกิดการพองตัวพร้อมกับมีการสลายพันธะไฮโดเจนพบว่ามีเอนไซม์ 3 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยเซลลูโลส ได้แก่

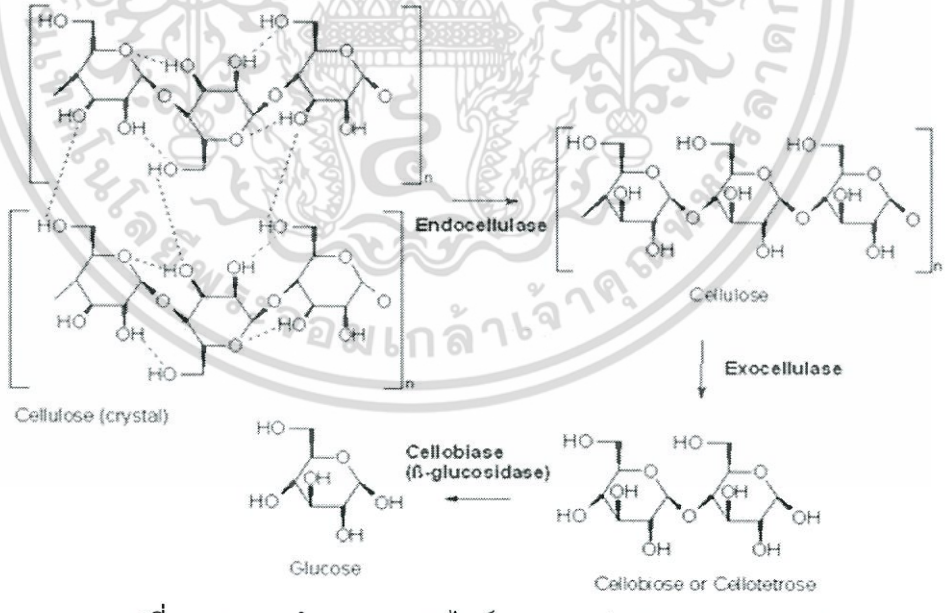
2.11.2.1 Endoglucanase (1,4-β-D-glucannohydrolase) มีน้ำหนักโมเลกุล 18,000-60,000 ทำหน้าที่ย่อย β-1,4-Glycosidic linkage แบบสุ่มได้กลูโคส เซลโลไบโอสเซลโลไตรโอสไม่ย่อยเซลโลไบโอสแต่ย่อยเซลโลเดกซ์ตริน (Cellodextrin) เซลลูโลสที่ทำให้เกิดการพองตัวด้วยฟอสฟอรัส คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose; CMC) ไฮดรอกซีเอทธิลเซลลูโลส (Hydroxyethyl cellulose; HEC) และสามารถย่อยเซลลูโลสรูปผลึกได้ด้วยความจำเพาะของเอนไซม์ไม่สูงมากนักวิเคราะห์เอนไซม์นี้ได้โดยใช้ CMC และ HEC เป็นสารตั้งต้น

2.11.2.2 Cellobiohydrolase (1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase) หรือ Exoglucanase หรือ C1 มีน้ำหนักโมเลกุล 50,000-70,000 ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสตรง Non-reducing End ของสายได้เซลโลไบโอส มีความจำเพาะสูงกว่าคาร์บอกซีเมธิลเซลลูเลส ย่อยเซลโลเดกซ์ตริน แต่ไม่ย่อยเซลโลไบโอส การวิเคราะห์เอนไซม์ชนิดนี้ใช้สำลี (cotton) อวิเซล (Avicel) และ Amorohous cellulose เป็นสารตั้งต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.2.3 β-Glucosidase (β-D-glucohydrolase) ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Cello-oligosaccharide) ได้กลูโคส แต่ไม่ย่อยเซลลูโลส หรือ เซลโลแดกซ์ตริน วิเคราะห์เอนไซม์นี้โดยใช้เซลโลไบโอส p-nitrophenyl-β-D-glucoside หรือ Salicin เป็นสารตั้งต้น (Enari, 1983 อ้างอิงโดยอารี กังแฮ, 2536)

การทำงานของเซลลูเลสเริ่มต้นโดยการเข้าทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นซึ่งเอนไซม์คาร์บอกซีเมธิลเซลลูเลสจะสลายโครงสร้างเซลลูโลสส่วนที่เป็น amorphous แต่จะทำปฏิกิริยาได้น้อยในส่วนของเซลลูโลสที่เป็น crystalline จากนั้นเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสจะช่วยสลายโครงสร้างเซลลูโลสให้กลายเป็นเซลโลไบโอส ซึ่งเป็นน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจะช่วยย่อยเซลโลไบโอสกลายเป็นน้ำตาลกลูโคส (เกษม, 2541) อธิบายว่าเส้นใยเซลลูโลสจะประกอบด้วยส่วนที่เป็นระเบียบและส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ เอนไซม์ Cx (Carboxymethyl Cellulase) จะเข้าไปย่อยสลายส่วนที่ไม่เป็นระเบียบทำให้เส้นใยเซลลูโลสขาดเป็นช่วงๆเอนไซม์ C1 (Exoglucanase) เข้าไปย่อยส่วนปลายของเส้นใยที่ขาดออกมาจากนั้นสายโซ่โมเลกุลของเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายให้เป็นโมเลกุลที่สั้นลงโดยเอนไซม์ Cx และ C1 และสายโซ่โมเลกุลที่สั้นลงนั้นจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกลูโคส



รูปที่ 2.11 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (Wikimedia, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12 Sodium hypochlorite

ตารางที่ 2.5 ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับ Sodium hypochlorite (Narcotic control division, 2012)

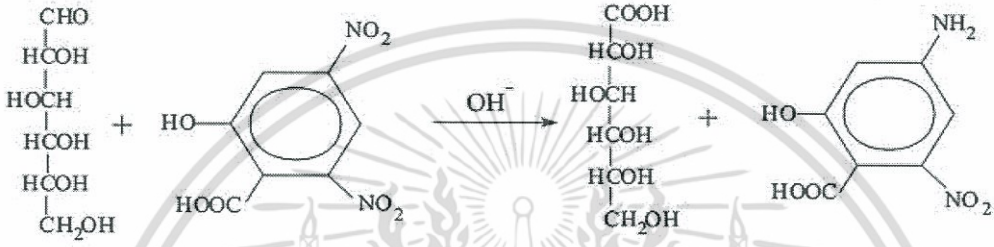
ชื่อทางการค้า	Sodium hypochlorite
ชื่อทางเคมี	Hypochlorous acid, Sodium salt
CAS No.	7681-52-9
สูตรโมเลกุล	NaOCl
น้ำหนักโมเลกุล	74.44
จุดหลอมเหลว	18°C
pH-value	12
คุณสมบัติ	เป็นผลึกแข็ง มักอยู่ในรูปสารละลายใส มีสีเหลืองอมเขียว มีกลิ่นคลอรีน
การใช้ที่ผิดกฎหมาย	เป็นตัว oxidizing ในการผลิตโคเคน
การใช้ที่ถูกกฎหมาย	1) ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกกระดาษและสิ่งทอ 2) เป็นน้ำยาความสะอาดและฆ่าเชื้อโรค 3) ใช้ซักล้างทำความสะอาดเสื้อผ้า
การควบคุม	1) จัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535 ถ้าเป็นส่วนผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์ซักผ้าขาว ฆ่าเชื้อโรค 2) ผู้ใดผลิต นำเข้า ส่งออกหรือมีไว้ในครอบครองซึ่งวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 โดยมิได้รับอนุญาต ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินสองปี หรือปรับไม่เกินสองแสนบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ 3) หน่วยงานที่รับผิดชอบ : สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข
	1) จัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 1 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535 2) ผู้ใดผลิต นำเข้า ส่งออกหรือมีไว้ในครอบครองซึ่งวัตถุอันตรายชนิดที่ 1 ไม่ปฏิบัติตามประกาศของรัฐมนตรีผู้รับผิดชอบ ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าหมื่นบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ 3) หน่วยงานที่รับผิดชอบ : 3.1) กรมโรงงานอุตสาหกรรม 3.2) กระทรวงอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.13 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)

หลักการของปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1998)

การต้มน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายเบสที่มีกรดไดไนโตรซาลิไซลิค ซึ่งสารตัวนี้จะเปลี่ยนรูปให้เป็นสารที่มีสีเข้มขึ้น ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสงช่วง 500-550 nm ปฏิกิริยานี้จะไม่หยุดจนกว่าจะเกิดผลิตภัณฑ์หมด สีที่เกิดขึ้นเป็นสีของ 3-amino-5-dinitrosalicylic acid ดังสมการ



Glucose DNS Gluconic acid 3-amino-5-nitrosalicyclic acid

รูปที่ 2.12 ปฏิกริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และสาร 3,5-dinitrosalicylic acid ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเข้มของ 3-amino-5-nitrosalicylic acid (Royal society of chemistry, 2015)

2.12 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Saratale and Min-Kyu Oh (2015) ทำการศึกษาการผลิต Poly-3-hydroxybutarate (PHB) โดยใช้ข้าวเปลือกเป็นแหล่งคาร์บอนทำการปรับสภาพด้วย NaOH และ KOH หรือ NaOCl ซึ่งนำมาประยุกต์ใช้ก่อนที่จะนำไปไฮโดรไลซิส ทำการปรับสภาพข้าวเปลือกด้วย 2% NaOH อุณหภูมิ 121°C ระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์จะได้ผลน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 703 mg/g และเปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิส 84.19% ทำการทดสอบความเป็นไปได้ในการสังเคราะห์ PHB ของ Ralstoniacutropha ATCC 17699 โดยใช้ข้าวปลือกที่ผ่านการไฮโดรไลซิสมาเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งสังเกตน้ำหนักเซลล์แห้งและการเก็บสะสมของ PHA กับ PHB เปรียบเทียบการใช้แหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ผลการเปรียบเทียบมีความใกล้เคียงกันภายใต้สภาวะต่างๆ โดยได้การสังเคราะห์ PHA สูงสุด 75.45% และผลิต PHB ได้ 11.41 g/L ใช้เวลาหมัก 48 ชั่วโมงและผลการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและทางเคมี ของ PHB ที่สกัดได้มีผลสอดคล้องกันกับลักษณะมาตรฐานของโพลิเมอร์PHB ดังนั้นข้าวเปลือกจึงได้รับการพิสูจน์เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีและถูกสำหรับการผลิต PHB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Javier M. Naranjo *et. al.* (2014) ได้ทำการศึกษาไว้ว่า PHB คือประเภทของโพลิเมอร์ชีวภาพที่สามารถผลิตจากการไฮโดรไลซ์โพลิแซ็กคาไรด์โดยสามารถใช้ทดแทนโพรพิลีนและเอทิลีนซึ่งย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ PHB ดูเหมือนจะยังไม่เป็นที่นิยมเมื่อเทียบกับโพลิเมอร์ปิโตรเคมีเนื่องจากมีต้นทุนการผลิตที่สูงกว่าดังนั้นต้องมีการปรับปรุงกระบวนการผลิตและค้นหาวัตถุดิบใหม่โดยออกแบบเทคนิคการปรับสภาพและปรับปรุงขั้นตอนการหมักและการแยกนอกจากนี้ถ้า PHB ใช้วัตถุดิบธรรมชาติมาเป็นวัตถุดิบตั้งต้นโดยผ่านปฏิกิริยาทางชีวภาพเพื่อเปลี่ยนวัตถุดิบเหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายสามารถเพิ่มมูลค่าทางด้านเศรษฐกิจและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมในงานนี้เลือกการผลิต PHB จากกล้วยที่ถูกทิ้งจากอุตสาหกรรมการเกษตรผลปรากฏว่าสามารถประหยัดพลังงานได้ถึง 30.6% และสามารถช่วยประหยัดน้ำถึง 35% ดังนั้นงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้วัตถุดิบธรรมชาติมาเป็นวัตถุดิบตั้งต้นเป็นทางเลือกที่ดีในกระบวนการผลิตและลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

Abhishek Dutt Tripath *et. al.* (2013) มีความพยายามที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต PHB โดยตัวแปรทางกายภาพได้แก่ pH, อุณหภูมิ และความเร็วในการกวน โดยผลิต PHB จากแบคทีเรีย *Alcaligenes* sp. เลือกสายพันธุ์โดยใช้วิธีการย้อมด้วย Nile blue A ซึ่งใช้กากน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนโดยการเพิ่มประสิทธิภาพของตัวแปรโดยใช้โปรแกรม DX 8.0.6 ด้วยวิธี Central Composite Rotatable Design (CCRD) ทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมคืออุณหภูมิที่ 34.5°C, pH 6.54 และความเร็วในการกวนเท่ากับ 1.13 Hz PHB YPa/s 76.80% ของกากน้ำตาลและแสดงไว้ 98.0% ซึ่งมีคล้ายคลึงกับ YPa/s ที่คาดการณ์ไว้จะให้อัตราร้อยละ 77.78% ทำในปริมาตร 7.5 L ภายใต้เงื่อนไขที่ให้มวลเซลล์สูงสุด 11±0.5 g/L และ PHB content 8.8±0.4 g/L หลังหมักจากผ่านไป 48 ชั่วโมงจากการศึกษากระบวนการหมักให้ผลผลิต PHB yield เท่ากับ 0.78 และ PHB เท่ากับ 0.19 g/L ซึ่งสูงกว่ารายงานก่อนหน้านี้ภายใต้เงื่อนไขที่คล้ายกันโดยวัดคุณลักษณะของ PHB ด้วย FTIR

