การผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ *Bacillus megaterium* บนอาหารแข็ง

POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION OF *Bacillus megaterium* ON SOLID MEDIUM

อนุตรา แสนนอก
อภิสิทธิ์ วารินทร์
อาภาภรณ์ คำบุปผา

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ *Bacillus megaterium* บนอาหารแข็ง

POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION OF *Bacillus megaterium* ON SOLID MEDIUM

อนุตรา แสนนอก

อภิสิทธิ์ วารินทร์

อาภาภรณ์ คำบุปผา

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION OF *Bacillus megaterium* ON SOLID MEDIUM

ANUTRA SAENNOK

APISIT WARIN

ARPAPORN KHAMBUBPHA

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 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ*Bacillus megaterium*บนอาหารแข็ง Polyhydroxybutyrate Production of *Bacillus megaterium* on Solid medium
ชื่อนักศึกษา	นางสาวอนุตรา แสนนอก รหัสนักศึกษา 57050660 นายอภิสิทธิ์ วารินทร์ รหัสนักศึกษา 57050663 นางสาวอาภาภรณ์ คำบุปผา รหัสนักศึกษา 57050666
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ประธานกรรมการ	
ผศ.พิสมัย ชัยรัตน์อุทัย กรรมการ	
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตของเชื้อ *Bacillus megaterium* บนอาหารแข็ง

ชื่อนักศึกษา นางสาวอนุตรา แสนนอก รหัสนักศึกษา 57050660
นายอภิสิทธิ์ วารินทร์ รหัสนักศึกษา 57050663
นางสาวอาภาภรณ์ คำบุปผา รหัสนักศึกษา 57050666

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)

ภาควิชา เคมี

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate;PHB) เป็นพลาสติกชีวภาพที่สามารถสังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียและสามารถย่อยสลายได้ โครงงานพิเศษนี้จึงต้องการที่จะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 บนอาหารแข็ง เมื่อเปรียบเทียบการผลิต PHB ระหว่างอาหารแข็งและอาหารเหลว พบว่าปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB ที่ผลิตบนอาหารแข็งมากกว่าในอาหารเหลว จากนั้นศึกษาแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในอาหารที่มี 2% Molasses ได้น้ำหนัก PHB มากที่สุด ได้น้ำหนัก PHB 5.24 กรัมต่อลิตร (26.53 %น้ำหนักเซลล์แห้ง) จากนั้นนำ Molasses มาศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดยใช้ความเข้มข้น Molasses ที่แตกต่างกัน จากการทดลองพบว่าความเข้มข้น 1% Molasses ได้น้ำหนัก PHB มากที่สุดเท่ากับ 3.97 กรัมต่อลิตร (23.96 %น้ำหนักเซลล์แห้ง) นำ PHB ที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR ผลการวิเคราะห์พบว่าตัวอย่างที่ได้มีสมบัติเป็น PHB เมื่อเทียบกับ Standard PHB

คำสำคัญ : พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB), แบคทีเรียบาซิลลัส, โซเดียมไฮโปคลอไรท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Polyhydroxybutyrate Production of *Bacillus megaterium* on Solid medium
Students	Miss Anutra Saennok Student ID 57050660
	Mr. Apisit Warin Student ID 57050663
	Miss Arpaporn Khambubpha Student ID 57050666
Degree	Bachelor of Science (Environmental Chemistry)
Department	Chemistry
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Dr. Tipachai Vatanavicharn

Abstract

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a bioplastic that synthesized and decomposed by bacteria. This project optimized PHB production using *Bacillus megaterium* SWU 01 strains on solid medium. Comparing between solid and liquid medium, the results showed that both dry cell weight and PHB weight produced from solid medium were significantly higher than those from liquid medium. Then the appropriate carbon sources were investigated. Medium with 2% Molasses represented the best of carbon sources that produced 5.24 g/l of PHB (26.53% dry cell weight). The effect of molasses concentration was then determined. It was found that the PHB production using 1% Molasses as a carbon source gave the highest PHB content of 3.97 g/l (23.96% dry cell weight). FT-IR analysis of the extracted PHB showed that the sample had the same properties compared to the standard PHB.

Keywords: Polyhydroxybutyrate (PHB), *Bacillus megaterium*, Sodium Hypochlorite

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทางคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน เป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้ความรู้คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลืออย่างใกล้ชิด และช่วยชี้แนะแนวทางในการทำ โครงงานพิเศษตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และขอขอบพระคุณกรรมการสอบโครงงานพิเศษ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ และ ผศ.พิสมัย ชัยรัตน์อุทัย ที่ให้คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความรู้คำแนะนำ คำปรึกษา และเอื้อเฟื้อความสะดวกในการใช้สถานที่ เครื่องมือสารเคมี ในการวิจัยงานต่างๆจนโครงงานพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ภาควิชาเคมี ภาควิชาชีววิทยา รวมทั้งนักศึกษาระดับปริญญาโท คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือตลอดการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ที่ให้การสนับสนุนทางด้านการศึกษา คอยอบรมสั่งสอน และคอยเป็นแรงผลักดันในการทำโครงงานพิเศษนี้ คณะผู้จัดทำหวังว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะเกิดประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ หากมีข้อผิดพลาด ข้อบกพร่องประการใด คณะผู้จัดทำโครงงานวิจัยขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

อนุตรา แสนนอก
อภิสิทธิ์ วารินทร์
อาภาภรณ์ คำบุปผา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ฌ
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 1
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ปัญหาพลาสติกในปัจจุบัน 3
2.2 ประเภทของพอลิเมอร์ 3
2.2.1 จำแนกตามแหล่งของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิต 3
2.2.2 จำแนกตามกระบวนการสังเคราะห์ 4
2.3 พลาสติกชีวภาพ 4
2.4 การย่อยสลายของพลาสติก 5
2.5 พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) 6
2.5.1 คุณสมบัติทั่วไปของ PHB 7
2.5.2 การสังเคราะห์และสะสม PHB ในแบคทีเรีย 9
2.5.3 การสกัดแยก PHB และการทำให้บริสุทธิ์ 10
2.5.4 แบคทีเรียที่ผลิต PHB 10
2.5.5 การประยุกต์ใช้ PHB 11
2.5.6 การย่อยสลาย PHB 11
2.6 *Bacillus* 11
2.6.1 แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* 12
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต 12
2.7.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ 12
2.7.2 อุณหภูมิ 13
2.7.3 พีเอช 13
2.7.4 แหล่งคาร์บอน 13
2.7.5 แหล่งไนโตรเจน 13
2.7.6 ออกซิเจน 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7.7 ไอออนของโลหะหนัก 13
2.7.8 ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส และเกลือแร่ 13
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 15
3.1 วัสดุอุปกรณ์ 15
3.1.1 เชื้อแบคทีเรีย 15
3.1.2 สารเคมี 15
3.1.3 อุปกรณ์ 15
3.2 วิธีดำเนินการทดลอง 16
3.2.1 การ streak plate โดยเทคนิค Streak-Plate Technique 16
3.2.2 เตรียม starter 17
3.2.3 การผลิต PHB บนอาหารแข็ง 17
3.2.4 การผลิต PHB ในอาหารเหลว 17
3.2.5 การหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB บนอาหารแข็ง 18
3.2.6 การหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB บนอาหารแข็ง 18
3.3 การสกัด PHB 19
3.4 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง 19
3.5 การหาน้ำหนัก PHB 20
3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ 20
3.7 การวิเคราะห์โครงสร้างของ PHB 20
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผลการทดลอง 21
4.1 เปรียบเทียบการผลิต PHB บนอาหารแข็งและในอาหารเหลว 21
4.2 การหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB บนอาหารแข็ง 22
4.3 การหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB บนอาหารแข็ง 23
4.4 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นด้วยเทคนิค FT-IR 24
บทที่ 5 สรุปผลการการทดลองและข้อเสนอแนะ 26
5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 26
5.2 ข้อเสนอแนะ 26
เอกสารอ้างอิง 27
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี ตารางและกราฟ 30
ภาคผนวก ข ผลการทดสอบทางสถิติด้วยโปรแกรม ANOVA 36
ภาคผนวก ค เทคนิคการวิเคราะห์ 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 เปรียบเทียบคุณสมบัติของโพลีโพรไพลีน (PP) และ PHB 8

2.2 สายพันธุ์แบคทีเรียต่างๆที่สามารถผลิต PHB ได้ 10

ก-1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียบนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ 30

ก-2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียในอาหารเหลวด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ 31

ก-3 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียบนอาหารแข็งที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ 31

ก-4 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียบนอาหารแข็งที่มี Molasses ที่ความเข้มข้นต่างๆ 31

ข-1 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็ง ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน 36

ข-1.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 36

ข-1.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ 36

ข-1.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA 36

ข-1.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ 37

ข-2 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการผลิต PHB บนอาหารแข็ง ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ที่แตกต่างกัน 38

ข-2.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 38

ข-2.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนการผลิต PHB บนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ 38

ข-2.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA 38

ข-2.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHBบนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ 39

ข-3 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารเหลว ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน 40

ข-3.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 40

ข-3.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารเหลวด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ 40

ข-3.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA 40

ข-3.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHB บนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ข-4 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการผลิต PHB ในอาหารเหลว ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน 42
ข-4.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 42
ข-4.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนการผลิต PHB ในอาหารเหลวด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ 42
ข-4.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA 42
ข-4.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHB ในอาหารเหลวด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ 43
ข-5 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 44
ข-5.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 44
ข-5.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็งโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 44
ข-5.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA 44
ข-5.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็งโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 45
ข-6 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของของน้ำหนัก PHB บนอาหารแข็ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 46
ข-6.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 46
ข-6.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนการผลิต PHB บนอาหารแข็งโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 46
ข-6.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA 46
ข-6.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHB บน อาหารแข็งโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 47
ข-7 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็ง โดยใช้ Molasses ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 48
ข-7.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 48
ข-7.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็งโดยใช้ Molasses ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 48
ข-7.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA 48
ข-7.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็งโดยใช้ Molasses ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 49
ข-8 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการผลิต PHB บนอาหารแข็ง โดยใช้ Molasses ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 50
ข-8.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ข-8.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนการผลิต PHB บนอาหารแข็ง โดยใช้ Molasses ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 50
ข-8.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA 50
ข-8.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล การผลิต PHB บนอาหารแข็ง โดยใช้ Molasses ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน..... 51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของ PHB	7
2.2	PHB ที่ถูกสะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์	7
2.3	การสังเคราะห์ PHB ในแบคทีเรีย	9
2.4	สภาวะที่จำกัดออกซิเจนของ PHB	9
2.5	*Bacillus megaterium*ที่ย้อมด้วย Sudan Black B และ Safranin	12
3.1	เทคนิค Streak-Plate Technique	17
3.2	ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งและเพื่อหาน้ำหนัก PHB	19
4.1	เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ	21
4.2	เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักPHB ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ	21
4.3	ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักPHB ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ	22
4.4	ค่า %PHB Content ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ	23
4.5	ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่เติมMolasses ความเข้มข้นต่างๆ	23
4.6	ค่า %PHB Content ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่เติม Molasses ความเข้มข้นต่างๆ	24
4.7	สเปคตรัมของ PHB ที่สกัดได้จากเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 ผลิต PHB บนอาหารแข็งที่มี Molasses1% เป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่0.5	25
4.8	สเปคตรัมของ PHB มาตรฐาน	25
ก-1	ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณPHB ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียบนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ	32
ก-2	ค่า %PHB Content ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่ ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ	32
ก-3	การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ	32
ก-4	การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนัก PHB ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ	33
ก-5	ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณPHB ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียในอาหารเหลวด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ	33
ก-6	ค่า %PHB Content ที่ได้จากการผลิตในอาหารเหลว ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ	33
ก-7	การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการผลิตในอาหารเหลวด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

ก-8 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนัก PHB ที่ได้จากการผลิตในอาหารเหลวด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ 34

ก-9 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ 34

ก-10 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนัก PHB ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ 35

ก-11 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการผลิตในอาหารแข็งที่เติม Molasses ความเข้มข้นต่างๆ 35

ก-12 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนักเซลล์PHBที่ได้จากการผลิตในอาหารแข็งที่เติม Molasses ความเข้มข้นต่างๆ 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
°C	Degrees Celsius
Ml	Milliliter
g/l	Grams/Liter
µL	Microliter
L	Liter
M	Molar
% V/V	Percent volume by volume
% W/V	Percent weight by volume
CDW	Cell dry weight
OD	Optical density
NA	Nutrient Agar
rpm	Revolutions per Minute
Nm	Nanometer
Mpa	megapascal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พลาสติกเป็นวัสดุสังเคราะห์ที่เข้ามามีบทบาทมากในชีวิตประจำวันและมีแนวโน้มการใช้งานที่เพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องเพราะสามารถใช้ทดแทนทรัพยากรธรรมชาติ เช่น ไม้และเหล็กได้เป็นอย่างดี ราคาถูกและน้ำหนักเบาสามารถผลิตให้มีสมบัติต่างๆที่ตามวัตถุประสงค์ของการใช้งานรูปแบบต่างๆ พลาสติกอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในด้านการจัดการขยะที่เกิดขึ้น เนื่องจากการย่อยสลายพลาสติกเกิดขึ้นได้ยากหรืออาจใช้เวลานับหลายร้อยปี ดังนั้นเพื่อเป็นการลดปัญหาที่เกิดขึ้นจึงมีการศึกษาค้นคว้าหาวัสดุทดแทนที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี นั่นคือการเลือกใช้พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable Plastic) เช่นพอลิไฮดรอก-ซีอัลคาโนเอท (PHA), พอลิแลคติคแอซิด (PLA) และพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) เป็นต้น ซึ่งพลาสติกเหล่านี้สามารถย่อยสลายได้ในระยะเวลาสั้นและไม่ทำลายสิ่งแวดล้อมแต่พลาสติกชีวภาพยังคงมีราคาสูงอยู่เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ใช้กันอยู่ทั่วไป

พอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate) หรือ PHB เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย โดย PHB จะถูกสะสมภายในเซลล์ของแบคทีเรียและมีการสกัด PHB ออกจากเซลล์เพื่อนำออกมาใช้ประโยชน์ และมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ เช่น ไม่ละลายน้ำ, มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส, มีอุณหภูมิทรานซิสชัน 15 องศาเซลเซียส และมีความทนแรงดึง 40 Mpa จึงสามารถหล่อขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ภาชนะบรรจุอาหาร ถุงพลาสติก แผ่นฟิล์ม อุปกรณ์ทางการแพทย์ เป็นต้น

งานวิจัยส่วนใหญ่ทำการผลิต PHB จากแบคทีเรียในอาหารเหลว ซึ่งยังไม่มีงานวิจัยใดที่มีการผลิตบนอาหารแข็ง การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงเลือกแบคทีเรียชนิด *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 มาใช้ในการผลิต PHB บนอาหารแข็ง เพื่อเป็นการหาแนวทางในการลดขั้นตอนการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณ PHB ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบปริมาณ PHB เพื่อหาความแตกต่างของอาหารแข็งและอาหารเหลว และทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB ในแบคทีเรียชนิดนี้ มีตัวแปรต่อไปนี้ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร, แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม และหาปริมาณความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ PHB ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU01 บนอาหารแข็ง (Nutrient agar, NA) และในอาหารเหลว (Nutrient broth, NB)

2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB บนอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 ในการผลิต PHB บนอาหารแข็งและในอาหารเหลว

2) หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB บนอาหารแข็ง (solid medium) โดยมีตัวแปรต่างๆ ดังนี้

2.1) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

2.2) แหล่งคาร์บอน (Glucose 2%, Sodium acetate 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ Molasses 2% (ปริมาตร/ปริมาตร)

2.3) ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (0, 1, 2, 3, และ 4 เปอร์เซ็นต์)

3) ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ในการสกัด PHB ออกจากเซลล์

4) ตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของ PHB โดยใช้เทคนิค FT-IR

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพบนอาหารแข็งได้

2) ได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปัญหาพลาสติกในปัจจุบัน

ในปัจจุบันมีการนำพลาสติกมาใช้ในชีวิตประจำวันมากขึ้น เนื่องจากพลาสติกมีราคาถูก น้ำหนักเบาทำให้ไม่สิ้นเปลืองค่าขนส่ง อีกทั้งมีความยืดหยุ่นทำให้พลาสติกมีข้อดีเหนือวัสดุอื่นๆ ทั้งยังเป็นวัสดุที่มีความหนาแน่นต่ำและสามารถทนแรงอัดได้สูงกว่าขยะมูลฝอยประเภทอื่น มีความคงทนต่อสารเคมี ไม่เป็นสนิมไม่ผุกร่อน รวมทั้งไม่ย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ส่งผลให้พลาสติกมีอายุยืนยาวนับร้อยปี ประกอบกับพลาสติกมีราคาถูกจึงมีการใช้งานอย่างแพร่หลาย โดยมีการใช้งานทดแทนวัสดุอื่นๆเพิ่มขึ้นเรื่อยๆทำให้ปริมาณและสัดส่วนของขยะพลาสติกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (กรมควบคุมมลพิษ, 2560) ซึ่งสารประกอบในพลาสติกบางชนิดก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพได้ นอกจากนี้ในกระบวนการผลิตพลาสติกจะมีการเพิ่มสารเติมแต่งบางชนิดลงไป เช่น สารเสริมสภาพพลาสติก สารคงสภาพพลาสติก สารยับยั้งปฏิกิริยา และสารสีต่างๆ ดังนั้นการขาดความรู้และมีความเข้าใจผิดเกี่ยวกับการใช้งานพลาสติก อาจทำให้สารเคมีจากผลิตภัณฑ์พลาสติกถูกชะและปนเปื้อนสู่อาหารและเครื่องดื่มได้ อาจส่งผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพของผู้บริโภค นอกจากนี้ปริมาณการใช้พลาสติกที่เพิ่มมากขึ้นทำให้เกิดของเสียที่เป็นภาระในการจัดเก็บและการทำลาย โดยเฉพาะพลาสติกบางชนิดที่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมตามมา (ศุลีพร และคณะ, 2556)

ปัจจุบันประเทศไทยมีปริมาณขยะพลาสติกและโฟมมากถึง 2.7 ล้านตันหรือเฉลี่ย 7,000 ตันต่อวัน แบ่งเป็นถุงพลาสติกร้อยละ 80 หรือ 5,300 ตันต่อวัน หรือประมาณ 2 ล้านตัน ส่วนที่เหลือเป็นขยะโฟมประมาณ 700,000 ตัน ใช้เวลาย่อยสลายยาวนานถึง 450 ปี ทั้งนี้ พบว่าขยะพลาสติกร้อยละ 50 กำจัดไม่ถูกวิธี ที่สำคัญขยะพลาสติกและโฟมหากใช้วิธีฝังกลบจะใช้พื้นที่มากกว่าขยะปกติถึง 3 เท่า หรือหากนำไปเผาทำลายจะทำลายสิ่งแวดล้อมอย่างมาก รวมทั้งมีสารตกค้างในสิ่งแวดล้อมจำนวนมาก เนื่องจากถุงพลาสติกทำจากเม็ดปิโตรเลียม ทำให้มีการปนเปื้อนของสารตกค้างในดินและน้ำ ส่งผลก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก สาเหตุของภาวะโลกร้อนในปัจจุบัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2559)

2.2 ประเภทของพอลิเมอร์

2.2.1 จำแนกตามแหล่งของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิต

1) พอลิเมอร์ที่ได้มาจากวัตถุดิบที่เป็นมวลชีวภาพ (Biomass) ได้แก่วัตถุดิบที่เป็นโพลิแซคคาไรด์ที่ได้จากแป้งข้าวสาลี แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวโพดหรือ วัตถุดิบที่เป็นผลิตภัณฑ์ลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟาง ไม้ เป็นต้น นอกจากนั้นยังรวมไปถึงวัตถุดิบในกลุ่มของไคโตซาน และไคติน ซึ่งเมื่อนำมาละลายในกรดอินทรีย์จะมีลักษณะเป็นสารละลายเหนียวใสคล้ายวุ้น และสามารถนำมาขึ้นรูปเป็นพลาสติกได้ หรือวัตถุดิบในกลุ่มคอลลาเจนและเจลาตินที่สกัดได้จากโปรตีนพืชและสัตว์ ก็สามารถนำมาขึ้นรูปเป็นพลาสติกได้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) พอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตจากจุลินทรีย์ ได้แก่พอลิเมอร์ในกลุ่ม Polyhydroxyalkanoat (PHAs) และ Polyhydroxybutyrate (PHB)

3) พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการทางเคมีที่ใช้วัตถุดิบที่เป็นมอนอเมอร์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง อ้อย เป็นต้น โดยเมื่อผ่านกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพแล้วจะเปลี่ยนแป้งที่ได้จากวัตถุดิบไปเป็นน้ำตาลและเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นมอนอเมอร์ซึ่งก็คือ กรดแลคติก (Lactic acid) และนำกรดแลคติกที่ได้มาเชื่อมต่อเป็นพอลิเมอร์สายยาวซึ่งพอลิเมอร์ประเภทนี้ คือ Polylactic acid (PLA)

4) พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาจากมอนอเมอร์หรือพอลิเมอร์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักคือ กลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นโซ่สายตรงเช่น Polybutylene succinate (PBS) ที่ได้จากมอนอเมอร์คือกรดซัคซินิค และ1, 4-บิวเทนไดออล และกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นวงอะโรมาติก เช่น Polybutyleneadipate/tetraphthalate (PBAT) เป็นต้น

2.2.2 จำแนกตามกระบวนการสังเคราะห์

1) พอลิเมอร์ภายในเซลล์ (Intracellular polymer) เป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์และต้องอาศัยการสกัด และการทำบริสุทธิ์เพื่อนำเอาพอลิเมอร์ที่ต้องการออกมาจากเซลล์

2) พอลิเมอร์ภายนอกเซลล์ (Extra cellular polymer) เป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์และจุลินทรีย์หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ใน 2 รูปแบบ คือ แคปซูล ซึ่งยึดติดอยู่กับผนังเซลล์และในรูปของเมือก (Soluble slime) ซึ่งปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมรอบๆเซลล์ (ศิริพร, 2544)

2.3 พลาสติกชีวภาพ

ด้วยจำนวนประชากรของโลกที่เพิ่มมากขึ้น และกิจกรรมต่างๆที่มนุษย์ทำต้องอาศัยทรัพยากรธรรมชาติมากขึ้นทรัพยากรธรรมชาติจึงลดลงอย่างรวดเร็ว มนุษย์จึงต้องคิดค้นและพัฒนาหาสิ่งที่จะนำมาทดแทนทรัพยากรธรรมชาติ ซึ่งสิ่งที่ได้ออกมาก็คือ “พลาสติก (Plastic)” แต่ด้วยคุณสมบัติที่ทนทาน มีอายุการใช้งานนานนับร้อยปีของพลาสติก ทำให้เกิดปัญหาขยะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จึงต้องหาแนวทางแก้ไขโดยการคิดค้นพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ (Biodegradable plastic) เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาวัสดุสำหรับการใช้งานเพื่ออนุรักษ์สิ่งแวดล้อม ทั้งในด้านวัตถุดิบ กระบวนการผลิต และกระบวนการกำจัด โดยปัจจุบันการผลิตพลาสติกชีวภาพได้มุ่งเน้นไปที่พลาสติกสำหรับบรรจุภัณฑ์ เนื่องจากมีการใช้งานเป็นจำนวนมากและก่อให้เกิดขยะมากที่สุด ซึ่งหากสามารถเปลี่ยนให้บรรจุภัณฑ์เหล่านั้นผลิตจากพลาสติกชีวภาพได้ก็จะทำให้ปัญหาขยะลดลงได้ โดยพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ นั้นผลิตมาจากวัตถุดิบที่สามารถผลิตทดแทนขึ้นใหม่ได้ในธรรมชาติ (Renewable resource) ใช้พลังงานในกระบวนการผลิตต่ำ และสามารถย่อยสลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ได้ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ภายหลังจากการใช้งาน โดยพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้นั้นจะมีคุณสมบัติในการใช้งานได้เทียบเท่าพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีแบบดั้งเดิม และสามารถทดแทนการใช้งานที่มีอยู่ได้

พลาสติกชีวภาพ สามารถแบ่งตามวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตออกเป็น 2 ประเภท คือ พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี (Petroleum-based biodegradable plastics) เช่น พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol, PVA) พอลิเอสเทอร์สังเคราะห์แบบสายโซ่ตรง เช่น พอลิคาร์โปรแลคโทน (Polycaprolactone, PCL) เป็นต้น และพลาสติกย่อยสลายได้ทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบมวลชีวภาพ (Bio-based biodegradable plastics) เช่นพอลิแลกติกแอซิด (Polylactic acid, PLA) พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalcanoate,PHA) และพอลิไฮ-ดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB) เป็นต้น (Tokiwa *et. al.*, 2009)

2.4 การย่อยสลายของพลาสติก

โดยทั่วไป เราสามารถแบ่งกลไกการย่อยสลายของพลาสติกเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1) การย่อยสลายได้โดยแสง (Photodegradation) การย่อยสลายโดยแสงมักเกิดจากการเติมสารเติมแต่งที่มีความว่องไวต่อแสงลงในพลาสติกหรือสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ให้มีหมู่ฟังก์ชันหรือพันธะเคมีที่ไม่แข็งแรง แตกหักง่ายภายใต้รังสี (UV) เช่น หมู่คีโตน (Ketone group) อยู่ในโครงสร้าง เมื่อสารหรือหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวสัมผัสกับรังสียูวีจะเกิดการแตกของพันธะกลายเป็นอนุมูลอิสระ (Free radical) ซึ่งไม่เสถียร จึงเข้าทำปฏิกิริยาต่ออย่างรวดเร็วที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้เกิดการขาดของสายโซ่ แต่การย่อยสลายนี้จะไม่เกิดขึ้นภายในบ่อฝังกลบขยะ กองคอมโพสท์ หรือสภาวะแวดล้อมอื่นที่มืด หรือแม้กระทั่งชิ้นพลาสติกที่มีการด้วยหมึกที่หนามากบนพื้นผิว เนื่องจากพลาสติกจะไม่ได้สัมผัสกับรังสียูวีโดยตรง

2) การย่อยสลายทางกล (Mechanical Degradation) โดยการให้แรงกระทำแก่ชิ้นพลาสติก ทำให้ชิ้นส่วนพลาสติกแตกออกเป็นชิ้น ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้โดยทั่วไปในการทำให้พลาสติกแตกเป็นชิ้นเล็กๆ

3) การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative Degradation) การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสติก เป็นปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนลงในโมเลกุลของพอลิเมอร์ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติอย่างช้าๆ โดยมีออกซิเจน และความร้อน แสงยูวี หรือแรงทางกลเป็นปัจจัยสำคัญ เกิดเป็นสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydroperoxide, ROOH) ในพลาสติกที่ไม่มีการเติม สารเติมแต่งที่ทำหน้าที่เพิ่มความเสถียร (Stabilizing additive) แสงและความร้อนจะทำให้ ROOH แตกตัวกลายเป็นอนุมูลอิสระ RO และ OH) ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยาต่อที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลอย่างรวดเร็ว แต่ด้วยเทคโนโลยีการผลิตที่ได้รับการวิจัยและพัฒนาขึ้นในปัจจุบันทำให้พอลิโอเลฟินเกิดการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนได้เร็วขึ้นภายในช่วงเวลาที่กำหนด โดยการเติมสารเติมแต่งที่เป็นเกลือของโลหะทรานสิชัน ซึ่งทำหน้าที่คะตะลิสต์เร่งการแตกตัวของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydroperoxpide, ROOH) เป็นอนุมูลอิสระ (Free radical) ทำให้สายโซ่พอลิเมอร์เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลรวดเร็วยิ่งขึ้น

4) การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolytic Degradation) การย่อยสลายของพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์ เช่น แป้ง พอลิเอสเทอร์ พอลิแอนไฮดรายด์ พอลิคาร์บอเนต และพอลิยูริเทน ผ่านปฏิกิริยาก่อให้เกิดการแตกหักของสายโซ่พอลิเมอร์ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้น โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทที่ใช้คะตะลิสต์ (Catalytic hydrolysis) และไม่ใช้คะตะลิสต์ (Non-Catalytic Hydrolysis) ซึ่งประเภทแรกยังแบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือ แบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายนอกโมเลกุลของพอลิเมอร์เร่งให้เกิดการย่อยสลาย (External Catalytic Degradation) และแบบที่ใช้ คะตะลิสต์จากจากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์เองในการเร่งให้เกิดการย่อยสลาย (Internal catalytic degradation) โดยคะตะลิสต์จากภายนอกมี 2 ชนิด คือคะตะลิสต์ที่เป็นเอนไซม์ต่างๆ (Enzyme) เช่น Depolymerase lipase esterase และ Glycohydrolase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางชีวภาพ และคะตะลิสต์ที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Non-enzyme) เช่น โลหะแอลคาไลด์ (Alkaline metal) เบส (Base) และกรด (Acid) ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมในธรรมชาติ ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางเคมี สำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์นั้นใช้หมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group) ของหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์บริเวณปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

5) การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) การย่อยสลายของพอลิเมอร์จากการทำงานของจุลินทรีย์โดยทั่วไปมีกระบวนการ 2 ขั้นตอน เนื่องจากขนาดของสายพอลิเมอร์ยังมีขนาดใหญ่และไม่ละลายน้ำ ในขั้นตอนแรกของของการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นภายนอกเซลล์โดยการปลดปล่อยเอ็นไซม์ของจุลินทรีย์ซึ่งเกิดได้ทั้งทั้งแบบใช้ Endo-enzyme หรือ เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะภายในสายโซ่พอลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบ และแบบ Exo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะทีละหน่วยจากหน่วยซ้ำที่เล็กที่สุดที่อยู่ด้านปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ เมื่อพอลิเมอร์แตกตัวจนมีขนาดเล็กพอจะแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ และเกิดการย่อยสลายต่อในขั้นตอนที่ 2 ได้ผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย (Ultimate biodegradation) คือ พลังงาน และสารประกอบขนาดเล็กที่เสถียรในธรรมชาติ (Mineralization) เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สมีเทน น้ำ เกลือ แร่ธาตุต่างๆและมวลชีวภาพ (Biomass)