Yueshu *et. al.* (2013) ได้ทำการศึกษากระบวนการปรับสภาพของชานอ้อยด้วยกระบวนการที่แตกต่างกัน คือปรับสภาพด้วยการต้มด้วยน้ำ (LHW) ปรับสภาพด้วยการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และการใช้สองกระบวนการนี้รวมกัน และทำการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาลจากชานอ้อย การปรับสภาพด้วยการต้มน้ำ (LHW) ละลายได้ไซแลนมากกว่า 82% และ กำจัดลิกนินได้ 42% การปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ กำจัดลิกนินออกได้ 78% และเก็บกลูแคนได้สูงสุด และการปรับสภาพด้วยการใช้ทั้งสองกระบวนการรวมกันนั้นการใช้ LHW-NaOH ปรับสภาพจะทำให้ได้ ไซแลนมากกว่า 92% กำจัดลิกนินได้ 76% และได้เปอร์เซ็นน้ำตาลสูงสุดถึง 73% หลังจากการใช้การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์นาน 72 ชั่วโมง และการใช้ NaOH-LHW ปรับสภาพจะกำจัดลิกนินได้เกือบ 84% แต่ได้ไซแลน 71% การใช้เอนไซม์ย่อยการย่อยที่สูงที่สุดของหลังจากการปรับสภาพด้วยกระบวนการต่างๆ ประสิทธิภาพการปรับสภาพคือ : NaOH-LHW > NaOH > LHW-NaOH > LHW

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pattanan *et. al.* (2009) ได้ศึกษาการใช้ชานอ้อยเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการไฮโดรไลซิสของชานอ้อย หลังจากแยกลิกนินออกจากชานอ้อยได้ใช้สภาวะที่แตกต่างกันโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) หรือกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่ความเข้มข้น 0.5-5 %v/v เวลา 1-5 ชั่วโมง และให้ความร้อน 90-120°C ผลที่ออกมาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ 0.5% ของ กรดไฮโดรคลอริก ใช้เวลา 5 ชั่วโมง ให้ความร้อนที่ 100°C ค่าประสิทธิภาพที่สูงที่สุด (E) เป็น 10.85 และได้น้ำตาลกลูโคส 1.50 ไซโลส 22.59 อราบิโนส 1.29 กรดอะซิติก 0.15 และเฟอร์ฟิวรัล 1.19

Kumar *et. al.* (2008) ได้ทำการศึกษาในการทดลองทำการคัดกรองเลือกสายพันธุ์ *Bacilius* จาก 100 สายพันธุ์ที่แตกต่างกันและทำการเลือกแบคทีเรีย *Bacilius* มาทดสอบความสามารถในการผลิต PHB จำนวณ 6 สายพันธุ์คือ *Bacillus* sp. *EGU75* , *B. cereus EGU3* , *B. cereus EGU43* , *B. cereus EGU44* , *B. cereus EGU5204* และ *B. thuringiensis EGU45* ซึ่งมีการผลิต PHBปริมาณมากที่สุดโดยการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacilius* เมื่อเลี้ยงตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 72 พบว่าแบคทีเรีย *Bacilius* เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 48 จะมีการเจริญเติบโตสูงสุดหลังจากนั้นจนถึงชั่วโมงที่ 72 การเจริญเติบโตจะคงที่ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองการเจริญเติบโตและดูปริมาณการผลิต PHB ในระยะเวลาที่ 48 ชั่วโมง

ภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์มหาลัยนเรศวรจังหวัดพิษณุโลก (2008) ได้ศึกษาการผลิตและสมบัติของ Polyhydroxybutyrale จากกากน้ำตาลและน้ำหมักข้าวโพดซึ่งผลิตโดยเชื้อ *Bacillus megaterium* ATCC6748 โดยการสะสม Polyhydroxybutyrale (PHB) ในเซลล์ของเชื้อ *Bacillus megaleriumATCC* 6748 มีนัยสำคัญขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนโดยพบในกากน้ำตาลอ้อย (MOL) และน้ำหมักข้าวโพด (CSL) ได้นำมาใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนที่อุดมไปด้วยคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ทำให้มีการพัฒนาเพื่อลดต้นทุนในการผลิตเมื่อสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนที่ได้รับส่งผลกับปริมาณการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและการสะสม PHB ในแบคทีเรีย นอกจากนี้เซลล์แบคทีเรียเมื่อผสมกับคลอโรฟอร์มใช้กระบวนการ Homogenizer ทำให้น้ำหนักโมเลกุลของ PHB ลดลงเมื่อตรวจสอบPHB เชิงพาณิชย์และข้อมูลอื่นๆที่พบในงานศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ PHB พบว่ากากน้ำตาลอ้อยและน้ำหมักข้าวโพดสามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการผลิต PHB ซึ่งได้รับมีสมบัติทางความร้อนเช่นเดียวกับ PHB เชิงพาณิชย์ที่มีมวลโมเลกุลสูง (ประมาณ 3.9x10 Da)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาคือ *Bacillus* sp. No.1 ได้มาจากมูลสัตว์ (ขี้ควาย) และทำการถ่ายเชื้อเก็บในอาหาร nutrient agar (NA) ที่อุณหภูมิห้อง

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารสกัดยีสต์ (yeast extract)
3.1.2.2 เปปโตน (peptone)
3.1.2.3 ผงวุ้น (agar)
3.1.2.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
3.1.2.5 โซเดียมมอนอไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดต ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)
3.1.2.6 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนซัลเฟต (KH_2PO_4)
3.1.2.7 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
3.1.2.8 แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)
3.1.2.9 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)
3.1.2.10 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)
3.1.2.11 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl)
3.1.2.12 อะซิโตน ($CH_3CO\ CH_3$)
3.1.2.13 เอทานอล (C_2H_5OH)
3.1.2.14 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
3.1.2.15 เอนไซม์เซลลูเลส (22.42 FPU/mL)

3.1.3 อุปกรณ์

3.1.3.1 ออโต้ปิเปต (auto pipette) ขนาด 10 mL, 1000 µL และ 200 µL
3.1.3.2 Tip ขนาด ขนาด 10 mL, 5 mL, 1000 µL และ 200 µL
3.1.3.3 หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก ขนาด 1.5 mL, 2 mL, 50 mL
3.1.3.4 หลอดทดลองแบบมีฝาเกลียวปิดขนาด 15 mL
3.1.3.5 ฟลาสก์ขนาด 50 , 250 , 600 , 1000 mL
3.1.3.6 กระบอกตวงขนาด 100 mL
3.1.3.7 หลอดทดลอง 10 mL
3.1.3.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3.9 ลวดเขี่ยเชื้อ

3.1.3.10 ช้อนตักสาร

3.1.3.11 คิวเวตต์

3.1.3.12 ที่ตั้งหลอดทดลองพลาสติก

3.1.3.13 กระดาษฟอยล์

3.1.3.14 แท่งคนสาร

3.1.3.15 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.1.3.16 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

3.1.3.17 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (shaking incubator)

3.1.3.18 เครื่องเขย่าสาร (vortex)

3.1.3.19 ตู้ปลอดเชื้อ (UV laminar)

3.1.3.20 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer)

3.1.3.21 หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave)

3.1.3.22 เพลทเลี้ยงเชื้อชนิดพลาสติก (priti dish)

3.1.4 ชานอ้อย

ได้รับความอนุเคราะห์ชานอ้อยจาก คุณอำพล ยศมงคล ร้านขายน้ำอ้อย เลียบทางด่วนวงแหวนบางประอิน กรุงเทพมหานคร โดยเก็บที่อุณหภูมิ 10°C

3.1.5 กากน้ำตาล

ซื้อจากบริษัท อี เอ็ม เอ็กซ์ตร้า จำกัด ความเข้มข้น 77%

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหาร nutrient agar (NA)

เป็นอาหารที่ใช้ในการรักษาเชื้อของ *Bacillus* sp. No.1 มีส่วนประกอบ ดังนี้

สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	3.0	g/L
เปปโตน (peptone)	5.0	g/L
ผงวุ้น (agar)	15.0	g/L

โดยละลายส่วนผสม yeast extract ปริมาณ 3.0 g และ peptone ปริมาณ 5.0 g เข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 L จากนั้นนำไปละลายบนเครื่องกวนสารละลายพร้อมให้ความร้อน (Hotplate stirrer) และนำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายนำไปเทลงเพลทเชื้อแล้วรอให้เย็น

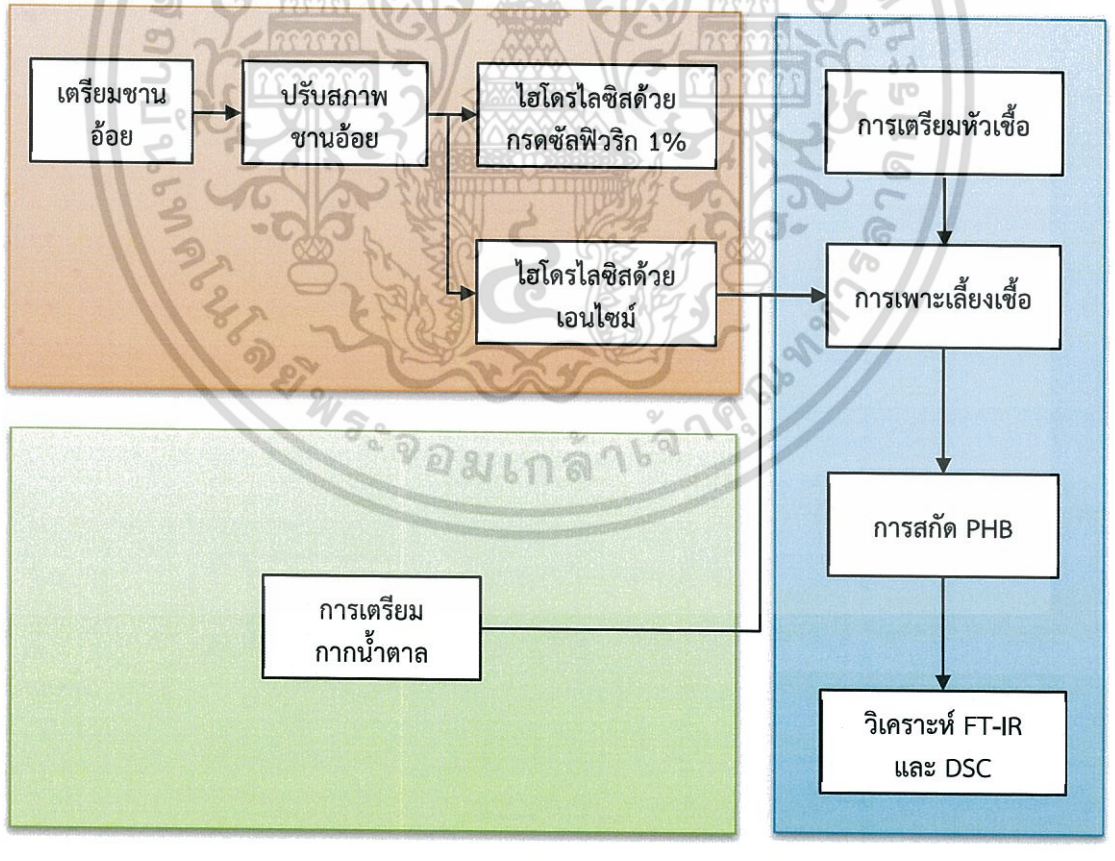
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 อาหารเอ็มไนน์ มินิมอล มีเดีย (M9 minimal media)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. No.1 ในปริมาตร 1000 mL

น้ำตาลกลูโคส 2% (ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)	20.0	mL
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนซัลเฟต (KH_2PO_4)	15.0	g/L
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2.5	g/L
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	5.0	g/L
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 1M	100.0	µL
โซเดียมมอนอไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดต	64.0	g/L

นำ $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 64 g, KH_2PO_4 15 g, NaCl 2.5 g, NH_4Cl 5 g ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรของอาหาร M9 salts ให้เป็น 1 L และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ M9 Salts มาเติม $MgSO_4$ 1M เท่ากับ 2 mL, น้ำตาลกลูโคส 2% ปริมาณ 20 mL และ $CaCl_2$ 1M 100 µL



รูปที่ 3.1 แผนผังขั้นตอนการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การเตรียมชานอ้อย

นำกากชานอ้อยมาคัดเลือกเฉพาะส่วนที่ไม่มีราเจือปนจากนั้นหั่นกากชานอ้อยล้างด้วยน้ำประปาแล้วอบที่อุณหภูมิ 60°C อบจนน้ำหนักคงที่แล้วนำไปเข้าเครื่องบดหยาบจากนั้น เข้าเครื่องบดละเอียดคัดขนาดอนุภาคขนาด 0.25 mm และเก็บผงของกากชานอ้อยใส่ถุงซิปล็อคนำเก็บในโถดูดความชื้น (desiccator)

3.4 การปรับสภาพชานอ้อยด้วยเบส

นำชานอ้อยมาล้างด้วยน้ำประปาแล้วมาอบที่อุณหภูมิ 60°C อบจนน้ำหนักคงที่แล้วนำไปเข้าเครื่องบดหยาบจากนั้น เข้าเครื่องบดละเอียดและคัดขนาดอนุภาคขนาด 0.25 mm ปรับสภาพด้วย 0.25M NaOH ในอัตราส่วนชานอ้อย 1 g ต่อ NaOH 20 mL และนำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 80°C ระยะเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากปรับสภาพชานอ้อยด้วย NaOH แล้วนำมากรองโดยเก็บส่วนกากชานอ้อยมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่ง pH อยู่ในช่วง 7 นำชานอ้อยที่ปรับสภาพ pH แล้วไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105°C เก็บใน desiccator และนำมาย่อยทางเคมี และย่อยทางเอนไซม์