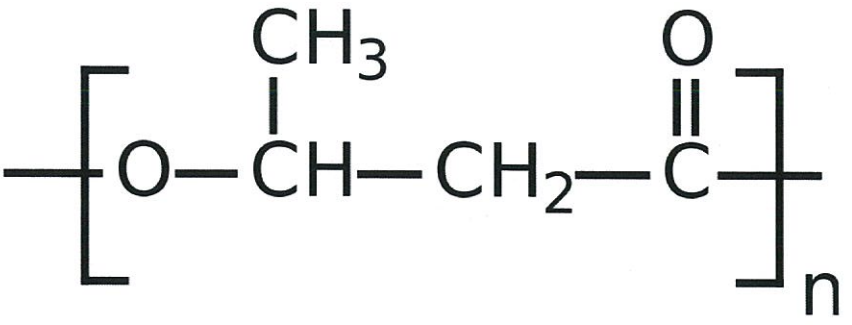
นอกจากนี้ยังพบว่า มีการใช้คำว่า "พลาสติกย่อยสลายได้ในสภาวะแวดล้อมธรรมชาติ (Environmentally Degradable Plastics, EDP)" ซึ่งหมายถึง พลาสติกที่สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติเนื่องจากปัจจัยต่างๆ ในสภาวะแวดล้อม เช่น กรด ด่าง น้ำ และออกซิเจนในธรรมชาติ แสงจากดวงอาทิตย์ แรงเค้นจากการกระทบของเม็ดฝนและแรงลม หรือจากเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมี กลายเป็นสารที่ถูกดูดซึม และย่อยสลายต่อได้อย่างสมบูรณ์โดยจุลินทรีย์ได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ สารอนินทรีย์ และมวลชีวภาพ เป็นผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย โดยการย่อยสลายและการดูดซึมนี้ต้องเกิดขึ้นได้รวดเร็วเพียงพอที่จะไม่ทำให้เกิดการสะสมในสภาวะแวดล้อม

2.5 พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB)

PHB ถูกค้นพบโดย Maurice Lemoigne นักจุลชีววิทยาชาวฝรั่งเศส เมื่อปี ค.ศ.1926 ในเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium*

PHB เป็นอนุพันธ์ของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งจัดได้ว่าเป็นพอลิเมอร์ ประเภทอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (Aliphatic polyester) มีโครงสร้างเป็นสายยาว (รูปที่ 2.1) และมีคุณสมบัติต่างๆ คล้ายกับพลาสติกทั่วไปเช่น พอลิโพรไพลีน (Polypropylene, PP) จากคุณสมบัติข้างต้น ทำให้ PHB มีความยืดหยุ่นและสามารถนำมาหลอมเพื่อขึ้นรูปและใช้ใหม่ได้อีกครั้ง (ตริตาภรณ์ และพรเทพ, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของ PHB (Polimerek, 2008)

นอกจากนี้ PHB เป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ของมอนอเมอร์ (Monomer) ชนิด PHB ที่มีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วย หมู่เอสเทอร์ (Ester) และหมู่เมทิล (Methyl) โดยจะสะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์พอลิเมอร์แต่ละสายจะประกอบด้วยมอนอเมอร์ดังกล่าวประมาณ 23,000–35,000 มอนอเมอร์ ซึ่งความยาวของพอลิเมอร์ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ วิธีสกัด PHB ออกจากเซลล์ ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ผลิต ชนิดของสารตั้งต้น ระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ ชนิดของสารอาหารที่จำกัดต่อการเจริญเติบโต ตลอดจนภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงระหว่างการผลิต

รูปที่ 2.2 PHB ที่ถูกสะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ (Green Plastics, 2010)

2.5.1 คุณสมบัติทั่วไปของ PHB

1) PHB ไม่สามารถละลายน้ำได้และต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส ทำให้ PHB ต่างจากพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้หรือมีความไวต่อความชื้น

2) PHB ละลายได้ในคลอโรฟอร์มและสารประกอบคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ

3) PHB สามารถต้านทานต่อรังสีอัลตร้าไวโอเลตและออกซิเจน สามารถซึมผ่านได้ดีแต่มีความต้านทานต่อกรดและเบสต่ำPHB มีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (Biocompatible) ทำให้สามารถนำไปใ ช้ผลิตพลาสติกที่ใช้ในทางการแพทย์ได้

4) PHB มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิทรานซิสชัน15 องศา-เซลเซียส และมีความทนแรงดึง 40 Mpa ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) PHB สามารถจมน้ำได้ทำให้ถูกย่อยสลายในสภาวะที่ไม่ใช้อากาศได้ (Jogdand, 2004) นอกจากคุณสมบัติต่างๆของสาร PHB ข้างต้นนี้ ยังมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิโพรพิลีน ซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบคุณสมบัติของโพลีโพรไพลีน (PP) และ PHB

Parameter	Polypropylene (PP)	PHB
จุดหลอมเหลว [°C]	171 - 186	171 - 182
อุณหภูมิที่มีสภาวะคล้ายแก้ว [°C]	- 155	- 10
เปอร์เซ็นต์การตกผลึก [%]	65 - 70	65 - 80
ความหนาแน่น [g cm^{-3}]	0.905 - 0.94	1.23 - 1.25
มวลโมเลกุล ($x10^{-5}$)	2.2 - 7	1 - 8
การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล	5 - 12	2.2 - 3
ความต้านทานต่อการดัดงอ [GPa]	1.7	3.5 - 4
แรงต้านทานแรงดึง [MPa]	39	40
สภาพการยืดหยุ่น [%]	400	6 - 8
ต้านทานต่อรังสีอัลตร้าไวโอเลต	แย่	ดี
ต้านทานการละลาย	ดี	แย่
อัตราการซึมผ่านของออกซิเจน[$cm^{-3}m^{-2}atm^{-1}d^{-1}$]	1700	45
การย่อยสลายทางชีวภาพ	ย่อยไม่ได้	ย่อยได้ดี
อื่นๆ	เนื่องจากมีความหนาแน่นต่ำจึงทำให้สามารถลอยน้ำได้	เนื่องจากมีความหนาแน่นสูงจึงจมน้ำทำให้เกิดการย่อยสลายโดยไม่ใช้อากาศ

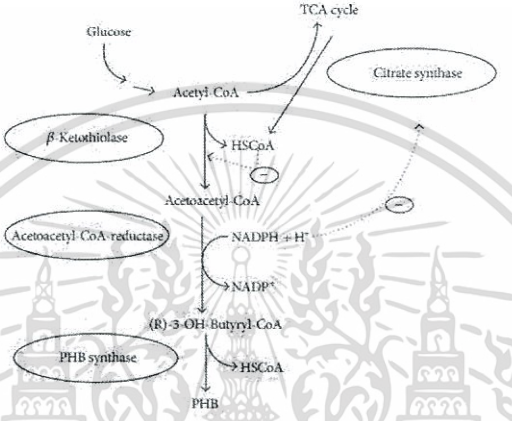
ที่มา: (ตริตาภรณ์ และพรเทพ, 2553)

แม้ PHB จะมีคุณสมบัติที่มีประโยชน์ในหลายๆด้านแต่มีข้อเสียคือ มีความเสถียรของการหลอมเหลวต่ำ เนื่องจากเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลว นอกจากนี้ PHB มีความสามารถในการต้านทานต่อตัวทำละลายต่ำกว่าพอลิโพรพิลีน แต่ทนต่อรังสีอัลตราไวโอเลตได้ดีกว่า และจะเปราะเมื่อเวลาผ่านไปเพียงไม่กี่วันภายใต้สภาวะปกติ แต่สามารถลดความเปราะบางของ PHB ได้โดยการทำเป็นโคพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์ตัวอื่น หรือการผสมกับพอลิ-เมอร์ตัวอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

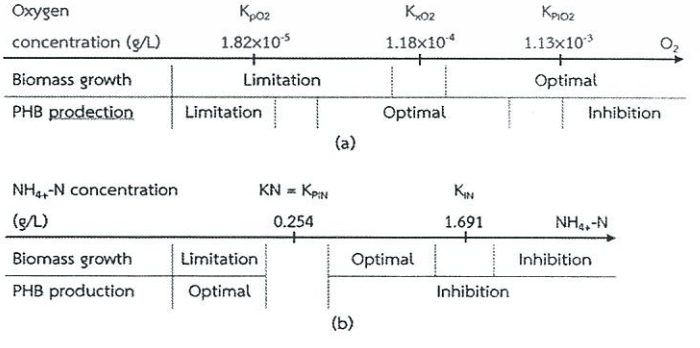
2.5.2 การสังเคราะห์และสะสม PHB ในแบคทีเรีย

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



รูปที่ 2.3 การสังเคราะห์ PHB ในแบคทีเรีย (B. Kessler and B. Witholt, 2001)

การสังเคราะห์และการสะสมของพอลิเมอร์ PHB ภายในจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นเมื่อเข้าสู่การเจริญในระยะคงที่ของจุลินทรีย์ หรือในอีกกรณีคือมีการสร้างพอลิเมอร์ PHB ไปพร้อมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งจะต้องอยู่ในสภาวะจำกัดสารอาหาร เช่น ฟอสฟอรัส ออกซิเจน ไนโตรเจน เป็นต้น เพื่อให้เซลล์ของจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์และสะสมพอลิเมอร์ PHB ได้ในขณะเดียวกัน หากจุลินทรีย์มีสารอาหารที่เพียงพอเซลล์จะใช้สารอาหารในการเจริญเติบโตทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ PHB ได้ ดังรูปที่ 2.4



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 การสกัดแยก PHB และการทำให้บริสุทธิ์

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

1) การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

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

2) การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Sodium hypochloride extraction)

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

3) การสกัดด้วยเอนไซม์ (Enzymatic extraction)

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

2.5.4 แบคทีเรียที่ผลิต PHB

ตารางที่ 2.2 สายพันธุ์แบคทีเรียต่างๆที่สามารถผลิต PHB ได้

แบคทีเรีย	อัตราการผลิต (ร้อยละต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง)
Aeromonas hydrophila	50
Alcaligenes latus	96
Bacillus megaterium	73
Bacillus ssp.	50
Escherichia coli	80
Methylobacterium sp.	57
Ralstonia eutropha	80

ที่มา: (G. Q. Chen, 2009 and Jogdand, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.5 การประยุกต์ใช้ PHB

จากคุณสมบัติของ PHB ที่สามารถย่อยสลายได้ง่าย จึงมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ (ตริตาภรณ์ และพรเทพ, 2553) ได้แก่

1) ด้านการแพทย์ เช่น ไหมเย็บแผล (Sutures) ตัวเย็บแผล (Staples) วัสดุปิดแผล (Wound dressing) อุปกรณ์ฝังในร่างกาย (Surgical implants) อุปกรณ์สำหรับยึดกระดูก (Orthopedic fixation devices) วัสดุนำพาหรือสำหรับปล่อยตัวยาซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปล่อยตัวยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2) ด้านการเกษตร เช่น ภาชนะปลูกพืช วัสดุห่อหุ้ม และปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช หรือปุ๋ยตามช่วงเวลาที่กำหนด

3) ด้านบรรจุภัณฑ์ เช่น บรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ถุงพลาสติก กล่องโฟม ฟิล์มสำหรับหีบห่อ เม็ดโฟมกันกระแทก ตัวเคลือบภาชนะกระดาษ

4) ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์ยากลุ่ม chiral compound

2.5.6 การย่อยสลาย PHB

PHB จะถูกย่อยให้เล็กลงโดยเอนไซม์ PHB hydrolase จนได้เป็นโอลิโกเมอร์ (Oligomer) ไตรเมอร์ (Trimer) และ ไดเมอร์ (Dimer) หลังจากนั้นเอนไซม์ไดเมอร์ไฮโดรเลส (Dimerhydrolase) จะทำให้เกิดเป็นโมโนเมอร์ของ PHB และเอนไซม์ PHB dehydrogenase จะทำปฏิกิริยาจนได้เป็น Acetoacetate จากนั้นจะเกิดเป็นโมเลกุลของ Acetoacetyl-CoA และ Acetyl-CoA โดยเอนไซม์ของ Acetoacetyl-CoA thiokinaseและ β-ketithiolase ตามลำดับ เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับตัวมันเอง (Pouton และ Akhtar, 1996) การย่อยสลาย PHB สามารถเกิดได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน หากย่อยสลายในสภาวะที่มีอากาศจะทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่หากย่อยสลายภายในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และมีเทน (Reddy และคณะ, 2003) การย่อยสลายนี้เกิดขึ้นได้ในอุณหภูมิที่กว้าง โดยอุณหภูมิสูงสุดคือ 60 องศาเซลเซียส และความชื้นประมาณ 55% ทำให้สามารถย่อยสลาย PHB ได้ในระยะเวลาประมาณ 7 สัปดาห์ (Johnstone, 1990 ; Flechter, 1993) อัตราการย่อยสลายเกิดได้ในระยะเวลาตั้งแต่ไม่กี่เดือนจนถึงเป็นปี (Jendrossek *et al.*, 1996)

2.6 *Bacillus*

Bacillus คือแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นท่อนอาจพบเป็นท่อนเดียวหรือต่อกันเป็นสาย ย้อมติดสีแกรมบวก อยู่ในวงศ์ *Bacillaceae* สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา เชื้อบาซิลลัสพบอยู่ทั่วไปในทุกสภาพแวดล้อม และสามารถสร้างสปอร์ได้ดังนั้นสปอร์จึงลอยไปตกตามที่ต่างๆซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต หากไปตกในที่มีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาพที่มีความร้อน ความแห้งแล้ง สารเคมีและสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ก็สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมเจริญเติบโตได้ มีขนาด 0.5-2.5 x 1.2-10 ไมโครเมตร เติบโตได้ดีในอุณหภูมิปกติที่อยู่ในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส และพีเอชเป็นกลาง สภาพแวดล้อมที่ต่างกันทำให้เชื้อบาซิลลัสมีความหลากหลาย ได้แก่ พวกที่ต้องการออกซิเจน (Aerobes) ไม่ต้องการออกซิเจนเป็นบางช่วง (Facultative anaerobes) เจริญเติบโตในสภาพกรด(Acidophiles) สภาพด่าง(Alkalophiles) สภาพที่มีความเค็ม(Halophiles)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (Psychrophiles) อุณหภูมิสูง (Thermophiles)และพวกที่ใช้สารเคมีอนินทรีย์ในการเจริญ (Chemolithotrophs)

บาซิลลัสมีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา ลักษณะโคโลนีมีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมคุณภาพและปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ อายุโคโลนีและจำนวนโคโลนีต่อจานอาหารที่เลี้ยงซึ่งมีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Rosovitz *et al.*, 1998) แบคทีเรียสกุล *Bacillus* สร้างสปอร์ภายในเซลล์เมื่ออาหารมีจำกัด เซลล์จะเข้าสู่ระยะ Stationary phase และอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้

2.6.1 แบคทีเรีย *Bacillus megaterium*

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

รูปที่ 2.5 *Bacillus megaterium* ที่ย้อมด้วย Sudan Black B และ Safranin (Bary, 1884)