3.5 การไฮโดรไลซิสชานอ้อย

3.5.1 การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)

นำชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสแล้วมาใส่ลงในบีกเกอร์เติม 1% H_2SO_4 ในอัตราส่วนชานอ้อย 1 g ต่อ H_2SO_4 15 mL โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C ปิดด้วยกระจกนาฬิกาเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง (เติมน้ำกลั่นเมื่อปริมาณน้ำลดลงจากเดิม) นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสมาปรับ pH ด้วย 2M NaOH จนกระทั่ง pH เท่ากับ 7 นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค Dinitrosalicylic acid method (DNS)

3.5.2 การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

นำชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพในหัวข้อ 3.4 แล้ว มาปริมาณ 2.5 g ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 500 mL เติมสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส 22.42 FPU/mL ปริมาตร 1 mL และเติมโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 50 mL จากนั้นนำไปย่อยในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองด้วยเครื่องกรองลดความดันเพื่อเอากากส่วนที่เป็นชานอ้อยออก แล้วนำเอาส่วนใสไปวัดปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS)

ในขั้นตอนการวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS) นำตัวอย่างปริมาณ 1 mL มาใส่ในหลอดทดลอง ส่วนในหลอดทดลองที่เป็นตัวควบคุม (control) จะใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงค์ (blank) แทนตัวอย่างจากนั้นเติม 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid) ปริมาณ 1.5 mL นำผสมเข้าด้วยกันแล้วนำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่น้ำประปาให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาณ 3 mL ผสมเข้าด้วยกันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยเทียบความเข้มข้นกับกราฟน้ำตาลมาตรฐาน (Miller, 1959)

3.6 การเตรียมกากน้ำตาล

นำกากน้ำตาลความเข้มข้น 77% มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 2% แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7000 rpm โดยใช้หลอดขนาด 50 mL แล้วนำส่วนใสไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที

3.7 การเตรียมหัวเชื้อ

3.7.1 การเพาะเชื้อขนาด 10 mL

ทำการเขี่ยโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งมา 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 10 mL ในหลอดเซนติฟิวก์พลาสติกขนาด 50 mL จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบเครื่อง 250 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้น

3.7.2 การเพาะเชื้อขนาด 50 mL

นำเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนมากขึ้นจากข้อ 3.7.1 ใส่ลงในอาหารเหลว butrient broth (NB) ปริมาตร 50 mL ในฟลาสก์ขนาด 250 mL จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบเครื่อง 250 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้น

3.8 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในฟลาสก์

3.8.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์โดยการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.7 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.5 แล้วเติมลงในอาหารเอ็มไนท์ มินิมัล มีเดีย (M9 minimal media) โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาล 2% นำไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

3.8.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์โดยการใช้แหล่งคาร์บอนที่ย่อยด้วยเอนไซม์

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.7 มาเจือจางให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 600 nm แล้วเติมลงในอาหารเอ็มไนท์ มินิมัล มีเดีย (M9 minimal media) โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 2% นำไปผ่านการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 20 นาที แล้ว จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่ 24 และ 48

3.8.3 วิธีวัดการเจริญเติบโตจากน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างที่เก็บได้จากการบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มาอย่างละ 30 mL ใส่หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก 50 mL มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสเก็บส่วนตะกอนเซลล์ไปล้างด้วยน้ำกลั่น 30 mL จากนั้นแบ่งใส่หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก 2 mL หลอดละ 1 mL จำนวน 3 หลอด ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 mL ซ้ำอีกรอบแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่จำนวนรอบและเวลาเท่าเดิม จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตะกอนแห้งไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight, g/L) ดังสูตรต่อไปนี้

สูตรการคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight, g/L)

$$\text{cell dry weight (g/L)} = \frac{\text{cell dry weight (g)}}{\text{sample volume (mL)}} \times 1000\ (\text{mL})$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การสกัด PHB

รูปที่ 3.2 แผนผังการสกัด PHB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 3.1 ทำการชั่งหลอดเซนติฟิวก์พลาสติกขนาด 2 mL จำนวน 6 หลอด นำเชื้อจากการเพาะเชื้อตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าแล้วเทแบ่งใส่หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก 50 mL จำนวน 2 หลอด หลอดละ 30 mL นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 7000 rpm ระยะเวลา 10-15 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วเก็บส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์ใส่น้ำกลั่นหลอดละ 3 mL ทั้ง 2 หลอด แบ่งใส่หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก 2 mL ที่ชั่งน้ำหนักไว้ หลอดละ 1 mL จำนวน 6 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แยกหลอดที่ 1, 2, 3 ทิ้งส่วนใสแล้วทำการล้างเซลล์ อีกรอบด้วยน้ำกลั่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว รอบและระยะเวลาเท่าเดิม จากนั้นทิ้งส่วนใสและเก็บส่วนตะกอนเซลล์นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนหลอดที่ 4, 5, 6 ทิ้งส่วนใสเก็บส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์จากนั้นใส่ NaOCl (Sodium hypochlorite) เข้มข้น 10% หลอดละ 1 mL เพื่อทำให้เซลล์แตก แล้วนำไป resuspend cell บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วล้างส่วนตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 mL นำหลอดมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม ทำซ้ำ 2 รอบเมื่อล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น เก็บส่วนตะกอนเซลล์มาล้างด้วย Acetone 1 mL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เวลา 5 นาทีเก็บส่วนตะกอนเซลล์ ล้างต่อด้วย Ethanol 1 mL เป็นขั้นสุดท้ายทิ้งส่วนใสและเก็บตะกอนเซลล์มาอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.9.1 ปริมาณของโพลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

นำตัวอย่างที่เก็บได้จากการบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มาอย่างละ 30 mL ใส่หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก ปริมาตร 50 mL มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสเก็บส่วนตะกอนเซลล์ไปล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นแบ่งใส่หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก 2 mL หลอดละ 1 mL จำนวน 3 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใสเก็บส่วนตะกอนเซลล์มาล้างด้วยโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (NaOCl) หลอดละ 1 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใสเก็บส่วนตะกอนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิมจำนวน 2 ซ้ำ จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยอะซิโตนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและระยะเวลาเท่าเดิม นำไปล้างด้วยเอทานอล ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและระยะเวลาเท่าเดิม จากนั้นนำส่วนตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตะกอนแห้งไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักของ PHB โดยการชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณเป็นปริมาณ PHB (PHB content, gPHB/g cell dry weight) ดังสูตรต่อไปนี้

สูตรการคำนวณน้ำหนัก PHB (PHB weight, g/L)

$$\text{PHB weight (g/L)} = \frac{\text{PHB weight (g)}}{\text{sample volume (mL)}} \times 1000 \text{ (mL)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรการคำนวณปริมาณ PHB (PHB content, gPHB/g cell dry weight)

$$\text{PHB concentration (\%)} = \frac{\text{PHB weight (g)}}{\text{cell dry weight (g)}} \times 100$$

3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS statistics 20 ที่ความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

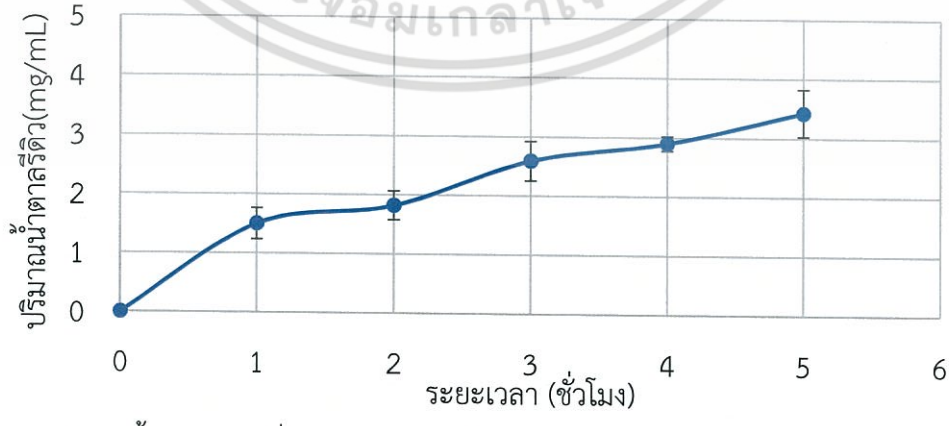
บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

เพื่อศึกษาการการผลิต Polyhydroxybutyrate (PHB) จากเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้ชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์ และกากน้ำตาลในการเพาะเลี้ยง โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพของชานอ้อยและย่อยด้วยเอนไซม์ จากนั้นจึงนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 และการนำกากน้ำตาลไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการจากเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกัน

4.1 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก

ศึกษาชานอ้อยที่ได้รับการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วนำมาไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1% ที่อุณหภูมิ 90 - 100˚C โดยเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ 1, 2, 3, 4, 5 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึง ชั่วโมงที่ 5 มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ และที่ชั่วโมงที่ 5 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดคือ 3.43 mg/mL ดังรูปที่ 4.1 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Laopaiboon *et. al.* (2010) พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสจะเพิ่มขึ้นตามเช่นกัน

เนื่องจากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1% ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไม่เพียงพอสำหรับการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และยังเกิดสารพิษยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย



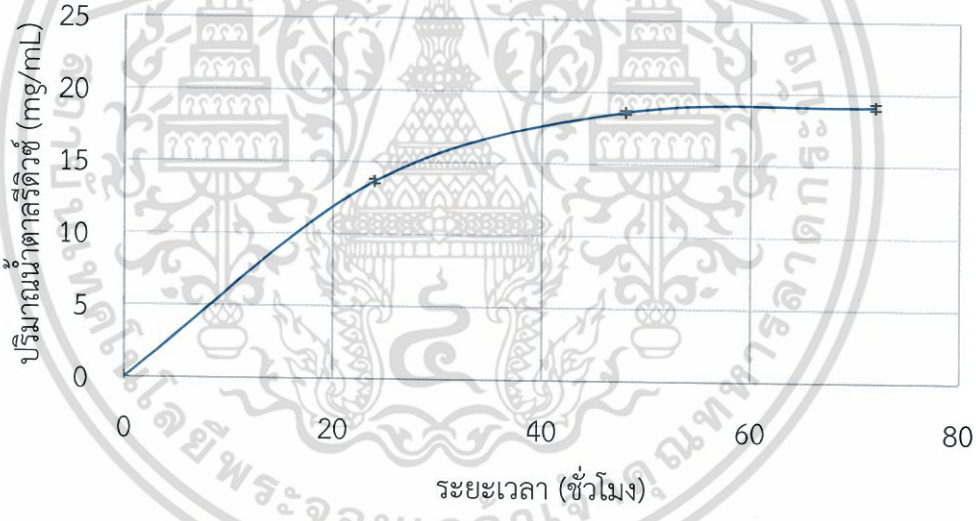
รูปที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกที่ชั่วโมงที่ 1, 2, 3, 4, 5, ตามลำดับโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-100˚C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์

4.2.1 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิส

ทำการทดลองนำชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วมาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้น 22.42 FPU/mL เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมงมาวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicy Acid Method (DNS) (Miller, 1959) (กราฟมาตรฐาน DNS แสดงในภาคผนวก ก) พบว่าที่ 72 ชั่วโมง มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 19.12 mg/mL, ที่ 48 ชั่วโมงมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 18.63 mg/mL และที่ 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 13.67 mg/mL โดยกราฟมาตรฐานและผลที่ได้จากการทดลองจะแสดงในภาคผนวก ก จากข้อมูลทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ทั้ง 3 เวลานั้น แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่ในชั่วโมงที่ 72 และ 48 ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน จึงเลือกใช้การเขย่าที่ 48 ชั่วโมง ทั้งนี้เพื่อลดระยะเวลาในการทดลอง



รูปที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์โดยนำไปไว้ในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm อุณหภูมิ 37°C เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 24, 48 และ 72 แล้ว

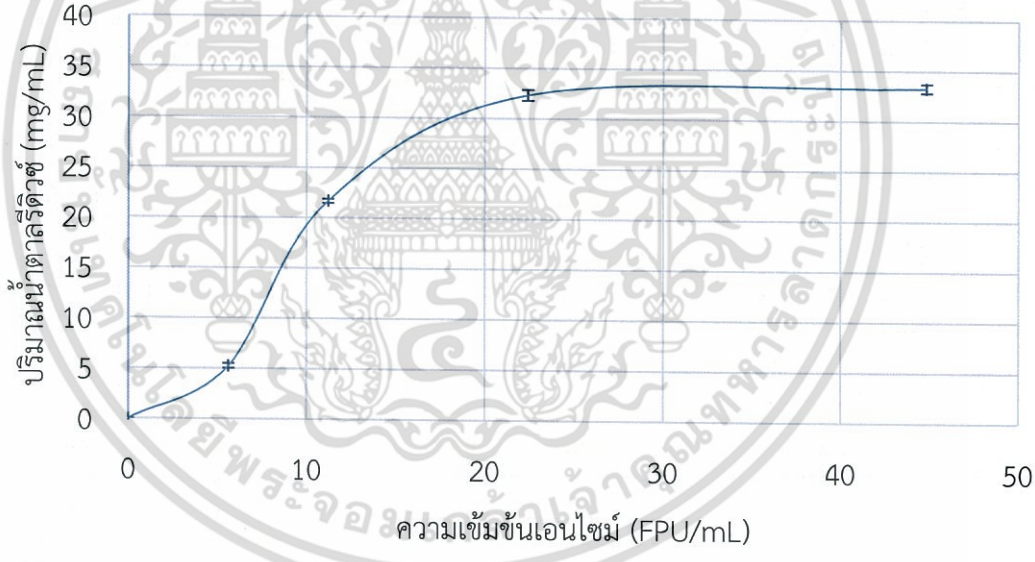
4.2.2 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิส

การเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้น 5.61, 11.21, 22.42, และ 44.84 FPU/mL ไปไว้ในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) (กราฟมาตรฐาน DNS แสดงในภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่าตัวอย่างที่ทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เข้มข้น 44.84 FPU/mL จะไฮโดรไลซิสได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด คือ 33.27 mg/mL รองลงคือเอมไซม์ที่ความเข้มข้น 22.42 FPU/mL จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 32.32 mg/mL เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 11.21 FPU/mL จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 21.08 mg/mL และเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 5.61 FPU/mL จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.08 mg/mL ซึ่งเป็นไปตามงานวิจัยของ Yueshu Gao *et. al*, (2013) ปริมาณน้ำตาลจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 44.84 FPU/mL จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด เท่ากับ 33.27 mg/mL แต่ใกล้เคียงกับการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 22.42 FPU/mL ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 32.32 mg/mL จึงเลือกใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 22.42 FPU/mL เนื่องจากการไฮโดรไลซิสได้ปริมาณน้ำตาลที่เพียงพอสำหรับเป็นแหล่งอาหารให้กับแบคทีเรียเจริญเติบโต และยังเป็นการประหยัดเอนไซม์สำหรับการไฮโดรไลซิส



รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสซานอ้อยขนาด 0.25 mm ด้วยเอมไซม์ที่ความเข้มข้น 5.61, 11.21, 22.42, และ 44.84 FPU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ 250 rpm เวลา 48 ชั่วโมง

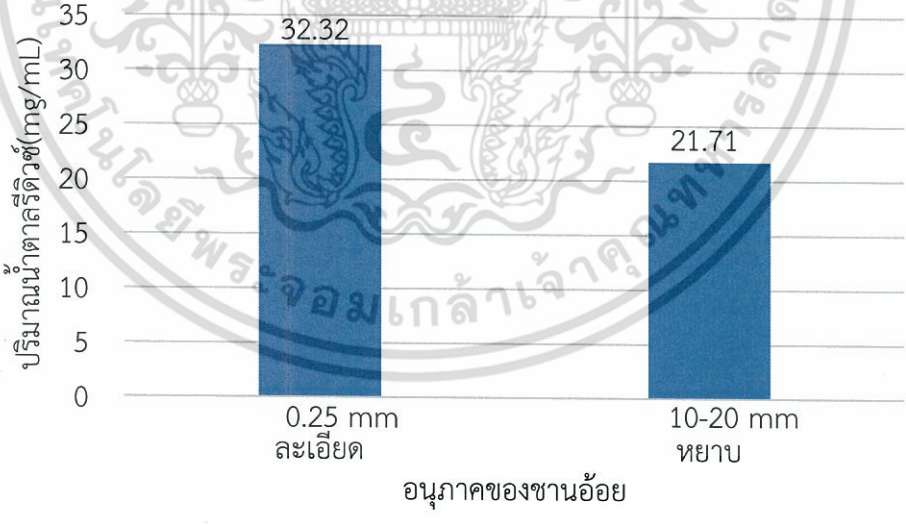
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ศึกษาขนาดอนุภาคของวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

เปรียบเทียบขนาดอนุภาคของชานอ้อยอบที่อุณหภูมิ 60˚C จนน้ำหนักคงที่แล้ว จากนั้นนำไปบดแบบหยาบโดยเข้าบดแบบหยาบ และแบบละเอียดจะนำไปเข้าเครื่องบดหยาบก่อนแล้วนำไปเข้าเครื่องแบบละเอียดที่คัดขนาดอนุภาคขนาด 0.25 mm แล้วนำชานอ้อยที่บดแบบหยาบและแบบละเอียดไปปรับสภาพด้วย NaOH จากนั้นนำชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วทั้งแบบหยาบและแบบละเอียดไปไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 22.42 FPU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37˚C เขย่าที่ 250 rpm แล้วนำไปวิเคราะห์โดยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) (กราฟมาตรฐาน DNS แสดงในภาคผนวก ก)

จากการทดลองจะพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการไฮโดรไลซิสชานอ้อยแบบละเอียดจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 32.32 mg/mL ซึ่งมากกว่าการไฮโดรไลซิสชานอ้อยแบบหยาบที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 21.71 mg/mL

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าเลือกใช้ชานอ้อยแบบหยาบที่จะนำไปไฮโดรไลซิสเพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ต่อไป เนื่องจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชานอ้อยแบบหยาบเพียงพอต่อการนำไปเลี้ยงแบคทีเรีย ทั้งนี้เพื่อลดขั้นตอนการผลิตและระยะเวลาลงได้



รูป 4.4 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยที่มีขนาดอนุภาคที่แตกต่างกัน โดยนำชานอ้อยที่ผ่านการอบจนน้ำหนักคงที่แล้ว ลักษณะหยาบ และลักษณะละเอียดมาปรับสภาพก่อนนำไปไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การผลิต PHB ของเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยและการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

เพื่อการศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และการผลิต PHB ของเชื้อ *Bacillus* sp. ทำการทดลองโดยใช้ อาหารสูตร M9 Minimal Media ผสมกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยชานอ้อยมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20 mg/mL ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) แล้วเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทำการเขย่าตลอดเวลาความเร็วรอบ 250 rpm ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ

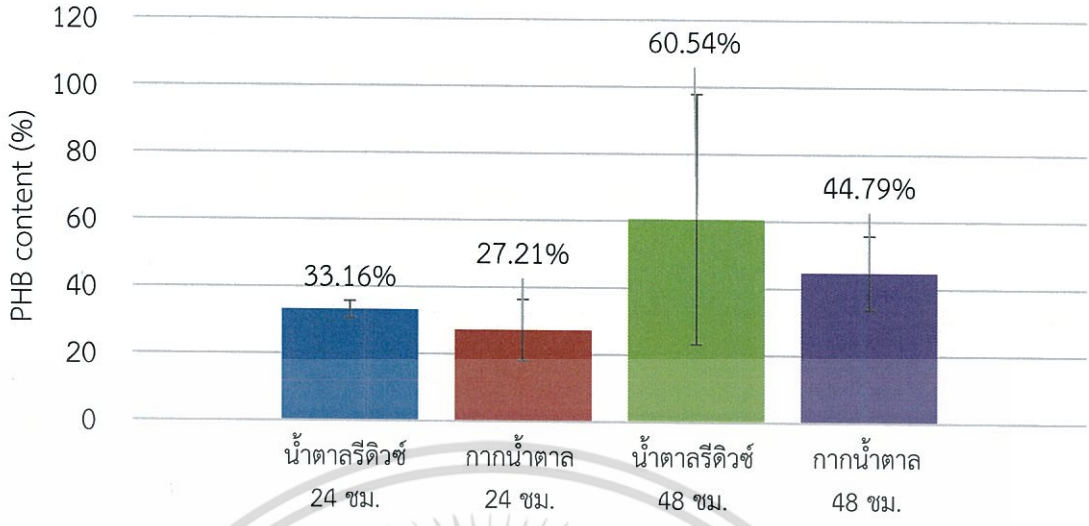
การทดลองโดยใช้ อาหารสูตร M9 Minimal Media ผสมกับกากน้ำตาลที่เจือจางความเข้มข้นของน้ำตาลให้เป็น 20 mg/mL และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) แล้วเติมหัวเชื้อ 58.96 mL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ทำการเขย่าตลอดเวลาความเร็วรอบ 250 rpm และทำการเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

จากการทดลองพบว่าการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 24 และ 48 ชั่วโมง จะได้ % PHB content เท่ากับ 33.16% และ 60.54% ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.60 g/L และ 3.32 g/L ค่าน้ำหนัก PHB เท่ากับ 0.86 g/L และ 2.01 g/L เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Silva *et. al.* (2004) พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.4 g/L และ %PHB content 62% ที่ 72 ชั่วโมง เพราะแตกต่างกันที่ระยะเวลาในการทดลองแต่ค่าที่ได้แตกต่างกันไม่มากนัก

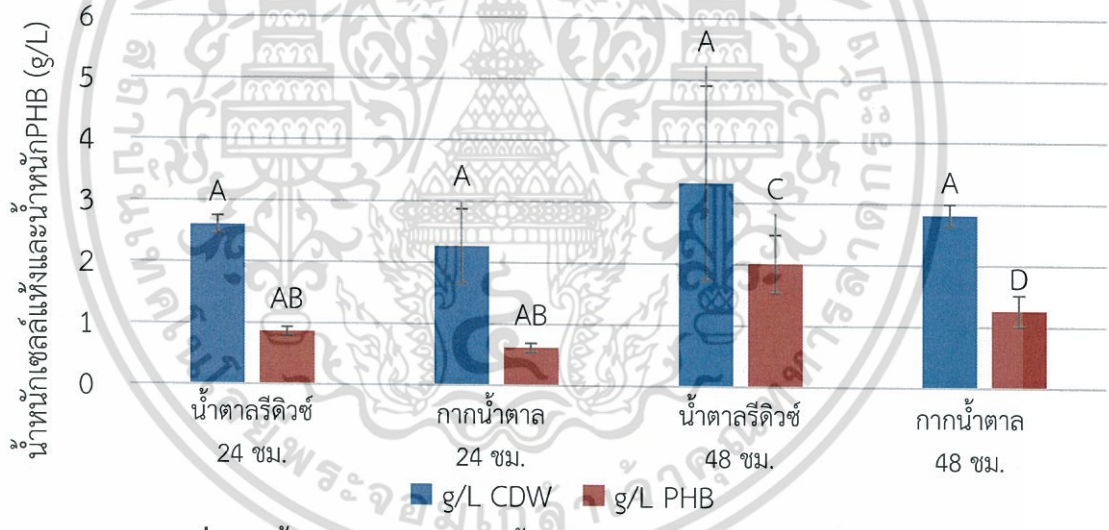
จากการทดลองพบว่าการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ % PHB content เท่ากับ 27.21% และ 44.79 % ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.27 g/L และ 2.82 g/L ค่าน้ำหนัก PHB เท่ากับ 0.62 g/L และ 1.26 g/L ดังรูปที่ 4.5 และ 4.6 ซึ่งได้ปริมาณ PHB น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ Gouda *et. al.* (2001) โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนจะผลิต PHB สูงสุดคิดเป็น 46.2%

ดังนั้นการผลิต PHB ของเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยและการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกัน จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างชั่วโมงที่ 48 โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน จะได้ %PHB content น้ำหนักเซลล์แห้ง และ น้ำหนัก PHB มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ค่าปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (PHB Content) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

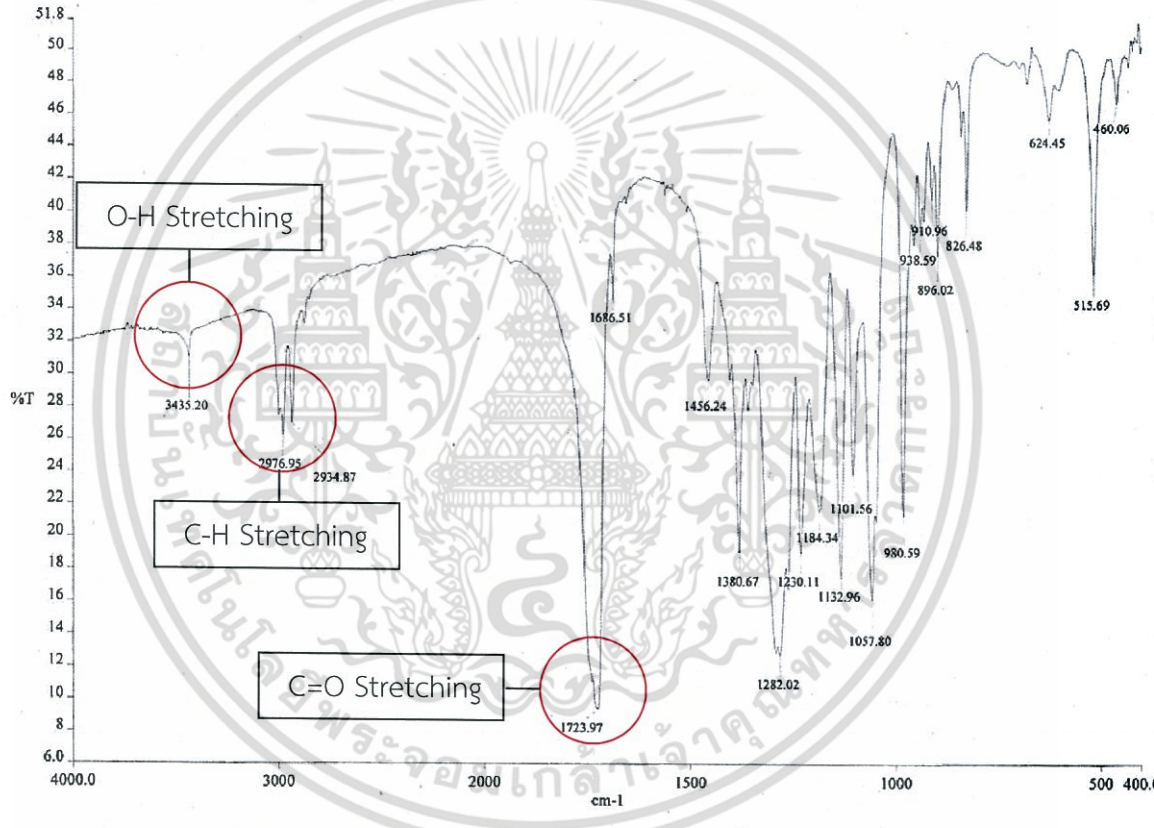


รูปที่ 4.6 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นด้วยเทคนิค Fourier transform infrared Spectroscopy (FT-IR)