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB

2.7.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิต จากการรายงานพบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน แต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กันจะทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันออกไปด้วย โดยจุลินทรีย์บางชนิดผลิตพอลิเมอร์ในรูปโฮโมพอลิเมอร์ (Homopolymer) และบางชนิดผลิตในรูปโคพอลิเมอร์ (Copolymer)

2.7.2 อุณหภูมิ

1) แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophilic bacteria)
2) แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic bacteria)
3) แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic bacteria)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3 พีเอช

พีเอช เริ่มต้นมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการผลิตพอลิเมอร์ของเชื้อพบว่าการผลิตพอลิเมอร์จะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อควบคุมพีเอช เริ่มต้นที่ 7.0

2.7.4 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ในการสร้างพลังงานและสร้างส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ ซึ่งแหล่งคาร์บอนอยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และสารอินทรีย์ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต

2.7.5 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8–10 ของน้ำหนักเซลล์แห้งความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น เกลือไนไทรต์ ไนเทรต หรือแอมโมเนียม แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ โปรตีน โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน

2.7.6 ออกซิเจน

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

2.7.7 ไอออนของโลหะหนัก

ไอออนของโลหะหนักมีความจำเป็นต่อการเจริญตามปกติของแบคทีเรีย เช่น K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+} เป็นต้น ซึ่งบางชนิดอาจทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ที่สำคัญของเอนไซม์ต่างๆ

2.7.8 ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส และเกลือแร่

แหล่งของซัลเฟอร์อาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ซัลเฟอร์มีความจำเป็นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด แหล่งของฟอสฟอรัสอาจอยู่ในรูปของฟอสเฟตที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ ฟอสโฟลิพิด กรดไทโคอิก และสารอื่นๆ ส่วนเกลือแร่นั้นจุลินทรีย์ต้องการในปริมาณที่น้อย แต่เกลือแร่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตและการเจริญมาก โดยทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเพื่อแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งเรียกว่า Polyhydroxybutyrate (PHB) จากการเก็บตัวอย่างจากดินพบว่าสามารถแยกได้ 78 ไอโซเลท ที่ได้รับการยืนยันว่าเซลล์มีการสะสม PHB ภายในเซลล์ จากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด300 กลุ่ม นำแบคทีเรียมาเลี้ยงภายใต้ภาวะขาดอาหารเพื่อรักษาความสามารถในการผลิต PHB การคัดแยกเซลล์ที่สามารถผลิต PHB พบว่ามีเพียง 29 ชนิดที่ให้ %PHB content ≥ 40% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามี 10 ไอโซเลท ที่ได้รับการคัดเลือกเพื่อศึกษาต่อและประยุกต์ใช้ ซึ่งแบคทีเรียที่ผลิต PHB ได้ใน 10 ไอโซเลท มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางสรีรวิทยาเพื่อตรวจสอบระบุลักษณะโดยทั่วไป พบว่าไอโซเลทเป็นชนิด Gram-positive รูปร่างเป็นแท่ง มีสปอร์ สกุล *Bacillus* และจากการตรวจสอบลักษณะระบุว่าเป็นแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* (Gloria, 1997)

จากการศึกษาการผลิต PHB โดยเชื้อ *Bacillus megaterium* ของ Gouda และคณะ พบว่าเมื่อใช้ Corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *B. megaterium* สามารถผลิต PHB ได้ 32.7% ของน้ำหนักเซลล์ และเมื่อใช้ molasses ความเข้มข้น 2% โดยปริมาตร จะทำให้ *B. megaterium* ผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้นเป็น 46.2% ของน้ำหนักเซลล์ ต่อมา Uğur และŞahin (2002) ได้ทดลองเปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตเจน พบว่า ไกลซีน (Glycine) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพหารผลิต PHB ของเชื้อ *Streptomyces anulatus* MU117 จาก 0.3% เป็น 7.6% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และจากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสามารถในการผลิต PHA (ตั้งชื่อว่า INT005) จากดินบริเวณทุ่งหญ้า พบว่า เชื้อ INT005 สามารถผลิต PHA ได้มากกว่า *Bacillus megaterium* และ *Ralstonia eutropha* เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส และ PHA ที่ผลิตได้ยังมีคุณสมบัติ Thermostable อีกด้วย (Gouda *et al.*, 2001)

พอลิเมอร์สังเคราะห์ไม่สามารถย่อยสลายได้และตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงพยายามคิดค้นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้นั่นก็คือ Polyhydroxyalkanoates (PHAs) รวมทั้ง Polyhydroxybutyrate (PHB) ซึ่งเป็นกลุ่มของพลาสติกชีวภาพที่น่าสนใจที่มีการนำมาประยุกต์ทางการแพทย์ PHAs เป็นโมเลกุลชีวภาพขนาดเล็กสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ ในการศึกษานี้ได้มีการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากดินในประเทศอียิปต์เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิต PHB โดยใช้การย้อมสีไนล์เรด จำนวนทั้งหมด 44 ไอโซเลท ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง Mineral salt medium (MSM) พบว่ามี 19 ไอโซเลทที่สามารผลิตPHBได้ ตามความสามารถของการเรืองแสง และมีการทดสอบทางชีวเคมีของการผลิต PHB ของ *Bacillus sp* N2ซึ่งจำกัดปริมาณของแหล่งไนโตเจนโดยใช้อาหาร MSM ที่เติมกลูโคสมากเกินพอเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว พบว่าการสะสม PHB มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 20% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์พอลิเมอร์ชีวภาพที่ได้ด้วยเทคนิค NMR, FT-IR, TGA และ DSC เพื่อเป็นการยืนยันความบริสุทธิ์ของ PHB (Hassan *et al.*, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา คือ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 ได้มาจากมูลวัว ทำการถ่ายเชื้อเก็บในอาหาร Nutrient Agar (NA) ที่อุณหภูมิห้อง

3.1.2 สารเคมี

1) อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Nutrient broth บริษัท HiMedia Laboratories Pvt.ประเทศอินเดีย

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

3) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เกรดวิเคราะห์ บริษัท CARLO ERBA ประเทศฝรั่งเศส

4) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เกรดวิเคราะห์ บริษัท European Distribution Center ประเทศอินเดีย

5) ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Fisher Scientific UK Limited ประเทศอังกฤษ

6) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศออสเตรเลีย

7) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศออสเตรเลีย

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

9) เอธิลแอลกอฮอล์95% (C_2H_5OH) เกรดcommercial บริษัท CARLO ERBA ประเทศฝรั่งเศส

10) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เกรดวิเคราะห์ บริษัท CARLO ERBA ประเทศฝรั่งเศส

11) โพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr)

12) อะซิโตน (CH_3COCH_3)

13) โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10% (NaOCl)

3.1.3 อุปกรณ์

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 อุปกรณ์ (ต่อ)

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

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

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

7) เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น ML204/01 บริษัท Metter Toledo ประเทศสวิตเซอร์-แลนด์

8) เครื่องวัดกรด–ด่าง (pH meter) รุ่น C860 version 1.2 บริษัท Hanna Instruments ประเทศเบลเยี่ยม

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

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

11) โถดูดความชื้น (Desiccator)

12) ออโต้ปิเปต (Auto Pipette) ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร

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

14) หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก ขนาด 1.5, 2, 50 มิลลิลิตร

15) ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

16) กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร

17) ตะเกียงแอลกอฮอล์

18) ลวดเขี่ยเชื้อ

19) ช้อนตักสาร

20) คิวเวตต์

21) แท่งคนสาร

22) จานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

3.2.1 การ streak plate โดยเทคนิค Streak-Plate Technique

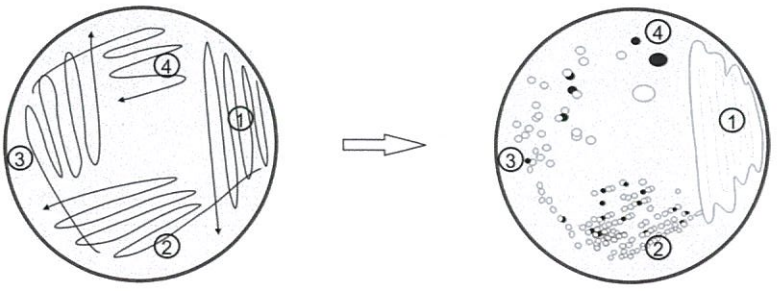
1) เผาไฟห่วงเขี่ยเชื้อให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อและรอให้เย็นลง

2) ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ SWU 01

3) นำไปลากหรือขีด (streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (Nutrient agar, NA) อยู่ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น หลังจากเสร็จในระนาบแรกซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุดให้นำห่วงเขี่ยเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดให้หมด จากนั้นจึงขีดเชื้อจากส่วนของรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้งแล้วลากเป็นระนาบที่สอง 4-5 เส้นติดกันโดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สองจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณสี่ระนาบ (รูปที่ 3.1)

4) เมื่อ Streak เสร็จนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

รูปที่ 3.1 เทคนิค Streak-Plate Technique
(ก) การขีดเชื้อในแนวระนาบทั้ง 4 แนว **(ข)** โคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนแนวระนาบทั้ง 4 แนว

3.2.2 เตรียม starter

ทำการเขี่ยโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งมา 4-5 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้น

3.2.3 การผลิต PHB บนอาหารแข็ง

1) นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จาก Starter มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) โดยใช้ NB เป็นแบลงค์

2) เจือจางเชื้อ ให้ได้ค่า OD_{600} ที่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0

3) เทเชื้อที่เจือจางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ NA ในปริมาณ 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 จาน และเอียงอาหารให้ไหลทั่วจานอาหาร

4) จากนั้นตากจานอาหารให้แห้ง ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่าง

3.2.4 การผลิต PHB ในอาหารเหลว

1) นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จาก Starter มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) โดยใช้ NB เป็นแบลงค์

2) เจือจางเชื้อ ให้ได้ค่า OD_{600} ที่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0

3) เทเชื้อที่เจือจางในปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อ 1 หลอด ลงในหลอดเซนติฟิวก์ขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหาร NB 20 มิลลิลิตร

4) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB บนอาหารแข็งโดยใช้ Glucose, Sodium acetate และ Molasses เป็นแหล่งคาร์บอน

1) นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จาก Starter มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) โดยใช้ NB เป็นแบลงค์

2) เจือจางเชื้อ ให้ได้ค่า OD_{600} ที่เหมาะสม ที่ได้จากการทดลอง 3.2.3

3) เทเชื้อที่เจือจางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่เติม Glucose 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร), Sodium acetate 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ Molasses 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) เพื่อเป็นการหาแหล่งคาร์บอนในปริมาณ 1 ml ต่อ 1 จาน และเอียงอาหารให้ไหลทั่วจานอาหาร

4) จากนั้นตากจานอาหารให้แห้งก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่าง

3.2.6 การหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB บนอาหารแข็ง

1) นำหัวเชื้อที่เตรียมได้จาก Starter มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) โดยใช้ NB เป็นแบลงค์

2) เจือจางเชื้อ ให้ได้ค่า OD ที่เหมาะสม ที่ได้จากการทดลอง 3.2.5

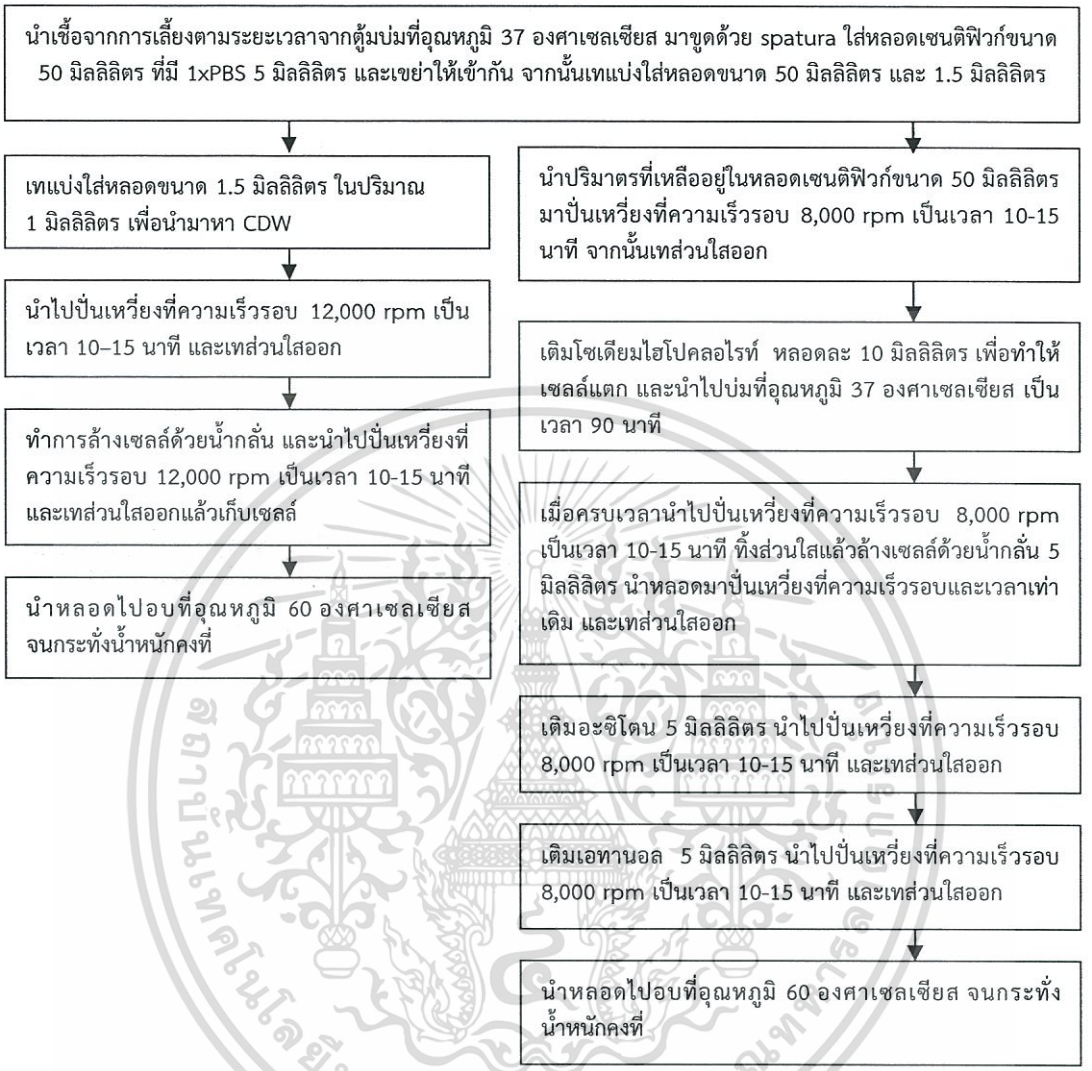
3) เทเชื้อที่เจือจางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ความเข้มข้นของ Molasses 0, 1, 2, 3 และ 4% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ได้จากการทดลอง 3.2.2.3 ในปริมาณ 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 จานและเอียงอาหารให้ไหลทั่วจานอาหาร

4) จากนั้นตากจานอาหารให้แห้งก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและทำการเก็บตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การสกัด PHB

การเก็บตัวอย่างโดยวิธีการขูดจากจานเลี้ยงเชื้อ มีขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งและเพื่อหาน้ำหนัก PHB

3.4 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

1) นำจานเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการบ่มมาขูดเชื้อที่ขึ้นบนผิววุ้นด้วย Spatura

2) ขูดเชื้อใส่ในหลอดเซนติฟิวก์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี 1XPBS ลองก้นหลอดปริมาณ 5 มิลลิลิตร

3) เมื่อขูดเสร็จให้เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งใส่หลอดเซนติฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร โดยนำหลอดปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10-15 นาที แล้วเทส่วนใสออก

4) ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 1 มิลลิลิตรและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10-15 นาทีอีกครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) เทส่วนใสออก จากนั้นนำหลอดไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนเซลล์แห้งและน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำเซลล์แห้งไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) ดังแสดงในสูตรที่ (3.1)

$$\text{Cell Dry Weight (g/l)} = \frac{\text{Cell Dry Weight (g)}}{\text{Total sample volume (ml)}} \times 1{,}000 \text{ ml} \qquad (3.1)$$

3.5 การหาน้ำหนัก PHB

1) นำตัวอย่างที่ได้จากการขูดมาแบ่งใส่หลอดเซนติฟิวก์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาณทั้งหมดที่เหลือจากการแบ่งไปหาน้ำหนักแห้ง

2) นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นเทส่วนใสออกและเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที

3) เมื่อครบเวลาให้นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นเทส่วนใสออก และเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์และนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10-15 นาที

4) เทส่วนใสออกและเติมอะซิโตน 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10-15 นาที

5) เทส่วนใสออกและเติมเอทานอล 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10-15 นาที

6) เทส่วนใสออก จากนั้นนำหลอดไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนเซลล์แห้งและน้ำหนักคงที่

7) นำเซลล์แห้งที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนัก PHB โดยการชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณเป็นน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ดังแสดงในสูตรที่ (3.2)

$$\text{PHB Weight (g/l)} = \frac{\text{PHB Weight (g)}}{\text{Total sample (ml)}} \times 1{,}000 \text{ ml} \qquad (3.2)$$

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-Way ANOVA (DUNCAN) ที่ความเชื่อมั่นที่ 95%

3.7 การวิเคราะห์โครงสร้างของ PHB

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

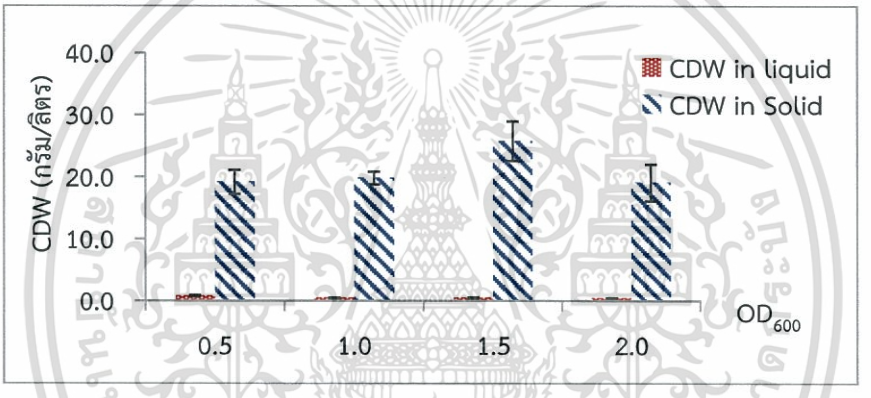
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

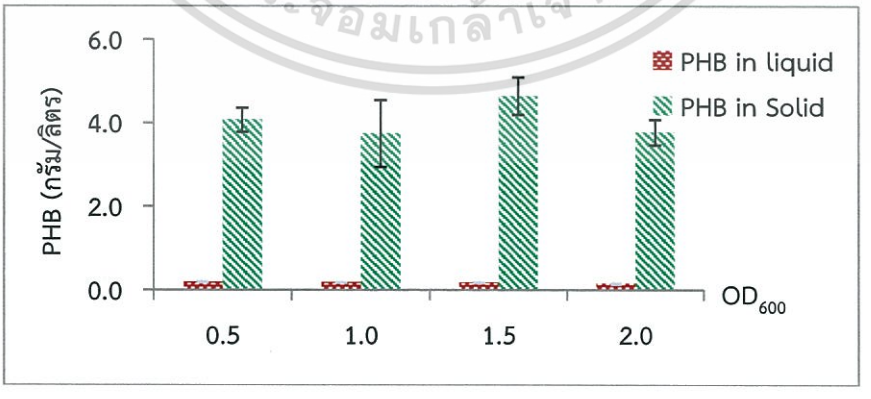
ผลการวิจัยและการอภิปรายผลการทดลอง

4.1 เปรียบเทียบการผลิต PHB บนอาหารแข็งและในอาหารเหลว

จากการศึกษาการผลิต PHB ของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 บนอาหารแข็ง โดยใช้อาหาร Nutrient Agar (NA) เติมหัวเชื้อแบคทีเรียที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5, 1.0, 1.5 และ2.0 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับการผลิต PHB ในอาหารเหลว ซึ่งใช้อาหาร Nutrient Broth (NB), ปริมาณเชื้อเริ่มต้น, อุณหภูมิ และเวลาที่บ่มเท่ากัน เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งมากกว่าในอาหารเหลว (รูปที่ 4.1 และ 4.2) ซึ่งน้ำหนัก PHB ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งได้เท่ากับ 4.07, 3.74, 4.64 และ3.77 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้ค่าใกล้เคียงกัน



รูปที่ 4.1 เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง



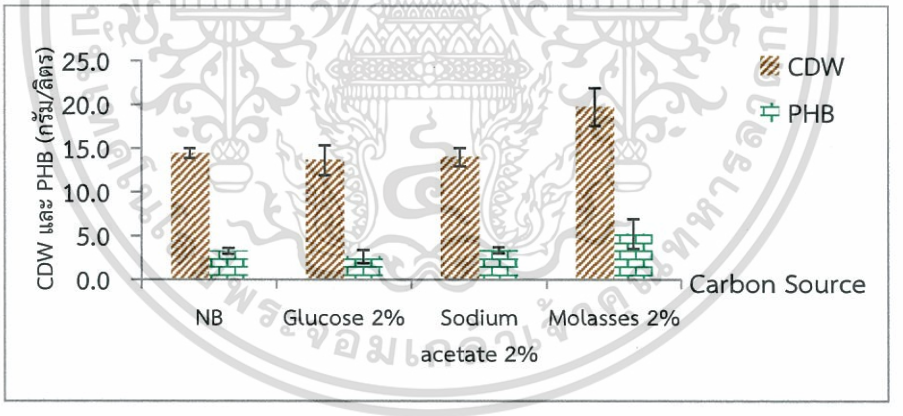
รูปที่ 4.2 เปรียบเทียบปริมาณน้ำหนักPHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5, 1.0, 1.5และ 2.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5, 1.0, 1.5 และ2.0 ได้น้ำหนัก PHB ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ข-2.4 ภาคผนวก ข) น้ำหนักเซลล์แห้งและ PHB ของปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5 และ 2.0 ค่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHB เพราะหัวเชื้อที่ได้มีคุณสมบัติของเซลล์ที่เหมือนกัน (สภาวะที่ใช้ในการเตรียม Starter เดียวกัน) สรุปได้ว่าในการทดลองต่อไป ควรเลือกใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5 เพราะสามารถประหยัดหัวเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการเจือจางปริมาณเชื้อเริ่มต้นได้

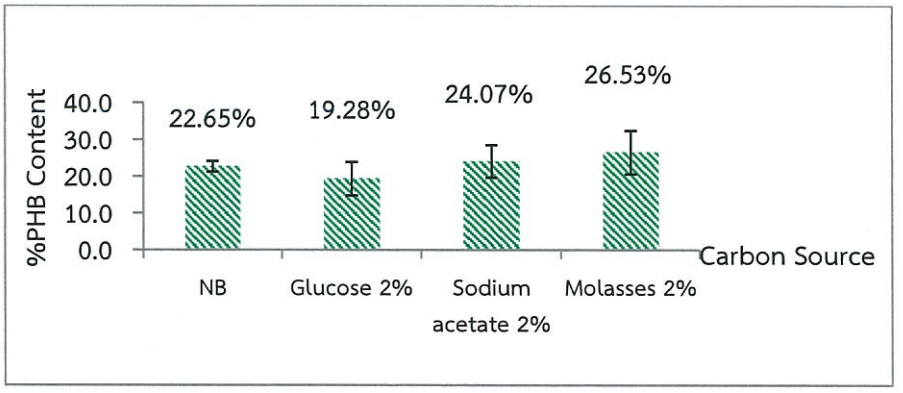
4.2 การหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB บนอาหารแข็ง

ศึกษาการผลิต PHB บนอาหารแข็งที่เติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันได้แก่ Glucose2% (น้ำหนัก/ปริมาตร), Sodium acetate2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และMolasses 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) เติมปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHB คือ Molasses 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 19.73 กรัม/ลิตร และน้ำหนัก PHB เท่ากับ 5.24 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.3) ให้ %PHB Content 26.53% (รูปที่ 4.4)(Gouda *et al.*,2001) ทดลองผลิต PHB โดยเชื้อ *Bacillus megaterium* พบว่าเมื่อใช้ Molasses 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนช่วยให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดี ผลิต PHB ได้ %PHB Content สูงถึง 46.2% และ (Yilmaz *et al.*,2005) ทำการทดลองศึกษาพบว่าแบคทีเรียจะสามารถผลิต PHB ในอาหาร NB ที่เติมแหล่งคาร์บอนได้สูงกว่าอาหารที่ไม่เติม



รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักPHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เวลา24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

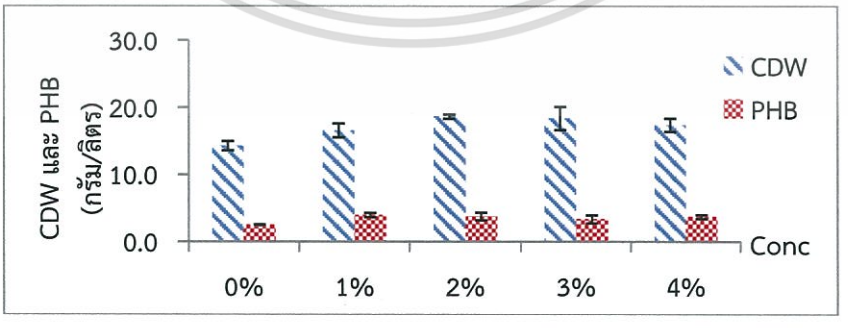


รูปที่ 4.4 ค่า %PHB Content ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าอาหารแข็งที่เติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ในอาหารที่มี Molasses 2%ได้น้ำหนัก PHB แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแหล่งคาร์บอนอื่น (ตารางที่ ข-6.4 ภาคผนวก ข) เนื่องจาก Molasses เป็นสารที่ Impurity ประกอบด้วยสารอาหารต่างๆ เช่น กลูโคส, ซูโครส, วิตามิน, กรดอะมิโน, กรดอินทรีย์และอื่นๆอีกมากมาย สามารถทดแทนสารอาหารได้หลากหลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและการผลิต PHB (Kucukasik *et al.*,2011) สรุปได้ว่าเลือกใช้ Molasses เป็นแหล่งคาร์บอนในการทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป

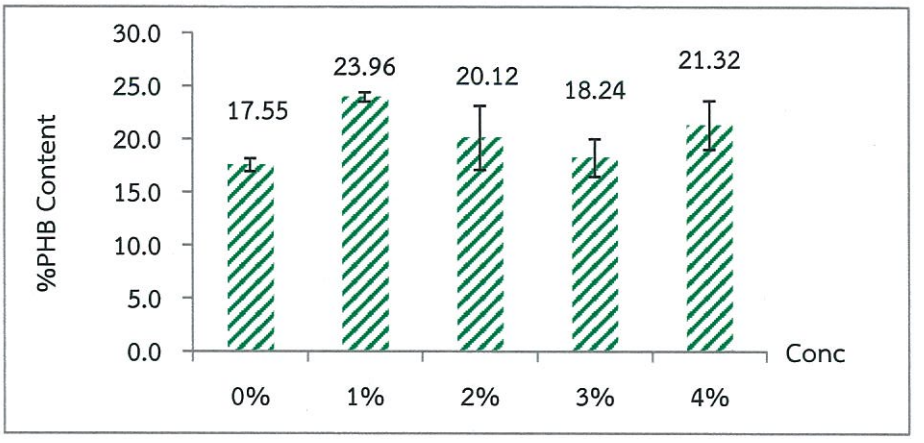
4.3 การหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB บนอาหารแข็ง

ศึกษาหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB บนอาหารแข็งที่มีความเข้มข้นของ Molasses ดังนี้ 0, 1, 2, 3 และ4% ตามลำดับ เติมปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอาหารแข็งที่มี Molasses 1% ให้น้ำหนัก PHB สูงที่สุด ได้น้ำหนัก PHB เท่ากับ 3.97 กรัม/ลิตร, น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 16.57 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.5) และได้ %PHB Content เท่ากับ 23.96% (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.5 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตบน อาหารแข็งที่เติมMolassesความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนด้วย ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



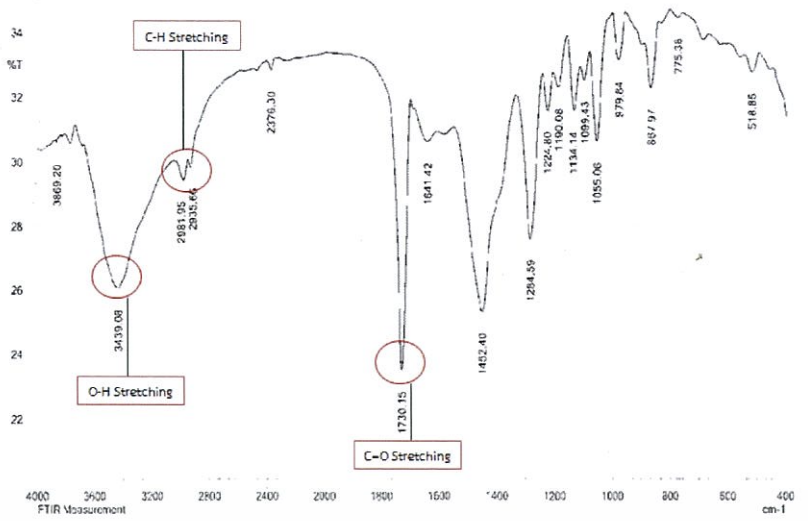
รูปที่ 4.6 ค่า %PHB Content ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่เติม Molassesความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าความเข้มข้นของMolassesที่แตกต่างกัน ได้น้ำหนัก PHB ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ข-8.4 ภาคผนวก ข) จากการทดลองสรุปได้ว่าความเข้มข้นของ Molassesต่างๆให้น้ำหนัก PHB ที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน แตกต่างกันเล็กน้อย และสามารถนำ Molassesมาเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHB ในการทดลอง ถือเป็นการลดต้นทุนในการผลิต PHB เพราะMolasses เป็นผลพลอยจากการผลิตน้ำตาลจากอ้อย ซึ่งมีราคาถูกและหาได้ง่าย