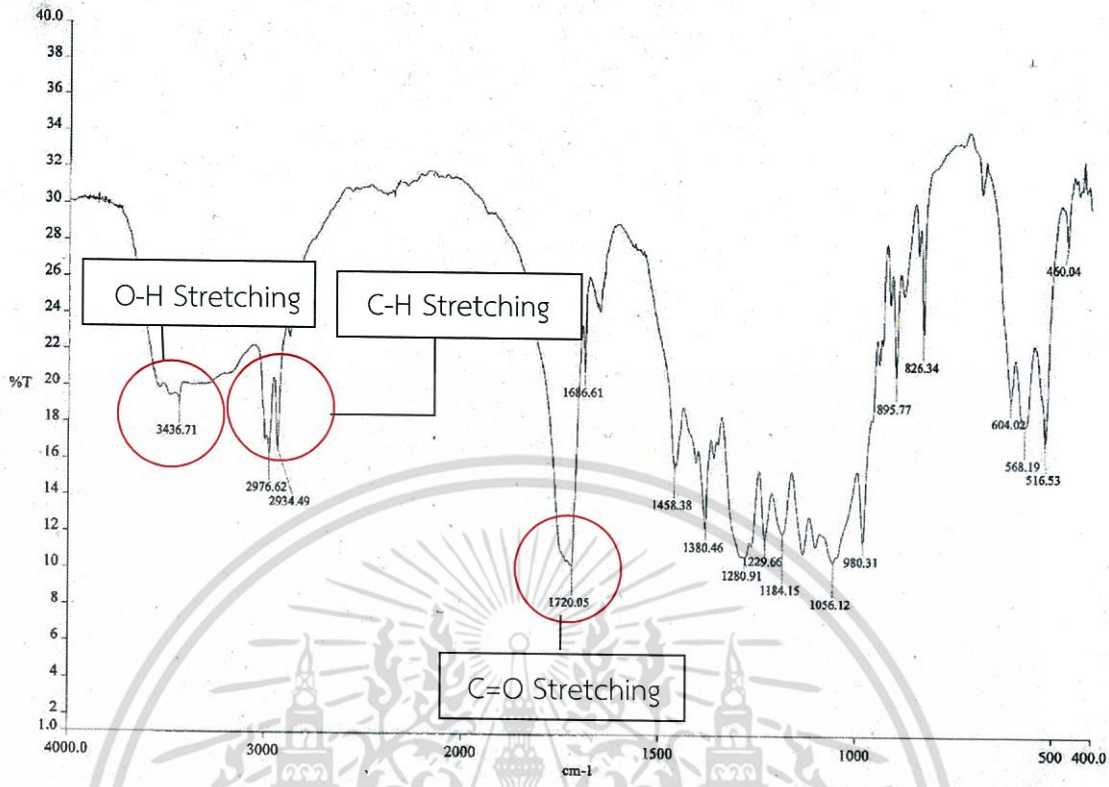
การวิเคราะห์พลาสติกชีวภาพทางการค้า Standard Polyhydroxybutyrate (PHB) ทางวิทยาศาสตร์โดยเทคนิค Attenuated total reflection Fourier transform infrared Spectroscopy ได้สเปกตรัมดังรูปที่ 4.7 และวิเคราะห์พลาสติกที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. หลังจากอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งทำการตรวจวิเคราะห์โดยตั้งค่าช่วงการวิเคราะห์ที่เลขคลื่น 4,000 – 400 cm^{-1} ค่า Resolution 4 cm^{-1} จำนวนการรันตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง Scan ได้สเปกตรัมดังรูป 4.10 และ 4.11



รูปที่ 4.7 สเปกตรัมของ Standard Polyhydroxybutyrate (PHB)

จากสเปกตรัมของพลาสติกชีวภาพทางการค้า Standard Polyhydroxybutyrate (PHB) พบพีคลักษณะกว้างมีเลขคลื่นประมาณ 2500 – 3300 cm^{-1} ซึ่งคาดว่าเป็นพีค O-H Stretching และพีคของ C-H Stretching ที่ช่วงเลขคลื่น 2835 – 3000 cm^{-1} และพีคหลักคือพีคที่เกิดจาก C=O Stretching ที่เลขคลื่น 1725 cm^{-1} (มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2554)

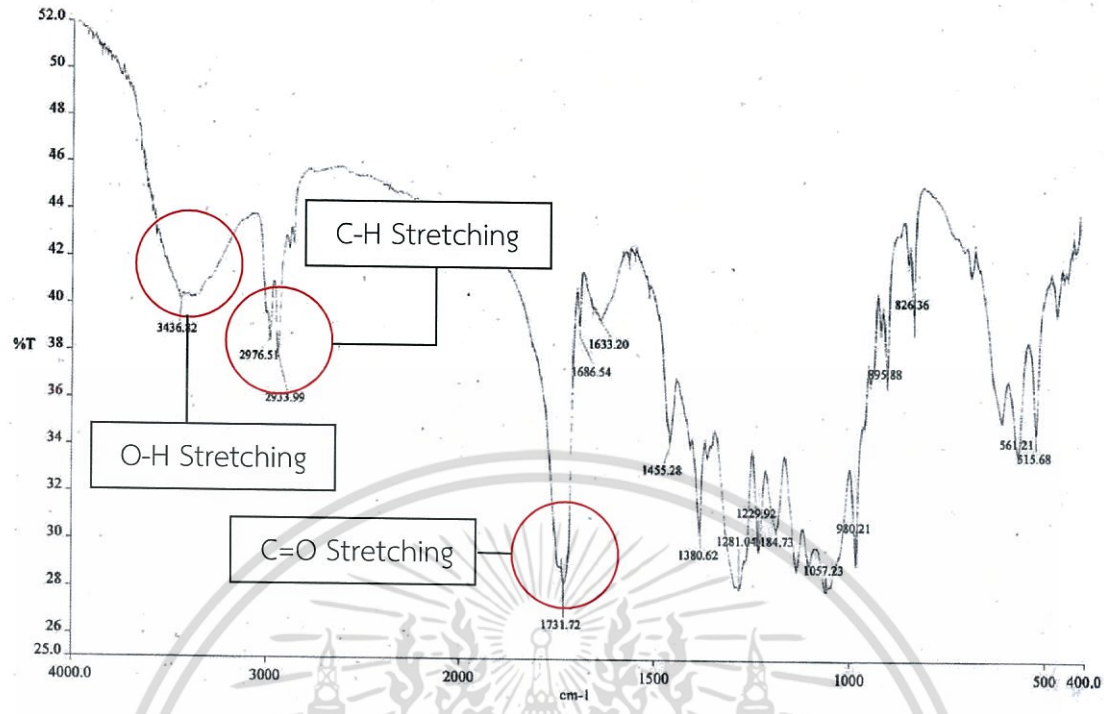
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 สเปกตรัมของการสกัดพลาสติกชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

จากรูป 4.8 พบว่าสเปกตรัมของ Polyhydroxybutyrate (PHB) ที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 250 mL มีพีคที่เกิดขึ้นบริเวณ 3436 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชั่น O-H Stretching ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโพลิเมอร์ ส่วนพีคที่ 2976 cm^{-1} และ 2934 cm^{-1} เป็นพีคของ CH_3 และ CH_2 นอกจากนี้พีคที่เกิดขึ้นที่ 1720 cm^{-1} เป็น C=O Stretching จากพีคที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบ Standard Polyhydroxybutyrate (PHB) สรุปได้ว่าการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. ในกากน้ำตาลปริมาตร 250 mL สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพ Polyhydroxybutyrate (PHB) ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 สเปกตรัมของการสกัดพลาสติกชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

จากรูป 4.9 พบว่าสเปกตรัมของ Polyhydroxybutyrate (PHB) ที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. โดยเลี้ยงในน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยปริมาตร 250 mL มีพีคที่เกิดขึ้นบริเวณ 3436 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงหมู่ฟังก์ชั่น O-H Stretching เป็นองค์ประกอบของโพลิเมอร์ และพีคที่ 2976 cm^{-1} และ 2933 cm^{-1} เป็นพีคของ CH_3 และ CH_2 นอกจากนี้พีคที่เกิดขึ้นที่ 1731 cm^{-1} เป็น C=O Stretching จากพีคที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบ Standard Polyhydroxybutyrate (PHB) สรุปได้ว่าการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยปริมาตร 250 mL สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพ Polyhydroxybutyrate (PHB) ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของ Polyhydroxybutyrate (PHB) ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC)

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) เป็นวิธีที่ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของโพลิเมอร์ที่ตัวอุณหภูมิและเวลาในการทดสอบนี้ได้ทำการทดสอบวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิการหลอมเหลวของวัสดุ (Melting temperature หรือ T_m), วิเคราะห์อุณหภูมิการเกิดผลึกของวัสดุ (Crystallization Temperature หรือ T_c), วิเคราะห์ปริมาณผลึกของวัสดุโพลิเมอร์ (%Crystallinity), วิเคราะห์ปริมาณพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลว (Heat of fusion หรือ ΔH) ของโพลิเมอร์ที่สกัดออกมาได้ ในที่นี้เครื่อง DSC ที่ได้ทำการใช้วัดไม่สามารถวัดค่า T_g ของโพลิเมอร์ได้เนื่องจาก ค่า T_g มาตรฐานของ PHB จะค่า T_g อยู่ในช่วง 5 – 10°C ซึ่งเครื่อง DSC รุ่นนี้สามารถทำการวัดได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 50°C ขึ้นไป

จากรูป 4.10 ผลการทดสอบได้ทำการการวิเคราะห์พลาสติกชีวภาพทางการค้า Standard Polyhydroxybutyrate (PHB) ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) จากรูป 4.12 จะแสดงให้เห็นว่าค่า T_m ของโพลิเมอร์เท่ากับ 178.18°C, ค่า ΔH จะเท่ากับ 68.30 J/g, ค่า T_c เท่ากับ 88.00°C

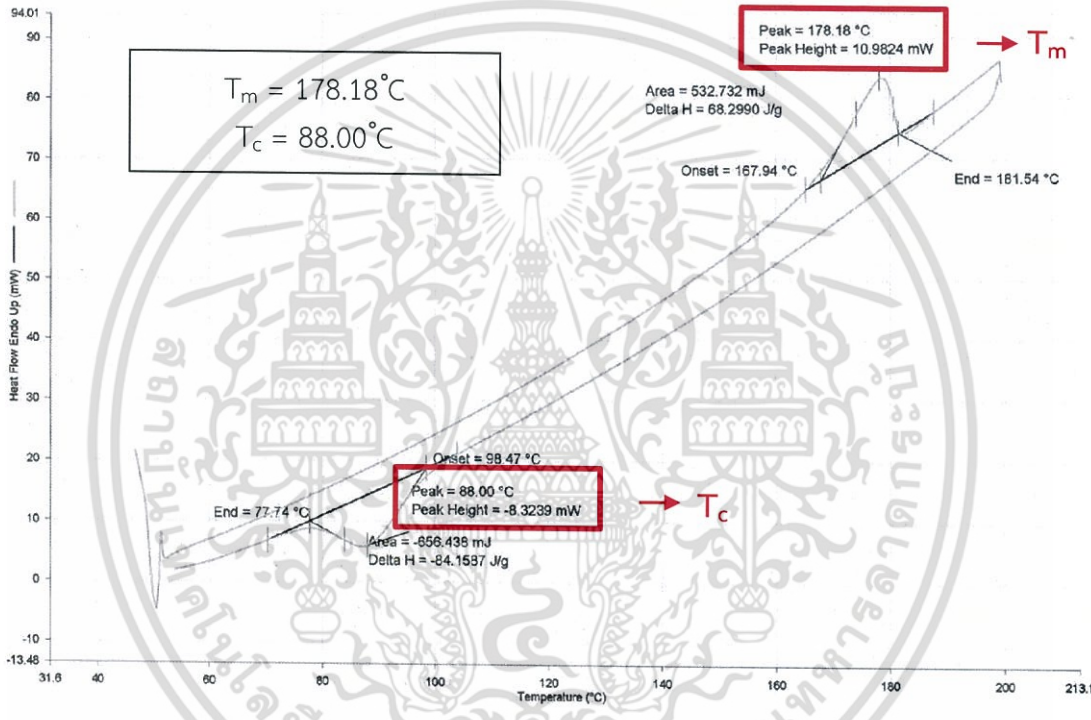
การคำนวณปริมาณผลึกของวัสดุโพลิเมอร์ (%Crystallinity)

$$\% \text{ Crystallinity} = \frac{\Delta H \text{ PHB Sample}}{\Delta H \text{ PHB Standard}} \times 100$$