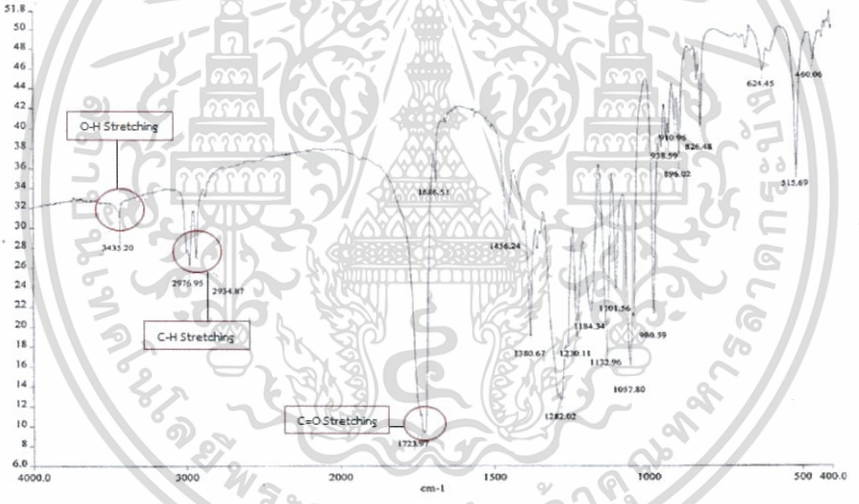
4.4 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นด้วยเทคนิค Fourier transform infrared Spectroscopy (FT-IR)

พอลิเมอร์ที่สกัดได้โดยเชื้อ *Bacillus megaterium* SWU 01 ผลิต PHB บนอาหารแข็งที่มี Molasses1%เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น(OD_{600}) 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งและPHB นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรืออบจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared Spectroscopy (FT-IR) ที่ช่วงการวิเคราะห์ที่ 4,000 – 400 cm^{-1} ค่า Resolution 4 cm^{-1} โดยทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับโครงสร้างของ PHB มาตรฐาน จากการทดลองพบว่า PHB บริสุทธิ์ที่สกัดได้ พบพีคที่เลขคลื่น 1730.15 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของ C=O Stretching, พีคที่เลขคลื่น 3,439.08 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของ O-H Stretching, และพีคที่เลขคลื่น 2,981.95 cm^{-1} และ 2,935.66 cm^{-1} แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันของหมู่ฟังก์ชัน C-H Stretching (รูปที่ 4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 สเปคตรัมของ PHB ที่สกัดได้จากเชื้อ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU01 ผลิตPHB บนอาหารแข็งที่มี Molasses1% เป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมงและใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการสกัด



รูปที่ 4.8 สเปคตรัมของ PHB มาตรฐาน (กตัญญู และคณะ, 2559)

จากสเปกตรัมของ PHB มาตรฐาน พบพีคลักษณะกว้างมีเลขคลื่นประมาณ 2500 – 3300 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของหมู่ฟังก์ชัน O-H Stretching, พีคของหมู่ฟังก์ชัน C-H Stretching ที่ช่วงเลขคลื่น 2835–3000 cm^{-1} และพีคหลักคือพีคที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชัน C=O Stretching ที่เลขคลื่น1725 cm^{-1} (รูปที่ 4.8) เมื่อทำการเปรียบเทียบ PHB ที่สกัดได้กับ PHB มาตรฐาน พบว่า PHB ที่สกัดได้มีหมู่ฟังก์ชันใกล้เคียงกันเหมือนกัน จึงสามารถยืนยันได้ว่าพอลิเมอร์ที่สกัดได้เป็น PHB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาเปรียบเทียบการผลิต PHB ของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU 01 บนอาหารแข็งและในอาหารเหลว พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งมากกว่าการผลิตในอาหารเหลว และใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB ใกล้เคียงกัน

เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB พบว่าอาหารแข็งที่เติม Molasses 2% ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 19.73 กรัม/ลิตร และน้ำหนัก PHB เท่ากับ 5.24 กรัม/ลิตร จากนั้นเปรียบเทียบ Molasses ความเข้มข้นต่างๆมาเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในอาหารที่มี Molasses 1% ให้น้ำหนัก PHB สูงที่สุด เท่ากับ 3.97 กรัม/ลิตร, น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 16.57 กรัม/ลิตร

จากการนำตัวอย่าง PHB ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU 01 บนอาหารแข็ง มาวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Fourier transform infrared Spectroscopy (FT-IR) พบว่าพอลิเมอร์ที่สกัดได้มีหมู่ฟังก์ชัน C=O Stretching ที่ 1730.15 cm^{-1}, หมู่ฟังก์ชัน O-H Stretching ที่ 3,439.08 cm^{-1}, หมู่ฟังก์ชัน C-H Stretching ที่ 2,981.95cm^{-1} และ 2,935.66 cm^{-1} ซึ่งเลขคลื่นที่ได้ใกล้เคียงกับ PHB มาตรฐาน แต่อาจมีพีคอื่นแทรกมาเนื่องจากขั้นตอนการสกัด PHB ออกมาไม่บริสุทธิ์เพียงพอ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) ควรหาเวลาที่เหมาะสมในการผลิต PHB ของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ SWU 01 บนอาหารแข็ง

2) ควรวิเคราะห์หา %Glucose ที่อยู่ใน Molasses ก่อนนำมาใช้ในการทดลองทุกครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กตัญญู ชูกลิ่น, กนกพรรณ อนันต์สกุลชัย และปาณิสรา ลี้เทียน. 2559. **การผลิตโพลิไฮดรอกซีบิว-ทิเรตของเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้กากน้ำตาลและน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน.** ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเคมีสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรมควบคุมมลพิษ. 2559. **รายงานสถานการณ์ขยะมูลฝอยชุมชนของประเทศไทยปี พ.ศ.2559.** [Online]. Available: http://www.pcd.go.th/public สืบค้นเมื่อวันที่ 25 ตุลาคม 2560

กรมควบคุมมลพิษ. 2560. **แผนจัดการขยะพลาสติกอย่างบูรณาการ พ.ศ.2560–2564.** [Online]. Available: http://www.pcd.go.th สืบค้นเมื่อวันที่ 15 ตุลาคม 2560

จารุวรรณ มารุจกล้า, สุกัญญา ศรีนอก และสุวรรณี แก้วล้อม. 2555. **การผลิตพลาสติกชีวภาพจากน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วย *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095.** โครงงานด้านชีววิทยา สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2550. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์

พรเทพ ถนนแก้ว และตริตาภรณ์ จันทน์เทศ. 2553. **โพลีไฮดรอกซีบิวทิเลต: พลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้ง่าย.** วารสารศูนย์บริการวิชาการ. 18(1):26-29.

ศิริพร หมาดหล้า. 2544. **การคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่ผลิตพอลิเมอร์ การจำแนกชนิดและคุณสมบัติของพอลิเมอร์.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศุลีพร แสงกระจ่าง, ปัทมา พลอยสว่าง และปริณดา พรหมหิตาธร. 2556. **ผลกระทบของพลาสติกต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม.** วารสารพิษวิทยาไทย. 28(1):39-50.

สุขใจ ชูจันทร์. 2557. **พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ (Microbial Polymers).** กรุงเทพฯ

ส่งศรี กุลปรีชา. 2538. **การผลิตโพลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติจากจุลินทรีย์.** รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

B. Kessler and B. Witholt. 2001. **Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism.** Journal of Biotechnology. 2, 97–104.

Bary, A. de. 1884. **Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bacterien.** West_virginia_university : Americana

Bian YZ, Wang Y, Guli S, Chen GQ. Wu Q. 2009. **Evaluation of poly (β-hydroxybutyrate-co-β-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration.** Biomaterials. 30, 217-225

Flechter, A. 1993. **In: plastics from bacteria and for bacteria: PHA as natural, biodegradable polyesters.** Springer Verlag, New York. 77-93.

Gloria D. Reyes, R.S. So, M.M. Ulep. 1997. **Isolation, Screening and Identification of Bacteria for Poly-β-Hydroxybutyrate (PHB) Production.** Studies in Environmental Science. 66, 737-748.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jendrossek, D., Schirmer, A. and Schlegel, H.G. 1996. **Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids.** Applied Microbiology and Biotechnology. 46, 451–463.

Jogdand, S.N. 2004. Welcome to the Eco - Friendly Plastic [Online]. Available: http://www.biotechsupportindae.com/jogsn/.html สืบค้นเมื่อวันที่ 25 ตุลาคม 2560

Johnstone, B. 1990. **A throw away answer.** Far Eastern Economic Review, 147:62-63

Kucukasik F., Kazak H., Guney D., Finore I., Poli A. and Yenigun O. 2011. **Molasses as Fermentation substrate for levan production by *Halomonas sp.*** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 1729-1740. 10.1007/s00253-010-3055-8

Luengo, J.M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, E.R. 2003. **Bioplastics from microorganisms.** Current Opinion in Microbiology. 6, 251-260.

Material Designs. 2010. **Green Plastics : Plastics from Grass** [Online]. Available: https://materialdesigns.wordpress.com สืบค้นเมื่อวันที่ 15 ตุลาคม 2560

Mohamed A. Hassan, Elsayed K. Bakhiet, Salah G. Ali, Hussien R. Hussien. 2016. **Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by *Bacillus sp.* isolated from Egypt.** Journal of Applied Pharmaceutical Science. 6 (04), 046-051.

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

Plastics Instiute of Thailand. 2015. **พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB)** [Online] Available: http://asp.plastics.or.th สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ตุลาคม 2560

Polimerek.2008.**Polyhydroxybutyratestructure.**[Online].Available:https://commons.wikimedia.org สืบค้นเมื่อวันที่ 15 ตุลาคม 2560

Pouton, C.W. and Akhtar S. 1996. **Biosynthetic polyhydroxyalkanoates delivery and their potential in drug.** Advanced Drug Delivery Reviews. 18, 133-162.

Reddy, C.S., Ghai, R., Rashmi, and Kalia, V.C. 2003. **Polyhydroxyalkanoates : an overview.** Bioresource Technology. 87, 137–146.

Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I. and Chambliss, G.H. 1998. **Bacillus . In: A Balows and B. I. Duerden (Eds.), Systematic Bacteriology.** Arnold Press, London. 709-720.

Yilmaz.M., H. Soran and Y, Beyatli. 2005. **Determination of poly-b-hydroxybutarate (PHB) Production by some *Bacillus spp.*** World J. Microbiol. Biotechnol. 21: 565-566.

Yutaka Tokiwa, Buenaventurada P. Calabia, Charles U. Ugwu and Seiichi Aiba. 2009. **Biodegradability of Plastics.** Int. J. Mol. Sci. 10, 3722-3742566.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี ตารางและกราฟ

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์

เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3.99 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร

2. สารละลายไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 โมลาร์

เตรียมโดยเจือจางสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 35.4% ปริมาณ 8.66 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลาย10X Phosphate buffer saline (10XPBS)

เตรียมโดยชั่งสารดังต่อไปนี้

โซเดียมคลอไรด์	16	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	4	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.48	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.88	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับ pH ด้วยHCl ให้ได้ pH ประมาณ 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 มิลลิลิตร

4. Nutrient agar

- Nutrient broth	13 กรัม/ลิตร
- อะการ์	15 กรัม/ลิตร

โดยละลายส่วนผสมเข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ประมาณ 7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำอาหารที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อเสร็จนำไปเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วรอให้เย็นด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

ตาราง

ตารางที่ ก-1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

OD	CDW (g/l)	PHB (g/l)	%PHB
0.5	19.17	4.07	21.25
1.0	19.80	3.74	18.89
1.5	20.43	4.64	20.06
2.0	19.07	3.77	19.78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียในอาหารเหลว ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm

OD	CDW (g/l)	PHB (g/l)	%PHB
0.5	0.77	0.18	23.91
1.0	0.46	0.17	37.80
1.5	0.48	0.17	34.88
2.0	0.42	0.14	33.33

ตารางที่ ก-3 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียบนอาหารแข็งที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5 และ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Carbon Source	CDW (g/l)	PHB (g/l)	%PHB
NB	14.43	3.27	22.66
Glucose 2%	13.63	2.63	19.28
Sodium acetate 0.24 M	14.00	3.37	24.07
Molasses 2%	19.73	5.24	26.53

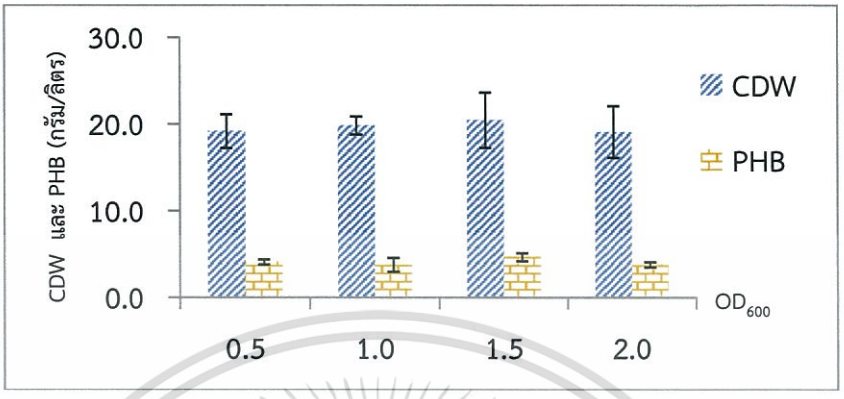
ตารางที่ ก-4 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียบนอาหารแข็งที่มี Molasses ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5 และบ่มที่อุณหภูมิ37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Concentration	CDW (g/l)	PHB (g/l)	%PHB
Molasses 0%	14.27	2.50	17.55
Molasses 1%	16.57	3.97	23.96
Molasses 2%	18.63	3.75	20.12
Molasses 3%	18.37	3.35	18.24
Molasses 4%	17.37	3.70	21.32

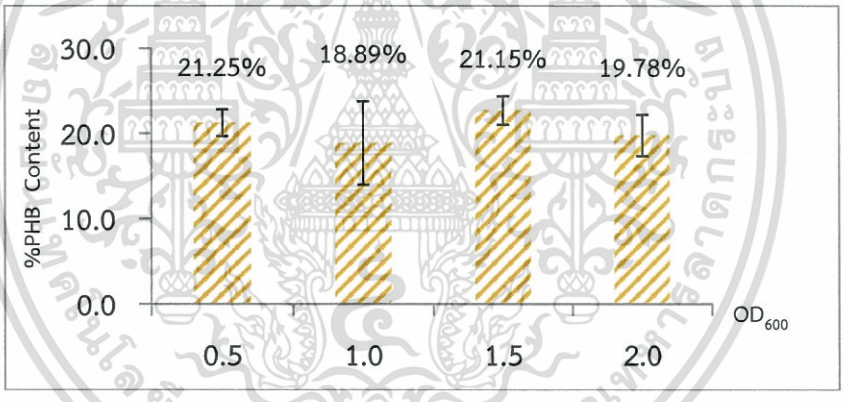
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟ

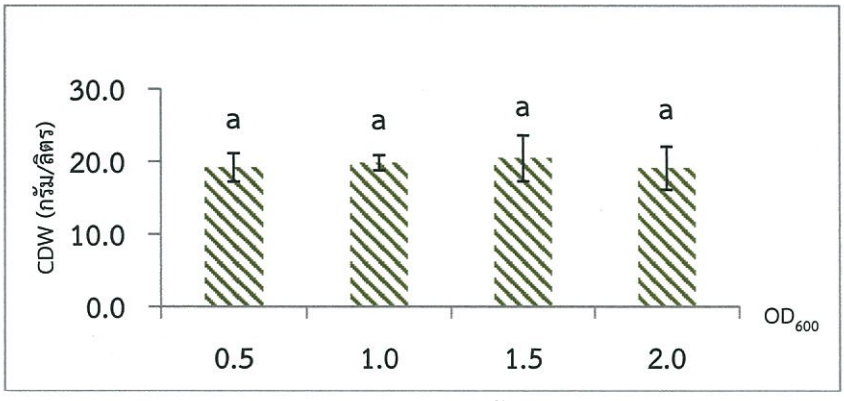
รูปที่ ก-1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ ก-2 ค่า % PHB Content ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่ ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

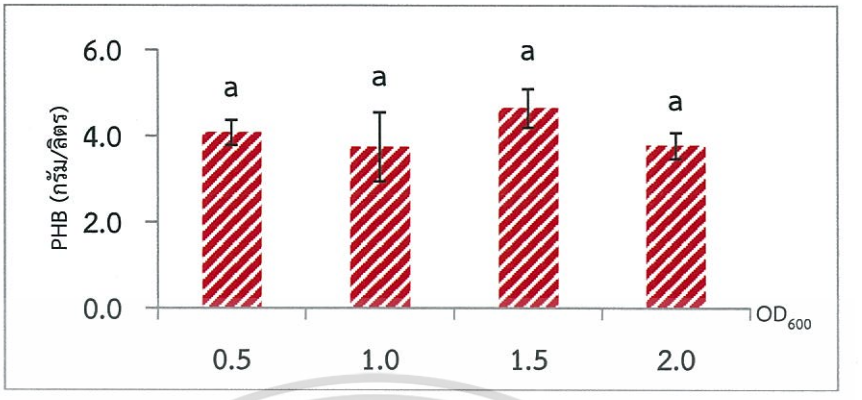


รูปที่ ก-3 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็ง ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

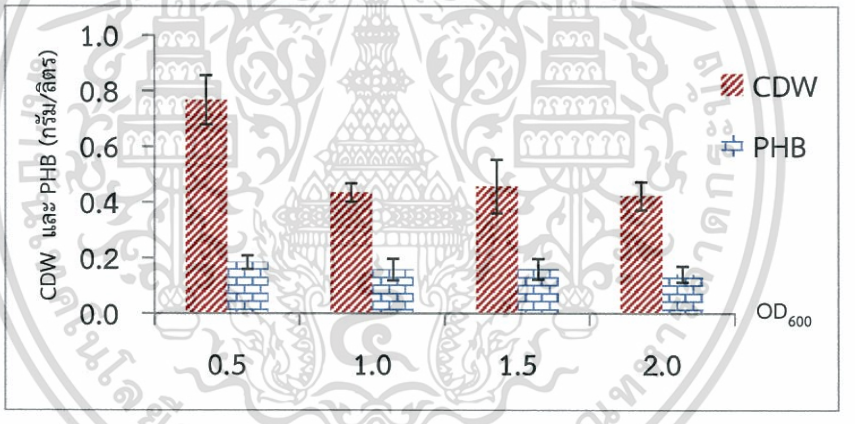


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

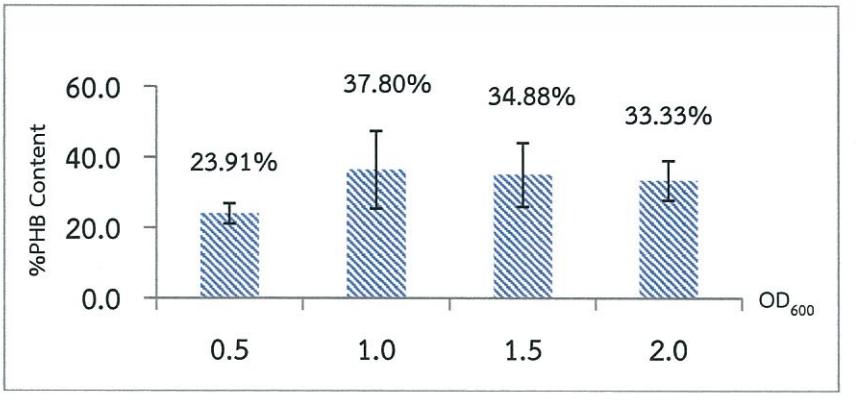
รูปที่ ก-4 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนัก PHB ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็ง ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ ก-5 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียในอาหารเหลว ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

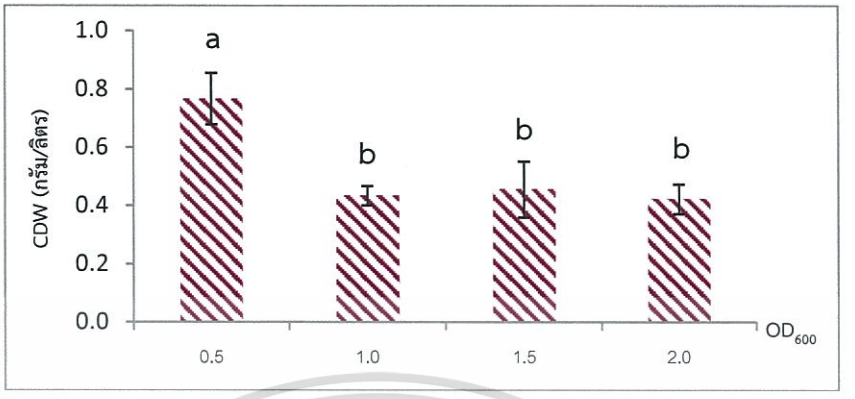


รูปที่ ก-6 ค่า % PHB Content ที่ได้จากการผลิตในอาหารเหลว ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

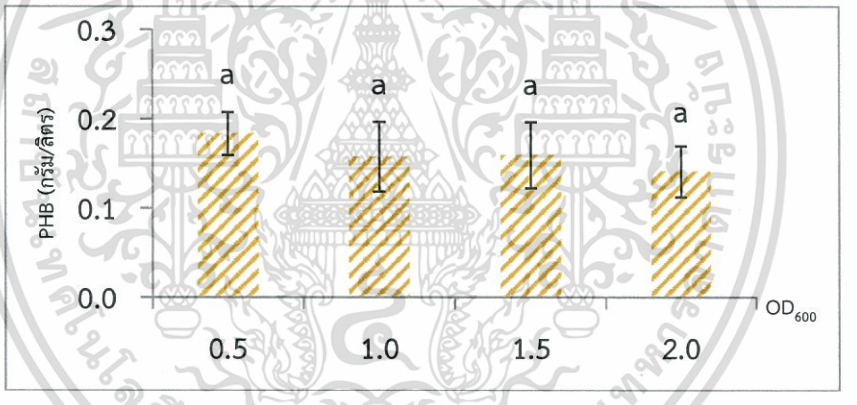


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

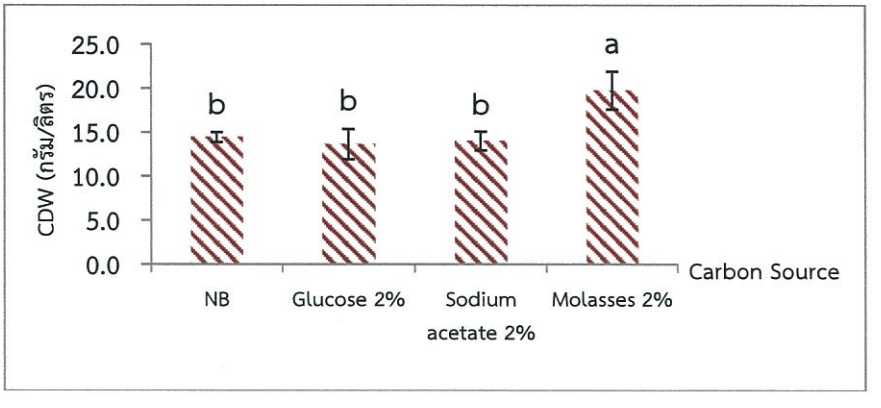
รูปที่ ก-7 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการผลิตในอาหารเหลว ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ ก-8 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนัก PHB ที่ได้จากการผลิตในอาหารเหลว ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

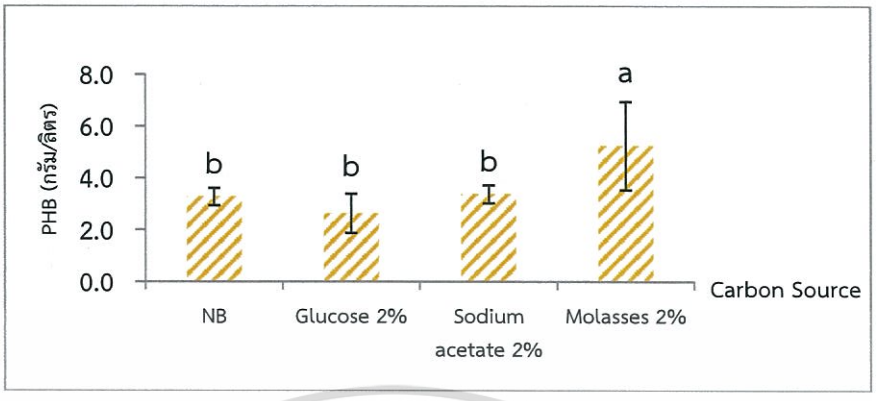


รูปที่ ก-9 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

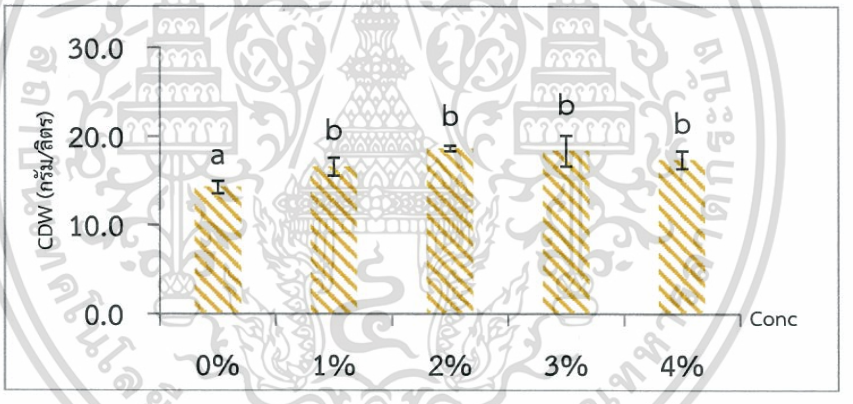


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

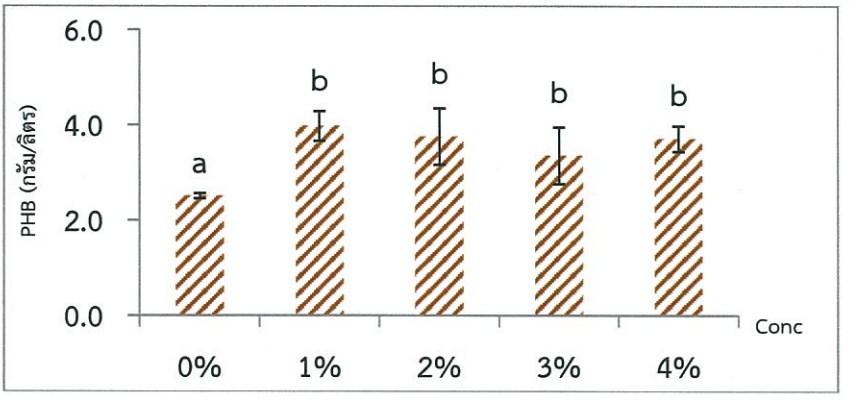
รูปที่ ก-10 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนัก PHB ที่ได้จากการผลิตบนอาหารแข็งที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ ก-11 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการผลิตในอาหารแข็งที่เติม Molasses ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ ก-12 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 20 โดย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของน้ำหนักเซลล์PHB ที่ได้จากการผลิตในอาหารแข็งที่เติม Molasses ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) 0.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ผลการทดสอบทางสถิติด้วยโปรแกรม ANOVA

ข-1 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็ง ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ข-1.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0.5	3	1.916667E1	1.9425070	1.1215069E0	14.341212	23.992121	17.5000	21.3000
1.0	3	1.980000E1	1.0440307	.6027714	17.206484	22.393516	18.6000	20.5000
1.5	3	2.313333E1	4.2453897	2.4510769E0	12.587201	33.679466	19.5000	27.8000
2.0	3	1.906667E1	2.9737743	1.7169094E0	11.679402	26.453931	15.9000	21.8000
Total	12	2.029167E1	2.9650873	.8559470	18.407740	22.175593	15.9000	27.8000

ตารางที่ ข-1.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.802	3	8	.225

ตารางที่ ข-1.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	33.249	3	11.083	1.397	.313
Within Groups	63.460	8	7.933		
Total	96.709	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-1.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ

			Subset for alpha = 0.05
	OD	N	1
Student-Newman-Keulsa	2.0	3	19.066667
	0.5	3	19.166667
	1.0	3	19.800000
	1.5	3	23.133333
	Sig.		.353
Tukey HSDa	2.0	3	19.066667
	0.5	3	19.166667
	1.0	3	19.800000
	1.5	3	23.133333
	Sig.		.353
Duncana	2.0	3	19.066667
	0.5	3	19.166667
	1.0	3	19.800000
	1.5	3	23.133333
	Sig.		.135

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-2 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการผลิต PHB บนอาหารแข็ง ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ข-2.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0.5	3	.766667	.0882169	.0509321	.547524	.985810	.7000	.8667
1	3	.433333	.0333500	.0192546	.350487	.516179	.4000	.4667
1.5	3	.455567	.0962443	.0555667	.216483	.694651	.4000	.5667
2	3	.422233	.0509102	.0293930	.295765	.548701	.3667	.4667
Total	12	.519450	.1617213	.0466849	.416697	.622203	.3667	.8667

ตารางที่ ข-2.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนการผลิต PHB บนอาหารแข็ง ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.360	3	8	.147

ตารางที่ ข-2.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.246	3	.082	15.820	.001
Within Groups	.041	8	.005		
Total	.288	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-2.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล การผลิต PHB บนอาหารแข็งด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ

	OD	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Student-Newman-Keuls[a]	2	3	.422233	
	1	3	.433333	
	1.5	3	.455567	
	0.5	3		.766667
	Sig.		.841	1.000
Tukey HSD[a]	2	3	.422233	
	1	3	.433333	
	1.5	3	.455567	
	0.5	3		.766667
	Sig.		.939	1.000
Duncan[a]	2	3	.422233	
	1	3	.433333	
	1.5	3	.455567	
	0.5	3		.766667
	Sig.		.601	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-3 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารเหลว ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ข-3.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0.5	3	.766667	.0882169	.0509321	.547524	.985810	.7000	.8667
1.0	3	.433333	.0333500	.0192546	.350487	.516179	.4000	.4667
1.5	3	.455567	.0962443	.0555667	.216483	.694651	.4000	.5667
2.0	3	.422233	.0509102	.0293930	.295765	.548701	.3667	.4667
Total	12	.519450	.1617213	.0466849	.416697	.622203	.3667	.8667

ตารางที่ ข-3.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารเหลว ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.360	3	8	.147

ตารางที่ ข-3.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.246	3	.082	15.820	.001
Within Groups	.041	8	.005		
Total	.288	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-3.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารเหลวด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ

			Subset for alpha = 0.05	
	OD	N	1	2
Student-Newman-Keuls[a]	2.0	3	.422233	
	1.0	3	.433333	
	1.5	3	.455567	
	0.5	3		.766667
	Sig.		.841	1.000
Tukey HSD[a]	2.0	3	.422233	
	1.0	3	.433333	
	1.5	3	.455567	
	0.5	3		.766667
	Sig.		.939	1.000
Duncan[a]	2.0	3	.422233	
	1.0	3	.433333	
	1.5	3	.455567	
	0.5	3		.766667
	Sig.		.601	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-4 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการผลิต PHB ในอาหารเหลว ด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ข-4.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0.5	3	.183333	.0241804	.0139606	.123266	.243401	.1556	.2000
1.0	3	.157400	.0389819	.0225062	.060564	.254236	.1167	.1944
1.5	3	.159267	.0369662	.0213425	.067437	.251096	.1167	.1833
2.0	3	.140733	.0284869	.0164469	.069968	.211499	.1167	.1722
Total	12	.160183	.0320979	.0092659	.139789	.180577	.1167	.2000

ตารางที่ ข-4.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนการผลิต PHB ในอาหารเหลวด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.342	3	8	.796

ตารางที่ ข-4.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	3	.001	.862	.499
Within Groups	.009	8	.001		
Total	.011	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-4.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHB ในอาหารเหลวด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (OD_{600}) ต่างๆ

			Subset for alpha = 0.05
	OD	N	1
Student-Newman-Keuls[a]	2	3	.140733
	1	3	.157400
	1.5	3	.159267
	0.5	3	.183333
	Sig.		.433
Tukey HSD[a]	2	3	.140733
	1	3	.157400
	1.5	3	.159267
	0.5	3	.183333
	Sig.		.433
Duncan[a]	2	3	.140733
	1	3	.157400
	1.5	3	.159267
	0.5	3	.183333
	Sig.		.172

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-5 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ข-5.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	1.443333E1	.5686241	.3282953	13.020793	15.845874	13.8000	14.9000
2	3	1.363333E1	1.7009801	.9820613	9.407864	17.858802	11.9000	15.3000
3	3	1.400000E1	1.0440307	.6027714	11.406484	16.593516	12.8000	14.7000
4	3	1.973333E1	2.1501938	1.2414150E0	14.391956	25.074711	17.9000	22.1000
Total	12	1.545000E1	2.8952940	.8357994	13.610418	17.289582	11.9000	22.1000

ตารางที่ ข-5.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็งโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.488	3	8	.290

ตารางที่ ข-5.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	74.350	3	24.783	11.101	.003
Within Groups	17.860	8	2.232		
Total	92.210	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-5.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

			Subset for alpha = 0.05	
	food	N	1	2
Student-Newman-Keuls[a]	2	3	1.363333E1	
	3	3	1.400000E1	
	1	3	1.443333E1	
	4	3		1.973333E1
	Sig.		.794	1.000
Tukey HSD[a]	2	3	1.363333E1	
	3	3	1.400000E1	
	1	3	1.443333E1	
	4	3		1.973333E1
	Sig.		.911	1.000
Duncan[a]	2	3	1.363333E1	
	3	3	1.400000E1	
	1	3	1.443333E1	
	4	3		1.973333E1
	Sig.		.547	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

หมายเหตุ 1 = NB

2 = Glucose 2%

3 = Sodium acetrate 2%

4 = Molasses 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-6 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการผลิต PHB บนอาหารแข็ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ข-6.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	3.269867E0	.3311598	.1911952	2.447220	4.092513	2.8889	3.4889
2	3	2.629167E0	.7568124	.4369459	.749140	4.509193	1.8140	3.3095
3	3	3.369600E0	.3421716	.1975529	2.519599	4.219601	3.1702	3.7647
4	3	5.235933E0	1.7104425	.9875245	.986959	9.484908	3.5405	6.9610
Total	12	3.626142E0	1.3067884	.3772373	2.795848	4.456435	1.8140	6.9610

ตาราง ข-6.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนการผลิต PHB บนอาหารแข็ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.931	3	8	.203

ตารางที่ ข-6.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.334	3	3.778	4.057	.050
Within Groups	7.450	8	.931		
Total	18.785	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-6.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลการผลิต PHB บนอาหารแข็ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

			Subset for alpha = 0.05	
	food	N	1	2
Student-Newman-Keuls[a]	2	3	2.629167	
	1	3	3.269867	3.269867
	3	3	3.369600	3.369600
	4	3		5.235933
	Sig.		.632	.085
Tukey HSD[a]	2	3	2.629167	
	1	3	3.269867	3.269867
	3	3	3.369600	3.369600
	4	3		5.235933
	Sig.		.785	.135
Duncan[a]	2	3	2.629167	
	1	3	3.269867	
	3	3	3.369600	
	4	3		5.235933
	Sig.		.394	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

หมายเหตุ 1 = NB

2 = Glucose 2%

3 = Sodium acetrate 2%

4 = Molasses 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-7 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็ง โดยใช้ Molasses ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ข-7.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	1.426667E1	.7094599	.4096069	12.504271	16.029063	13.5000	14.9000
2	3	1.656667E1	1.0214369	.5897269	14.029277	19.104057	15.4000	17.3000
3	3	1.863333E1	.3055050	.1763834	17.874417	19.392250	18.3000	18.9000
4	3	1.836667E1	1.7473790	1.0088497E0	14.025937	22.707397	16.9000	20.3000
Total	12	1.736667E1	.9865766	.5696002	14.915875	19.817459	16.7000	18.5000

ตารางที่ ข-7.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็ง โดยใช้ Molasses ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.457	4	10	.114

ตารางที่ ข-7.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	36.963	4	9.241	8.154	.003
Within Groups	11.333	10	1.133		
Total	48.296	14			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-7.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้งบนอาหารแข็ง โดยใช้ Molasses ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

	Conc	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Student-Newman-Keuls[a]	0	3	1.426667E1	
	1	3		1.656667E1
	4	3		1.736667E1
	3	3		1.836667E1
	2	3		1.863333E1
	Sig.		1.000	.145
Tukey HSD[a]	0	3	1.426667E1	
	1	3	1.656667E1	1.656667E1
	4	3		1.736667E1
	3	3		1.836667E1
	2	3		1.863333E1
	Sig.		.134	.199
Duncan[a]	0	3	1.426667E1	
	1	3		1.656667E1
	4	3		1.736667E1
	3	3		1.836667E1
	2	3		1.863333E1
	Sig.		1.000	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

หมายเหตุ 0 = Molasses 0%
1 = Molasses 1%
2 = Molasses 2%
3 = Molasses 3%
4 = Molasses 4%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-8 การทดสอบและการจัดกลุ่มและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของการผลิต PHB บนอาหารแข็ง โดยใช้ Molasses ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

ตารางที่ ข-8.1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	2.504433E0	.0557431	.0321833	2.365960	2.642907	2.4421	2.5495
2	3	3.969367E0	.3126601	.1805144	3.192676	4.746057	3.6180	4.2169
3	3	3.748633E0	.5913443	.3414128	2.279653	5.217614	3.2000	4.3750
4	3	3.350067E0	.5934970	.3426557	1.875738	4.824395	2.9176	4.0267
Total	12	3.702900E0	.2656138	.1533522	3.043079	4.362721	3.4884	4.0000

ตารางที่ ข-8.2 ตารางทดสอบเอกพันธุ์ของความแปรปรวนการผลิต PHB บนอาหารแข็ง โดยใช้ Molasses ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.607	4	10	.100

ตารางที่ ข-8.3 ค่าทางสถิติด้วยวิธีตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.981	4	.995	5.697	.012
Within Groups	1.747	10	.175		
Total	5.727	14			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-8.4 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล การผลิต PHB บนอาหารแข็ง โดยใช้ Molasses ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

			Subset for alpha = 0.05	
	Conc	N	1	2
Student-Newman-Keuls[a]				
	0	3	2.504433	
	3	3		3.350067
	4	3		3.702900
	2	3		3.748633
	1	3		3.969367
	Sig.		1.000	.322
Tukey HSD[a]	0	3	2.504433	
	3	3	3.350067	3.350067
	4	3		3.702900
	2	3		3.748633
	1	3		3.969367
	Sig.		.172	.417
Duncan[a]	0	3	2.504433	
	3	3		3.350067
	4	3		3.702900
	2	3		3.748633
	1	3		3.969367
	Sig.		1.000	.121

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

หมายเหตุ 0 = Molasses 0%
1 = Molasses 1%
2 = Molasses 2%
3 = Molasses 3%
4 = Molasses 4%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
เทคนิคการวิเคราะห์

1.การประเมินการเจริญของจุลินทรีย์โดยการวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer

Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณแสงที่ผ่านทะลุตัวอย่างที่เป็นของเหลว ซึ่งในที่นี้คืออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Liquid medium) ที่ความยาวคลื่นของแสงที่กำหนด และปริมาณแสงนี้จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของตัวอย่างเพิ่มขึ้น (เมื่อจำนวนเซลล์ในอาหารเหลวเพิ่มขึ้น) องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่อง มีดังต่อไปนี้

1) แหล่งกำเนิดแสง เป็นแสงจากหลอดไฟ ซึ่งอาจจะเป็นทังสเตน (W) หรือ ดิวทีเรียม (D, H_1^2)

2) เกรตติงเลี้ยวเบน (Diffraction grating) หรือปริซึม (Prism) เพื่อแยกแสงจากแหล่งกำเนิดออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆ เช่น ความยาวคลื่น 100-400 นาโนเมตรอยู่ในช่วงของอัลตรา - ไวโอเลต และความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร อยู่ในช่วงที่ตามองเห็นได้ เป็นต้น

3) ช่องแสง (Slit) แยกแสงเฉพาะที่มีความยาวคลื่นเหมาะสมกับตัวอย่างที่สุด

4) คิวเวท (Cuvette) เป็นหลอดหรือภาชนะที่ใช้ใส่ตัวอย่างที่จะวัด อาจทำด้วยแก้วหรือควอทซ์ โดยความกว้างของ Cuvette เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งต่อปริมาณแสงที่ผ่านทะลุตัวอย่างออกมา

5) โฟโตทิวบ์ (Phototube) จะรวบรวมแสงที่ผ่านทะลุคิวเวท

6) กัลวานอมิเตอร์ (Galvanometer) เปลี่ยนแสงที่รวบรวมจาก phototube ให้เป็นพลังงานไฟฟ้า และแสดงบนหน้าปัดในหน่วยสากล

เมื่อใส่ตัวอย่างลงคิวเวทและนำไปใส่ในช่องวางตัวอย่าง (Sample holder) แสงจากแหล่งกำเนิดจะถูกแยกเฉพาะความยาวคลื่นที่เหมาะสมกับตัวอย่างโดยปริซึม ซึ่งความยาวคลื่นที่เรียกใช้จะต่างกัน ตามสีของของเหลวตัวอย่าง เช่น ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ใช้สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Nutrient broth เพราะแสงที่ความยาวคลื่นนี้จะผ่านทะลุอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีนี้ได้เกือบทั้งหมดและมากที่สุด แสงที่ทะลุผ่าน cuvette และตัวอย่างนี้จะถูกรวบรวมโดยโฟโตทิวบ์และกัลป์วานอ-มิเตอร์จะทำหน้าที่เปลี่ยนปริมาณแสงทั้งหมดเป็นพลังงานไฟฟ้า และแสดงบนหน้าปัดในหน่วยสากล คือ Transmittance (%) และ Optical density (OD) ทั้งนี้อาจจะขยายสัญญาณให้อ่านค่าได้ดีขึ้นโดยใช้ตัวขยายสัญญาณ (Amplifier) เนื่องจากเซลล์ของจุลินทรีย์ เป็นตัวปิดกั้นแสง ดั้งนั้นแสงที่ผ่านปริซึมมาแล้วบางส่วนอาจไม่ผ่านเซลล์ของจุลินทรีย์ในตัวอย่างได้และกระจัดกระจายหรือสะท้อนออกไป ทำให้เหลือปริมาณแสงที่ทะลุผ่านน้อยลงและค่า Ttransmittance ก็ต่ำลงด้วยหรือกล่าวอีกอย่างหนึ่งว่า “ความขุ่น” เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวัดความขุ่นหรือวัดค่า OD เป็นวิธีที่นิยมใช้วัดการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่าค่า Transmittance ทั้งนี้เพราะความเข้มข้นของเซลล์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความขุ่น ดังนั้นถ้าเขียนกราฟระหว่างค่า OD กับน้ำหนักเซลล์แห้งหรือกับจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ จะได้กราฟเส้นตรง แต่ความสัมพันธ์มีข้อจำกัด กล่าวคือค่า OD ที่อยู่ในช่วง 0.1-0.5 จะเป็นช่วงที่มีความแม่นยำมากที่สุด และจะได้กราฟเส้นตรง แม้ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่ก็เป็นการวัดการเจริญของเซลล์ทั้งหมด โดยไม่อาจแยกเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายได้

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

หลักการ

เทคนิค IR เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาหมู่ฟังก์ชันของสาร โดยใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าช่วง รังสีอินฟาเรด (Infrared, IR) ที่มีความยาวคลื่น(λ) 0.8-200 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นรังสีที่มีเลขคลื่น หรือ จำนวนคลื่น (Wave Number) 12500 - 50 cm^{-1} เมื่อโมเลกุลดูดกลืนแสง IR พันธะจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในแบบต่างๆ เช่น สั่น ยืด หรือ งอ พันธะต่างชนิดจะดูดกลืนแสง IR ช่วงความยาวคลื่น หรือ ความถี่ต่างกัน โดยทั่วไปแสดงคลื่น IR ที่ถูกดูดกลืนในรูปของคลื่น

การเตรียมสารตัวอย่าง

การบดผสมกับ KBr และอัดเป็นแผ่นบาง (KBr disc) นำสาร PHB ที่สกัดได้ 2-3 มิลลิกรัม บดรวมกับ KBr ที่อบแห้งจำนวน 0.2-0.5 กรัม บดให้เข้าที่และเทลงแม่พิมพ์ อัดให้แน่นด้วยความดัน 10^4 กิโลกรัม/ ตารางเซนติเมตร นาน 5 นาที จะได้แผ่น KBr ที่มีสาร PHB ที่สกัดได้บรรจุอยู่ (KBr disc) มีลักษณะบางและโปร่งใส ถอดออกจากแม่พิมพ์ด้วยเครื่องมือสำหรับถอดแผ่น KBr ข้อเสียของวิธีนี้คือ จะเปราะ แตกง่าย และดูดความชื้น ทำให้ OH-Stretch ของน้ำอาจรบกวนการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้