จากรูปที่ 4.11 ผลการทดสอบได้ทำการวิเคราะห์โพลิเมอร์ชนิด Polyhydroxybutyrate (PHB) ที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) จากรูป 4.11 จะแสดงให้เห็นว่าค่า T_m ของโพลิเมอร์เท่ากับ 172.37°C , ค่า ΔH เท่ากับ 19.0472 J/g, ค่า T_c เท่ากับ 98.43°C และค่าปริมาณผลึกของวัสดุโพลิเมอร์เท่ากับ 27.90 % ซึ่งเมื่อเทียบกับข้อมูลที่ทำการสกัดเซลล์ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์จะได้ค่าปริมาณผลึกของวัสดุโพลิเมอร์ที่ 30% ซึ่งมี PHB มีค่าน้อยกว่ามากเนื่องจาก PHB ที่ได้นั้นไม่บริสุทธิ์ และค่านี้ยังบอกได้ถึงความแข็งแรงของโพลิเมอร์ ซึ่งโพลิเมอร์ที่สกัดได้จะมีความแข็งแรงต่ำกว่าโพลิเมอร์ทางการค้ามาก

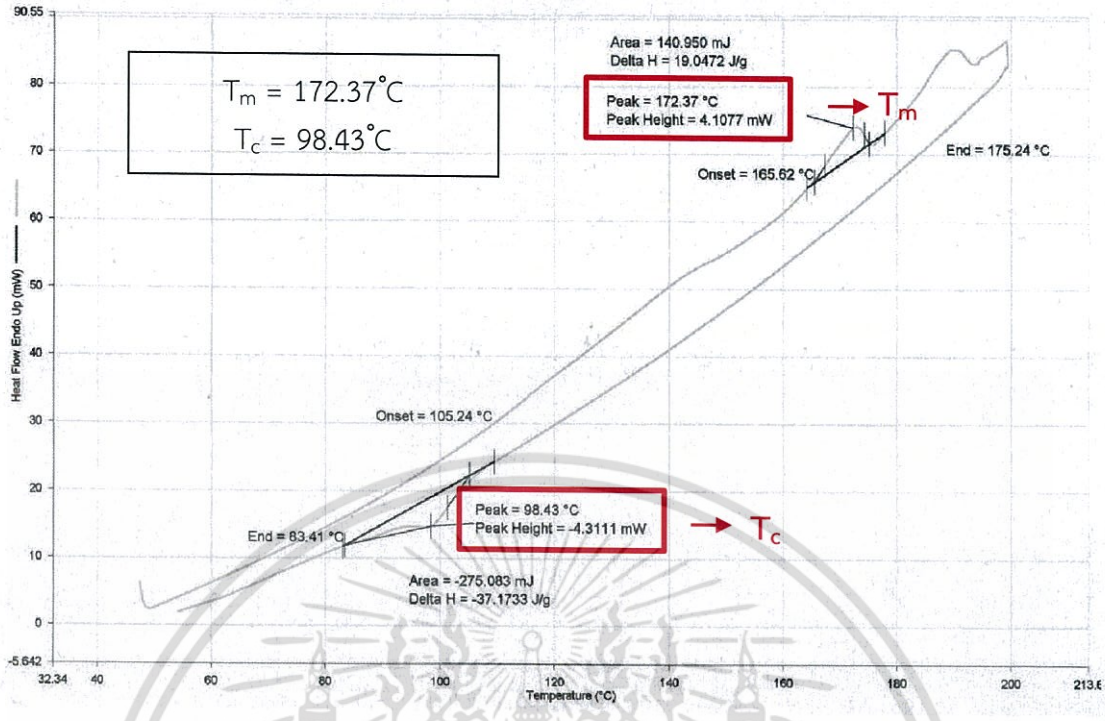
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูป 4.12 ผลการทดสอบได้ทำการวิเคราะห์โพลิเมอร์ชนิด Polyhydroxybutyrate (PHB) ที่สกัดได้จากจุลินทรีย์ที่ใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) จากรูป 4.12 จะแสดงให้เห็นว่าค่า T_m ของโพลิเมอร์ เท่ากับ 165.51°C, ค่า ΔH เท่ากับ 33.25 J/g, ค่า T_c เท่ากับ 99.59°C และค่าปริมาณผลึกของวัสดุโพลิเมอร์เท่ากับ 48.68% ซึ่งเมื่อเทียบความแข็งแรงของโพลิเมอร์นี้น้อยกว่า Standard Polyhydroxybutyrate (PHB) จากทางการค้าแต่แข็งแรงกว่าโพลิเมอร์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

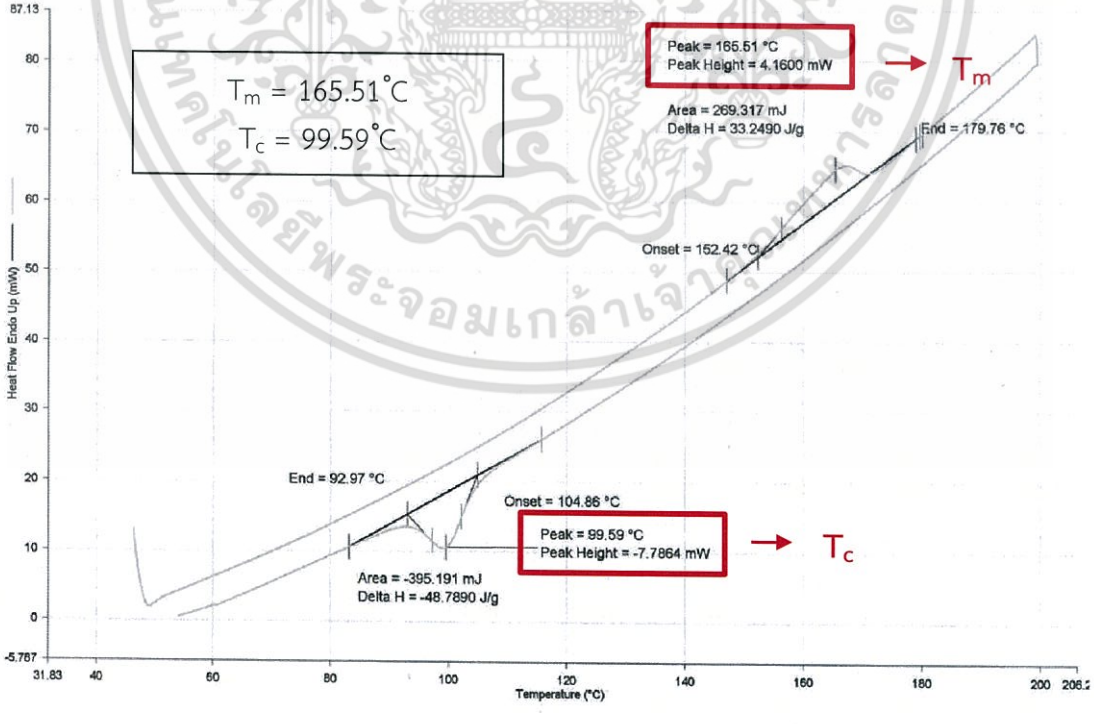


รูปที่ 4.10 เทอร์โมแกรมของพลาสติกชีวภาพทางการค้า Standard Polyhydroxybutyrate (PHB) ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 เทอร์โมแกรมของโพลิเมอร์ชนิด Polyhydroxybutyrate (PHB) ที่สกัดได้จากจุลินทรีย์ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC)



รูปที่ 4.12 เทอร์โมแกรมของโพลิเมอร์ชนิด Polyhydroxybutyrate (PHB) ที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบค่า T_m, T_C, ΔH และ %Crystallinity จากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

แหล่งคาร์บอน	T_m (°C)	T_C (°C)	ΔH (J/g)	%Crystallinity
มาตรฐาน	178.18	88.00	68.30	100.00
กากน้ำตาล	172.37	98.43	19.05	27.90
น้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อย	165.51	99.59	33.25	48.68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ด้วยวิธีการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1% เปรียบเทียบวิธีการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 22.42 FPU/mL ใช้ชานอ้อยแบบหยาบ เวลา 48 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 21.71 mg/mL ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1% อุณหภูมิ 90°C ระยะเวลา 5 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 3.43 mg/ml เนื่องจากวิธีการทดลองทั้งสองวิธีนี้มีปัจจัยที่แตกต่างกันจึงไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จึงเลือกใช้การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพียงพอต่อการนำไปเป็นแหล่งคาร์บอน และมีความเป็นพิษต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วิธีการไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟิวริก

เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนโดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์กับการใช้กากน้ำตาลมาเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่าการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ น้ำหนักเซลล์แห้ง และ %PHB content มากกว่า คือได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 3.32 g/L และ % PHB content 60.54% ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อนำกากน้ำตาลมาเป็นแหล่งคาร์บอนระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 2.82 g/L และ %PHB content 44.80% จึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง จะได้ปริมาณตัวอย่าง PHB สูงที่สุด

ผลจากการนำตัวอย่างที่ได้จากการสกัดเชื้อ *Bacillus* sp. ที่ใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ มาวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชั่นด้วยเทคนิค Fourier transforms infrared Spectroscopy (FT-IR) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ Standard PHB พบพีคที่สำคัญในช่วง O-H Stretching เลขคลื่นประมาณ 2500 – 3300 cm^{-1}, C-H Stretching เลขคลื่นประมาณ 2835 – 3000 cm^{-1} และ C=O Stretching เลขคลื่นประมาณ 1725 cm^{-1} จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างที่นำมานั้นเป็น PHB เนื่องจากใกล้เคียงกับ Standard PHB แต่อาจมีพีคอื่นแทรกมาเนื่องจากขั้นตอนการสกัดอาจจะสกัด PHB ออกมาได้ไม่บริสุทธิ์เพียงพอทำให้มีสารอื่นยังเจือจนอยู่ใน PHB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการนำตัวอย่างที่ได้จากการสกัดเชื้อ *Bacillus* sp. ที่ใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ มาวิเคราะห์หาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ Standard PHB พบว่าค่าอุณหภูมิการหลอมเหลว, ค่าอุณหภูมิการเกิดผลึก, ค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลว มีค่าใกล้เคียงกับ Standard PHB และค่าปริมาณผลึกของวัสดุโพลิเมอร์มีค่าน้อยกว่า Standard PHB เนื่องจากโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ที่ใช้ในการสกัด PHB มีความเป็นเบสสูง (pH 12) จึงทำให้สายโซ่ของ PHB สั้นลงทำให้ความเป็นผลึกต่ำ จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างที่นำมานั้นมีสมบัติใกล้เคียงกับ Standard PHB

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในการสกัด PHB จากแบคทีเรียโดยใช้โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ซึ่งมีความเป็นเบสสูงเป็นตัวสกัดทำให้สายโซ่ PHB ที่สกัดได้สั้นลง หากมีการวิจัยเพื่อต่อยอดอาจใช้สารเคมีในการสกัดตัวอื่น เช่น Methanol เพื่อที่จะทำให้ประสิทธิภาพการสกัดและสมบัติของ PHB ดีขึ้น

5.2.2 งานวิจัยในครั้งนี้ ทำการทดลองในฟลาสก์ขนาด 500 mL เพื่อเป็นการต่อยอดควรทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักซึ่งมีกำลังการผลิตมากกว่าระดับฟลาสก์สามารถเพิ่มกำลังการผลิต PHB ให้ได้ปริมาณมากขึ้น

5.2.3 การใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์และใช้น้ำตาลจากกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเพาะเชื้อเป็นระเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง อาจมีการเติมแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรียเนื่องจากแบคทีเรียอาจใช้จะน้ำตาลหมดไป

5.2.4 ควรทดลองเปลี่ยนแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกษม พิพัฒน์ปัญญานุกูล. 2541. **การควบคุมคุณภาพงานเตรียมสิ่งทอเพื่อการย้อม**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์บริษัทประชาชน.

ศุลีพร แสงกระจ่าง และคณะ. 2556. "ผลกระทบของพลาสติกต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม." *วารสารพิษวิทยาไทย*. 28(1). : 39-50.

อรุณวรรณ นุชพ่วง. 2547. การย่อยสลายหญ้าแฝกหอม *Vetiveriazizanioides* Nash โดยใช้เชื้อราที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Adney, B. and Baker, J. 1996. Measurement of Cellulase Activities. National Renewable Energy Laboratory. 2-11.

Abhishek, D.T. 2013. Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes* sp. Biomass and Bioenergy. 55: 243-250.

Biotechnologie Kempe. 2006. **องค์ประกอบของกากน้ำตาลแมน**. [Online]. Available : http://www.biotechnologie-kempe.de/Molasses_OLBRICH.pdf.

Fan,L.T.,Gharpuray, M.M. and Lee, Y.H. 1987. Cellulose Hydrolysis Biotechnology.

Grous, W.R., Converse, A.O. and Grethlein, H.E. 1986. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. Enzyme Microb. Technol.8: 274-280.

Hatatakka, A.I. 1983. Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymatic saccharification of cellulose. Appl. Microbiol. 18: 350-357.

Igem. 2010. **PHB systhasis**. [Online]. Available : http://2010.igem.org/Team:INSA-Lyon/Project/Stage1/Theory

Javier M., N. 2014. Use of residual banana for polyhydroxybutyrate(PHB) production: Case of study in an integrated biorefinery. Waste Management. 34: 2634-2640.

Jogdand, S. N. (2004). *Welcome to the Eco-Friendly Plastic (online).* Retrieved December 25, 2010, from http://www.biotechsupportindae.com/jogsn/.html.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khanna, S., &Srivastana, A. K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstoniaeutrophus. Process Biochemistry,* 40, 2173-2182.

Metinee3. 2016. **ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหาร.** [Online]. Available :https://metinee3.files.wordpress.com/.../3e0b89be0b8b1e0b888e0b888e0b8b1e0b8a.

Miller, G., 1959. Use of dinitrisalicylic acid reagentfor determination of reducing sugars. Analytical Chemistry. 31: 426-429.

Mona, K.G., Azza, E.S. and Sanaa, H.O. 2001. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. Microbiolcal Research. 156: 201–207.

Narcotic Control Division. 2012. **Sodium hypochlorite.** [Online]. Available : http://narcotic.fda.moph.go.th/welcome/?p=1585.

Ncbi. 2014. **โครงสร้างของเซลลูโลสแสดงพันธะ Beta-Glucosidic และพันธะไฮโดรเจน.** [Online]. Available : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4163452/figure/fig5/

Ncbi. 2014. **โครงสร้างของลิกนิน.** [Online]. Available : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4163452/figure/fig3/.

Ncbi. 2014. **โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส,โครงสร้างของไซแลน,โครงสร้างของกลูโคแมน.** [Online]. Available : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4163452/figure/fig4/

Pattana, L., Arthit, T. Vichean, L. and Lakkana, L. 2009. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. Bioresource Technology. 101: 1036–1043.

Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, V.C., &Kalai. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87: 137-146.

Royal Society of Chemistry. 2016. **Analytical Methods.** [Online]. Available : http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/ay/c5ay01233c#!divAbstrac

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Saratale, G. and Min-kyu, O. 2015. Characterization of poly-3-hydroxybutyrate(PHB) produced from Ralstoniaeutopha using an alkali-pretreated biomass feedstock. Biological Macromolecules. 80: 627–635.

Silva, L.F., Taciro, M.K., Ramos, M.E., Carter, J.M., Pradella, J.G.C.and Gomez, J.G.C. 2004. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. Microbiol Biotechnol. 31: 245–254.

Sudesh, K., Abe, H., &Doi, Y. (2000). Synthesis structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Progress in Polymer Science. 25: 1503-1555.

Sun,Y. and Cheng,J.2002.Hydrolysis of linocellulosic material for ethanol production : a review. Bioresource Technol. 83: 1-11.

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

TAPPI.2000-2001. Method for determination of alfa-,beta-,gramma-,cellulose in pulp. Technical Association of Pulp Industry.

Wikimedia. 2015. **องค์ประกอบชานอ้อย**. [Online]. Available : https://th.wikipedia.org/wiki/ชานอ้อย.

Wikimedia. 2016. **การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส**. [Online]. Available : https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/be/Types_of_Cellulase2.png/500px-Types_of_Cellulase2.png

Wikimedia. 2016. **โครงสร้างโพลิไฮดรอกซีบิวทิเรต**. [Online]. Available : https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8d/Poly-(R)-3-hydroxybutyrat.svg/200px-Poly-(R)-3-hydroxybutyrat.svg.png.

Yueshu, G., Xu, J., Zhang, Y. and Liu, Y. 2013. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. Bioresource Technology. 144: 396–400.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการเตรียมสาร การทดลอง และกราฟมาตรฐาน

การวัดค่าของกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

วิธีการเตรียมสาร

DNS Reagents

ผสม :	น้ำกลั่น	1416 mL
	3,5 Dinitrosalicylic acid	10.6 g
	NaOH	19.8 g

ละลายสารดังกล่าวข้างต้น แล้วเพิ่ม

Rochelle salts (sodium potassium tartrate)	306 g
Phenol (ละลายที่อุณหภูมิ 50°C)	7.6 mL
Sodium metabisulfite	8.3 g

ไทเทรตตัวอย่าง 3 mL กับHCl 0.1N ใช้ phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งควรจะใช้ HCl 0.1N จำนวน 5-6 mL (ถ้ามีความจำเป็นที่ต้องเพิ่ม NaOH ; 2 g = 1 mL 0.1N HCL)

Citrate Buffer

สำหรับ *Trichodermareesei* ใช้ Citrate Buffer 0.05M ที่ pH 4.8 ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสอื่นๆ ค่าพีเอชและการทดสอบอุณหภูมิอาจแตกต่างกันซึ่งเงื่อนไขการทดสอบจะต้องบอกเมื่อรายงานผล

Citric acid monohydrate	210 g
น้ำกลั่น	750 mL
NaOH เพิ่มจนค่า pH เท่ากับ 4.3	50 ถึง 60 g

เจือจางจนปริมาตร 1 L และตรวจสอบค่า pH และเพิ่ม NaOH จนถึง pH 4.5 เมื่อเจือจาง 1M stock citrate buffer stock ถึง 50 mM pH ควรจะเป็น 4.8 โดยหลังจากเจือจางตรวจสอบค่า pH ให้มีค่า 4.8

การเตรียมกระดาษกรองเพื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ตรวจสอบการแตกของพันธะ Glycosidic bond โดยจะแบ่งการการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ทำคู่ขนานกันไป (สารผสมที่วิเคราะห์, Blanks และตัวควบคุม, สารกลูโคสมาตรฐาน) สารตั้งต้น 50 mg กระดาษกรอง Whatman No. 1 (1.0 x 6.0 cm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลอง

หลอดทดสอบเอนไซม์

1) นำกระดาษที่ตัดใส่ในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 mL
2) เติม 0.05 M Na-Citrate pH 4.8 จำนวน 1.0 mL ลงบนกระดาษกรองให้เปียก
3) ปรับอุณหภูมิ 50°C ของหลอดบับเฟอร์ และสารตั้งต้นให้เท่ากัน
4) เติมเอนไซม์เจือจาง 0.5 mL ลงในcitrate bufferและเติมเอนไซม์เจือจางลงในกลูโคสอย่างน้อย 2 ความเข้มข้น โดยกลูโคสต้องน้อยกว่า 2 mg (เติมในกลูโคส 2 mg, 1.9 mg ตามลำดับ)
5) บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เวลา 60 นาที
6) เมื่อครบ 60 นาที เอาหลอดทดลองออกมา แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม DNS 3 mL ผสมเข้าไป

Blanks และตัวควบคุม

1) Blanks : citrate buffer 1.5 mL
2) Enzyme control : citrate buffer 1.0 mL + เอนไซม์เจือจาง 0.5 mL
3) Substrate control : citrate buffer 1.5 mL+ filter-paper strip (กระดาษกรอง)

การเตรียมกลูโคสมาตรฐาน

1) เตรียม Glucose stock solution10 mg/mL ควรจะปิดสนิทและเก็บไว้แช่แข็ง
2) เจือจาง Stock solution

   1.0 mL + 0.5 mL buffer = 1:1.5 = 6.7 mg/mL (3.35 mg/0.5 mL)
   1.0 mL + 1.0 mL buffer = 1:2 = 5 mg/mL (2.5 mg/0.5 mL)
   1.0 mL + 2.0 mL buffer = 1:3 = 3.3 mg/mL (1.65 mg/0.5 mL)
   1.0 mL + 4.0 mL buffer = 1:5 = 2 mg/mL (1.0 mg/0.5 mL)
3) นำ Glucose stock ที่เจือจางตามความเข้มข้นที่เตรียมไว้มาความเข้มข้นละ 0.5 mL จากนั้นเติมซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นละ 1 mL
4) Blanks และ หลอดควบคุม, Glucose standardsต้มที่อุณหภูมิ 50°C เวลา 60 นาที เมื่อครบ 60 นาที เอาหลอดทดลองออกมา แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม DNS 3 mL ผสมเข้าไป

การเปลี่ยนสี

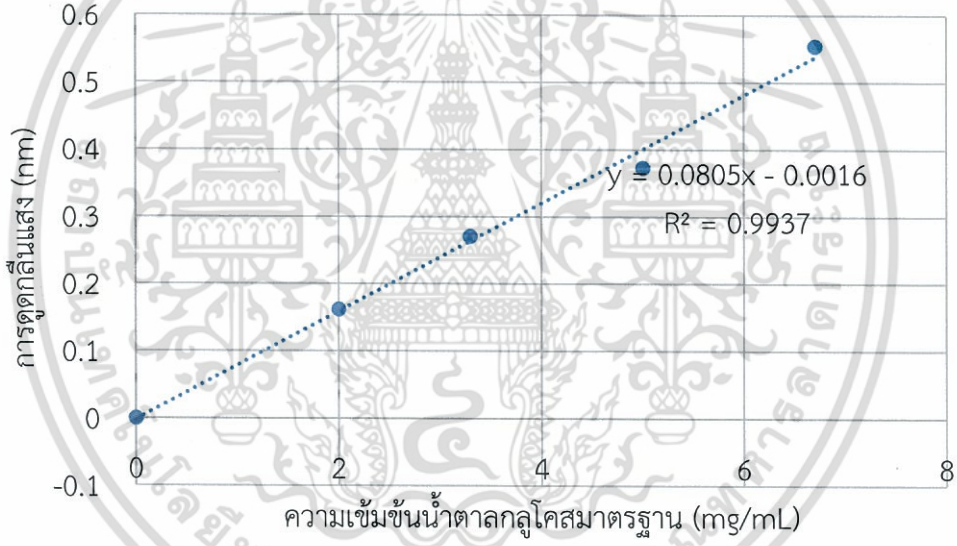
1) นำทุกหลอดมาต้ม 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งเพื่อลดอุณหภูมิ
2) นำสารละลายที่ผ่านการต้มแล้ว 5 นาที มา 0.2 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2.5 mL แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลกราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) เมื่อทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
0	0
2	0.162
3.3	0.271
5.0	0.373
6.7	0.554

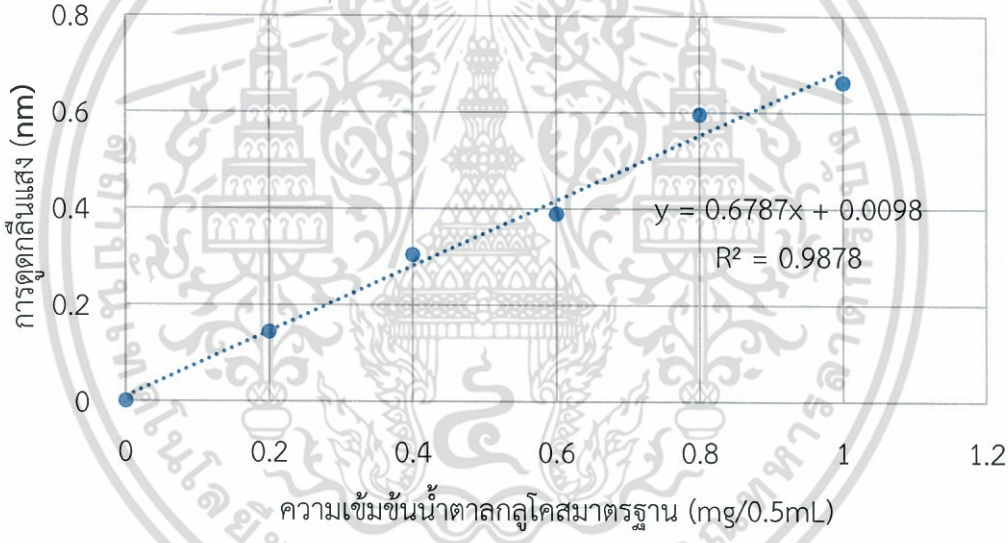


รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1%

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
0	0
0.2	0.144
0.4	0.304
0.6	0.389
0.8	0.596
1.0	0.662

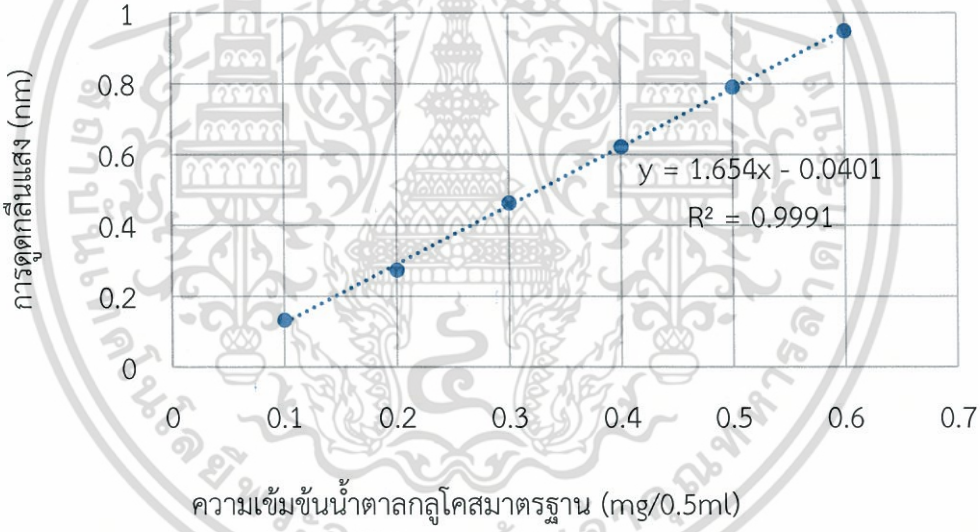


รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์ เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 24, 48, และ 72

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (mg/0.5mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
0.1	0.133
0.2	0.274
0.3	0.464
0.4	0.622
0.5	0.791
0.6	0.949

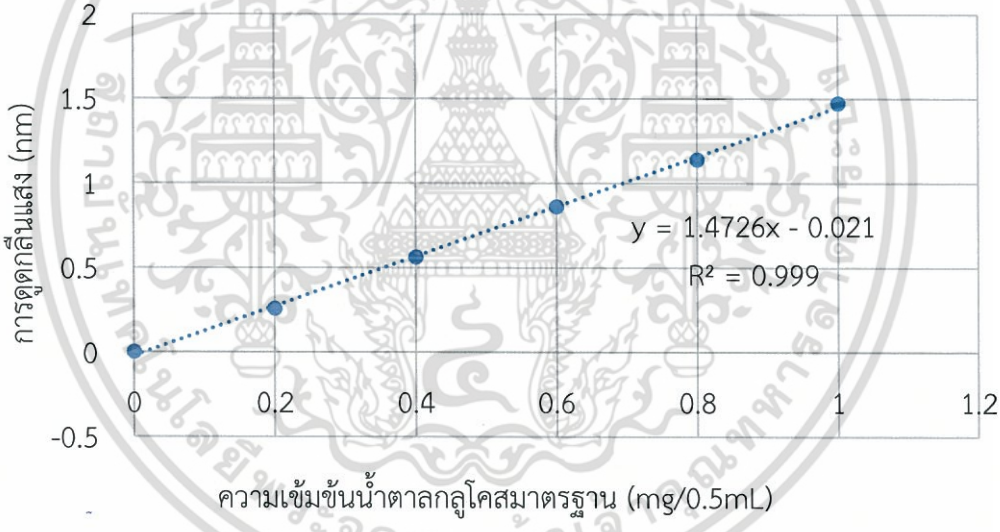


รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์ เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 24, 48, และ 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์ ที่ความเข้มข้น 5.61, 11.21, 22.42, และ 44.84 FPU/mL

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (mg/0.5mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
0	0
0.2	0.257
0.4	0.563
0.6	0.86
0.8	1.139
1.0	1.473

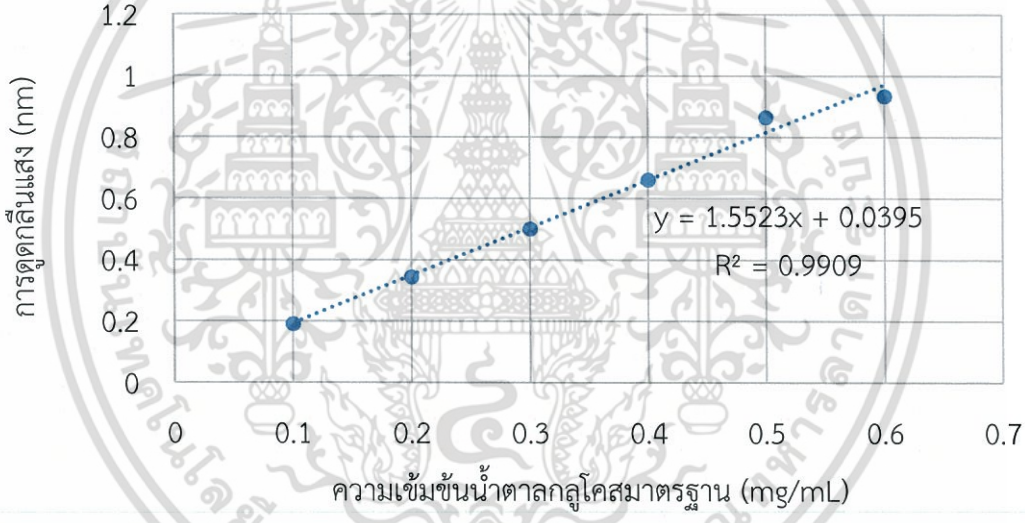


รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 5.61, 11.21, 22.42, และ 44.84 FPU/mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยแบบหยาบ

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
0.1	0.192
0.2	0.344
0.3	0.501
0.4	0.661
0.5	0.865
0.6	0.934



รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยไฮโดรไลซิสชานอ้อยแบบหยาบด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 22.42 FPU/mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตาราง ข.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสจากชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1% ที่จำนวนชั่วโมงที่แตกต่างกัน

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสด้วยด้วยกรดซัลฟิวริก 1% (mg/mL)	1.00	3	1.5000	.26514	.15308
	2.00	3	1.8233	.24420	.14099
	3.00	3	2.5900	.33407	.19287
	4.00	3	2.9000	.12166	.07024
	5.00	3	3.4333	.39829	.22995
	Total	15	2.4493	.76917	.19860

ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวน

น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสด้วยด้วยกรดซัลฟิวริก 1% (mg/mL)	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	.915	4	10	.492

ตาราง ANOVA

น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสด้วยด้วยกรดซัลฟิวริก 1 % (mg/mL)		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
	Between Groups	7.453	4	1.863	22.450	.000
	Within Groups	.830	10	.083		
	Total	8.283	14			

ตารางแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1% ด้วยจำนวนชั่วโมงที่แตกต่างกัน(mg/mL)

Duncan[a]

	จำนวนชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสด้วยด้วยกรดซัลฟิวริก 1 % (mg/mL)	1.00	3	1.5000		
	2.00	3	1.8233		
	3.00	3		2.5900	
	4.00	3		2.9000	
	5.00	3			3.4333
	Sig.		.199	.217	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.2 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสจากชานอ้อยด้วยจำนวนชั่วโมงที่แตกต่างกัน

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	จำนวนชั่วโมงในการไฮโดรไลซิส	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (mg/mL)	3	13.6767	.16166	.09333	3
	3	18.6367	.12662	.07311	3
	3	19.1167	.21127	.12197	3
	9	17.1433	2.61245	.87082	9

ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวน

น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (mg/mL)	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	.791	2	6	.495

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	54.426	2	27.213	940.535	.000
Within Groups	.174	6	.029		
Total	54.599	8			

ตารางแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์ด้วยจำนวนชั่วโมงที่แตกต่างกัน (mg/mL)

Duncan[a]

จำนวนชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
24.00	3	13.6767		
48.00	3		18.6367	
72.00	3			19.1167
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.3 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสจากชานอ้อยด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (FPU/mL)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
44.84	3	5.2700	.07211	.04163
22.42	3	21.6767	.21032	.12143
11.21	3	32.3233	.55157	.31845
5.61	3	33.2733	.44163	.25497
Total	12	23.1358	11.78052	3.40074

ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวน

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (FPU/mL)	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	4.880	3	8	.032

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1525.489	3	508.496	3706.916	.000
Within Groups	1.097	8	.137		
Total	1526.586	11			

ตารางแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์ด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน (mg/mL)

Duncan[a]

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (FPU/mL)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
44.84	3	5.2700			
22.42	3		21.6767		
11.21	3			32.3233	
5.61	3				33.2733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a.Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.4 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB ชั่วโมงที่ 24 และ 48 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์และกากน้ำตาล

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

		N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	ชานอ้อย 24 ชั่วโมง	3	2.6033	.14468	.08353
	กากน้ำตาล 24 ชั่วโมง	3	2.2667	.60715	.35054
	ชานอ้อย 48 ชั่วโมง	3	3.3200	1.58660	.91602
	กากน้ำตาล 48 ชั่วโมง	3	2.8200	.17776	.10263
	รวม	12	2.7525	.83294	.24045
น้ำหนัก PHB (g/L)	ชานอ้อย 24 ชั่วโมง	3	.8633	.07234	.04177
	กากน้ำตาล 24 ชั่วโมง	3	.6167	.07371	.04256
	ชานอ้อย 48 ชั่วโมง	3	2.0100	.47149	.27221
	กากน้ำตาล 48 ชั่วโมง	3	1.2633	.25325	.14621
	รวม	12	1.1883	.59801	.17263

ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวน

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
น้ำหนักเซลล์แห้ง	9.455	3	8	.005
น้ำหนัก PHB	6.484	3	8	.016

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	Between Groups	1.755	3	.585	.796	.530
	Within Groups	5.877	8	.735		
	Total	7.632	11			
น้ำหนัก PHB (g/L)	Between Groups	3.340	3	1.113	14.987	.001
	Within Groups	.594	8	.074		
	Total	3.934	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)

Duncan

ปัจจัย		N	Subset for alpha = 0.05
			1
กากน้ำตาล	24 ชั่วโมง	3	2.2667
ชานอ้อย	24 ชั่วโมง	3	2.6033
กากน้ำตาล	48 ชั่วโมง	3	2.8200
กากน้ำตาล	48 ชั่วโมง	3	3.3200
Sig.			.195

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล น้ำหนัก PHB (g/L)

Duncan

ปัจจัย		N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
กากน้ำตาล	24 ชั่วโมง	3	.6167		
ชานอ้อย	24 ชั่วโมง	3	.8633	.8633	
กากน้ำตาล	48 ชั่วโมง	3		1.2633	
กากน้ำตาล	48 ชั่วโมง	3			2.0100
Sig.			.300	.110	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
เทคนิคการวิเคราะห์

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นด้วยเทคนิค Attenuated total reflectionFourier transform infrared Spectroscopy (FT-IR)

หลักการ

เทคนิค IR เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาหมู่ฟังก์ชั่นของสาร โดยใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าช่วงรังสีอินฟราเรด (Infrared, IR) ที่มีความยาวคลื่น (λ) 0.8 – 200 μm ซึ่งเป็นรังสีที่มีเลขคลื่น หรือ จำนวนคลื่น (Wave number) 12500 – 50 cm^{-1} เมื่อโมเลกุลดูดกลืนแสง IR พันธะจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในแบบต่างๆ เช่น สั่น ยืด หรืองอ พันธะต่างชนิดกันจะดูดกลืนแสง IR ช่วงความยาวคลื่น หรือความถี่ต่างกัน โดยทั่วไปแสดงคลื่น IR ที่ถูกดูดกลืนในรูปของเลขคลื่น (Wave number)

การเตรียมสารตัวอย่าง

การบดผสมกับ KBr และอัดเป็นแผ่นบาง (KBr disc) นำสารPHB ที่สกัดได้ 2-3 mg บดรวมกับ KBr (เฮไลด์ตัวอื่น) ที่อบแห้งจำนวน 0.2-0.5 g บดให้เข้าที่และเทใส่ลงแม่พิมพ์ อัดให้แน่นด้วยความดัน 10^4 kg/cm^2 นาน 5 นาทีจะได้แผ่น KBr ที่มีสาร PHB ที่สกัดได้บรรจุอยู่ (KBr disc) มีลักษณะบางและโปร่งใส ถอดออกจากแม่พิมพ์ด้วยเครื่องมือสำหรับถอดแผ่น KBr ข้อเสียของวิธีนี้คือ จะเปราะ แตกง่าย และดูดความชื้นทำให้ O-H stretch ของน้ำอาจรบกวนการวิเคราะห์

วิธีการทดลอง

1) ทำการเทียบมาตรฐานเครื่องมือด้วยแผ่นฟิล์มโพลิสไตรีน โดยบันทึก IR Spectrum ในช่วง 4,000 – 400 cm^{-1} แล้วเทียบสเปกตรัมที่บันทึกได้กับสเปกตรัมมาตรฐานค่า Resolution 4 cm^{-1}
2) เตรียมสารตัวอย่างโดยผสมสาร PHB ที่สกัดได้ประมาณ 0.2 - 0.5 mg กับ KBr ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่องอัดให้เป็นแผ่นใส
3) ทำการวิเคราะห์และบันทึกสเปกตรัมของสาร PHB ที่สกัดได้ในช่วง 4,000 – 400 cm^{-1} ค่า Resolution 4 cm^{-1}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบคุณลักษณะของโพลิเมอร์ ดิฟเฟอเรนเชียล สแกนนิ่ง แคลอริเมทรี (Differential Scaning Calorimetry ; DSC)

หลักการ

DSC เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ทดสอบวัสดุโดยการวัดค่าพลังงานความร้อนและอุณหภูมิของสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ หรือ การเปลี่ยนทางเคมี เช่นการหลอมเหลว การเปลี่ยนสถานะ การเปลี่ยนรูปผลึก การเกิดปฏิกิริยาเคมี เป็นต้น โดยพื้นที่ใต้กราฟที่เกิดขึ้นจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงความร้อนของตัวอย่าง

สารตัวอย่าง และสารอ้างอิงที่เฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยา ที่บรรจุในถ้วยอะลูมิเนียมขนาดเล็ก (ทองแดง หรือ แกรไฟต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 800 °C) จะถูกให้ความร้อนในบรรยากาศไนโตรเจน จากนั้นสมบัติทางความร้อนของสารตัวอย่างที่เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิในตัวอย่างจะถูกตรวจวัด และแปรผล ปริมาณของตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.5 – 1.0 mg

การเตรียมสารตัวอย่าง

นำ Aluminum pan มาชั่งสาร PHB ที่สกัดได้ ประมาณ 0.5 – 1.0 mg ทำการอัดก่อนนำไปวิเคราะห์

วิธีการทดลอง

1) นำสาร PHB ที่สกัดได้ชั่งและทำการอัดมาทำการวิเคราะห์ โดยถาดแรกเป็นถาดบรรจุสาร PHB ที่สกัดได้ (Sample pan) ส่วนถาดที่สองเป็นถาดอ้างอิง (Reference Pan) ซึ่งเป็นถาดเปล่าไปวางบนอุปกรณ์ให้ความร้อน (Furnace) ชนิดเดียวกัน ซึ่งวางอยู่ข้างๆกัน
2) เริ่มการทดลองจะให้ความร้อนแก่ถาดทั้งสอง โดยเครื่อง DSC จะควบคุมอุณหภูมิให้คงที่อุณหภูมิเริ่มต้น 50 °C และสิ้นสุดการทดลองที่ 200 °C โดยค่าอุณหภูมิจะค่อยๆเพิ่มขึ้น 10 °C ต่อ 1 นาที และลดลง 10 °C บรรยากาศที่ใช้ในการทดลองคือแก๊สไนโตรเจน
3) บันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง