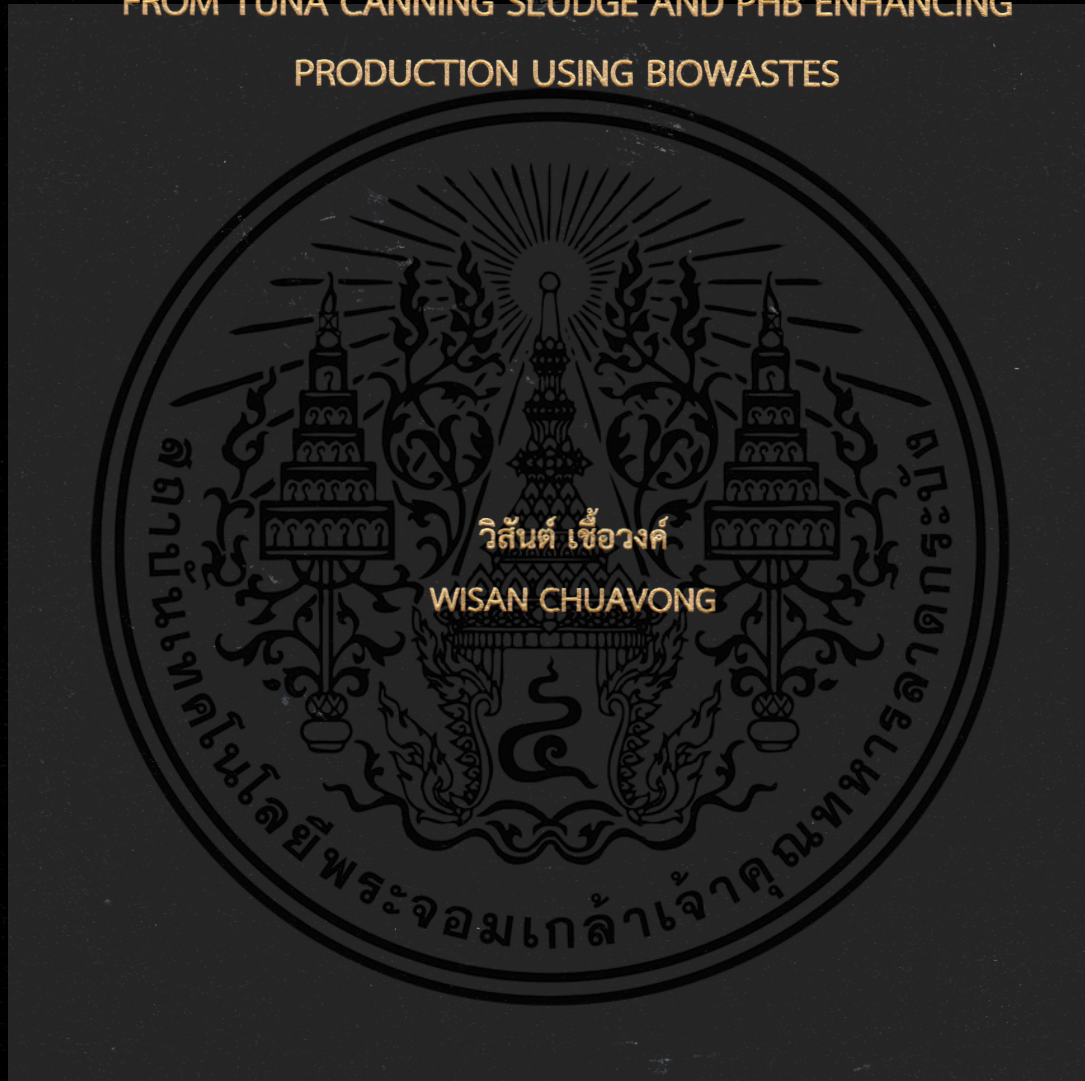


การคัดแยกและการระบุชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีจากกากตะกอน  
โรงงานทUNA กระป๋อง และการเพิ่มการผลิตพีเอชบีโดยใช้ของเสียชีวภาพ

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHB PRODUCING BACTERIA  
FROM TUNA CANNING SLUDGE AND PHB ENHANCING  
PRODUCTION USING BIOWASTES



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม)  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ 2561

KMITL- 2018-SC-M-016-002

การคัดแยกและการระบุชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีจากกากตะกอน  
โรงงานทUNA ฆ่ากระป๋อง และการเพิ่มการผลิตพีเอชบีโดยใช้ของเสียชีวภาพ

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHB PRODUCING BACTERIA  
FROM TUNA CANNING SLUDGE AND PHB ENHANCING  
PRODUCTION USING BIOWASTES



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษิตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม)  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ 2561

KMITL- 2018-SC-M-016-002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคัดแยกและการระบุชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีจากกากตะกอน  
โรงงานทูน่ากระป๋อง และการเพิ่มการผลิตพีเอชบีโดยใช้ของเสียชีวภาพ

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHB PRODUCING BACTERIA  
FROM TUNA CANNING SLUDGE AND PHB ENHANCING  
PRODUCTION USING BIOWASTES



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษิตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม)  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ 2561

KMITL- 2018-SC-M-016-002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHB PRODUCING BACTERIA  
FROM TUNA CANNING SLUDGE AND PHB ENHANCING  
PRODUCTION USING BIOWASTES



A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT  
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(ENVIRONMENTAL CHEMISTRY) DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
YEAR 2018  
KMITL-2018-SC-M-016-002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2018

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยก และการระบุชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีจากกากตะกอนโรงงานท่อน้ำกรอง และการเพิ่มการผลิตพีเอชบีโดยใช้ของเสียชีวภาพ
ชื่อนักศึกษา	นางสาววิสันต์ เชื้อวงศ์ รหัสนักศึกษา 57605040
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชา	เคมี
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
พ.ศ.	2561
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ศิริขวัญ พลประทีป

#### บทคัดย่อ

โพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต (พีเอชบี) คือโพลีเมอร์ชีวภาพที่สะสมในแกรนูลภายในเซลล์ของแบคทีเรียโดยเก็บเป็นแหล่งพลังงานสำรอง ในงานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีการสะสมพีเอชบีจากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานปลาท่อน้ำกรอง และ มูลวัว พบว่ามีแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่มีการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์ และ จากการระบุสายพันธุ์โดยยีน *16s rDNA* พบว่าอยู่ในจีนัส *Bacillus* เมื่อเปรียบเทียบปริมาณพีเอชบีที่ผลิตได้ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ SWU01 มีการผลิตพีเอชบีสูงสุด ภายหลังจากการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพีเอชบีของสายพันธุ์ SWU01 พบว่ามีการผลิตพีเอชบีสูงสุดเท่ากับ 0.91 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารดัดแปลง M9 ที่ประกอบด้วย โซเดียมอะซิเตต 2% และ ยีสต์สกัด 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน pH7 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค FT-IR และ NMR พบว่าโพลีเมอร์ที่สกัดได้เป็นพีเอชบี จากนั้นได้นำกากน้ำตาล และ น้ำตาลรีตีวซ์จากขานอ้อยมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพีเอชบีโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลรีตีวซ์จากขานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนให้การผลิตพีเอชบีสูงสุดเท่ากับ 2.01 กรัมต่อลิตร งานวิจัยนี้ยังศึกษาการผลิตพีเอชบีภายในเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* BL21(DE3) ที่มีการแสดงออกของยีนพีเอชบีซินเทส (*phaC*) จากแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU44 พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนหลุมผสมพีเอชบีซินเทสขนาด 41.5 กิโลดาลตัน แต่ไม่พบการผลิตพีเอชบี

**คำสำคัญ :** โพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต การผลิตพีเอชบี กากน้ำตาล ขานอ้อย พีเอชบีซินเทส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Thesis Title</b>	Isolation and Identification of PHB Producing Bacteria from Tuna Canning Sludge and PHB Enhancing Production Using Biowastes
<b>Student Name</b>	Ms.Wisan Chuavong Student ID 57605040
<b>Degree</b>	Master of Science (Environmental Chemistry)
<b>Department</b>	Chemistry
<b>Faculty</b>	Science
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
<b>Year</b>	2018
<b>Thesis Advisor</b>	Dr. Tipachai Vatanavicharn
<b>Thesis Co-advisor</b>	Dr. Sirikwan Ponprateep

### Abstract

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a bio-polymer that accumulates in the granule of a bacterial cell, as a source of energy. In this study, five strains of PHB producing bacteria were isolated from canned tuna sewage sludge and cow manure. Bacterial identification using *16s rDNA* gene sequencing showed the five strains were classified in the *Bacillus* genus. Comparison of PHB production showed that SWU01 produced the highest PHB. The cultivation of SWU01 stain in optimization condition (modified M9 medium supplemented with 2% sodium acetate and 0.5% yeast extract at pH 7 for 48 h) yielded 0.9 g/L of PHB. The structural studies using FT-IR and NMR showed that the extracted polymers were PHB. Molasses and reducing sugar from sugarcane bagasse were used as a carbon source for the PHB production of SWU01. The highest PHB production of 2.01 g/L was obtained by reducing sugar from bagasse as a carbon source. This study also investigated the production of PHB in *E.coli BL21 (DE3)* bacteria containing *PHB synthase (phaC)* gene from SWU44 strain. The recombinant PHB synthase was produced with the size of 41.5 kDa. However, none of PHB production was found.

**Key words:** polyhydroxybutyrate, PHB production, bagasse, molasses, PHB synthase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความช่วยเหลือ และความอนุเคราะห์ จากบุคลากรหลายฝ่ายด้วยกัน ผู้จัดทำใคร่ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารย์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้

ขอขอบพระคุณ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุวรรณิ จรรยาพูน และ ผศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำให้ คำปรึกษา เสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา และกรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์ อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ดร. ประเวศ อรรถวิวัฒน์วงศ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวก ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ และสารเคมีในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยสังเคราะห์ภาพระดับนาโน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวก ในการใช้กล้องจุลทรรศน์สำหรับการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

วิสันต์ เชื้อวงศ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำย่อ.....	ฎ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 ความสำคัญของพลาสติก.....	4
2.2 ปัญหาขยะจากพลาสติก.....	5
2.3 พลาสติกชีวภาพ.....	6
2.3.1 พลาสติกสลายตัวได้ทางชีวภาพ (Compostable plastics).....	6
2.3.2 พลาสติกที่ผลิตจากชีวมวล (Biobased-plastics).....	7
2.4 ความสำคัญ และสถานการณ์ของพลาสติกชีวภาพในตลาดโลก.....	7
2.5 โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalcanoate: PHA).....	9
2.5.1 กลุ่มของพีเอชเอตามลักษณะของมอนอเมอร์.....	9
2.6 โพลีไฮดรอกซีลิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate: PHB).....	10
2.7 คุณสมบัติทั่วไปของโพลีไฮดรอกซีลิวทีเรต.....	10
2.8 การสังเคราะห์และสะสมพีเอชบีในจุลินทรีย์.....	11
2.9 การคัดแยกแบคทีเรียที่สะสมโพลีไฮดรอกซีลิวทีเรต.....	13
2.10 แผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic trees).....	13
2.11 เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์โครงสร้างของพีเอชบี.....	15
2.11.1 เทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy .....	15
2.11.2 เทคนิค Nuclear magnetic resonance spectroscopy.....	16
2.12 การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านอุณหภูมิจากโพลีเมอร์.....	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.12.1 เทคนิค Differential scanning calorimetry .....	18
2.12.2 เทคนิค Thermogravimetric analysis .....	19
2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>23</b>
3.1 อุปกรณ์เครื่องมือ และสารเคมี.....	23
3.1.1 อุปกรณ์.....	23
3.1.2 เครื่องมือ.....	23
3.1.3 สารเคมี.....	24
3.1.4 ชุดคิด และเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	26
3.1.4 แบคทีเรีย.....	26
3.2 การเก็บตัวอย่างมูลวัว และกากตะกอนน้ำเสียโรงงานอาหารทะเล.....	26
3.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรตโดยการย้อมสี Sudan black B.....	26
3.4 การยืนยันการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์แบคทีเรียด้วยการย้อมสี Nile blue A.....	27
3.5 การตรวจสอบการสะสมพีเอชบีในแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ ส่องผ่าน.....	27
3.6 การระบุสายพันธุ์ และสร้างไฟโลเจเนติกทรีของแบคทีเรีย.....	28
3.6.1 การระบุสายพันธุ์แบคทีเรียโดยการเพิ่มปริมาณยีน <i>16s rDNA</i> .....	28
3.6.2 การสร้างไฟโลเจเนติกทรีของยีน <i>16s rDNA</i> .....	28
3.7 การผลิต และสกัดพีเอชบีจากแบคทีเรียที่คัดแยกจากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานทუნ่า กระป๋อง และมูลวัว.....	29
3.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี.....	29
3.8.1 ช่วงเวลาที่เหมาะสม.....	29
3.8.2 ค่าพีเอชที่เหมาะสม.....	30
3.8.3 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม.....	30
3.8.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน.....	30
3.8.5 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม.....	30
3.9 การผลิตพีเอชบีจากแบคทีเรียโดยใช้กากน้ำตาล และชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน.....	30
3.9.1 การปรับสภาพชานอ้อยด้วยเบส.....	31
3.9.2 การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรด.....	31
3.9.3 การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.....	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.9.4 การผลิตพีเอชบีโดยใช้น้ำตาลรีดิวส์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อย และกากน้ำตาลจากแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ SWU01.....	32
3.10 การระบุโครงสร้าง และวิเคราะห์คุณสมบัติของพีเอชบี.....	32
3.10.1 การระบุโครงสร้างจากหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FT-IR.....	32
3.10.2 การระบุโครงสร้างจากมอนอเมอร์ด้วยเทคนิค <sup>1</sup> H-NMR.....	32
3.10.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านอุณหภูมิจากพีเอชบี.....	33
3.11 การผลิตพีเอชบีจาก <i>Escherichia coli</i> ที่มีการแสดงออกของโปรตีนพีเอชบีจีนเนส.....	33
3.11.1 การเพิ่มปริมาณยีน <i>phaC</i> จาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ SWU44.....	33
3.11.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีน <i>phaC</i> .....	34
3.11.3 การผลิต และตรวจสอบโปรตีนลูกผสมพีเอชบีจีนเนส.....	34
3.11.4 การผลิตพีเอชบีในแบคทีเรียที่ผลิตโปรตีนลูกผสมพีเอชบีจีนเนส.....	35
3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	35
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>36</b>
4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีด้วยการย้อม Sudan black B.....	36
4.2 ผลการยืนยันการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์แบคทีเรียโดยการย้อมด้วย Nile blue A....	36
4.3 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน <i>16s rDNA</i> ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์.....	39
4.4 สมบัติ และโครงสร้างของพีเอชบีที่สกัดได้จากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์.....	41
4.5 ผลการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตพีเอชบีได้สูงสุดจากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์.....	44
4.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี.....	45
4.7 การผลิตพีเอชบีโดยใช้น้ำตาลรีดิวส์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยและกากน้ำตาลจากแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ SWU01.....	49
4.7.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรด.....	49
4.7.2 การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.....	49
4.8 ผลการผลิตพีเอชบีด้วยแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. SWU01 โดยใช้น้ำตาลรีดิวส์ และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน.....	51
4.9 การระบุโครงสร้างของพีเอชบีโดยหมู่ฟังก์ชันภายในโมเลกุลด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) .....	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.10 สมบัติของพีเอชบีจากการวัดค่าพลังงานความร้อนของพอลิเมอร์ด้วยเครื่อง Different scanning calorimetry .....	52
4.11. การศึกษายีนที่เกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์พีเอชบีซินเทสในแบคทีเรียที่ คัดแยกจากมูลวัว.....	53
4.11.1 ลักษณะของยีน <i>phaC</i> จากแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ SWU44.....	53
4.11.2 ผลการแสดงผลของโปรตีนลูกผสมพีเอชบีซินเทสในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	55
4.11.3 ผลการผลิตพีเอชบีในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> ที่มีการผลิตโปรตีนลูกผสม.....	55
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>57</b>
เอกสารอ้างอิง.....	59
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี.....	67
ภาคผนวก ข ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>16s rDNA</i> และ Plasmid pET-28 b (+).....	68
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	74
ภาคผนวก ง ผลการวิเคราะห์โครงสร้าง และคุณสมบัติด้านอุณหภูมิจึง.....	93
ประวัติผู้เขียน.....	114

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 เปรียบเทียบข้อเท็จจริง และประโยชน์ของพลาสติกชีวภาพ และพลาสติกสังเคราะห์.....	8
2.2 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของ โพลีโพรพิลีน และโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต.....	11
3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน <i>16s rDNA</i> และ <i>phaC</i> .....	28
4.1 คุณสมบัติของพีเอชบีที่สกัดได้วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimeter และ Thermogravimetric analysis.....	44
4.2 คุณสมบัติด้านอุณหภูมิของพีเอชบีที่สกัดจากแบคทีเรีย <i>Bacillus sp.</i> สายพันธุ์ SWU01.....	52
ค-1 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพีเอชบีของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะสม.....	74
ค-2 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพีเอชบีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 ในการหาระยะเวลาที่เหมาะสม.....	76
ค-3 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพีเอชบีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 ที่ในการหาความเป็นกรด-ด่าง (pH) เหมาะสมของอาหาร modified M9.....	79
ค-4 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพีเอชบีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 ในการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม.....	81
ค-5 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพีเอชบีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมอะซิเตตในการผลิตพีเอชบี.....	82
ค-6 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพีเอชบีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 ในการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี.....	85
ค-7 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกที่เวลาต่างๆ.....	87
ค-8 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่เวลาต่างๆในการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส.....	88
ค-9 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ในการหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส.....	89
ค-10 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณ น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนัก พีเอชบี ชั่วโมงที่ 24 และ 48 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน.....	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 สัดส่วนการใช้พลาสติกของยุโรปแบ่งตามส่วนงาน ปี 2013 และความต้องการใช้พลาสติกของยุโรปโดยแบ่งตามชนิดของโพลีเมอร์ ปี 2013.....	4
2.2 พลาสติกที่ถูกทิ้งในมหาสมุทร และ ถูกจัดขึ้นมาสะสมบนชายหาดก่อให้เกิดปัญหาขยะ (ก) และปริมาณพลาสติกที่ผลิตในทวีปยุโรปและทั่วโลกตั้งแต่ปี 1950-2013 (ข).....	5
2.3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากไบโอพลาสติก.....	6
2.4 โครงสร้างทั่วไปของพีเอชเอ.....	9
2.5 ลักษณะโครงสร้างพีเอชเอแบบต่างๆ.....	9
2.6 โครงสร้างของโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต (ก) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากพลาสติกชีวภาพ (ข).....	10
2.7 การสังเคราะห์ และการย่อยสลายโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรตในแบคทีเรีย.....	12
2.8 ภาพโครงสร้างของพีเอชเอที่มีโปรตีนที่มีความจำเพาะเชื่อมต่อโดยรอบ.....	13
2.9 ส่วนประกอบของไฟโลเจเนติกทรี (ก) และขั้นตอนทั่วไปในการสร้างไฟโลเจเนติกทรี (ข).....	14
2.10 I-R spectrum ของพีเอชบีไฮโมโพลีเมอร์.....	16
2.11 <sup>1</sup> H-NMR spectra ของพีเอชบีมาตรฐาน (ก) และพีเอชบีที่ได้จากการสกัด (ข).....	17
2.12 เทอร์โมแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย DSC.....	18
2.13 เทอร์โมแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย TGA.....	19
4.1 แบคทีเรีย 5 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานปลาทุ่นากระป๋องและมูลวัว.....	37
4.2 การย้อมแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ด้วย Sudan black B และ Nile blue A.....	38
4.3 ภาพแสดงพีเอชบีแกรนูลภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 5 ไอโซเลท โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM).....	39
4.4 ไฟโลเจเนติกทรีแสดงความสัมพันธ์ของยีน <i>16s rDNA</i> ของแบคทีเรียจีส <i>Bacillus</i> spp. จำนวน 32 สายพันธุ์.....	40
4.5 FT-IR spectra ของพีเอชบีที่สกัดได้จากแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ทั้ง 5 สายพันธุ์.....	42
4.6 <sup>1</sup> H-NMR spectra ของพีเอชบีที่สกัดได้จากแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ทั้ง 5 สายพันธุ์.....	43
4.7 การผลิตพีเอชบีของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> spp. ที่คัดแยกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์.....	45
4.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> SWU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified M9.....	46
4.9 ลักษณะแกรนูลพีเอชบีภายในเซลล์แบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. SWU01 และ การผลิตพีเอชบีที่เลี้ยงในอาหาร optimized M9.....	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก.....	49
4.11 สภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.....	50
4.12 การผลิตฟิเอซบีของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ SWU01 ในอาหาร modified M9 โดยใช้กากน้ำตาลหรือน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน.....	51
4.13 FT-IR-Spectra ของฟิเอซบีมาตรฐาน และฟิเอซบีที่สกัดจากแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ SWU01 โดยใช้กากน้ำตาลหรือน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน.....	53
4.14 การเพิ่มปริมาณยีน <i>phaC</i> และการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนโปรตีนลูกผสมฟิเอซบี ซินเทสของแบคทีเรีย SWU44.....	54
4.15 ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนลูกผสมฟิเอซบีซินเทสที่ผลิตจาก <i>E. coli</i> BL21(DE3)....	55
4.16 FT-IR-Spectra ของตัวอย่างฟิเอซบีที่สกัดจาก <i>E. coli</i> BL21(DE3) ที่ผลิตโปรตีนลูกผสม ฟิเอซบีซินเทสเปรียบเทียบกับฟิเอซบีมาตรฐาน.....	56
ข-1 Plasmid: pET-28 b (+) .....	73
ง-1 DSC เทอร์โมแกรมแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01.....	93
ง-2 DSC เทอร์โมแกรมแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU29.....	95
ง-3 DSC เทอร์โมแกรมแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU44.....	97
ง-4 DSC เทอร์โมแกรมแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU47.....	99
ง-5 DSC เทอร์โมแกรมแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU48.....	101
ง-6 DSC เทอร์โมแกรมของฟิเอซบีมาตรฐาน.....	103
ง-7 TGA เทอร์โมแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01.....	105
ง-8 TGA เทอร์โมแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU29.....	105
ง-9 TGA เทอร์โมแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU44.....	106
ง-10 TGA เทอร์โมแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU47.....	106
ง-11 TGA เทอร์โมแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU48.....	107
ง-12 TGA เทอร์โมแกรมของฟิเอซบีมาตรฐาน.....	107
ง-13 FT-IR spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01.....	108
ง-14 FT-IR spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU29.....	108
ง-15 FT-IR spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU44.....	109
ง-16 FT-IR spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU47.....	109
ง-17 FT-IR spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU48.....	110
ง-18 FT-IR spectra ของฟิเอซบีมาตรฐาน.....	110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ง-19 $^1\text{H-NMR}$ spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01.....	111
ง-20 $^1\text{H-NMR}$ spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU29.....	111
ง-21 $^1\text{H-NMR}$ spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU44.....	112
ง-22 $^1\text{H-NMR}$ spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU47.....	112
ง-23 $^1\text{H-NMR}$ spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU48.....	113
ง-24 $^1\text{H-NMR}$ spectra ของพีเอชบีมาตรฐาน.....	113



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
$\Delta H$	ค่าพลังงานเอนทาลปี
bp	base pair
CDW	cell dry weight
DNS	dinitrosalicylic acid
DSC	differential scanning calorimeter
FPU/ml	filter paper cellulase units (FPU) ต่อ มิลลิลิตร
FT-IR	fourier-transform infrared spectroscopy
$^1\text{H-NMR}$	$^1\text{H}$ Nuclear magnetic resonance
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PHB	polyhydroxybutyrate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Tc	crystallization temperature
Td	degradation temperature
TEM	transmission electron microscopy
Tg	glass transition temperature
TGA	thermal gravimetric analysis
Tm	melting point temperature

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มา และความสำคัญของงานวิจัย

พลาสติกถือเป็นวัสดุที่มีความต้องการอย่างมากในปัจจุบัน โดยวัตถุดิบส่วนใหญ่ที่นำมาผลิตได้มาจากกระบวนการปิโตรเคมี แต่เนื่องจากพลาสติกเหล่านี้ใช้ระยะเวลานานในการย่อยสลาย หรือไม่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพจึงทำให้ตกค้างในสิ่งแวดล้อม และการกำจัดโดยการเผาไหม้ยังทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก จากปัญหาดังกล่าวพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพจึงเป็นวัสดุทางเลือกที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน (สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ, 2558)

โพลีไฮดรอกซีอัลคานอเอต (Polyhydroxyalkanoate : PHAs) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่ไม่ละลายน้ำ ไม่เป็นพิษ และย่อยสลายได้ตามธรรมชาติสมบูรณ์ นอกจากนี้โคพอลิเมอร์ของพีเอชเอ ยังมีสมบัติคล้ายกับโพลีเอทิลีน (PE) และโพลีโพรพิลีน (PP) ที่เป็นเทอร์โมพลาสติกที่สามารถขึ้นรูปได้ง่ายด้วยความร้อน รวมทั้งโคพอลิเมอร์ของพีเอชเอ ยังมีระยะห่างน้อยกว่าโพลีเอทิลีน และโพลีโพรพิลีน ส่งผลให้การผ่านของออกซิเจนน้อยกว่า ทำให้เป็นวัสดุที่เหมาะสมสำหรับบรรจุภัณฑ์อาหาร นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้กับบรรจุภัณฑ์ในอุตสาหกรรม หรือ ทางการแพทย์ เป็นต้น (Mizuno *et al.* 2010 ; Kung *et al.* 2007)

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถสะสมพีเอชเอ เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนภายในเซลล์ การสะสมพีเอชเอ ภายในเซลล์จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ไม่สมดุล เช่น มีคาร์บอนมากเกินไป หรือไนโตรเจนน้อยเกินไป (Luengo *et al.* 2003) โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่สามารถผลิตพีเอชเอจะผลิตออกมาในรูปของโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate : PHB) เป็นหลัก (Suriyamongkol *et al.* 2007) ถึงแม้ว่าพีเอชบีที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะเป็นทางเลือกที่ดีกว่าพลาสติกจากปิโตรเคมีที่ย่อยสลายยาก แต่การผลิตพีเอชบีในปัจจุบันถูกจำกัดด้วยต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง จึงต้องลดต้นทุนในการผลิตลงก่อนจะนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีการสะสมพีเอชบีจากแหล่งต่างๆ เช่น การคัดแยก *Bacillus megaterium* R11 จากดินในการผลิตพีเอชบีจากกากปาล์มหลังจากการสกัดน้ำมัน (Zhang *et al.* 2013) การคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสีย และกากตะกอนจากโรงงานเยื่อกระดาษและกระดาษแข็ง (Bhuwal *et al.* 2013) และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีจาก *Azotobacter Beijerinckii* DSMZ-1041 (Montaser *et al.* 2011) นอกจากนี้ยังมีการหาวัตถุดิบใหม่ๆ หรือแหล่งคาร์บอนราคาถูกเช่น ข้าวโพดหมัก กากน้ำตาลจากหัวบีท ถั่วเหลือง หรือกากน้ำตาลจากอ้อยมาใช้เพื่อลดต้นทุนในการผลิตอีกด้วย (Singh *et al.* 2013) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้สนใจคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพีเอชบีได้ จากกากตะกอนน้ำเสียที่ได้จากโรงงานทอผ้ากระโปรง และจาก

มูลวัว และหาสภาวะที่เหมาะสมในผลิตพีเอชบีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้รวมถึงการนำขานอ้อย และกากน้ำตาลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรีย และศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียจากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานทუნ่า ครอบง และมูลวัวที่สามารถผลิตพีเอชบีได้
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีจากแบคทีเรียที่แยกได้จากกากตะกอนน้ำเสีย โรงงานทუნ่าครอบง หรือ มูลวัว
3. เพื่อศึกษาโครงสร้าง และคุณสมบัติด้านอุณหภูมิของพีเอชบีที่สกัดได้จากแบคทีเรีย
4. เพื่อศึกษาการนำขานอ้อย และกากน้ำตาลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพีเอชบี
5. เพื่อศึกษาผลของโปรตีนลูกลมผสมพีเอชบีชนิดทดสอบต่อการผลิตพีเอชบีในระบบ *Escherichia coli*

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพีเอชบีด้วยการย้อมสี Sudan black B และ Nile blue A
2. สังเกตแการบุลของพีเอชบีที่สะสมภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy)
3. ระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถผลิตพีเอชบีโดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16s rDNA* และเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank และหาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โดยการทำให้โลเจเนติกทรี
4. คัดเลือกตัวแทนแบคทีเรียที่สามารถผลิตพีเอชบีได้สูงสุดในอาหารสังเคราะห์ modified M9 แหล่งคาร์บอนคือ 2% กลูโคส บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง
5. หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพลาสติกชีวภาพโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ modified M9 และ ตัวแปรที่ศึกษาคือ ระยะเวลาในการผลิตพีเอชบีได้แก่ 24, 30, 48, 54 และ 72 ชั่วโมง พีเอชของอาหารได้แก่ 6, 7, 8 และ 9 แหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส โซเดียมอะซิเตต และซูโครส ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนได้แก่ 1%, 2%, 3%, 4% และ 5% แหล่งไนโตรเจนได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต
6. ศึกษาหมู่ฟังก์ชันของพีเอชบีด้วย FT-IR spectroscopy และลักษณะมอโนเมอร์ของโพลิเมอร์ด้วย  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy และสมบัติด้านอุณหภูมิของพีเอชบีด้วย Differential scanning calorimetry และ Thermogravimetric analysis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ศึกษาการผลิตพีเอชบีจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน
8. ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนพีเอชบีซินเทสในระบบ *E. coli* BL21(DE3) จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของงานวิจัย

1. ได้แบคทีเรียที่สามารถผลิตพีเอชบี
2. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีจากแบคทีเรียที่คัดแยก
3. สามารถใช้ชีวมวล เช่น ชานอ้อยหรือกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพีเอชบี
4. ได้แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการผลิตพีเอชบี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

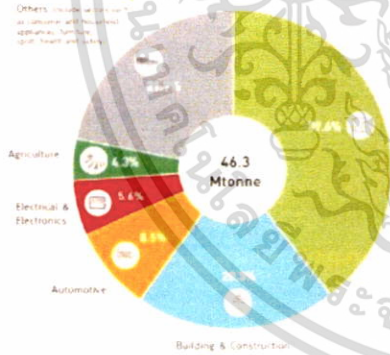
## บทที่ 2

# ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ความสำคัญของพลาสติก

พลาสติก (plastics) เป็นวัสดุที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายมากในปัจจุบัน การเจริญเติบโตของอุตสาหกรรมพลาสติกมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก และเป็นกุญแจสำคัญของผลิตภัณฑ์ และเทคโนโลยีในภาคอุตสาหกรรมอื่นๆเช่น การดูแลสุขภาพ การผลิตพลังงาน การบิน และ อวกาศ ยานยนต์ ทางทะเล การก่อสร้าง เครื่องใช้ไฟฟ้า และบรรจุภัณฑ์ หรือ สิ่งทอ (ภาพที่ 2.1) โดยนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของมนุษย์ เนื่องจากพลาสติกมีความทนทาน มีราคาถูก และสามารถขึ้นรูปได้ง่าย (PlasticsEurope, 2013) ซึ่งเทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic) เป็นพลาสติกที่ใช้กันแพร่หลายที่สุดในโลก ตัวอย่างเช่น พอลิเอทิลีน พอลิโพรพิลีน พอลิสไตรีน ซึ่งมีสมบัติพิเศษคือเมื่อหลอมแล้วสามารถนำมาขึ้นรูปกลับมาใช้ใหม่ได้ (Wikipedia, 2015) ในทวีปยุโรปปี 2013 อุตสาหกรรมพลาสติกทำให้เกิดการจ้างงานมากกว่า 1.45 ล้านคน คิดเป็น 2.4 ของ GDP (PlasticsEurope, 2015) อย่างไรก็ตามในด้านเศรษฐกิจพลาสติกอาจมีความสำคัญอย่างมากแต่อีกด้านหนึ่งพลาสติกก็ทำให้เกิดปัญหาขยะที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมากเช่นกัน

ก



ข



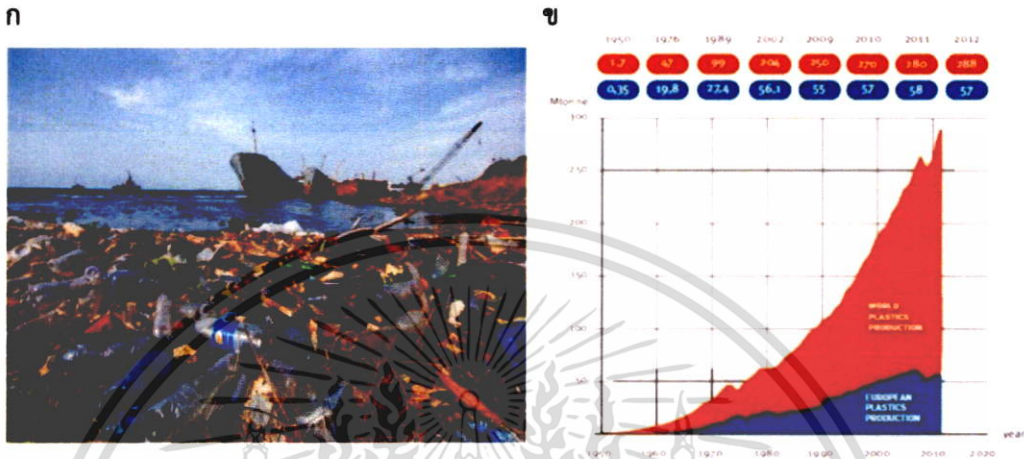
ภาพที่ 2.1 สัดส่วนการใช้พลาสติกของยุโรปแบ่งตามส่วนงาน ปี 2013 (ก) ความต้องการใช้พลาสติกของยุโรปโดยแบ่งตามชนิดของโพลีเมอร์ ปี 2013 (ข)

(PlasticsEurope, 2015)

โดยพลาสติกที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันกว่า 80% ผลิตจากโพลีเมอร์ที่มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี โดยพลาสติกประเภทนี้ไม่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติจึงก่อให้เกิดปัญหาขยะ และผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Sprajcar. et al. 2012) นอกจากคุณสมบัติที่ทนทานของพลาสติกสังเคราะห์แล้ว พฤติกรรมการใช้ผลิตภัณฑ์จากพลาสติกอย่างฟุ่มเฟือยของมนุษย์ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้ปัญหาขยะจากพลาสติกเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากพลาสติกเป็นวัสดุที่ทนทานสามารถใช้งานได้นานโดยไม่ย่อยสลายแต่การใช้พลาสติกกลับใช้ระยะเวลาสั้นๆ (European Commission, 2011)

## 2.2 ปัญหาขยะจากพลาสติก



ภาพที่ 2.2 พลาสติกที่ถูกทิ้งในมหาสมุทร และถูกพัดขึ้นมาสะสมบนชายหาดก่อให้เกิดปัญหาขยะ (ก) และปริมาณพลาสติกที่ผลิตในทวีปยุโรป และทั่วโลกตั้งแต่ปี 1950-2013 (ข)

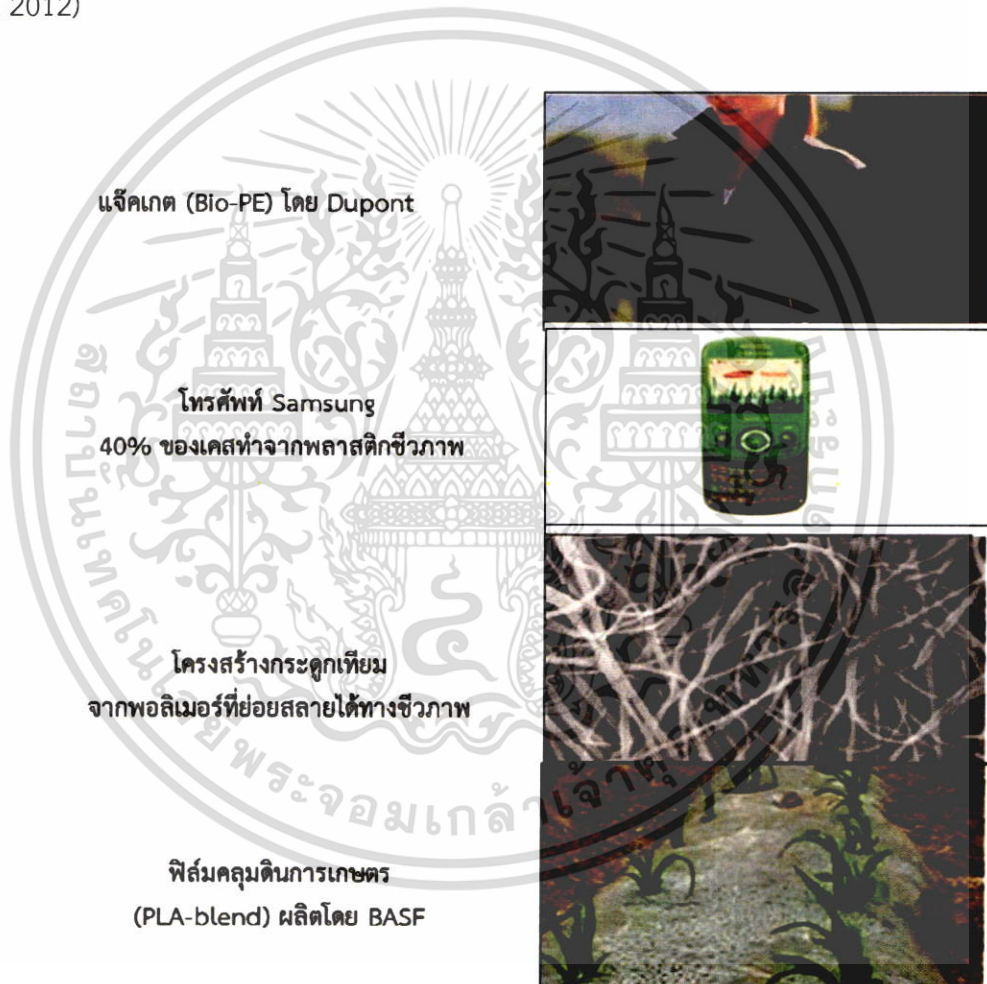
(Smith, 2016 และ PlasticsEurope, 2013)

จากการผลิตพลาสติกที่เพิ่มขึ้น และพฤติกรรมการใช้พลาสติกอย่างฟุ่มเฟือยทำให้สถานการณ์ขยะพลาสติกในปัจจุบันน่าเป็นห่วง (ภาพที่ 2.2) และยากที่จะตรวจสอบโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพแวดล้อมทางทะเล มีการคาดการณ์ว่าในปี 2008 สหภาพยุโรป (EU-27) ประเทศนอร์เวย์ และสวีเดนผลิตขยะพลาสติกประมาณ 24.9 ล้านตัน (Mudgal, et al. 2011) ปริมาณขยะพลาสติกทั้งบนบก และทะเลล้วนส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และต่อสุขภาพทั้งสิ้น นอกจากนี้มีความกังวลมากขึ้นเกี่ยวกับการปรากฏของไมโครพลาสติก ซึ่งเป็นชิ้นส่วนพลาสติกขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะ และสภาพอากาศที่เปลี่ยนไปทำให้พลาสติกขนาดใหญ่เปลี่ยนเป็นขนาดเล็กลงซึ่งเป็นเรื่องยากในการตรวจสอบ อาจส่งผลกระทบมากกว่าพลาสติกขนาดใหญ่ ในด้านสุขภาพผลกระทบต่อส่วนใหญ่มาจากสารเคมีที่เพิ่มเข้าไปเพื่อให้พลาสติกมีคุณสมบัติบางอย่าง เช่น Bisphenol A, phthalates และสารทนไฟ หรือ การดูดซับสารปนเปื้อนอื่นๆ เช่น สารพิษตกค้างยาวนาน (POPs) ทั้งหมดเหล่านี้ล้วนส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ และสัตว์ทั้งสิ้น (European Commission, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 พลาสติกชีวภาพ

พลาสติกชีวภาพคือ พลาสติกชนิดหนึ่งที่มีกลไกการย่อยสลาย ด้วยเอนไซม์ และแบคทีเรียในธรรมชาติ ซึ่งเมื่อย่อยสลายหมดแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น น้ำ มวลชีวภาพ ก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นสิ่งจำเป็นในการเจริญเติบโต และดำรงชีวิตของพืช พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพจะมีสมบัติต่างๆในการใช้งานเช่นเดียวกับพลาสติกโดยทั่วไป แต่จะมีความแตกต่างกันตรงที่เมื่อทิ้งพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพนี้ไปเป็นขยะ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมก็จะเกิดการย่อยสลายได้ พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีแนวโน้มทางการทำตลาดที่ดี และมีการผลิตเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์ (ภาพที่ 2.3) ได้แก่ พอลิแล็กติกแอซิด และพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (วชิระ, 2012)



ภาพที่ 2.3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากไบโอพลาสติก  
ดัดแปลงจาก (สถาบันพลาสติก, 2013)

พลาสติกชีวภาพสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ (สถาบันพลาสติก, 2013) คือ

### 2.3.1 พลาสติกสลายตัวได้ทางชีวภาพ (compostable plastics)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นพลาสติกที่อาจผลิตจากวัตถุดิบชีวมวล หรือ จากปิโตรเคมีก็ได้ พลาสติกกลุ่มนี้เมื่อใช้งานแล้ว และนำไปผ่านกระบวนการหมักทางชีวภาพจะย่อยสลายจนไม่หลงเหลือสิ่งที่ยังมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สิ่งแปลกปลอม หรือ สารพิษไว้ ตัวอย่างพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เช่น พลาสติกที่มีแบงเป็นองค์ประกอบพื้นฐาน พอลิแล็กติกแอซิด พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต และพอลิบิวทีลีนซัคซิเนต

### 2.3.2 พลาสติกที่ผลิตจากชีวมวล (biobased-plastics)

เป็นพลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบทางการเกษตร ซึ่งเป็นทรัพยากรที่ใช้แล้วไม่หมดไป สามารถปลูกขึ้นมาทดแทนใหม่ได้ (renewable resources) พลาสติกชนิดนี้ผลิตจากวัตถุดิบเช่น น้ำตาล แป้ง น้ำมัน หรือ เซลลูโลสที่ได้จากพืช ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์โพลีเอสเตอร์ที่ใช้วัตถุดิบจากโพรเพนไดออลที่มาจากพืช (bio-PDO) ในล่อนที่ผลิตจากน้ำมันเมล็ดละหุ่ง รวมถึงพลาสติกชีวภาพที่นำจับตามองในกลุ่มนี้ คือ โพลีเมอร์ที่มีโครงสร้างทางเคมีเหมือนกับโพลีเมอร์ที่ได้จากปิโตรเคมี แต่ว่ามีสัดส่วนของชีวมวลอยู่ด้วย เช่น พอลิเอธิลีน (bio-PE) พีวีซี (bio-PVC) หรือ เพท (bio-PET) ซึ่งผลิตจากเอทานอลที่ได้จากอ้อย

## 2.4 ความสำคัญ และสถานการณ์ของพลาสติกชีวภาพในตลาดโลก

การลงทุนผลิตพลาสติกชีวภาพยังไม่ค่อยแพร่หลายมากนักพบในเฉพาะตลาดบางกลุ่มเท่านั้น เนื่องจากการผลิตไบโอพลาสติกคุณภาพดีมีต้นทุนการผลิตที่สูงนั้นเป็นเหตุผลว่าทำไมส่วนแบ่งการตลาดของไบโอพลาสติกยังน้อยอยู่ แต่สิ่งที่สำคัญกว่าคือการคำนึงถึงคุณสมบัติของพลาสติกชีวภาพ เนื่องจากราคาของทรัพยากรที่ไม่สามารถนำมาหมุนเวียนได้ และแหล่งพลังงานที่มีราคาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้ราคาของพลาสติกชีวภาพสามารถแข่งขันกับพลาสติกสังเคราะห์ได้ ซึ่งเป็นสิ่งที่ทำให้การลงทุนนี้น่าสนใจขึ้น จากตารางที่ 2.1 แสดงข้อเท็จจริงต่างๆเกี่ยวกับพลาสติกชีวภาพ และพลาสติกสังเคราะห์ (Michael, 2004)

ในปี 2012 ยุโรปรายงานว่าพลาสติกชีวภาพคิดเป็นสัดส่วนน้อยกว่าร้อยละ 1 ของการใช้พลาสติกทั้งหมดทั่วโลก และได้ประมาณการผลิตพลาสติกชีวภาพทั่วโลกจะเพิ่มขึ้นจาก 798,070 ตัน ในปี 2010 เป็น 1,850,000 ตันในปี 2015 จากการคาดการณ์นี้ทำให้ SPI (The Plastics Industry Trade Association) ยังตั้งข้อสังเกตว่า “ปัจจุบันราคาปิโตรเลียม และก๊าซธรรมชาติที่สูงขึ้นได้กระตุ้นให้ภาคอุตสาหกรรมพยายามหาวัตถุดิบทางเลือกสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพ” ซึ่งสอดคล้องกับผลการสำรวจของ SPI พบว่าร้อยละ 27 ของผู้ทดสอบ รู้จักพลาสติกชีวภาพ ร้อยละ 34 ไม่รู้จัก หรือ ค้นเคยกับพลาสติกชีวภาพ หลังจากได้เรียนรู้เกี่ยวกับพลาสติกแล้วร้อยละ 50 ระบุว่าราคาของผลิตภัณฑ์จากไบโอพลาสติกแพงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามร้อยละ 57 ระบุว่าพวกเขาอาจจะหรือ พิจารณาที่จะซื้อผลิตภัณฑ์พลาสติกที่มีตราประทับของ USDA (The U.S. Department of Agriculture) มากขึ้น (The Plastics Industry Trade Association, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 2.1 เปรียบเทียบข้อเท็จจริง และประโยชน์ของพลาสติกชีวภาพกับพลาสติกสังเคราะห์

	พลาสติกธรรมดา Conventional Plastic	พลาสติกชีวภาพ Bioplastic
วัตถุดิบ	ปิโตรเลียม (non-renewable resource ไม่สามารถปลูกทดแทนได้)	ชีวมวล (renewable resource ปลูกหรือหาทดแทนได้)
ตัวอย่างเม็ดพลาสติก	PP, PC, PVC...	PLA, PBS, PHA, PBAT
ราคาเฉลี่ยต่อกิโลกรัม	40 บาท	60-130 บาท
ระยะเวลาในการย่อยสลายในธรรมชาติ	โดยเฉลี่ย 200 ปี หรือไม่สามารย่อยสลายได้	ชนิดที่ย่อยสลายได้จะใช้เวลาโดยเฉลี่ย 2 เดือน ขึ้นกับสภาพแวดล้อม และอุณหภูมิ
รีไซเคิล	ทำได้แต่ต้องมีการคัดแยกที่ดี	ทำได้เฉพาะชนิดที่มีโครงสร้างพอลิเมอร์ เหมือนพลาสติกทั่วไปและต้องมีการคัดแยกที่ดี

(สถาบันพลาสติก, 2013)

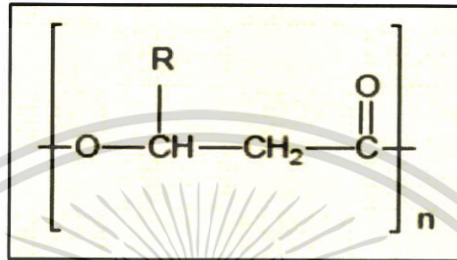
จากกระแสรักษ์สิ่งแวดล้อมของผู้บริโภค และความต้องการที่จะหันไปใช้วัตถุดิบทางเลือกอื่นๆ ทำให้กำลังการผลิตพลาสติกชีวภาพของโลกขยายตัวอย่างต่อเนื่องเฉลี่ยร้อยละ 20-30 ต่อปี และเพิ่มขึ้นถึง 1 ล้านตันในปี 2554 ปัจจุบันสัดส่วนของพลาสติกชีวภาพคิดเป็นร้อยละ 0.4 ของกำลังการผลิตพลาสติกจากปิโตรเคมีทั้งหมด (235 ล้านตันในปี 2554)

นอกจากนี้ความสำคัญของการใช้พลาสติกชีวภาพ คือการลดปัญหาการกำจัดขยะพลาสติก เพื่อลดปัญหาดังกล่าวรัฐบาลของประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป และประเทศญี่ปุ่นได้ร่วมลงนามในพิธีสารเกียวโต ทำให้มีพันธกรณีต้องลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก โดยประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปได้ตั้งเป้าหมายเพื่อลดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้ได้ร้อยละ 20 (เมื่อเทียบกับปี 1990) ภายในปี 2563 ในขณะที่ประเทศญี่ปุ่นตั้งเป้าลดให้ได้ร้อยละ 6 (เมื่อเทียบกับปี 1990) ระหว่างปี 2553-2555 เพื่อสร้างความตระหนักในปัญหาสิ่งแวดล้อมทำให้ผู้บริโภคปรับเปลี่ยนพฤติกรรมกรบริโภค โดยหันมาใส่ใจกับผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น ลดการพึ่งพาน้ำมัน และเป็นการการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลผลิตทางการเกษตร อย่างไรก็ตามพลาสติกชีวภาพยังมีโอกาสเติบโตได้อีกมาก ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการผลิตจะส่งผลให้สามารถผลิตเม็ดพลาสติกชีวภาพได้จากวัตถุดิบที่หลากหลาย และมีราคาถูกลง คาดว่ากำลังการผลิตพลาสติกชีวภาพจะเพิ่มขึ้นเป็น 5.8 ล้านตันภายในปี 2559 และเพิ่มสัดส่วนเป็นร้อยละ 7 ของพลาสติกทั้งหมด ภายในปี 2563 (สถาบันพลาสติก, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalcanoate: PHA)

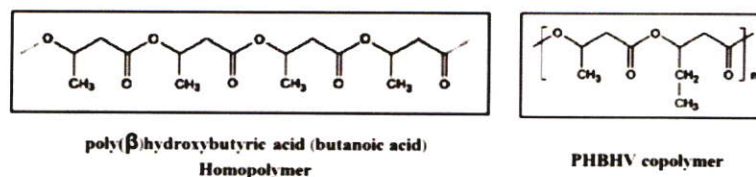
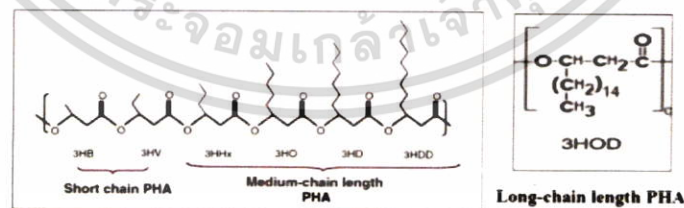
คือ โพลีเมอร์ชีวภาพตามธรรมชาติ (natural biopolymers) จัดอยู่ในกลุ่มของโพลีเอสเทอร์ ประกอบด้วยหน่วยมอนอเมอร์ (R)-3HA เช่น poly-3-hydroxybuteric acid (PHB) นอกจากนี้พบว่ามากกว่า 80 ชนิดของสารประกอบของพีเอชเอ ซึ่งทำให้โครงสร้าง คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี ของพีเอชเอแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการรวมตัวกันของหน่วยย่อยมอนอเมอร์โดยโครงสร้างทั่วไปของพีเอชเอเป็นดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทั่วไปของพีเอชเอ (Endres and Siebert-Raths, 2011)

### 2.5.1 กลุ่มของพีเอชเอตามลักษณะของมอนอเมอร์

พีเอชเอมีทั้งแบบโฮโมโพลีเมอร์คือ ประกอบด้วยมอนอเมอร์เพียง 1 ชนิด และ แบบ โคโพลีเมอร์คือประกอบด้วยมอนอเมอร์มากกว่า 1 ชนิด นอกจากนี้ชนิดของพีเอชเอสามารถแบ่งตามจำนวนคาร์บอนของมอนอเมอร์ได้เป็น 3 กลุ่มได้แก่ พีเอชเอสายสั้น (short chain length PHA) ประกอบด้วยพีเอชเอที่มีความยาว C4-C5 ซึ่งพีเอชบีจัดอยู่ในกลุ่มนี้ และ เป็นพีเอชเอตัวแรก ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ พีเอชเอสายยาวปานกลาง (medium chain length PHA) C6-C14 ถือว่าเป็นยางสังเคราะห์และยางพารา และ พีเอชเอสายยาว (long chain length PHA) >C14 ดังภาพที่ 2.5

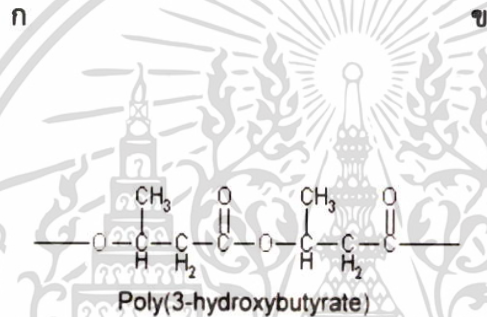


ภาพที่ 2.5 ลักษณะโครงสร้างพีเอชเอแบบต่างๆ

(Endres and Siebert-Raths, 2011; Chen, 2010 และ Singh and Mallick, 2008) ด้านการค้ำ  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate: PHB)

พีเอชบี คือ โพลีเมอร์พีเอชเอชนิดที่พบมากที่สุดจัดเป็นโพลีเอสเตอร์ตามธรรมชาติสามารถย่อยสลายได้ โครงสร้างมีลักษณะไอโซแทกติกแบบสมมาตรดังภาพที่ 2.6 คุณสมบัติเป็นโพลีเมอร์ชีวภาพที่ไม่ละลายน้ำ ไม่เป็นพิษ ย่อยสลายได้สมบูรณ์ ใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี เช่น โพลีเอทิลีน และโพลีโพรพิลีน โดยโคพอลิเมอร์ของโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต และโพลีไฮดรอกซีวาลาเรต (Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)) มีระยะห่างน้อยกว่าโพลีเอทิลีน และโพลีโพรพิลีน การผ่านของออกซิเจนน้อยกว่าทำให้โคพอลิเมอร์ของพีเอชเอเป็นวัสดุที่เหมาะสมสำหรับบรรจุภัณฑ์อาหาร นอกจากนี้ยังมีความสนใจในการนำไปใช้ในด้านบรรจุภัณฑ์ในอุตสาหกรรม, การแพทย์ เป็นต้นดังตัวอย่างในภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต (ก) และตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากพลาสติกชีวภาพ (ข) (Endres and Siebert-Raths, 2011) และ

(<https://www.wardpackaging.com.au/product-range/bags-plastic-other/>)

## 2.7 คุณสมบัติทั่วไปของโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต

1. ไม่ละลายน้ำ และสามารถต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำให้พีเอชบีต่างจากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ชนิดอื่นๆซึ่งสามารถละลายน้ำได้ หรือ มีความไวต่อความชื้น

2. ทนต่อรังสีอัลตราไวโอเล็ต และออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้ดี แต่มีความต้านทานต่อกรดและเบสต่ำ

3. พีเอชบีละลายได้ในคลอโรฟอร์ม และสารประกอบคลอรีนไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ

4. มีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์ หรือ อวัยวะของสิ่งมีชีวิต (Biocompatible)

5. มีจุดหลอมเหลว 175 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิทรานซิชัน 15 องศาเซลเซียส และมีความทนแรงดึง 15 เมกะปาสคาล (MPa)

6. พีเอชบี จมน้ำในขณะที่โพลีโพรพิลีนลอยตัวแต่การจมน้ำของพีเอชบีก่อให้เกิดการย่อยสลายโดยไม่ใช้ออกซิเจนในการตกตะกอน และไม่มีความเป็นพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากคุณสมบัติทั่วไปที่กล่าวข้างต้นคุณสมบัติทางเคมีอื่นๆของพีเอชบีเปรียบเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 2.2

**ตารางที่ 2.2** การเปรียบเทียบคุณสมบัติของ โพลีโพรพิลีน และ โพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต

พารามิเตอร์	โพลีโพรพิลีน	โพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต
Melting point Tm (°C)	171-186	171-182
Glass Transition Temperature Tg (°C)	-15	5-10
Crystallinity (%)	65-70	65-80
Density (g cm <sup>-3</sup> )	0.905-0.94	1.23-1.25
Molecular weight Mw(x10 <sup>-5</sup> )	2.2-7	1-8
Molecular weight distribution	5-12	2.2-3
Flexural modulus (GPa)	1.7	3.5-4
Extension to break (%)	400	6-8
UV resistance	แยء	ดี
Solvent resistance	ดี	แยء
Oxygen permeability (cm <sup>3</sup> m <sup>-2</sup> atm <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	1700	45
Biodegradability	-	ดี
Tensile modulus (MPa)	39	40
Other	ความหนาแน่นต่ำลอยน้ำ	ความหนาแน่นสูงจมน้ำ

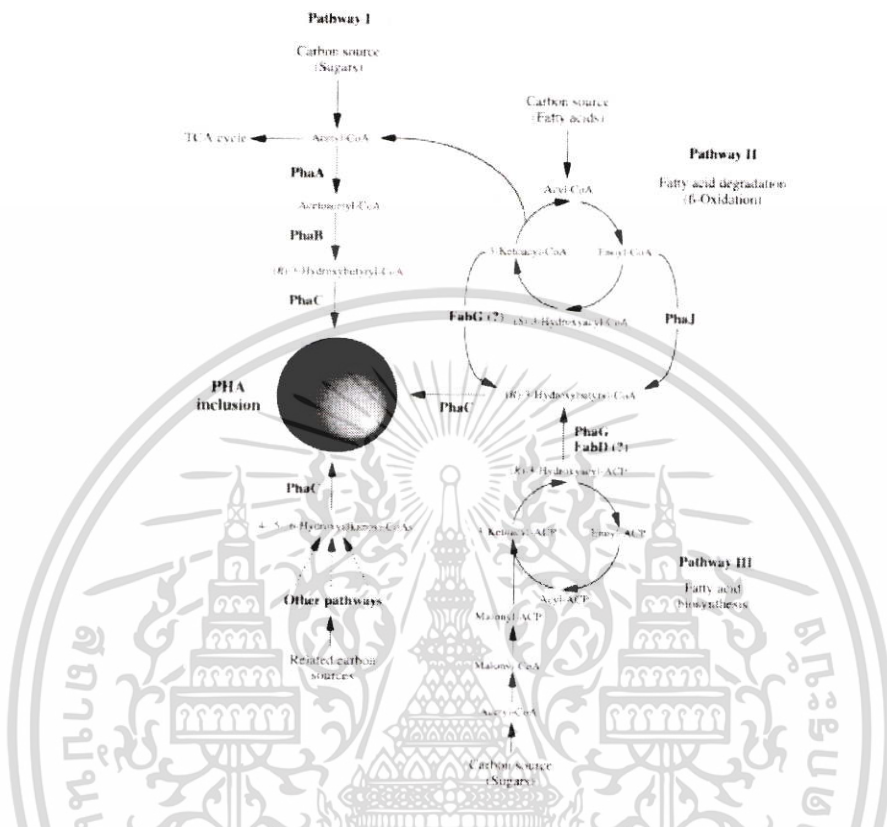
## 2.8 การสังเคราะห์ และสะสมพีเอชบีในจุลินทรีย์

การสะสมพีเอชบีพบในแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมบวก และแกรมลบจุลินทรีย์ส่วนใหญ่สะสมไว้ในแกรนูลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน และ พลังงานเมื่อสารอาหารไม่สมดุล ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรียมีการค้นพบ poly(3-hydroxybutyric acid) ครั้งแรกใน *Bacillus megaterium* (Lemoigen, 1926) การศึกษาต่อมา ก็พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นสามารถผลิตพีเอชบีได้สูง เช่น *Ralstonia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Aeromonas* และ *Pseudomonas* เป็นต้น

การสังเคราะห์พีเอชบีในแบคทีเรียเริ่มจาก acetyl-coA เปลี่ยนเป็น acetoacetyl-CoA ด้วยเอนไซม์  $\beta$ -ketothiolase จากนั้นเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase จะเปลี่ยน acetoacetyl-CoA เป็น 3-hydroxybutyryl-coA ต่อมาเกิดการสร้างสายโพลิเมอร์ (polymerization) เป็นพีเอชบีด้วยเอนไซม์พีเอชบีซินเทสดังแสดงในภาพที่ 2.7 ในการสังเคราะห์พีเอชบีประกอบด้วยการทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

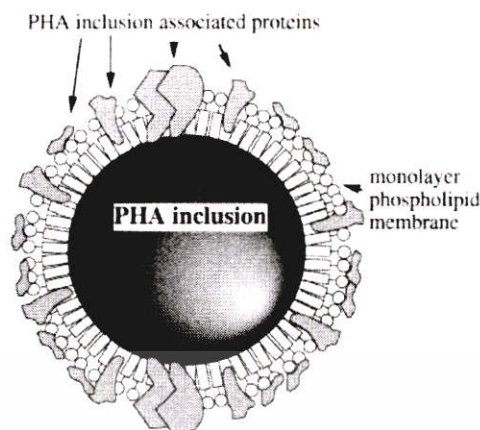
ของเอนไซม์ที่สำคัญ 3 ชนิดด้วยกันได้แก่  $\beta$ -ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase และฟิเอสบีซินเทสซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *phaCBA* cluster



ภาพที่ 2.7 การสังเคราะห์ และการย่อยสลายโพลิไฮดรอกซีบิวทิเรตในแบคทีเรีย (Sudesh, et al. 2000)

ซึ่งประกอบด้วยยีน *phaC phaB* และ *phaA* โดยยีน *phaC* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ฟิเอสบีซินเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างสายโพลิเมอร์ของฟิเอสบี ยีน *phaB* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน acetoacetyl-CoA เป็น 3-hydroxybutyryl-coA และ *phaA* ควบคุมการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -ketothiolase เพื่อเปลี่ยน acetyl-coA เป็น acetoacetyl-CoA นอกจากนี้ทั้ง 3 ชนิดนี้ในการสะสมฟิเอสบียังมียีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *phaZ* ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ PHB depolymerase เพื่อสลายฟิเอสบีที่สะสมในแกรนูลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเซลล์ ส่วนยีน *phaP* ทำหน้าที่ผลิตโปรตีน phasine ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวกับการสร้าง และ กำหนดขนาดแกรนูลของฟิเอสบี โดยโปรตีน phasine จะจับกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic surfaces) อยู่บนผิวแกรนูลของฟิเอสบี โดยแกรนูลของฟิเอสบีประกอบด้วยชั้นของฟอสโฟลิปิด (phospholipid monolayer) ที่ไม่ชอบน้ำที่ล้อมรอบแกรนูล ซึ่งมีโปรตีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับแกรนูลฟิเอสบีอยู่ (ภาพที่2.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.8 ภาพโครงสร้างของพีเอชไอที่มีโปรตีนที่มีความจำเพาะเชื่อมต่อโดยรอบ

(Sudesh. *et al.* 2000)

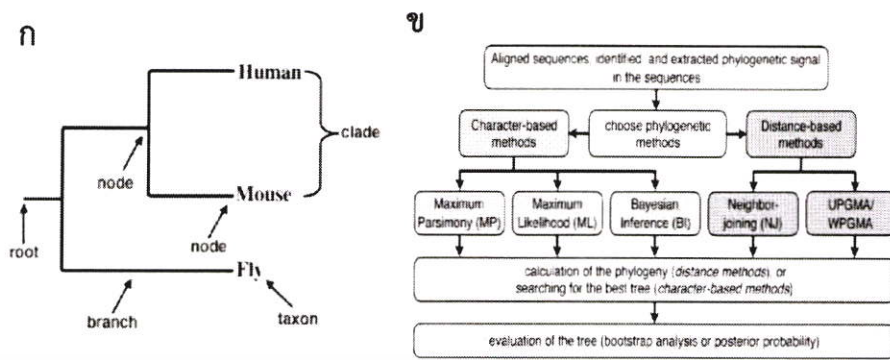
## 2.9 การคัดแยกแบคทีเรียที่สะสมโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต

ในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์เบื้องต้นใช้กลุ่มสีย้อม lipophilic dyes ย้อมเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างจุลินทรีย์ที่มีการสะสม และไม่สะสมพีเอชบี โดยใช้ Sudan black B จะย้อมติดสีกลุ่มกรดไขมัน และลิโปโปรตีนบางชนิด (lipoproteins) ดังนั้นการย้อมฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ด้วย Sudan black B จึงเป็นแนวทางที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียที่มีการสะสมพีเอชบีในเบื้องต้น แต่การย้อมด้วย Nile blue A มีความจำเพาะเจาะจงมากกว่า Sudan black B โดยแกรนูลที่มีการสะสมพีเอชบีจะถูกกระตุ้นด้วยแสงที่มีความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร และเรืองแสงสีส้มเมื่อสังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์ความเข้มข้นของแสงจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของพีเอชบีในแกรนูล

## 2.10 แผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic trees)

การสร้างไฟโลเจเนติกเป็นกรสร้างเพื่อใช้ศึกษาวิวัฒนาการ และความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาในระดับโมเลกุลได้แก่ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน (orthologous genes) โดยในแผนภูมิไฟโลเจเนติกที่มีส่วนประกอบคล้ายกับต้นไม้ดังภาพที่ 2.9

กิ่งก้านหรือแขนง (branch) ก้านอาจแตกเป็นกิ่งย่อยแบบสองทาง (bifurcation) หรือหลายทาง (multifurcation) ตำแหน่งที่ก้านแตกเป็นกิ่งย่อยเป็นจุดต่อ เรียกว่า โหนด (node) ที่ปลายสุดของกิ่งจะเป็นลำดับเบส หรือ โปรตีนสายพันธุ์ หรือ สปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตเรียกว่า ใบ (leaf) หรือ แทกซอน (taxon)



ภาพที่ 2.9 ส่วนประกอบ (ก) และ ขั้นตอนทั่วไปในการสร้างไฟโลเจเนติกทรี (ข)  
(Theobald, 2012 และ ประเวช, 2561)

ค่าบูทสเตรฟฟิง (Boostrapping) คือวิธีตรวจสอบความถูกต้องของไฟโลเจเนติกทรีอย่างง่ายที่สุด โดยอาศัยหลักการสำคัญคือ ความเกี่ยวข้องกันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ และการเปลี่ยนแปลงเบสแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยถ้าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเกี่ยวข้องกันมากการเปลี่ยนแปลงเบสก็จะมีผลต่อความเกี่ยวข้องนั้น แต่ถ้าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเกี่ยวข้องกันน้อย การเปลี่ยนแปลงเบสจะส่งผลอย่างมาก เพื่อเป็นการทดสอบว่าชุดของข้อมูลทั้งหมดสอดคล้องกับทรีหรือไม่ หรือว่าทรีที่ได้เป็นเพียงหนึ่งในบรรดาทรีทั้งหมดโดยขั้นตอนประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ การสุ่มตัวอย่างย่อยๆในแต่ละคอลัมน์ของชุดข้อมูล จากนั้นนำมาสร้างทรีต่างๆในแต่ละตัวอย่างย่อย และคำนวณความถี่ที่ส่วนต่างๆของทรีที่ถูกสร้างขึ้นโดยค่าสนับสนุนบูทสเตรฟฟิงจะแสดงไว้ที่โนดของทรี (สมชาย, 2008)

วิธีการสำหรับใช้คำนวณไฟโลเจเนติกทรี

วิธีที่ใช้คำนวณแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ วิธีที่ใช้เมทริกซ์ของระยะห่าง (distance Matrix method) และวิธีที่อาศัยข้อมูลที่แตกต่างกัน (discrete character method) (Lemey. *et al.* 2009) ซึ่งวิธีที่ใช้คำนวณในงานวิจัยนี้ได้แก่

วิธี Maximum likelihood (ML) คือการหาไฟโลเจเนติกทรีที่มีความเป็นไปได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กำลังศึกษา โดยนำข้อมูลมาจัดเรียง (alignment) และ สร้างทรีที่เป็นไปได้ทั้งหมดประกอบกับโมเดลการแทนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Substitution evolutionary model) ภายในกิ่ง (ancestral internal) โดยทรีที่มีค่า likelihood มากที่สุดหรือความเป็นไปได้มากที่สุด ซึ่งแปลตามโครงสร้าง และ ความยาวของกิ่งจะถูกเลือกเป็นไฟโลเจเนติกทรีที่เหมาะสม

วิธี Bayesian methods ยังคงใช้หลักการหาโครงสร้างที่เหมาะสมเหมือนกับวิธี ML แต่การคำนวณแบบ Bayesian จะกระจายความน่าจะเป็นไปยังทุกๆทรีเท่ากัน โดยจะสมมุติทรีที่มีความน่าเชื่อถือ หลังจากนั้นจะใช้เทคนิคการสุ่มตัวอย่างทรีด้วยวิธี Markov chain Monte Carlo (MCMC) โดยการจำลองชุดพารามิเตอร์แบบสุ่ม และคำนวณอัตราส่วนค่า likelihood เพื่อกำหนด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เงื่อนไขใหม่ ในแต่ละชั้น โดยผลรวมของพารามิเตอร์ที่ได้หลังจากการคำนวณที่ดีจะยอมรับ และใช้ในขั้นต่อไปส่วนผลลัพธ์ที่ไม่ดีจะถูกตัดทิ้ง โดยในไฟโพลเนติกทรีมมักจะแสดงผลเป็นแบบตัวเลข

## 2.11 เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์โครงสร้างของพีเอชบี

### 2.11.1 เทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy

FT-IR เป็นเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี ใช้ตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของสารโดยการวัดการดูดกลืนรังสีที่อยู่ในช่วงอินฟราเรดที่อยู่ในช่วงเลขคลื่น (Wave number)  $650-4000\text{ cm}^{-1}$  เมื่อรังสีอินฟราเรดตกกระทบกับโมเลกุลของโพลิเมอร์ จะเกิดการกระทำระหว่างรังสีอินฟราเรดกับโมเลกุลทำให้เกิดการสั่น และการหมุนของพันธะ โมเลกุลจะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ความถี่เดียวกันกับความถี่ในการสั่นของพันธะในโมเลกุลของสารนั้น ซึ่งสารอินทรีย์แต่ละชนิดจะมีค่าความถี่ในการสั่นจำเพาะที่แตกต่างกันไปทำให้สามารถนำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้าง และชนิดของสารแต่ละชนิดได้คุณสมบัตินี้เรียกว่า finger print

การสั่นของพันธะภายในโมเลกุล

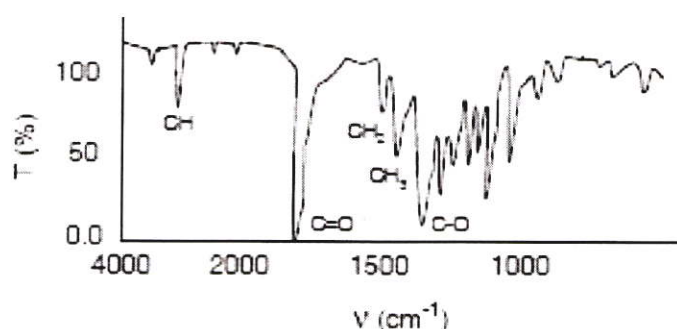
พันธะภายในโมเลกุลของสารอินทรีย์เป็นพันธะโคเวเลนต์ เกิดจากแต่ละอะตอมใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน โดยปกติพันธะจะเกิดการสั่นอยู่ตลอดเวลา เรียกว่า การสั่นหลักมูล (fundamental vibration) จำแนกออกเป็น 2 แบบ ดังนี้

1. แบบยืด (stretching) คือ พันธะระหว่างอะตอมยืดออก หรือ หดตามแกน เกิดได้ทั้งแบบยืดสมมาตร (symmetrical stretching) และ แบบยืดไม่สมมาตร (asymmetrical stretching)
2. แบบงอ (bending) คือ พันธะระหว่างอะตอมเปลี่ยนตำแหน่งไปจากแกนพันธะเดิม ส่งผลให้มุมพันธะเปลี่ยนแปลง ลักษณะการสั่นแบบงอจำแนกออกเป็น 4 แบบ ได้แก่ การโยก (rocking) กรรไกร (scissoring) การบิด (twisting) และการกระดิก (wagging)

การสั่นแบบการโยกและการบิดเป็นแบบไม่สมมาตร ส่วนแบบกรรไกร และ การกระดิกเป็นแบบไม่สมมาตร ทั้งการสั่นแบบยืด และ แบบงอที่สามารถดูดกลืนรังสีอินฟราเรดได้ เรียกว่า วงไวต่อรังสีอินฟราเรด (IR active) จะเกิดเฉพาะพันธะหรือโมเลกุลที่เปลี่ยนแปลงโมเมนต์ขั้วคู่ (dipole moment) หรือ มีสภาพขั้วไฟฟ้าลบเท่านั้น เช่น พันธะคู่ (C=C) ในเอทิลีน ( $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$ ) ซึ่งโมเลกุลสมมาตร การสั่นของพันธะ C=C จะไม่ไวต่อรังสีอินฟราเรด (IR inactive) แต่โมเลกุล 2-เมทิล-2-บิวทีน (2-Methyl-2-butene,  $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}(\text{CH}_3)$ ) ซึ่งเป็นโมเลกุลไม่สมมาตร การสั่นของ C=C จะไวต่อรังสีอินฟราเรด

ในการแสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้แสดงเป็นความสัมพันธ์ระหว่างเลขคลื่น (Wave number) กับ การส่งผ่าน (Transmittance) ดังแสดงในภาพที่ 2.10 (จุดพร 2558 ; ดารณี 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.10 IR spectrum ของพีเอซีบี (Nurbas and Kutsal, 2004)

### 2.11.2 เทคนิค $^1\text{H}$ -Nuclear magnetic resonance spectroscopy

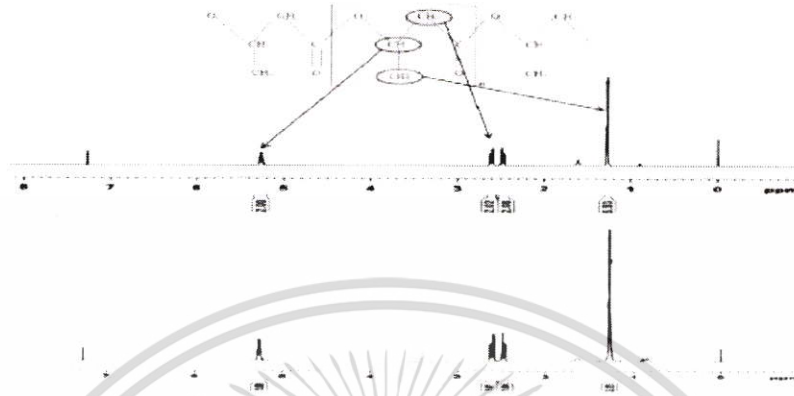
$^1\text{H}$ -NMR เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการดูดกลืนพลังงานของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงความถี่คลื่นวิทยุของนิวเคลียส เนื่องจากอะตอมนิวเคลียสจะเกิดการหมุนอยู่ตลอดเวลา โดยนิวเคลียสมีประจุ ซึ่งประจุที่อยู่ในขณะหมุน (spinning charges) จะสร้างสนามแม่เหล็ก และจะประพฤติตัวเป็นเหมือนแท่งแม่เหล็กอันเล็กๆ นิวเคลียสสำคัญที่ใช้ในการศึกษาหาโครงสร้างของสารอินทรีย์คือ  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  (spin  $\neq 0$ ) ดังนั้นเมื่อนิวเคลียสที่กำลังหมุนผ่านเข้าไปในสนามแม่เหล็กกำลังสูง นิวเคลียสเหล่านั้นจะเรียงตัวไปในทิศทางเดียวกันกับสนาม หรือ จะมีทิศทางตรงกันข้ามกับสนาม โดยนิวเคลียสที่วางตัวไปในทิศทางเดียวกันกับสนามจะมีพลังงานต่ำกว่านิวเคลียสที่มีทิศทางตรงกันข้ามกับสนามเล็กน้อย เมื่อเราให้พลังงานในช่วงความถี่คลื่นวิทยุ (radiofrequency; rf) เข้าไปจะไปกระตุ้นนิวเคลียสที่อยู่ในระดับพลังงานที่ต่ำ (lower energy state) ให้ขึ้นไปอยู่บนระดับพลังงานที่สูงกว่า (บัญชา, 2559)

การดูดกลืนพลังงานดังกล่าวเกิดขึ้นได้เนื่องจากนิวเคลียสของอะตอมมีการแยกออกเป็นระดับชั้นพลังงานสูง และ ต่ำ โมเมนต์การดูดกลืนพลังงานหรือการเกิดเรโซแนนซ์ นิวเคลียสที่อยู่ในระดับพลังงานสูงจะอยู่ในสถานะดังกล่าวได้ไม่นานก็จะพยายามกลับคืนสู่ระดับพลังงานที่ต่ำกว่า ซึ่งเป็นสถานะที่มีความเสถียรกว่า การกลับคืนสู่ระดับพลังงานที่ต่ำกว่านี้ เรียกว่า spin relaxation process จำนวน (population) ของนิวเคลียสในระดับพลังงานทั้ง 2 จะเปลี่ยนแปลงไปตลอด จนกระทั่งเมื่อจำนวนนิวเคลียสของระดับชั้นพลังงานทั้ง 2 มีค่าใกล้เคียงกัน กระบวนการดูดกลืนพลังงานจะหยุดลง และสัญญาณของการเกิดเรโซแนนซ์ที่วัดได้ก็จะค่อยๆ จางหายไป (fade out) ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่าการเกิดการอิ่มตัว (saturation) ของสัญญาณ NMR

ข้อมูลจากกระบวนการ spin relaxation นี้จะถูกเก็บในรูปแบบของคลื่น modulated free induction decay (FID) ซึ่งค่า FID เป็นข้อมูลที่แสดงถึงพฤติกรรมของนิวเคลียสที่กำลัง spin เมื่อเวลาผ่านไป จะถูกเปลี่ยนเป็นข้อมูลความถี่ (frequency domain data) และ รายงานความถี่ในรูปแบบค่า chemical shift เนื่องจากค่า chemical shift จะไม่เปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สนามแม่เหล็กภายนอก โดยตัวอย่างสเปกตรัม NMR จะมีลักษณะเป็นพีค โดยมีแกนนอน (x-axis) เป็นค่า chemical shift แสดงดังภาพ 2.11 (จตุพร, 2558)



ภาพที่ 2.11  $^1\text{H}$  NMR spectra ของพีเอซีบีมาตรฐาน (บน) และ พีเอซีบีที่ได้จากการสกัด (ล่าง)  
(Sindhu, et al. 2011)

## 2.12 การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านอุณหภูมิของโพลิเมอร์

โพลิเมอร์จัดเป็นสารที่มีโครงสร้างแบบกึ่งผลึก (semi-crystalline polymers) โดยโพลิเมอร์ที่มีโครงสร้างไม่เป็นระเบียบไม่สามารถอยู่ในสภาพผลึกได้เรียกว่า โพลิเมอร์อสัณฐาน (amorphous polymers) ส่วนโพลิเมอร์ที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบอยู่ในสภาพผลึกได้จะเรียกว่า โพลิเมอร์สภาพผลึก (crystalline polymers) โพลิเมอร์ที่อยู่ในสภาพแข็งเมื่อได้รับความร้อนก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลง ทั้งโพลิเมอร์อสัณฐาน และโพลิเมอร์สภาพผลึกจะมีการตอบสนองต่อความร้อนที่แตกต่างกัน

ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์คุณสมบัติด้านอุณหภูมิของโพลิเมอร์ประกอบด้วย (ธีระพล, 2556)

1. อุณหภูมิจุดหลอมเหลว (melting point temperature,  $T_m$ ) เป็นอุณหภูมิที่สายโซ่โพลิเมอร์ส่วนที่เป็นผลึกเปลี่ยนสถานะจากของแข็งเป็นของเหลว ในส่วนโพลิเมอร์แบบกึ่งผลึกสามารถตรวจวัด  $T_m$  ได้ เพราะจะเกิดการดูดพลังงานมาใช้ในการหลอมผลึกที่อุณหภูมินี้

2. อุณหภูมิการเปลี่ยนจากสถานะคล้ายแก้ว (glass transition temperature,  $T_g$ ) คืออุณหภูมิที่เปลี่ยนสมบัติของโพลิเมอร์ที่มีสถานะคล้ายแก้ว (glassy state) คือเป็นของแข็ง และเปราะ ไปเป็นสถานะคล้ายยาง (rubbery state) โดยการเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นกับสายโซ่โพลิเมอร์บริเวณปลายโซ่ (chain end) ได้รับพลังงานมากพอที่จะเคลื่อนไหวได้ จึงทำให้โพลิเมอร์มีการขยายตัว และ สัณฐานเปลี่ยนไปทำให้มีความยืดหยุ่นมากขึ้น แต่โพลิเมอร์จะยังคงอยู่ในสถานะของแข็งเนื่องจากโพลิเมอร์มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ยาวจะเกิดการเคลื่อนไหวส่วนต่างๆได้ยากทำให้สถานะไม่เปลี่ยนแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อุณหภูมิการเกิดผลึก (crystallization temperature,  $T_c$ ) เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดผลึกของพอลิเมอร์บางชนิด ทั้งนี้เพราะการจัดเรียงตัวของอะตอมต่างๆในโครงสร้างของพอลิเมอร์ ดังนั้นกระบวนการเกิดผลึกจึงเป็นกระบวนการเทอร์โมไดนามิกส์ที่ต้องมีความเป็นระเบียบในโครงสร้างจึงเกิดผลึกได้ การเกิดผลึกของพอลิเมอร์สามารถเกิดได้ 2 ทางคือเกิดขึ้นในขณะที่ค่อยๆให้ความร้อนแก่พอลิเมอร์ และเกิดขึ้นในขณะที่ปล่อยให้พอลิเมอร์เย็นตัวลงอย่างช้าๆ

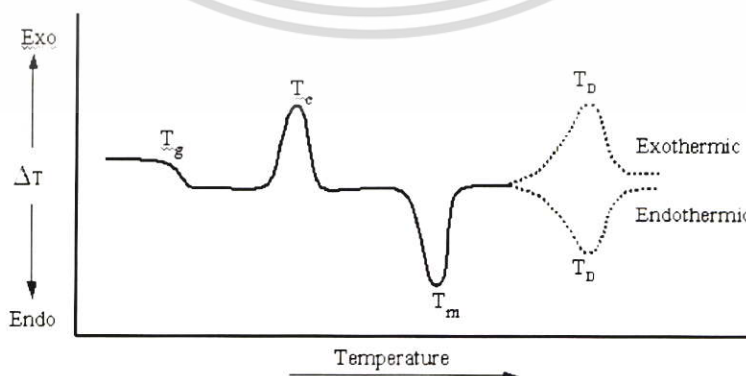
4. อุณหภูมิที่พอลิเมอร์เกิดการสลายตัว (degradation temperature,  $T_d$ ) เป็นกระบวนการแบบดูดความร้อนทำให้พอลิเมอร์เกิดการสลายตัว ลักษณะเส้นกราฟของในช่วงอุณหภูมินี้จะไม่เป็นพีกที่ไม่แน่นอนเพราะพอลิเมอร์เกิดการสลายตัว มวลโมเลกุลมีค่าลดลง สมบัติทางเคมีสมบัติทางกายภาพ สมบัติเชิงกลแย่งลงทำให้เส้นกราฟไม่แสดงลักษณะที่แน่นอน

สมบัติทางอุณหภูมิของพอลิเมอร์ สามารถศึกษาโดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ดังนี้ (ศุภยเทคโนโลยี โลหะและวัสดุแห่งชาติ, 2010)

### 2.12.1. Differential scanning calorimetry

DSC เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาปริมาณความร้อน และการเปลี่ยนแปลงความร้อนที่เกี่ยวข้องกับอุณหภูมิของพอลิเมอร์ มีหลักการทำงาน คือ สารตัวอย่าง และสารอ้างอิงที่เฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยาที่บรรจุในถ้วยอะลูมิเนียมขนาดเล็ก หรือ แกรไฟต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 800 องศาเซลเซียส จะถูกให้ความร้อนภายใต้ก๊าซไนโตรเจน จากนั้นสมบัติทางความร้อนของตัวอย่างที่เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิในตัวอย่างจะถูกตรวจวัด และแปลผล สำหรับเทคนิค DSC สารตัวอย่าง และสารอ้างอิงจะถูกให้ความร้อนจากแหล่งพลังงานสองแหล่งที่แยกกัน (ภาพที่ 2.12) ค่าพลังงานความร้อน ( $dQ/dt$ ) ที่ใช้ในการรักษาอุณหภูมิของตัวอย่าง และสารอ้างอิงให้เท่ากันจะถูกบันทึกไว้

ข้อมูลที่ถูกนำมาพลอตกราฟกับอุณหภูมิ  $dQ/dt$  กราฟที่ได้เรียกว่า เทอร์โมแกรม (thermogram) ข้อดีของเทคนิค DSC คือ พื้นที่ใต้พีกจะสัมพันธ์โดยตรงกับเอนทัลปี (enthalpy) หรือ การเปลี่ยนแปลงความร้อนของตัวอย่าง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความจุความร้อน ความร้อนของการหลอมเหลว หรือ เอนทัลปีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ตัวอย่างของเทอร์โมแกรมที่ได้จาก DSC แสดงดังภาพที่ 2.12

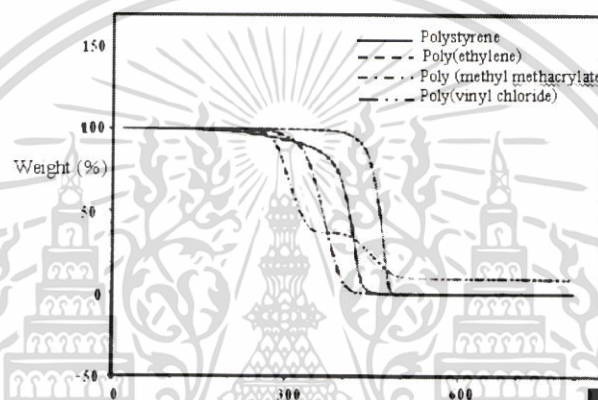


ภาพที่ 2.12 เทอร์โมแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย DSC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.12.2. Thermogravimetric analysis

TGA เป็นวิธีเบื้องต้นในการวิเคราะห์ความเสถียรของโพลิเมอร์เมื่อได้รับความร้อน โดยใช้พื้นฐานการวัดน้ำหนักอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องชั่งที่มีความไวสูง (thermobalance) ในระหว่างการวิเคราะห์ อุณหภูมิของตัวอย่างซึ่งอยู่ในบรรยากาศปกติ หรือก๊าซเฉื่อยจะถูกทำให้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ข้อมูลการวิเคราะห์จะถูกบันทึกเป็นเทอร์โมแกรมที่แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของตัวอย่าง และอุณหภูมิ ดังภาพที่ 2.13 การสูญเสียน้ำหนักในช่วงแรกของการวิเคราะห์ หรือที่อุณหภูมิต่างอาจเกิดจากการระเหยของน้ำหรือตัวทำละลาย แต่ที่อุณหภูมิสูงมักเกิดจากการสลายตัวของโพลิเมอร์ ข้อมูลเหล่านี้ทำให้ทราบเกี่ยวกับความเสถียรต่ออุณหภูมิของโพลิเมอร์ เทคนิคนี้ยังมีประโยชน์มากในการวิเคราะห์หาสารที่ระเหย หรือ สารเติมแต่งที่ไต่ลงไปในโพลิเมอร์อีกด้วย



ภาพที่ 2.13 เทอร์โมแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย TGA

### 2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Singh. *et al.* (2013) ผลิต poly  $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* NG220 พบว่าการใช้น้ำเสียจากโรงงานน้ำตาลร่วมกับการ และ เสริมด้วยคาร์บอน และ ไนโตรเจนจากแหล่งต่างๆพบว่าอัตราการเจริญเติบโตคือ 0.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง น้ำเสียจากโรงงานน้ำตาลถูกนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับการเพิ่มน้ำตาลมอลโตส (1% น้ำหนักต่อปริมาตร) และแอมโมเนียมซัลเฟต (1% น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า *Bacillus subtilis* NG220 ผลิต poly $\beta$ -hydroxybutyrate 5.297 กรัมต่อลิตร การสะสมพีเอชบีคิดเป็น 51.8 % (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ต่อน้ำหนักชีวมวลโครงสร้าง และ ลักษณะทางเคมีของพอลิเมอร์โดยเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) Fourier transform infrared (FTIR) และ GC-MS spectroscopy

Preethi. *et al.* (2012) ทำการแยกแบคทีเรียจากดินดูลักษณะ และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีการสะสมพีเอชบีด้วยวิธีย้อม Nile Blue A โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกนำมาหมักโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ วัตถุดิบต้นทุนต่ำ jambul seed (*Syzygium cumini*) พบว่าแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สายพันธุ์ SPY-1 มีการสะสมพีเอชบีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นที่คัดเลือกโดยเทียบกับ *Ralstonia eutropha* พีเอชบีที่สกัดจากแกรนูโลวเคราะห์ด้วย Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy พิกัดสำคัญที่ปรากฏได้แก่ 1650.9, 1728-1288 และ 1725-1277  $\text{cm}^{-1}$  สอดคล้องกับการสั่นของ C=O ใน โพลีไฮดรอกซีบิวทิเรตมาตรฐาน (พีเอชบี)
- Bhuwal. et al. (2013)** ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสีย และกากตะกอนจากโรงงานเยื่อกระดาษ และกระดาษแข็งโดยเลือกเชื้อที่มีการสะสมพีเอชเอภายในแกรนูโลเพื่อลดต้นทุนในการผลิตพีเอชบี ผลการทดลองสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 42 สายพันธุ์เมื่อย้อมด้วย Sudan black B และ Nile blue A ซึ่งเป็นสีย้อมสารกลุ่ม lipophilic แบคทีเรียที่ติดสีมี 15 สายพันธุ์โดยสายพันธุ์ NAP11 และ NAC1 ที่มาจากน้ำเสียโรงงานกระดาษแข็งมีการสะสมพีเอชบีสูงที่สุดคือ 79.27% และ 77.63% ปริมาณของโพลิเมอร์ 5.236 กรัมต่อลิตร และ 4.042 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีพบว่า คือ *Enterococcus sp.*, *Brevundimonas sp.* ตามลำดับ
- Gouda. et al. (2001)** ใช้กากน้ำตาล และน้ำหมักข้าวโพดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อการลดต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน และพบว่าการใช้กากน้ำตาล และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนการผลิต พีเอชบี สูงสุดคือ 40.8 และ 39.9 มิลลิกรัมต่อเซลล์แห้ง ตามลำดับการเจริญเติบโตที่เหมาะสมคือ การใช้กากน้ำตาล 3% ในขณะที่ผลผลิตพีเอชบีสูงสุดคิดเป็น 46.2% ต่อ มิลลิกรัมเซลล์แห้งใช้กากน้ำตาล 2% ส่วนปริมาณน้ำหมักข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพีเอชบี คือ 32.7 มิลลิกรัมต่อเซลล์แห้ง
- สรินญา และธารา (2010)** ศึกษาการสกัดพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิ-3-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จากเชื้อ *Alcaligenes latus* ให้ได้ปริมาณมากและพอลิเมอร์มีคุณภาพดี จึงได้ทำการศึกษาระบบการสกัดอย่างเป็นระบบ ทั้ง 3 ขั้นตอนย่อย คือ การเตรียมเซลล์ ทำให้เซลล์แตกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมกับการใช้แรงเชิงกลหลายรูปแบบ การเปรียบเทียบวิธี และตัวแปรทางการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ทั้งวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง และการสกัดโดยตรง ส่วนการทำบริสุทธิ์นั้นเน้นการตกผลึกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมจากนั้นนำโพลิเมอร์ที่สกัดได้มาวิเคราะห์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR และ NMR spectroscopy และวิเคราะห์สมบัติเฉพาะทางความร้อน และน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ได้ด้วยเทคนิค DSC และการวัดค่าความหนืดของสารเจือจาง ตามลำดับ
- สุพัฒน์ และรสมันต์ (2555)** ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเติบโต และการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (พีเอชบี) ของ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ในอาหาร Basal mineral medium ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ 10 ชนิด พบว่า เด็กซีโตรส และน้ำตาลทรายแดง มีศักยภาพใกล้เคียงกันต่อการผลิตพีเอชบีส่วนผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ซึ่งมีเด็กซีโตรสเป็นแหล่งคาร์บอนใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:2 20:4 20:6 20:8 และ 20:10 โดยน้ำหนัก พบว่าการใช้ผงขุรสบเป็นแหล่งไนโตรเจนที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:2 มีผลให้ *A. latus* สามารถสะสมฟิเอซบี ได้สูงถึง 80.6 %ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีความเข้มข้นของเซลล์ และ ฟิเอซบีเท่ากับ 4.86 และ 3.92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การใช้อีส์ตส์กักเป็นแหล่งไนโตรเจนที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20:4 มีการสะสมฟิเอซบี สูงสุดเพียง 61.1 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ได้ความเข้มข้นของเซลล์และฟิเอซบีสูงถึง 8.15 และ 4.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

**Wattanaphon and Pisutpaisal (2011)** ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในสภาวะไร้สภาวะระหว่างการผลิต โพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโพลีเอสเทอร์ จากกลีเซอรอลที่มีช่วงความเข้มข้น 0-70% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายใต้การทดสอบขวดเขย่า 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 50% ที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอล 10 และ 30 % การผลิตฟิเอซเอคือ 3,518.9 มิลลิกรัม HB กรัมต่อลิตร เซลล์แห้งต่อชั่วโมง และ 3,340.5 มิลลิกรัม HB กรัมต่อลิตร เซลล์แห้งต่อชั่วโมง จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางสังคมของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) โดยใช้ยีน 16s rDNA โดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อเริ่มต้น และ เชื้อที่เลี้ยงในกลีเซอรอลพบว่า แบคทีเรียที่น่าจะเป็นผู้ผลิตฟิเอซบีได้แก่ แบคทีเรียในจีนัส *Citrobacter*, *Klebsiella* และ *Dysgonomonas*.

**Gomaa (2014)** คัดแยกแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* จากดินปนเปื้อนของเสียโรงงานอุตสาหกรรม และใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง *Bacillus subtilis* และ *E.coli* เมื่อเลี้ยงด้วยกากน้ำตาล 6 และ 8% ผลิตฟิเอซบีคิดเป็น 54.1 และ 47.16% การเจริญเติบโต และการผลิตฟิเอซบีเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่ม 1% เทอทานอลในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อ *Bacillus subtilis* คือแอมโมเนียมซัลเฟต ส่วน *E.coli* คือแอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และ ปริมาณฟิเอซบีที่ผลิตได้คือ 62.21 และ 58.7% ตามลำดับโดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์คือปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8% pH7 อุณหภูมิในการเลี้ยง 35 องศาเซลเซียส และ ตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของฟิเอซบีด้วยเทคนิค FTIR

**El Rabey. et al. (2017)** ศึกษาโคลน และ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับฟิเอซบี จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus* ได้สำเร็จ โดยระบุสายพันธุ์ด้วยลำดับยีน 16S rDNA ลักษณะทางสัณฐาน และ สรีรวิทยาของแบคทีเรีย และระบุว่าเป็น *Bacillus cereus* MM7 โดยศึกษาอินทัง 4 ยีนของ *Bacillus cereus* MM7 ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโพลี-3-ไฮดรอกซีบิวทีเรตซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณยีนโดยใช้ไพโรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟิเอซเอของ *Bacillus cereus* โคลนใน *E. coli* DH5 $\alpha$  นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยวข้องกับสังเคราะห์ PHA ทั้ง 4 ยีน ใน *E. coli* XL1-Blue และ *E. coli* MJ 109 ตรวจสอบด้วย SDS-PAGE โดยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพีเอชบีถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค mass spectrometry เพื่อระบุลำดับกรดอะมิโน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์เครื่องมือ และสารเคมี

##### 3.1.1 อุปกรณ์

1. กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์ ยี่ห้อ SAIL (Thailand)
2. กระจกบอทวงขนาด 100 มิลลิลิตร
3. ขวดแก้วขนาดเล็ก (vial)
4. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร 50 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร
5. คิวเวตควอต (Quart Cuvette)
6. งานเพาะเชื้อพลาสติก เส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร
7. ทิปขนาดต่างๆ ยี่ห้อ GILSON (USA)
8. ที่คีบเหล็ก
9. แ่งแก้วคนสาร
10. แ่งแก้วสำหรับเกลี่ยเชื้อ (Spreader)
11. ปีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร 50 มิลลิลิตร 100 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร
12. แผ่นอะลูมิเนียมฟลอย
13. พาราฟิล์ม ตะเกียงแอลกอฮอล์ ไฟแช็ค
14. พลาสติกห่ออาหาร (Wrap)
15. แม่พิมพ์ขึ้นรูป TEM
16. ไมโครปิเปต ยี่ห้อ NICHIRYO รุ่น Nichipet EX II Series (Japan)
17. ลูปเขี่ยเชื้อ (Loops Inoculate)
18. หลอดทดลองแก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร
19. หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ยี่ห้อ Axygent (USA)
20. หลอดไมโครเซนติพิว ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
21. หลอดไมโครเซนติพิวขนาด 50 มิลลิลิตร
22. หลอด NMR ยี่ห้อ Wilmad (USA)

##### 3.1.2 เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์ Fluorescence Microscope (Olympus รุ่นBX-51)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Hettich รุ่นHET-1 1406 บริษัท เบคไทย กรุงเทพ  
อุปกรณ์เคมีภัณฑ์ จำกัด
3. เครื่องไมโครเซนติพิวจ์ (Microcentrifuge) รุ่น PC-200 บริษัท เบคไทย กรุงเทพอุปกรณ์  
เคมีภัณฑ์ จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
5. เครื่องเทอร์โมไซเคิล รุ่น T100 Thermal cycle บริษัท ซีระเทรตติ้ง จำกัด ประเทศไทย
6. เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) model 204 F1 Phoenix®
7. เครื่อง Dry Bath รุ่น BSH200 บริษัท เบคไทย กรุงเทพมหานครเคมิภัณฑ์ จำกัด
8. เครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) Perkin Elmer Spectrum GX FTIR System
9. เครื่อง Nuclear magnetic resonance (NMR) Bruker Avance II 300 MHz Ultrashield™ 2H-stop (46.072 MHz) NMR spectrometer
10. เครื่อง Thermal gravimetric analysis (Perkin Elmer PYRIS 1)
11. เครื่อง UV Transilluminator
12. เครื่อง UV-1200 Spectrophotometer ยี่ห้อ Mapada
13. เครื่อง vortex บริษัท Scientific Industries, INC ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. ชุดทดสอบขนาดดีเอ็นเอ agarose gel electrophoresis
15. ชุดทดสอบขนาดโปรตีน sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
16. เดซิเคเตอร์
17. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker) ยี่ห้อ Zhicheng รุ่น ZHWY-100H ประเทศจีน
18. ตู้ปลอดเชื้อ ยี่ห้อ Microtech รุ่น V3-T บริษัท แล็บไมโคร จำกัด
19. ตู้อบ
20. เตาไฟฟ้า (hot plate)
21. เทอร์โมมิเตอร์
22. พีเอชมิเตอร์ยี่ห้อ Suntex รุ่น SP-2100
23. ไมโครเวฟ
24. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ ZEALWAY รุ่น GI54TW

### 3.1.3 สารเคมี

1. กากน้ำตาลเข้มข้น 77% บริษัท อี เอ็ม เอ็ดจรั (Thailand)
2. คูไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *phaC*
3. คูไพรเมอร์สำหรับหาลำดับ *16s rDNA*
4. ขานอ้อยจากคุณภาพ ยศมงคล ร้านขายน้ำอ้อย เลียบทางด่วน วงแหวนบางปะอิน กรุงเทพมหานคร
5. สีย้อม Coomassie brilliant blue ยี่ห้อ Coomassie® บริษัท Merck KGaA (Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. สีย้อม Nile blue A sulphate A.R ยี่ห้อ HIMEDIA (India)
7. สีย้อม Sudan black B ยี่ห้อ AMRESCO (USA)
8. สารละลาย 3, 5-dinitrosalicylic acid
9. สารละลาย 4% paraformaldehyde
10. สารละลาย 5% safranin O
11. absolute ethanol ยี่ห้อ LabScan AR grade (Thailand)
12. agarose premium grade ยี่ห้อ LE Agarose (USA)
13. acetic acid (CH<sub>3</sub>COOH)
14. acetone ยี่ห้อ LabScan AR grade (Thailand)
15. agar powder ยี่ห้อ TMMEDIA bacteriological grade (India)
16. ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl) UNIVAR AR grade (Australia)
17. ammonium sulfate (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ยี่ห้อ UNIVAR AR grade (Australia)
18. ampicillin 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
19. blueye prestained rotpein ladder บริษัท genedirex (England)
20. calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) UNIVAR AR grade (Australia)
21. deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>) บริษัท Sigma-Aldrich (Germany)
22. disodium hydrogen phosphate heptahydrate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O) ยี่ห้อ QRëC AR grade (New Zealand)
23. excelband™ 100 bp+3K และ 0.25-10Kb DNA Ladder ยี่ห้อ SMOBIO (Taiwan)
24. fructose ยี่ห้อ UNIVAR AR grade (Australia)
25. glucose ยี่ห้อ UNIVAR AR grade (Australia)
26. hydrochloric acid (HCl)
27. isopropylthiogalactoside (IPTG)
28. LR white resin
29. magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>) UNIVAR AR grade (Australia)
30. peptone ยี่ห้อ TMMEDIA bacteriological grade (India)
31. pET28b (+) Vector
32. poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] ยี่ห้อ Sigma-Aldrich (Germany)
33. potassium bromide (KBr)
34. potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ยี่ห้อ UNIVARAR grade (Australia)
35. sodium acetate (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) UNIVAR AR grade (Australia)
36. sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ยี่ห้อ QRëC AR grade (New Zealand)
37. sodium chloride (NaCl) ยี่ห้อ UNIVAR AR grade (Australia)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

38. sodium hydroxide (NaOH) ยี่ห้อ CARLO ERBA AR grade (England)
39. sodium hypochlorite (NaOCl) บริษัท สามชัยเคมีคอล จำกัด (Thailand)
40. sucrose ยี่ห้อ UNIVAR AR grade (Australia)
41. yeast extract ยี่ห้อ TMMEDIA bacteriological grade (India)

### 3.1.4 ชุดคิด และเอนไซม์ตัดจำเพาะ

1. ชุดคิดทำพีซีอาร์ ยี่ห้อ RBC Bioscience
2. ชุดคิดสกัดดีเอ็นเอ FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen)
3. ชุดคิดสกัด และทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ (Favorgen)
4. ชุดคิด HisDetector™ Nickel-AP (KPL)
5. ชุดคิด plasmid extraction mini kit (Favorprep)
6. เอนไซม์ cellulase
7. เอนไซม์ ligase บริษัท New England Biolabs (USA)
8. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *XhoI* บริษัท New England Biolabs (USA)

### 3.1.5 แบคทีเรีย

1. *Escherichia coli* BL21 (DE3)

## 3.2 การเก็บตัวอย่างมูลวัว และกากตะกอนน้ำเสียโรงงานอาหารทะเล

ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีประกอบด้วยมูลวัวสดจาก อำเภอโพธารอง จังหวัดร้อยเอ็ด และตัวอย่างกากตะกอนน้ำเสียจากโรงงานท่อน้ำกระป๋อง อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 3.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต (polyhydroxybutyrate, PHB) โดยการย้อมสี Sudan black B

นำตัวอย่างตะกอนจากโรงงานท่อน้ำกระป๋อง และมูลวัวมาเจือจางใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยวิธีการเจือจางแบบซีเรียล (10-fold dilution) โดยนำตัวอย่างที่เจือจาง  $10^{-3}$  -  $10^{-7}$  นำมาสเปรดลงบนอาหารแข็ง NA (Nutrient Agar) นำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจหาแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีโดยการย้อมด้วยสารละลาย 0.5 % Sudan black B ใน 70% เอทานอล โดยเทลงบนจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีเชื้อขึ้น ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างออกด้วย 95% เอทานอล (Schlegel, 1970) ซึ่งแบคทีเรียที่มีการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์จะติดสีดำของ Sudan black B โคโลนีของแบคทีเรียที่ได้รับการระบุแล้วว่าการสะสมพีเอชบีโดยการย้อมด้วย Sudan black B (โคโลนีติดสีดำ) จะถูกนำมาย้อมบนสไลด์ด้วย Sudan black B โดยเขี่ยเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากโคโลนีเดี่ยวแล้วนำมาเกลี่ยในสไลด์ที่หยดด้วย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ (1 หยด) จากนั้นตรึงแบคทีเรียบนสไลด์โดยการผ่านเปลวไฟ และหยดสีย้อม 3% Sudan black B ใน 70% เอทานอล บ่มทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องล้างสีส่วนเกินออกด้วยไซลีน จากนั้นหยด 5% safranin O 30 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น (Wei. *et al.* 2011) นำสไลด์ที่ย้อมแล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องสว่าง (Olympus BX-53)

### 3.4 การยึดยับการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์แบคทีเรียด้วยการย้อมสี Nile blue A

โดยนำแบคทีเรียที่ตรึงบนสไลด์แล้วมาหยดสีย้อม 1% Nile blue A 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา จากนั้นล้างสีส่วนเกินโดยหยด 8% acetic acid ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ (Ostle, 1982) นำสไลด์ที่ย้อมแล้วมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus BX-53) เพื่อดูการเรืองแสงของพีเอชบีภายในเซลล์

### 3.5 การตรวจสอบการสะสมพีเอชบีในแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที 5 นาที ทั้งส่วนใสและตรึงเซลล์แบคทีเรียโดยเติม 4% paraformaldehyde บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ผสม 10 มิลลิโมลาร์ไกลซีน 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงทั้งส่วนใส ล้างทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นเตรียม 2% agarose แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวซ์หลอดละ 300 ไมโครลิตร (อุ่นเจลที่ละลายแล้วในหลอดไมโครเซนติฟิวซ์ไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส) ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วผสม (resuspended) กับเชื้อแบคทีเรีย และใช้ปิเปตดูดสารละลายของเชื้อกับน้ำแล้วจุ่มทึบที่มีเชื้อแบคทีเรียลงใน 2% agarose gel ที่อุ่นโดยปล่อยเชื้อแบคทีเรียลงในเจลอย่างช้าๆ จากนั้นนำไปปั่นอย่างรวดเร็ว (Quick spin) และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเจลแข็งตัวจึงใช้คัตเตอร์ตัดบริเวณที่มีแบคทีเรียเกาะกลุ่มให้มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาด 2x2x2 ตารางมิลลิเมตร แล้วนำไปใส่ในแม่พิมพ์สำหรับขึ้น เซลล์แบคทีเรียที่ถูกตรึงด้วย agarose gel จะถูกล้างด้วยเอทานอล 50%, 70%, 90% และ 100% ความเข้มข้นละ 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลายผสมระหว่าง เอทานอล : LR white resin (2:1) และ เอทานอล: LR white resin (1:2) บ่มทิ้งไว้ครั้งละ 20 นาที และบ่มเซลล์แบคทีเรียที่ตรึงด้วย LR white resin 100% บ่มทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยน LR white resin อีกครั้ง และบ่มข้ามคืนตามลำดับ ต่อมาบ่มด้วย LR white resin 100% อีก 2 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วย LR white resin ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เรซินเกิดการพอลิเมอร์ไรซ์ (polymerized) ทำการเตรียมสไลด์ และส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านโดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6 การระบุสายพันธุ์ และสร้างไฟโลเจเนติกทรีของแบคทีเรีย

#### 3.6.1 การระบุสายพันธุ์แบคทีเรียโดยการเพิ่มปริมาณยีน *16s rDNA*

ตารางที่ 3.1 โพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *16s rDNA* และ *phaC*

ลำดับ	ชื่อโพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ใช้เพิ่มปริมาณ	ที่มา
1	16srDNA forward	5' CCCGGGAACGTATTCACCG 3'	<i>16s rDNA</i>	Cameron 2002
2	16srDNA reverse	5' GCYTAAYACATGCAAGTCGA 3'	<i>16s rDNA</i>	Cameron 2002
3	Forward_phaC_NcoI	5'-GGCGCCATGGGATGGCAATTCCTTAC-3'	<i>phaC</i>	งานวิจัยนี้
4	Reverse_phaC_XhoI	5'-GGCGCTCGAGTTTAGAGCGTTTTTC-3'	<i>phaC</i>	งานวิจัยนี้

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้เลี้ยงในอาหารเหลว NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสกัดจีโนมดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ด้วยชุดคิตสกัดดีเอ็นเอ FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen) และเก็บจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดแล้วที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณยีน *16s rDNA* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้โพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *16s rDNA* โดยใช้คู่โพรเมอร์ลำดับที่ 1 และ 2 ดังตาราง 3.1 ปฏิกริยา PCR ประกอบด้วย 1xPCR buffer, dNTP 200 ไมโครโมลาร์ โพรเมอร์ forward และ reverse อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์ Taq DNA polymerase (RBC) 1 ยูนิต และจีโนมดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม 2 ไมโครลิตร ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอคือ initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที, denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, annealing 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอได้แสงยูวี หลังจากนั้นทำบริสุทธิ์ยีน *16s rDNA* ที่เพิ่มปริมาณแล้วด้วยชุด FavorPrep™ PCR Clean Up Kit (Favorgen) จากนั้นส่งชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัทเอกเซน (SolGent) วิเคราะห์ลักษณะพีคด้วยโปรแกรม Chromas เวอร์ชัน 2.6.2 แล้วนำข้อมูลที่ได้อ้างอิงเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank ใน NCBI โดยใช้ BLASTN (Altschul *et al.* 1990) เพื่อหาว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ใดจากนั้นลงทะเบียนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้แล้วเข้าไปใน GenBank

#### 3.6.2 การสร้างไฟโลเจเนติกทรีของยีน *16s rDNA*

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทำไฟโลเจเนติกทรีได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่มีการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์ 5 สายพันธุ์ แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* spp. 28 สายพันธุ์ และ *Streptococcus pneumoniae* AY525 โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียทั้งหมดมาจัดเรียงเปรียบเทียบกัน (alignment) ด้วยโปรแกรม MUSCLE เวอร์ชัน 3.2 (Edgar, 2004) ผ่านโปรแกรม SeaView เวอร์ชัน 4.6.1 (Gouy, 2010) ปรับแก้ช่องว่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ผ่าน SeqFIRE ออนไลน์ เวอร์ชัน 1.0.1 (Ajawatanawong, *et al.* 2012) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จัดเรียงทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

33 ลำดับ (แบคทีเรียที่สะสมพีเอชบี 5 ลำดับและจีโนม *Bacillus* spp. 28 ลำดับ) และ 1,260 ลักษณะ (คอลัมน์) สร้างแผนภูมิด้วยวิธี maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม PhyML เวอร์ชัน 3.0 (Guindon. *et al.* 2010) ผ่านโปรแกรม SeaView เวอร์ชัน 4.6.1 คำนวณด้วยโมเดล GTR + I + G วิเคราะห์ bootstrapping 1000 ครั้ง และ วิธี Bayesian inference โดยใช้ MrBayes เวอร์ชัน 3.2.6 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001 ; Ronquist and Huelsenbeck, 2003) คำนวณความเป็นไปได้ 1 ล้านชั่วอายุหลังจากนั้นปรับแต่งสีของแผนภูมิด้วย FigTree เวอร์ชัน 1.4.3. (Rambaut, 2007)

### 3.7 การผลิตและสกัดพีเอชบีจากแบคทีเรียที่คัดแยกจากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานท่อนำกระป๋อง และมูลวัว

เตรียมเชื้อเริ่มต้น (Starter culture) โดยเชื้อโคลนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกแล้วใส่ในอาหาร NB (Nutrient Broth) บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ข้ามคืนหลังจากนั้นวัดความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วใส่เชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified M9 ที่มีกลูโคส 2% (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กำหนดให้ความขุ่นเริ่มต้นในการเลี้ยงเป็น 0.5 ( $OD_{600}=0.5$ ) เลี้ยงเชื้อโดยบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจากนั้นสกัดพีเอชบีโดยดัดแปลงวิธีการสกัดของ Hahn. *et al.* (1994) เก็บเซลล์โดยการเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 10 นาที และนำตะกอนของเซลล์แบคทีเรียที่ปั่นเหวี่ยงแล้วมาเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 10% ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการวอร์เท็กซ์ แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 10 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ตามด้วยอะซิโตน และเอทานอล ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียสข้ามคืน

### 3.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี

#### 3.8.1 ช่วงเวลาที่เหมาะสม

นำแบคทีเรียที่สามารถผลิตพีเอชบีได้สูงสุดไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ข้ามคืนเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น (starter culture) จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในอาหาร modified M9 pH 7 แหล่งคาร์บอนคือ 2% กลูโคสโดยกำหนดให้ความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นเป็น 0.5 ( $OD_{600}=0.5$ ) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เก็บเซลล์ที่ชั่วโมงต่างๆดังนี้ 24 ชั่วโมง 30 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง 54 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง เก็บเซลล์เพื่อหาหน้าหนักเซลล์แห้ง 10 มิลลิลิตรต่อหลอด (เก็บซ้ำ 3 หลอด) และเพื่อหาปริมาณพีเอชบี 10 มิลลิลิตรต่อหลอด (เก็บซ้ำ 3 หลอด)

### 3.8.2 ค่าพีเอชที่เหมาะสม

การหาพีเอชที่เหมาะสมของอาหาร modified M9 ทำโดยปรับให้อาหารมีค่าพีเอชต่างๆ ได้แก่ pH 6, 7, 8 และ 9 แหล่งคาร์บอนคือ 2% กลูโคสกำหนดให้ความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นเป็น 0.5 ( $OD_{600} = 0.5$ ) เลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ในระยะเวลาที่มีการผลิต พีเอชปีสูงสุดจากนั้นเก็บเซลล์เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัมต่อหลอด (เก็บซ้ำ 3 หลอด) และเพื่อหาปริมาณพีเอชปี 10 มิลลิกรัมต่อหลอด (เก็บซ้ำ 3 หลอด)

### 3.8.3 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

การหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจะใช้แหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด ได้แก่ กลูโคส, ซูโครส, โซเดียมอะซิเตต และ ฟรุกโตส กำหนดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดเท่ากับ 2% โดยแทนที่แหล่งคาร์บอนเดิม (กลูโคส) ในอาหาร modified M9 ที่ปรับ pH ให้เหมาะสม โดยกำหนดให้ความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นเป็น 0.5 ( $OD_{600} = 0.5$ ) เลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 250 rpm ในเวลาที่มีการผลิตพีเอชปีสูงสุด โดยเก็บเซลล์เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัมต่อหลอด (เก็บซ้ำ 3 หลอด) และเพื่อหาปริมาณพีเอชปี 10 มิลลิกรัมต่อหลอด (เก็บซ้ำ 3 หลอด)

### 3.8.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

นำแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชปีจากการทดลองข้างต้นมาปรับความเข้มข้นเป็น 1, 2, 3, 4 และ 5% ตามลำดับ ในอาหาร modified M9 ที่ปรับพีเอชให้เหมาะสม โดยกำหนดให้ความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นเป็น 0.5 ( $OD_{600} = 0.5$ ) เลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ในเวลาที่มีการผลิตพีเอชปีสูงสุด เก็บเซลล์เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัมต่อหลอด (เก็บซ้ำ 3 หลอด) และเพื่อหาปริมาณพีเอชปี 10 มิลลิกรัมต่อหลอด (เก็บซ้ำ 3 หลอด)

### 3.8.5 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต และ เบปโตน กำหนดปริมาณแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร (เท่ากับแหล่งไนโตรเจนใน modified M9 salt) โดยนำแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดแทนที่แหล่งไนโตรเจนเดิมในอาหาร modified M9 ซึ่งแอมโมเนียมคลอไรด์ คือ แหล่งไนโตรเจนเดิมจากนั้นเลี้ยงเชื้อในอาหาร modified M9 salt ที่มีพีเอช แหล่งคาร์บอน และ ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ในเวลาที่มีการผลิตพีเอชปีสูงสุดกำหนดให้ความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นเป็น 0.5 ( $OD_{600} = 0.5$ ) จากนั้นเก็บเซลล์เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัมต่อหลอด (เก็บซ้ำ 3 หลอด) และเพื่อหาปริมาณพีเอชปี 10 มิลลิกรัมต่อหลอด (เก็บซ้ำ 3 หลอด)

## 3.9 การผลิตพีเอชปีจากแบคทีเรียโดยใช้กากน้ำตาล และชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

นอกจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมข้างต้นในการผลิตพีเอชปีแล้ว การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ของเสีย หรือ วัสดุทางเกษตรที่ไม่ใช่แล้วนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทางเลือกในการใช้ผลิตเอ็กสาร์เป็นเอกสารที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อขบปีจากแบคทีเรียซึ่งของเสีย และวัสดุทางการเกษตรที่ใช้ ได้แก่ ขานอ้อยหลังจากการคั้นน้ำอ้อย และกากน้ำตาล

### 3.9.1 การปรับสภาพขานอ้อย

นำขานอ้อยมาล้างด้วยน้ำแล้วอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักแห้งคงที่ จากนั้นนำเข้าเครื่องบด และนำขานอ้อยที่บดแล้วมาปรับสภาพด้วย 0.25 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในอัตราส่วนขานอ้อย 1 กรัมต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 มิลลิลิตร และนำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองโดยเก็บส่วน ขานอ้อยมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งวัดค่าพีเอชของน้ำได้เท่ากับ 7 นำขานอ้อยที่ปรับสภาพแล้วไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เก็บในเดซิเคเตอร์เพื่อใช้ศึกษาไฮโดรไลซิสด้วยกรด และ เอนไซม์เซลลูเลส

### 3.9.2 การไฮโดรไลซิสขานอ้อยด้วยกรด

นำขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพมาไฮโดรไลซิสโดยดัดแปลงวิธีตาม Bujanga. *et al.* (2013) โดยนำมาเติม 1% กรดซัลฟิวริกในอัตราส่วนขานอ้อย 1 กรัม ต่อกรดซัลฟิวริก 15 มิลลิลิตร โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ปิดด้วยกระจกนาฬิกาเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง (เติมน้ำกลั่นเมื่อปริมาณน้ำลดลงจากเดิม) นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสมาปรับพีเอชด้วย 2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์จนกระทั่งพีเอชเท่ากับ 7 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959)

### 3.9.3 การไฮโดรไลซิสขานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสขานอ้อย ได้แก่ เวลาในการบ่ม ปริมาณของเอนไซม์ และขนาดอนุภาคของขานอ้อยโดยการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสขานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส นำขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมา 2.5 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ) ความเข้มข้น 22.42 filter paper cellulase units (FPU) ต่อมิลลิลิตรปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เซลลูเลสเป็น 0.22 FPU/ml) และเติมโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องบ่มแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที โดยทำการศึกษาวเวลาที่ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส ดังนี้ คือ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองด้วยเครื่องกรองลดความดันเพื่อเอากากส่วนที่เป็นขานอ้อยออกแล้วนำเอาส่วนใสไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ต่อมาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เซลลูเลสในการไฮโดรไลซิสขานอ้อยโดยเลือกเอาระยะเวลาที่ดีที่สุดในการไฮโดรไลซิสแต่ปรับปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.11, 0.22, 0.45, และ 0.90 FPU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาหาความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของน้ำตาลรีดิวซ์ และในการศึกษาผลของขนาดอนุภาคของขานอ้อยต่อการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ เซลลูเลสโดยนำขานอ้อยแบบบดหยาบ และ บดละเอียดที่ผ่านการปรับสภาพมาทำการไฮโดรไลซิส ด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่คือใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.45 FPU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิส วิเคราะห์โดยวิธี DNS

### 3.9.4 การผลิตฟิเอซบีโดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสขานอ้อย และกาน้ำตาลจากแบคทีเรีย *Bacillus sp.* สายพันธุ์ SWU01

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียโดยการเชื้อโคลนเดี่ยวลงในอาหารเหลว NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ชำคืนจากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ modified M9 ผสมกับน้ำตาลรีดิวซ์ 2% (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยขานอ้อยสำหรับกาน้ำตาล ความเข้มข้นเริ่มต้น 77% (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำมาเจือจางให้ได้ 40% (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000xg จากนั้นนำแหล่งคาร์บอนที่เตรียมไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งออตไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเจือจางให้ได้ 2% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาหาร modified M9 เช่นกันหลังจากนั้นใส่เชื้อเริ่มต้นลงในอาหารที่เตรียมไว้โดยกำหนดให้ความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 ( $OD_{600} = 0.5$ ) จากนั้นเลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส 250 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บเซลล์ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงเพื่อนำไปหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และฟิเอซบี

## 3.10 การระบุโครงสร้าง และวิเคราะห์คุณสมบัติด้านอุณหภูมิของฟิเอซบี

### 3.10.1 การระบุโครงสร้างจากหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FT-IR

การตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันภายในโมเลกุลของฟิเอซบีด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) โดยบดสารตัวอย่างประมาณ 2 มิลลิกรัม ผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ประมาณ 100-200 มิลลิกรัม โดยใช้ครกบด (mortar) จากนั้นนำไปอัดขึ้นรูปเป็นแผ่น และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Perkin Elmer SPECTRUM GX FTIR System ช่วงเลขคลื่น  $4000-400\text{ cm}^{-1}$

### 3.10.2 การระบุโครงสร้างจากมอนอเมอร์ด้วยเทคนิค $^1\text{H}$ Nuclear magnetic resonance

การระบุโครงสร้างของฟิเอซบีจากจำนวนอะตอมของไฮโดรเจนที่ต่อกับคาร์บอนในโมเลกุลสามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิค  $^1\text{H}$  Nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ) โดยชั่งตัวอย่างประมาณ 5-10 มิลลิกรัม ใส่หลอด NMR และเติมตัวทำละลายดิวทีเรียมคลอโรฟอร์ม ( $\text{CDCl}_3$ ) 1 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อนในเครื่อง Dry Bath 3 วินาทีต่อครั้ง จนกระทั่งสารละลายใสแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง Bruker Avance II 300 MHz Ultrashield™  $^2\text{H}$ -stop (46.072 MHz) NMR spectrometer คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

### 3.10.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านอุณหภูมิของพีเอชบี

ศึกษาค่าพลังงานความร้อนของโพลิเมอร์ด้วยเครื่อง Different Scanning Calorimetry (DSC) รุ่น model 204 F1 Phoenix<sup>®</sup> ช่วงอุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียสถึง 200 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิเคราะห์ความเสถียรของโพลิเมอร์ด้วยเครื่อง Thermogravimetric Analysis (TGA) รุ่น Perkin Elmer PYRIS 1 ให้ความร้อน 50-900 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน วิเคราะห์โดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## 3.11 การผลิตพีเอชบีจาก *Escherichia coli* ที่มีการแสดงออกของโปรตีนพีเอชบีซินเทส

### 3.11.1 การเพิ่มปริมาณยีน *phaC* จากแบคทีเรีย *Bacillus sp.* สายพันธุ์ SWU44

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยเชื้อโคลนของแบคทีเรีย *Bacillus sp.* สายพันธุ์ SWU44 ลงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) 5 มิลลิลิตรจากนั้นทำการปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ชำคืนหลังจากนั้นทำการสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากเชื้อ 3 มิลลิลิตร ด้วยชุดคิด DNA extraction (FAVORGEN)

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน *phaC* จากคลัสเตอร์ของยีน polyhydroxy-alkanoate ของ *Bacillus megaterium* (AF109909.2) จากฐานข้อมูล GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ตำแหน่งที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์คือ CDS 5578-6663 ขนาดของยีน 1086 bp กรดอะมิโน 362 ตัว สังเคราะห์ไพรเมอร์โดยบริษัท BioBasic (Canada) โดยออกแบบให้มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* (CCATGG) และ *XhoI* (CTCGAG) บนไพรเมอร์ ทำการเพิ่มปริมาณยีน *phaC* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 1xPCR buffer, dNTP 200 ไมโครโมลาร์ , คู่ไพรเมอร์ Forward และ Reverse ลำดับที่ 3 และ 4 ในตาราง 3.1 อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์ , *Taq* DNA polymerase (RBC *Taq* DNA polymerase) 1ยูนิต และจีโนมดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 2 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร สภาวะในการเกิดปฏิกิริยา คือ initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 5 นาที, denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, annealing 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ทำทั้งหมด 30 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย agarose gel electrophoresis จากนั้นสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดคิด GEL/PCR Purification Kit (FAVORGEN) ส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Solgent) และ ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลในฐาน GenBank ด้วย BLASTN ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของพีเอชบีซินเทสที่พบกับแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* sp. ด้วยโปรแกรม Clustal Omega

### 3.11.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *phaC*

สร้างพลาสมิดลูกผสมโดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีด้านบน และพลาสมิด pET-28b(+)

(รายละเอียดในภาคผนวก ข-1) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* (New England Biolabs, USA) และ *XhoI* (New England Biolabs, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื่อมชิ้นยีน *phaC* และ pET-28b(+) ด้วยเอนไซม์ ligase (New England Biolabs, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 15-20 นาที จากนั้นทำการถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) โดยการทรานฟอร์มด้วยวิธี heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 1 นาที และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมบนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของ kanamycin 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำโคลนของแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารแข็งมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีส่วนผสมของ kanamycin 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดคิด Plasmid Extraction Mini kit (Favorprep) นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้มาตรวจสอบหาชิ้นยีน *phaC* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *XhoI* นำไปตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

### 3.11.3 การผลิต และตรวจสอบโปรตีนลูกผสมพีเอชบีซินเทส

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) ที่ถ่ายฝากยีน *phaC* ในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของ kanamycin ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที โดยเลี้ยงเชื้อจนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.4-0.6 จากนั้นเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีนลูกผสมด้วย 1 มิลลิโมลาร์ Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) โดยจะเก็บเซลล์แบคทีเรียก่อนและหลังจากเติม IPTG ที่ 1, 2, 3, 4 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE กระแส 25 มิลลิแอมป์ 90 นาที หลังจากนั้นย้อมด้วยสารละลาย coomassie brilliant blue R เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลาย destain จนแผ่นเจลใส ในการวิเคราะห์ด้วย Western blot ใช้ชุดคิด HisDetector™ Nickel- AP (KPL) โดยทำการย้ายโปรตีนจากแผ่นเจล 15% SDS-PAGE ลงสู่ nitrocellulose membrane ด้วยเครื่อง bolting ที่ 100 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยการเรียงแผ่น support ที่แช่สารละลาย transfer เป็นเวลา 30 นาที ลงบนเครื่องแล้วนำ nitrocellulose membrane ที่ผ่านการแช่เมทานอลแล้ววางลงบนแผ่น support จากนั้นนำแผ่นเจล 15% SDS-PAGE วางลงบน nitrocellulose membrane แล้วปิดทับด้วยแผ่น support อีกครั้ง เมื่อทำการย้ายโปรตีนแล้วให้นำแผ่นเมมเบรนไปบ่มใน Detector™ Block เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม Nickel-AP ลงไป โดยการเจือจาง 5000 เท่า แล้วบ่มไว้เป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายผสมของ NBT/BCIP ทิ้งไว้ 5 นาที จนสังเกตเห็นแถบสีม่วงแล้วล้างน้ำ ประมาณ 3-4 ครั้ง

#### 3.11.4 การผลิตพีเอชบีในแบคทีเรียที่ผลิตโปรตีนลูกผสมพีเอชบีซินเทส

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) ที่มีพลาสมิดลูกผสมลงในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ที่มีส่วนผสมของ kanamycin ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ช้ามคืน จากนั้นใส่เชื้อเริ่มต้นลงในอาหาร LB หลอดใหม่ที่มีส่วนผสมของ kanamycin ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:100 และเลี้ยงเชื้อจนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.4 - 0.6 จากนั้นเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโปรตีนลูกผสมด้วย 1 มิลลิโมลาร์ Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) และ เลี้ยงเชื้อต่อไป 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการสกัดพีเอชบี จากนั้นนำตะกอนที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วย Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) เทียบกับพีเอชบีมาตรฐาน

#### 3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพีเอชบีจากแบคทีเรีย และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทำการทดลองแบบ 3 ซ้ำเพื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS16.0 (Statistical Package for the Social Sciences) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) โดยเปรียบเทียบข้อมูลด้วยการทดสอบแบบ Duncan และ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย และอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตฟิเอซปีด้วยการย้อม Sudan black B

ในการทดลองได้ทำการเก็บตัวอย่างมูลวัวจากจังหวัดร้อยเอ็ด และตะกอนน้ำเสียโรงงาน ทุ่นำกระป๋อง จังหวัดสมุทรสาคร หลังจากนั้นนำตัวอย่างทั้งสองแหล่งมาแยกเชื้อโดยการเจือจางด้วย 0.85% NaCl และสเปรตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง Nutriant agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนพบว่า สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 94 ไอโซเลท โดยมาจากมูลวัว 49 ไอโซเลท และจากตะกอนน้ำเสีย 45 ไอโซเลท จากนั้นคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตฟิเอซปีโดยนำจานเพาะเชื้ออาหารที่มีเชื้อมาย้อมด้วย Sudan black B พบว่ามีแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ที่ติดสีดำของ Sudan black B อย่างชัดเจนแสดงดังภาพที่ 4.1 แบ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากกากตะกอนน้ำเสียคือไอโซเลท SWU01 คิดเป็น 2.22% จากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด และมูลวัวคือ ไอโซเลท SWU29, SWU44, SWU47 และ SWU48 คิดเป็น 8.16 % จากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้พบว่าการคัดแยกแบคทีเรียที่มีการสะสมฟิเอซปีในมูลวัวมีโอกาสพบมากกว่าในกากตะกอนน้ำเสีย เนื่องจากในมูลวัวเป็นแหล่งของสารอินทรีย์หลายชนิดรวมไปถึงสารอินทรีย์ในกลุ่ม volatile fatty acids (Hanajima, *et al.* 2011) ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacilli* สามารถย่อย และนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Miller and Varel, 2001) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผลิตฟิเอซปีจาก *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. โดยใช้ volatile fatty acids เป็นแหล่งคาร์บอน (Chakraborty, *et al.* 2009) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในโมเลกุลของ Sudan black B จะติดสีดำกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำทั้งหมดภายในเซลล์ของแบคทีเรียรวมทั้งฟิเอซปี ดังนั้นเพื่อยืนยันการสะสมฟิเอซปีภายในเซลล์ แบคทีเรียที่ย้อมติดสีดำของ Sudan black B จะนำมาย้อมอีกครั้งด้วยสี Nile blue A ซึ่งมีความจำเพาะต่อแกรนูลฟิเอซปีมากกว่า Sudan black B และสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

#### 4.2 ผลการยืนยันการสะสมฟิเอซปีภายในเซลล์แบคทีเรียโดยการย้อมด้วย Nile blue A

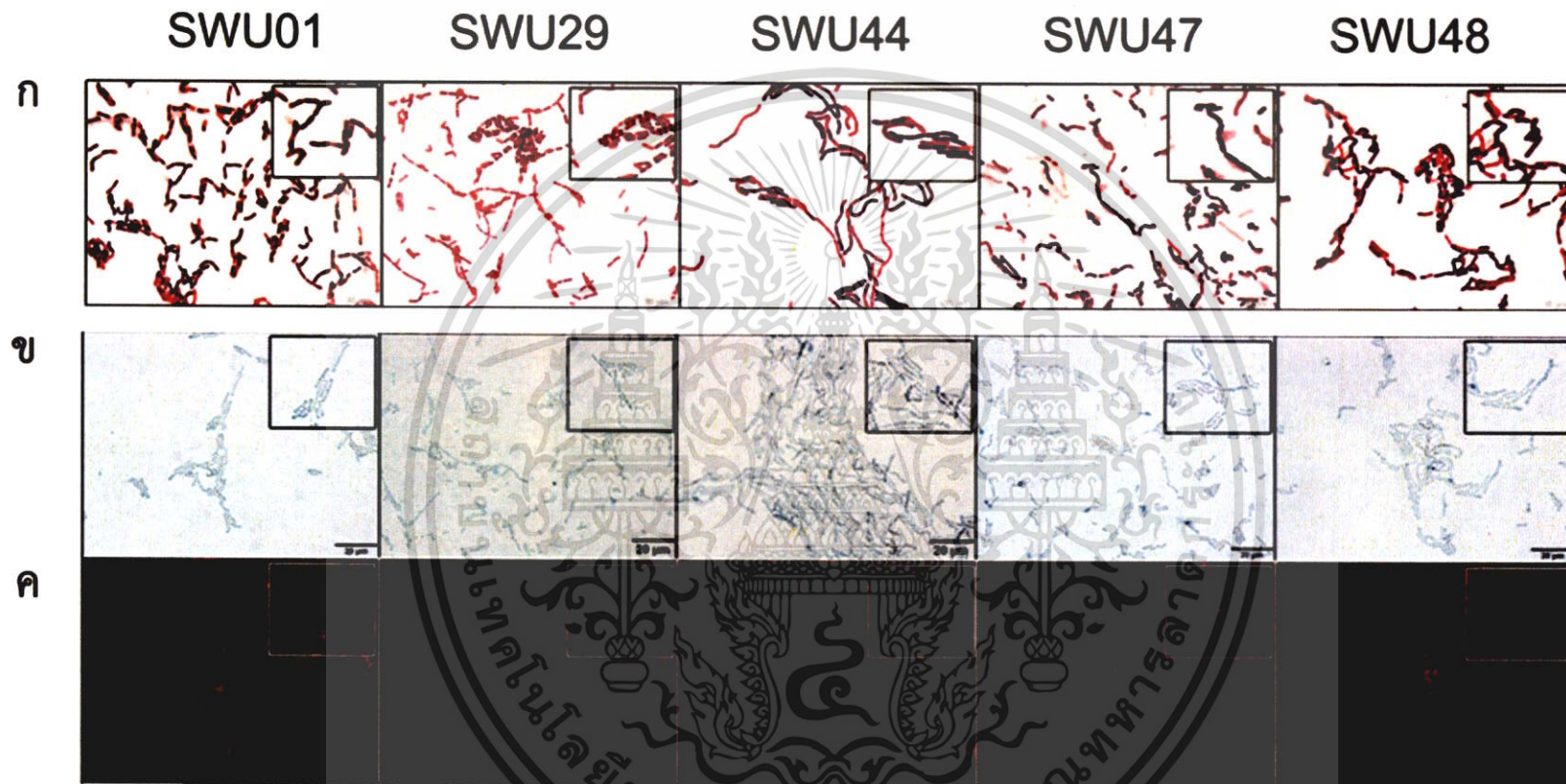
เนื่องจากสีย้อม Nile blue A ซึ่งจัดเป็นสีย้อมในกลุ่ม oxazine dye โดยใช้ย้อมกลุ่ม neutral lipids และสามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Bonilla and Prella, 1987) จากการย้อม Nile blue A เพื่อดูการเรืองแสงของฟิเอซปีที่สะสมภายในแบคทีเรียพบว่าไอโซเลท SWU01, SWU29, SWU44, SWU47 และ SWU48 มีการเรืองแสงสีส้มแดงของ Nile blue A (ภาพ 4.2ข และ 4.2ค) จึงสามารถยืนยันได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทมีการสะสมฟิเอซปี

นอกจากนี้การสังเกตลักษณะแกรนูลฟิเอซปีที่สะสมภายในเซลล์ของแบคทีเรียโดยการนำแบคทีเรียทั้งห้าชนิดไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) จากภาพที่ 4.3 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

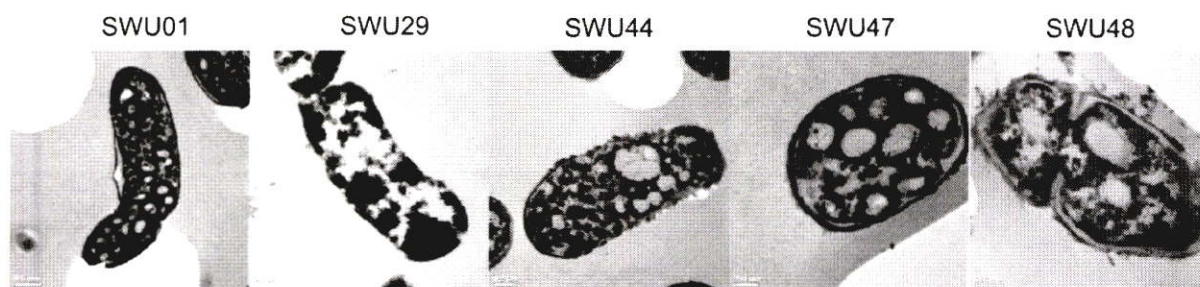
พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท มีการสะสมพีเอชบีโดยมีลักษณะแกรนูลขนาดเล็ก และใหญ่อยู่ภายในเซลล์ จากรูปจะสังเกตเห็นได้ว่าแกรนูลจะอยู่ใกล้เยื่อหุ้มไซโทพลาสซึม (cytoplasmic membrane) เนื่องจากระยะแรกในการสร้างแกรนูลจะก่อดำยู่ติดกับเยื่อหุ้มไซโทพลาสซึม โดยผ่านทางโปรตีน phasin ที่อยู่บนผิวแกรนูลพีเอชบี (Jendrossek. *et al.* 2007) โดยพบว่าโปรตีนชนิดนี้มีความสำคัญในการสร้างแกรนูลพีเอชบีใน *R. eutropha* (Potter. *et al.* 2002) ซึ่งแกรนูลพีเอชบีภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท ที่พบมีหลายขนาดแสดงให้เห็นว่าการสร้างแกรนูลยังไม่ถึงช่วงเจริญเต็มที่ (mature stage) (Bagheriasl, 2012) นอกจากนี้ในรูป TEM ยังพบว่าภายในไซโทพลาสซึมยังมีช่องว่างเหลืออยู่ ดังนั้นการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์ยังไม่ถึงขั้นสุด



ภาพที่ 4.1 แบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานปลาทุ่นำกระบอง และมูลวัว แบคทีเรียไอโซเลท SWU01 คัดแยกได้จากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานปลาทุ่นำกระบอง และแบคทีเรียไอโซเลท SWU29, SWU44, SWU47 และ SWU48 คัดแยกได้จากมูลวัวนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (ก) และย้อมโคโลนีด้วย 0.5% Sudan black B (ข)



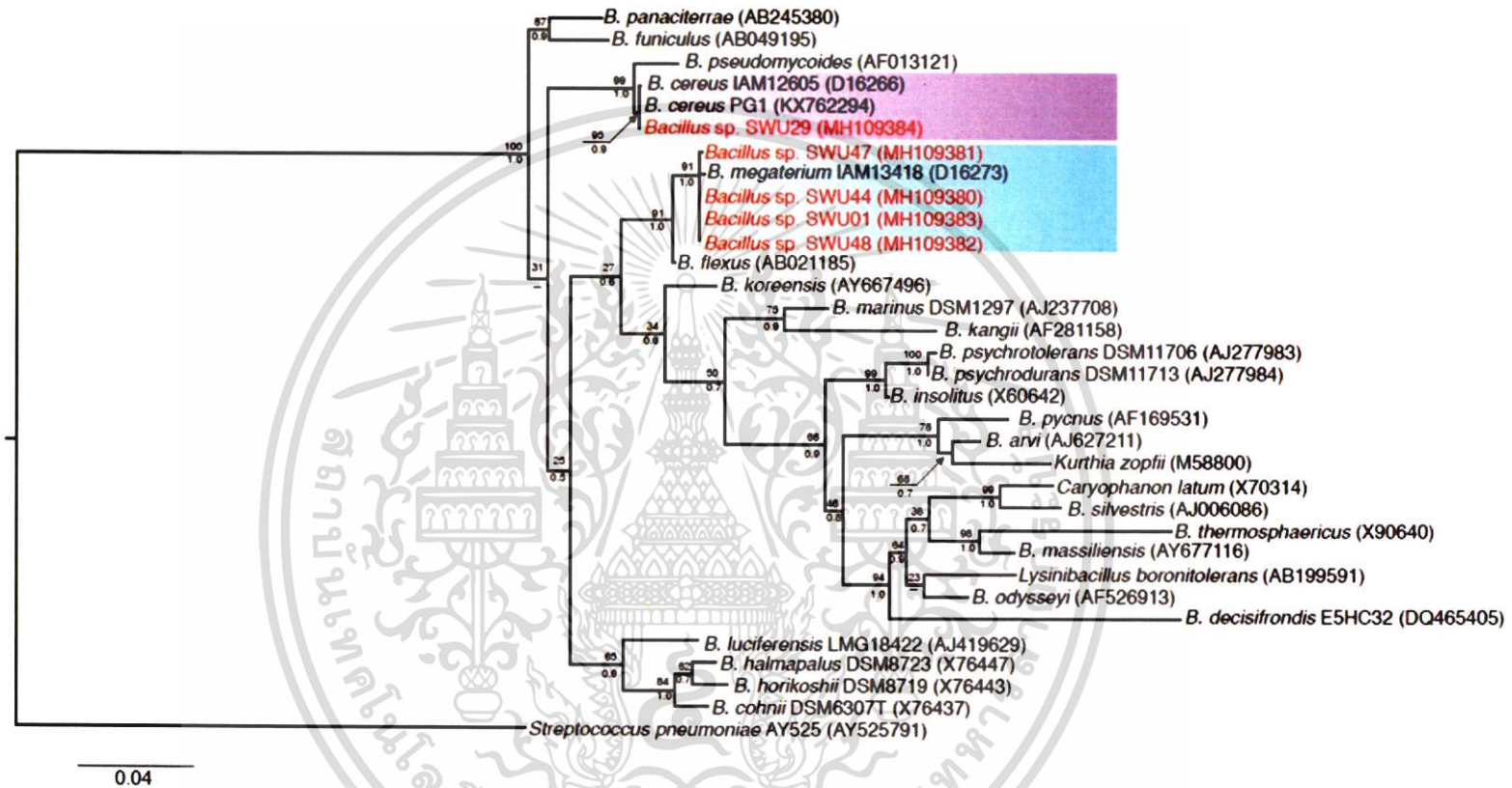
ภาพที่ 4.2 การย้อมแบคทีเรีย 5 โยโซเลท ด้วย Sudan black B และ Nile blue A นำแบคทีเรียมาทำตรึงบนสไลด์และทำการย้อมด้วย Sudan black B และย้อมขอบเขตเซลล์ด้วย 5% sulfranine O จากรูปบางส่วนภายในเซลล์ติดสีดำของ Sudan black B (ก) และเซลล์แบคทีเรียที่ย้อมด้วย Nile Blue A (ข) เรืองแสงสีส้มแดงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ได้กล้องจุลทรรศน์ (ค)



ภาพที่ 4.3 ภาพแสดงพีเอซิปแกรนูลภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 5 ไอโซเลท โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM) แถบแสดงขนาดของรูป 0.5 ไมโครเมตร (SWU01) และ 0.2 ไมโครเมตร (SWU29, SWU44, SWU47 และ SWU48)

#### 4.3 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *16s rDNA* ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16s rDNA* จากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ (รายละเอียดในภาคผนวก ข) และการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ด้วย BLASTN พบว่า *Bacillus* sp. SWU29 (accession number: MH109384) มีบรรพบุรุษร่วมกับ *B. cereus* IAM12605 (accession number: D16273) และ *Bacillus cereus* PG1 (accession number: KX762294) โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 95% ที่คำนวณด้วยวิธี maximum likelihood (ML) และความน่าจะเป็นเป็น 0.9 คำนวณด้วยวิธี Bayesian inference method (ภาพที่ 4.4) ในส่วนของ *Bacillus* spp. อีก 4 สายพันธุ์ได้แก่ SWU01, SWU44, SWU47 และ SWU48 มีบรรพบุรุษร่วมกับ *Bacillus megaterium* IAM13418 (accession number: D16273) โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 91% ที่คำนวณด้วยวิธี maximum likelihood (ML) และความน่าจะเป็นเป็น 1.0 คำนวณด้วยวิธี Bayesian inference method จากแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) สามารถระบุได้ว่าสายพันธุ์ SWU29 อาจจะเป็น *B. cereus* และ สายพันธุ์อื่นอีก 4 สายพันธุ์อาจจะเป็น *B. megaterium*. ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์จัดอยู่ในตระกูล Bacillales เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญได้ในที่มีอากาศ และสามารถสร้างสปอร์ได้โดย *Bacillus cereus* จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคโดยเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Granum and Lund, 1997)

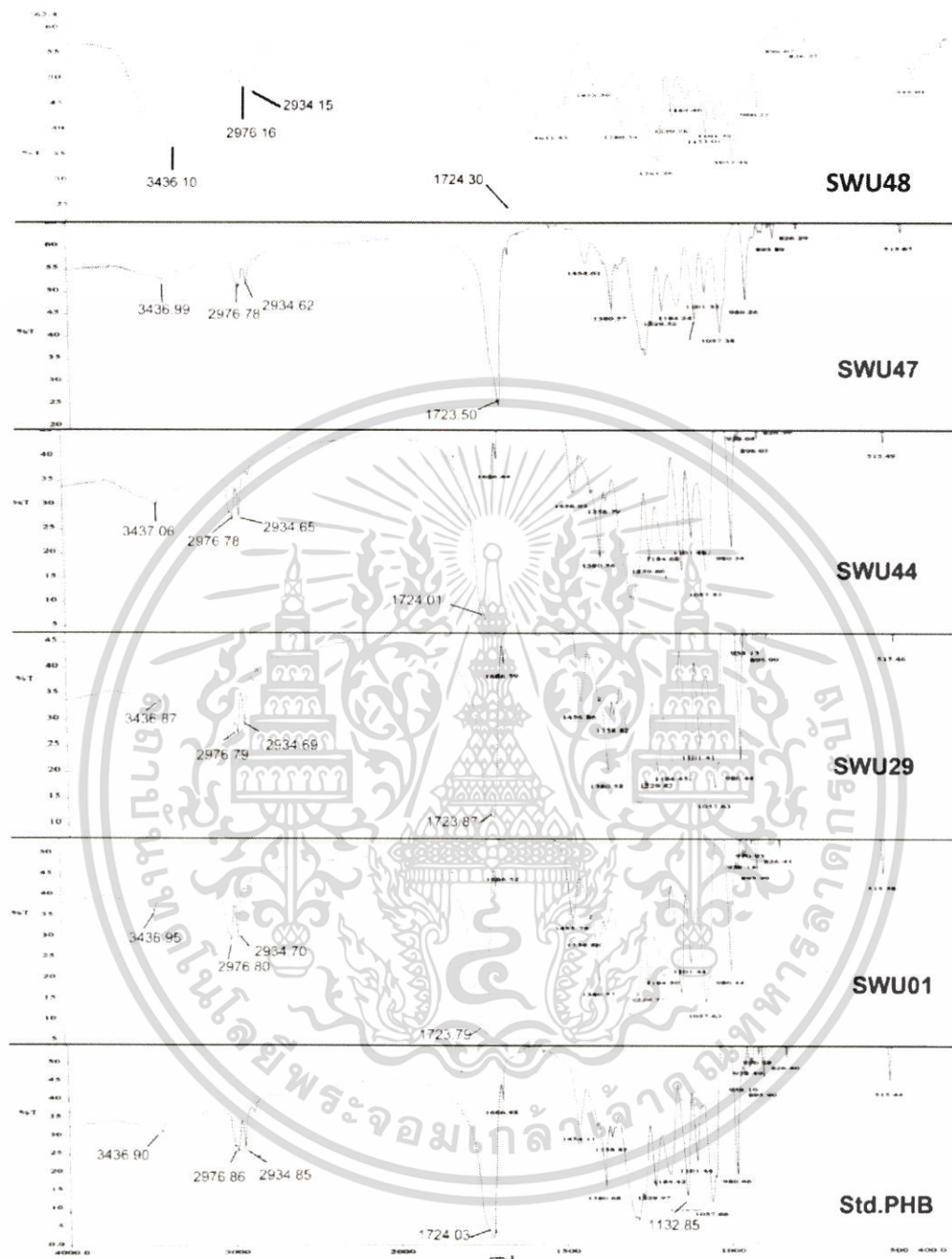


ภาพที่ 4.4 ไฟโลเจเนติกทรีแสดงความสัมพันธ์ของยีน 16s rDNA ของแบคทีเรียจีส *Bacillus* spp. จำนวน 32 สายพันธุ์ และใช้ *Streptococcus pneumoniae* AY525 เป็นแบคทีเรียนอกกลุ่ม โดย *B. cereus* และ *B. megaterium* อยู่ในแถบสีชมพู และสีฟ้า accession numbers ของแบคทีเรียที่ศึกษาแสดงเป็นตัวเลขสีแดงต่อจากชื่อที่ปรากฏในแผนภูมิ ค่าที่แสดงอยู่บนกิ่งของแผนภูมิคือ ค่า bootstrap ที่คำนวณโดยวิธี Maximum likelihood (ML) และที่แสดงอยู่ใต้กิ่งของแผนภูมิคือ ค่าความน่าจะเป็นที่คำนวณโดยวิธี Bayesian

#### 4.4 สมบัติด้านอุณหภูมิจึงและโครงสร้างของพีเอชบีที่สกัดได้จากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์

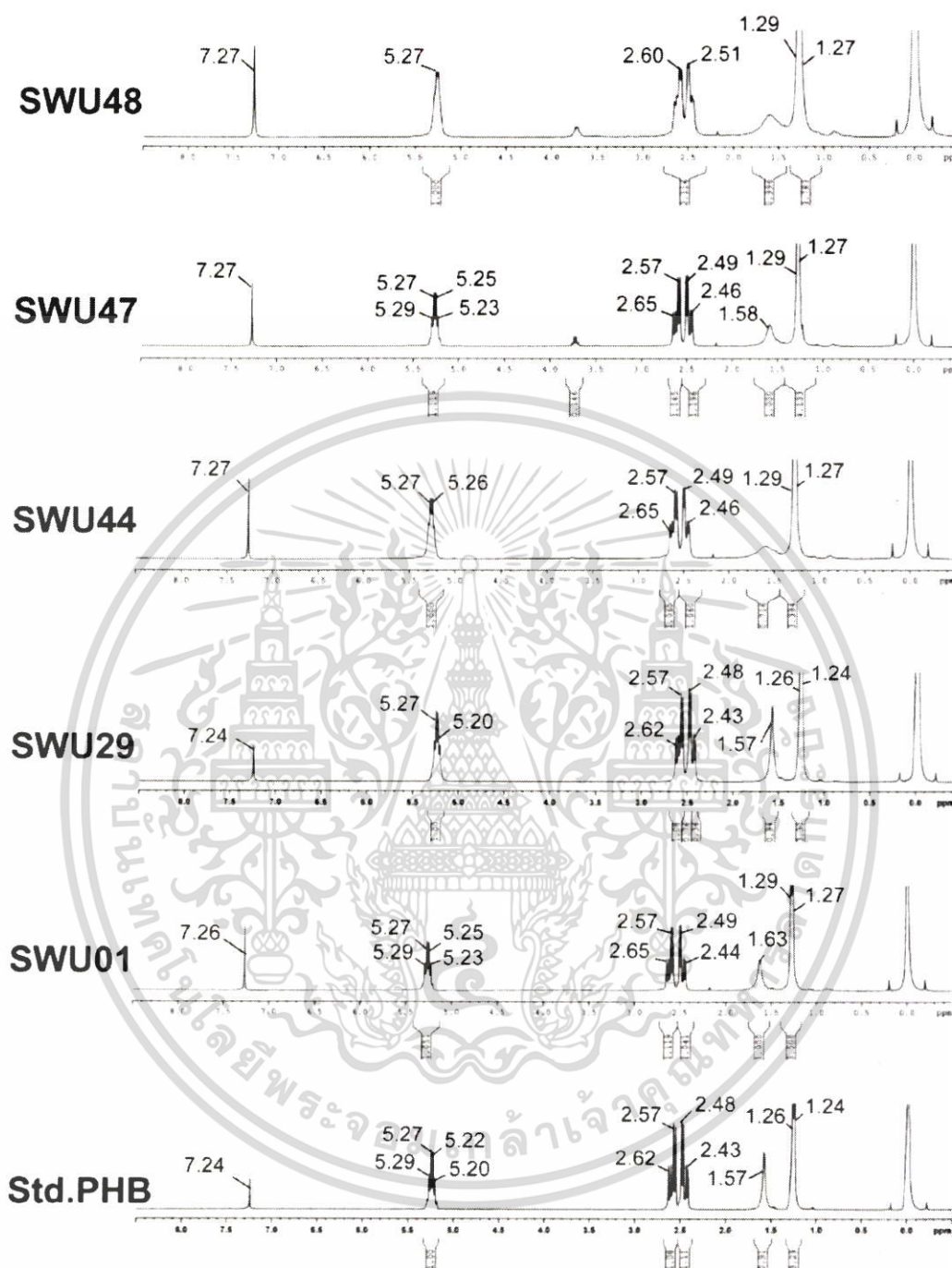
จากการนำพีเอชบีที่สกัดได้จากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์นำมาวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FT-IR โดยเปรียบเทียบกับพีเอชบีมาตรฐาน ผลที่ได้พบว่าไบโอพลาสติกที่สกัดได้มีพีคของหมู่คาร์บอนิล C=O แถบการยืดอยู่ระหว่าง  $1730-1735\text{cm}^{-1}$  และ C-H stretch ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ )  $3000-2840\text{cm}^{-1}$  (ภาพที่ 4.5) ซึ่งเป็นพีคที่สำคัญของ พีเอชบี นอกจากนี้ยังพบพีคของหมู่ ester (C-O)  $1300-1160\text{cm}^{-1}$  และ C-H bend  $700-610\text{cm}^{-1}$  ด้วย (รายละเอียดในภาคผนวก ง-13 ถึง ง-18) หลังจากเปรียบเทียบกับพีคของพีเอชบีมาตรฐานแล้วสามารถระบุได้ว่าไบโอพลาสติกที่ผลิตได้ คือ โพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต จากผล FT-IR spectra ที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกับพีคพีเอชบีที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* PW3A (Babruwad. et al. 2015)

การวิเคราะห์ตำแหน่งของอะตอมไฮโดรเจนภายในโครงสร้างของพีเอชบีด้วย  $^1\text{H-NMR}$  เทียบกับพีเอชบีมาตรฐาน (รายละเอียดในภาคผนวก ง-19 ถึง ง-24 ) พบว่า proton signals peak ของพีเอชบีที่สกัดได้กับพีเอชบีมาตรฐานมีลักษณะคล้ายกันโดยพบว่า proton signals peak ของหมู่  $\text{CH}_3$  ของพีเอชบีที่สกัดได้ และพีเอชบีมาตรฐานมีค่า chemical shift คือ  $1.29\text{ ppm}$  และ  $1.26\text{ ppm}$  ตามลำดับ ค่า chemical shift ของหมู่  $\text{CH}_2$  ในโครงสร้างของพีเอชบีที่สกัดได้ และพีเอชบีมาตรฐานคือ  $2.57\text{ ppm}$  และ  $2.55\text{ ppm}$ ตามลำดับ และค่า chemical shift ของหมู่ CH ของพีเอชบีที่สกัดได้กับพีเอชบีมาตรฐานคือ  $5.27\text{ ppm}$  และ  $5.22\text{ ppm}$  ตามลำดับ และค่า chemical shift ของตัวทำละลายคลอโรฟอร์มดีโดยมีค่า คือ  $7.2\text{ ppm}$  (ภาพที่ 4.6) นอกจากนี้ผล  $^1\text{H-NMR}$  spectra ยังใกล้เคียงกับพีเอชบีจากงานวิจัยของ Bhuwal และคณะ (2013) จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างพีเอชบีด้วยเทคนิค FT-IR และ  $^1\text{H-NMR}$  สามารถระบุได้ว่าพลาสติกชีวภาพที่สกัดจากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์คือ พีเอชบี ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ไปในทางเดียวกับคู่มือ Polymer Data Handbook (Noda. et al. 1999)



ภาพที่ 4.5 FT-IR spectra ของฟิเอซบีที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 5 สายพันธุ์ (SWU01, SWU29, SWU44, SWU47, SWU48) และฟิเอซบีมาตรฐานในช่วงเลขคลื่น 4000-400 $\text{cm}^{-1}$  โดยพิกของหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญของฟิเอซบีได้แก่ 1730-1735 $\text{cm}^{-1}$  คือ C=O ของหมู่คาร์บอนิล และ 3,000-2,840  $\text{cm}^{-1}$  ของหมู่ CH stretch

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6  $^1\text{H-NMR}$  spectra ของพีเอชบีที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 5 สายพันธุ์ (SWU01, SWU29, SWU44, SWU47, SWU48) และพีเอชบีมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้พีเอชบีที่สกัดได้ยังนำมาศึกษาคุณสมบัติด้านอุณหภูมิจากพอลิเมอร์ (Thermal properties of polymer) โดยพีเอชบีที่สกัดได้จะถูกนำมาทดสอบคุณสมบัติด้วยเครื่อง Differential scanning calorimeter (DSC) และ Thermal gravimetric analysis (TGA) เปรียบเทียบกับพีเอชบีมาตรฐาน (รายละเอียดในภาคผนวก ง-1 ถึง ง-12) จากตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติด้านอุณหภูมิจากพอลิเมอร์ได้แก่  $T_g$ ,  $T_c$ ,  $T_m$ ,  $T_d$  และ % crystallinity โดยคำนวณจากสูตรของ Wei and McDonald (2015)

$$X_c \text{ PHB (\%)} = \frac{\Delta H_{\text{PHB}}}{\Delta H_{\text{O-PHB}}} \times 100$$

เมื่อ

$\Delta H_{\text{PHB}}$  คือ ค่าพลังงานเอนทาลปีการหลอมเหลวผลึกของตัวอย่าง

$\Delta H_{\text{O-PHB}}$  คือ ค่าพลังงานเอนทาลปีการหลอมเหลวผลึก 100% ของพีเอชบี เท่ากับ 146 จูลต่อกรัม

พบว่าคุณสมบัติของพีเอชบีที่สกัดต่างจากพีเอชบีมาตรฐานเล็กน้อย ซึ่งน่าจะมาจากขั้นตอนการสกัด โดยโซเดียมไฮโปคลอไรด์อาจจะไปทำลายพันธะไฮโดรเจนในโครงสร้างของพีเอชบี เนื่องจากการเกิดผลึกของพีเอชบีขึ้นอยู่กับพันธะระหว่าง C-H ... O ของหมู่ C = O และ CH<sub>3</sub> (Porter and Yu, 2011) พันธะไฮโดรเจนสามารถถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน หรือ จากสภาวะแวดล้อมในการเกิดผลึก ซึ่งเปอร์เซ็นต์เกิดผลึกของพีเอชบีจะส่งผลต่อคุณสมบัติด้านอุณหภูมิจากพอลิเมอร์ด้วย อย่างไรก็ตาม พีเอชบีที่สกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์มีความบริสุทธิ์สูงเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยวิธีอื่น (Anis *et al.* 2013)

ตารางที่ 4.1 คุณสมบัติของพีเอชบีที่สกัดได้วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter และ Thermogravimetric analysis

Sample	Standard PHB	SWU01	SWU29	SWU44	SWU47	SWU48
$T_m$ (°C)	178.5	175.4	171.9	169.7	174.7	177.3
$T_c$ (°C)	81.1	84.8	84.4	88.6	87.0	89.8
$T_g$ (°C)	3.9	4.4	-2.7	-11	5.3	4.5
$T_d$ (°C)	263.12	293.10	247.31	256.96	258.96	263.12
$\Delta H$ J/g	103.8	86.53	78.26	85.43	90.24	94.71
% crystallinity	71.10	59.27	53.60	53.51	61.80	64.86

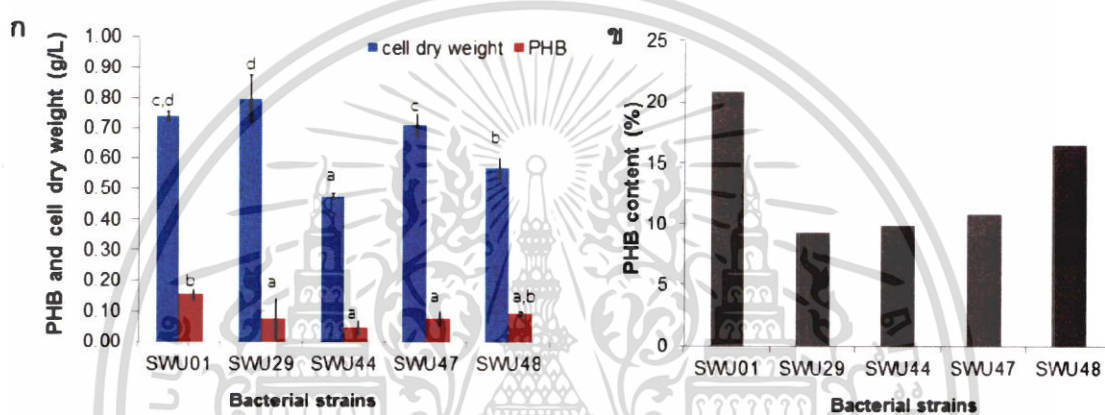
$T_g$ : glass transition temperature,  $T_c$ : crystallization temperature,  $T_m$ : melting temperature,  $T_d$ : decomposition temperature,  $\Delta H$ : melting enthalpy of the sample

#### 4.5 ผลการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตพีเอชบีได้สูงสุดจากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์

การทดลองนี้ได้นำแบคทีเรียที่ตรวจสอบแล้วว่ามีสารสะสมพีเอชบีในเซลล์ทั้งห้าสายพันธุ์ ได้แก่ SWU01, SWU29, SWU44, SWU47 และ SWU48 นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว modified M9 โดยใช้ 2% กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อหาแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีสูงสุด จากการทดลองพบว่าที่ 24 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันโดยแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SWU29 มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด และ SWU44 มีน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยที่สุด (ภาพที่ 4.7ก) เมื่อพิจารณาน้ำหนักพีเอชบีของแบคทีเรียแต่ละชนิดพบว่าปริมาณพีเอชบีที่ผลิตโดยแบคทีเรีย SWU01 และ SWU48 มากกว่าพีเอชบีจากแบคทีเรียอีกสามสายพันธุ์ (SWU29 SWU44 และSWU47) อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณพีเอชบีของ SWU01 และ SWU48 พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รายละเอียดในภาคผนวก ค-1) อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย SWU01 มีปริมาณพีเอชบีมากที่สุดคือ 0.15 กรัมต่อลิตร และมีการสะสมพีเอชบีสูงสุดคือ 20.82 % (ภาพที่ 4.7ข) ซึ่งมากกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ โดยจากการทดลองนี้ผู้วิจัยได้พิจารณาจากปริมาณพีเอชบีที่แบคทีเรียผลิต ดังนั้นแบคทีเรีย SWU01 จึงถูกเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

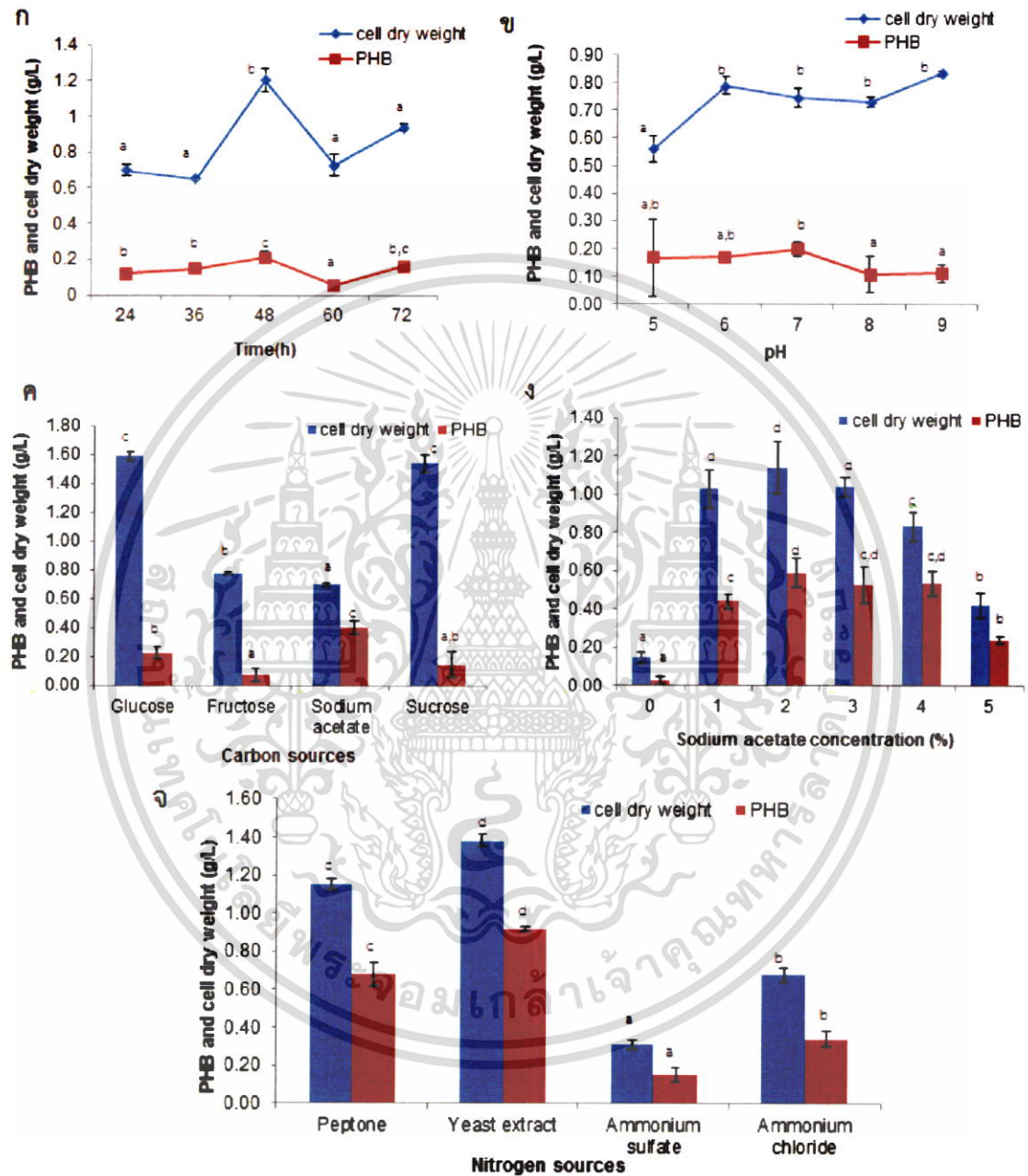


ภาพที่ 4.7 การผลิตพีเอชบีของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักพีเอชบี (กรัมต่อลิตร) ที่เลี้ยงในอาหาร modified M9 2% กลูโคส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก) และการสะสมพีเอชบีของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (ข)

#### 4.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี

จากผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีสูงสุด พบว่าแบคทีเรีย SWU01 มีปริมาณพีเอชบีมากที่สุด ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกแบคทีเรีย SWU01 มาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตพีเอชบี โดยสภาวะที่ทดสอบได้แก่ ระยะเวลา พีเอชของอาหาร แหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และ แหล่งไนโตรเจน การศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย SWU01 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ modified M9 โดยใช้กลูโคส 2% เป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 4.8 ก) ผลที่ได้พบว่าแบคทีเรียมีการสะสมพีเอชบีเพิ่มขึ้น และมากที่สุดที่ 36 ชั่วโมง คือ 22.9 % และรองลงมาคือ 17.7 % และ 16.7 % ที่ 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาที่ 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรีย SWU01 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณพีเอชบีมากที่สุดคือ 1.20 และ 0.21 กรัมต่อลิตร อาจเกิดจากการที่แบคทีเรียสามารถนำแหล่งคาร์บอนในอาหารมาใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี และยังสามารถใช้ในการสะสมพีเอชบีอีกด้วย ซึ่งน้ำหนักพีเอชบีพบว่าชั่วโมงที่ 48 และ 72 มีปริมาณพีเอชบีมากกว่าชั่วโมงที่ 24-36 และ 60 อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (รายละเอียดในภาคผนวก ค-2) จากผลเอกซสเรย์เป็นเอกซสเรย์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกซสเรย์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย SWU01 เริ่มมีการสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวเรต (logarithmic phase) จนเข้าสู่ช่วงคงที่ (stationary phase) ซึ่งมีลักษณะการเจริญ และการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวเรตคล้ายกับเชื้อ *Bacillus aryabhattai* (Balakrishna Pillai. et al. 2017)



ภาพที่ 4.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวเรตของแบคทีเรีย *Bacillus SWU01* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified M9 ได้แก่ ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวเรต (ก) ค่าพีเอชของอาหารที่เหมาะสม (ข) แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (ค) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน (ง) แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (จ) ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ระบุว่าแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบีแบ่งได้สองกลุ่มคือ ผลิตพีเอชบีในช่วงที่มีการเจริญเติบโต (logarithmic phase) และ ช่วงคงที่ (stationary phase) (Borah, *et al.* 2002)

อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำหนักพีเอชบีที่ 48 ชั่วโมง มากกว่า 72 ชั่วโมง ซึ่งคาดว่าที่ 48 ชั่วโมง แหล่งอาหารในระบบน่าจะอยู่ในสภาวะไม่สมดุล เช่น แหล่งไนโตรเจนจำกัด และส่งเสริมให้แบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 ผลิตพีเอชบีมากขึ้น ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็นเวลาในการเลี้ยงแบคทีเรีย SWU01 เพื่อผลิตพีเอชบีต่อไป

ผลการศึกษาพีเอชของอาหารโดยแปรผันพีเอชในช่วง pH 5-9 เพื่อหาพีเอชที่เหมาะสมโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าปริมาณพีเอชบีที่แบคทีเรีย SWU01 ผลิตได้ในช่วง pH 5-7 มากกว่า pH 8-9 อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (รายละเอียดในภาคผนวก ค-3) โดยเมื่ออาหารมีพีเอชสูงขึ้นการผลิตพีเอชบีลดลง (ภาพ 4.8ข) และเมื่อพิจารณาจากน้ำหนักพีเอชบีพบว่า pH7 ซึ่งเป็นพีเอชเดิมของอาหาร modified M9 แบคทีเรีย SWU01 สามารถผลิตผลิตพีเอชบีได้มากที่สุดคือ 0.20 กรัมต่อลิตร และมีการสะสมพีเอชบีคิดเป็น 26.7 % ซึ่งให้ค่าพีเอชที่เหมาะสม เช่นเดียวกับการผลิตพีเอชบีของ Rhizospheric bacteria ในดิน และ *Cupriavidus taiwanensis* (Lathwal, *et al.* 2015 ; Wei, *et al.*, 2011) เนื่องจากการปรับเปลี่ยนพีเอชเล็กน้อย (pH 6.0-7.5) จะส่งผลต่อแบคทีเรียในการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิดเท่านั้น (Palleroni and Palleroni, 1978) ดังนั้นจึงเลือก pH7 เป็นพีเอชของอาหาร modified M9 ในการศึกษาสภาวะอื่นๆต่อไป

หลังจากศึกษาระยะเวลา และพีเอชที่เหมาะสมแล้วการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีของ SWU01 จากรูป 4.8ค พบว่าเมื่อใช้กลูโคส และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดคือ 1.59 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อพิจารณาจากน้ำหนักพีเอชบีพบว่าเมื่อใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียสามารถผลิตพีเอชบีได้สูงสุดคือ 0.4 กรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (รายละเอียดในภาคผนวก ค-4) เมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆ โดยคิดเป็นสัดส่วนการสะสมพีเอชบี คือ 57 % ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี โดยอาจเกิดการที่แบคทีเรียสามารถเปลี่ยนอะซิเตตเป็น acetyl-CoA และ เข้าสู่กระบวนการในการสังเคราะห์พีเอชบีได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านวัฏจักร embden-meyerhof-parnas (EMP) (Yuan, *et al.* 2015 ; Zhang, 2015) ต่อมาได้ทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมอะซิเตตเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพีเอชบีของ SWU01 ในอาหาร modified M9 ผลการศึกษา พบว่าที่โซเดียมอะซิเตต 2% แบคทีเรีย SWU01 สามารถผลิตพีเอชบีได้สูงสุดคือ 0.59 กรัมต่อลิตร และ น้ำหนักเซลล์แห้ง 1.14 กรัมต่อลิตร (รายละเอียดในภาคผนวก ค-5) (ภาพที่ 4.8ง) ดังนั้น จากการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงเลือกโซเดียมอะซิเตต 2% เป็นแหล่งคาร์บอน

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีโดยอาหาร modified M9 พบว่า การใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนแบคทีเรีย SWU01 สามารถผลิตพีเอชบีได้มากที่สุด 0.91 กรัมต่อลิตร และ น้ำหนักเซลล์แห้ง 1.38 กรัมต่อลิตร การสะสมพีเอชบีคิดเป็น 66 % (ภาพที่ 4.8จ) เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆพบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (รายละเอียดในภาคผนวก ค-6) ซึ่งแตกต่างจาก *Cupriavidus necator* พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี (Aramvash. et al. 2015) อย่างไรก็ตามเนื่องจากยีสต์สกัดเป็นแหล่งของวิตามิน และ แร่ธาตุต่างๆที่แบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโต ดังนั้นอาจส่งผลให้การผลิตพีเอชบีที่สูงตาม

เมื่อทำการเปรียบเทียบภาพการสะสมพีเอชบีของแบคทีเรีย SWU01 ที่เลี้ยงในอาหาร modified M9 ในสภาวะที่เหมาะสมกับ modified M9 แบบเดิมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (ภาพที่ 4.9ก) พบว่าแกรนูลพีเอชบีภายในเซลล์แบคทีเรีย SWU01 ที่เลี้ยงในอาหาร modified M9 ในสภาวะที่เหมาะสมมีจำนวนพีเอชบีแกรนูลเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร modified M9 แบบเดิม เนื่องจากแบคทีเรีย SWU01 ที่เลี้ยงใน modified M9 ที่ถูกปรับสภาวะให้เหมาะสมโดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนโดยยีสต์สกัดประกอบไปด้วยวิตามิน และแร่ธาตุที่แบคทีเรียใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้ใช้โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งแบคทีเรียสามารถนำไปสะสมเป็นพีเอชบีได้รวดเร็ว ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และสามารถสะสมพีเอชบีได้มากขึ้น นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพีเอชบีของแบคทีเรีย SWU01 ที่เลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิด พบว่าแบคทีเรีย SWU01 ที่เลี้ยงในอาหาร modified M9 ที่ปรับสภาวะให้เหมาะสมมีการผลิตพีเอชบีเพิ่มขึ้น 7.5 เท่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารแบบเดิม (ภาพที่ 4.9ข)

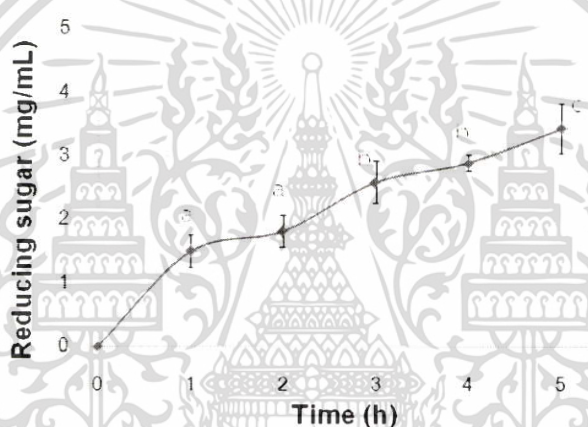


ภาพที่ 4.9 ลักษณะแกรนูลพีเอชบีภายในเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 และการผลิตพีเอชบีที่เลี้ยงในอาหาร optimized M9 การสะสมพีเอชบีในแกรนูลของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 ที่สภาวะที่เหมาะสม โดยส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (ก) และแสดงน้ำหนักพีเอชบี และ น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) โดยเลี้ยงในอาหาร M9 และ optimized M9 medium

#### 4.7 ผลการผลิตฟิเอซปีจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SWU01 โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อย และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

##### 4.7.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรด

จากการทดลองไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึง ชั่วโมงที่ 5 มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ดังภาพที่ 4.10 และพบว่าชั่วโมงที่ 5 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดคือ 3.43 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามในการเตรียมอาหารสำหรับผลิตฟิเอซปีต้องการปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อย่างน้อย 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รายละเอียดในภาคผนวก ค-7) ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดนั้นไม่เพียงพอสำหรับนำมาใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนวิธีเป็นการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส



ภาพที่ 4.10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก

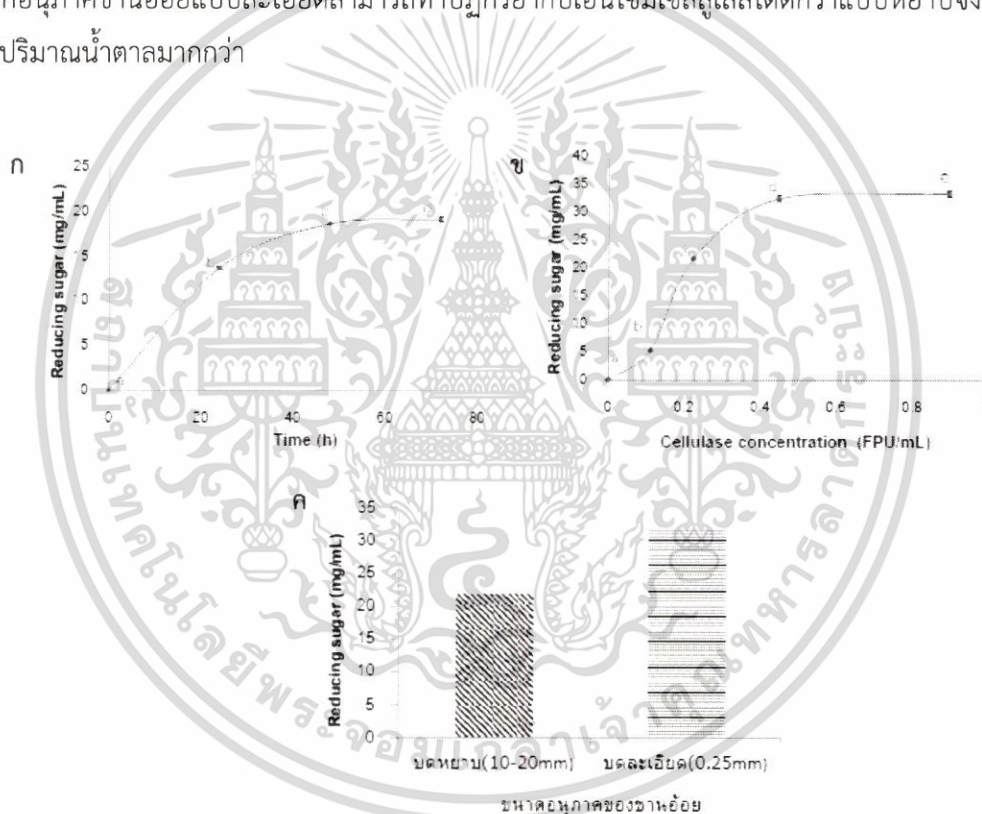
##### 4.7.2 การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ในการทดลองนี้ได้หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จากผลการทดลองพบว่าการไฮโดรไลซิสชานอ้อยโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส 0.22 FPU/ml บ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 13.67, 18.63 และ 19.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดที่เท่ากับ 19.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 72 ชั่วโมง (รายละเอียดในภาคผนวก ค-8) และจากภาพที่ 4.11ก พบว่าที่เวลา 48-72 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มคงที่ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณกลูโคส และ cellobiose ที่เพิ่มขึ้นทำให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ในเอนไซม์เซลลูเลส (Xiao, et al. 2004) อย่างไรก็ตามที่เวลา 48 ชั่วโมง ก็มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ 72 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกการไฮโดรไลซิสที่เวลา 48 ชั่วโมง ในการบ่มระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับชานอ้อยในการทดลองถัดไป ผลของการหาความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมพบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสในช่วง 0.11-0.45 FPU/ml มีการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์อย่างมาก (รายละเอียดในภาคผนวก ค-9) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คงที่ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 0.90 FPU/ml (ภาพที่ 4.11ข) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.45 FPU/ml สามารถไฮโดรไลซิสขานอ้อย และได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถึง 32.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้น 0.45 FPU/ml เนื่องจากได้ปริมาณน้ำตาลเพียงพอต่อการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

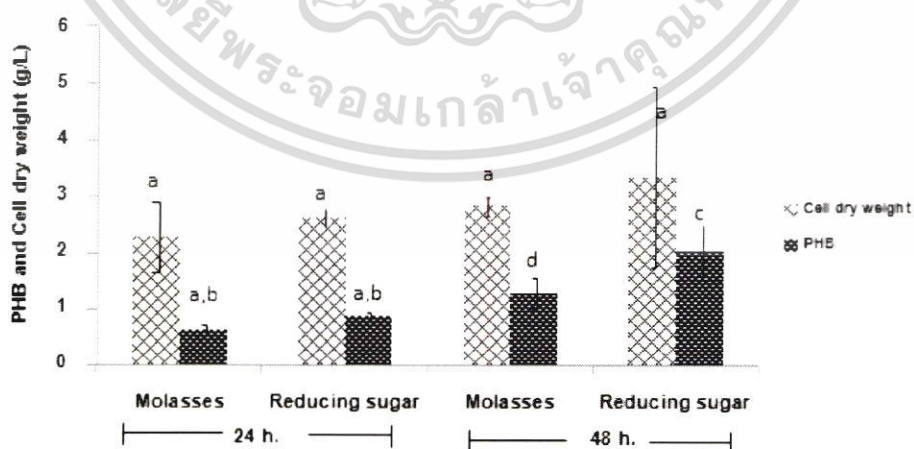
นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของอนุภาคขานอ้อยต่อการไฮโดรไลซิสขานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบขนาดอนุภาคแบบบดยาบ (10-20 มิลลิเมตร) และบดละเอียด (0.25 มิลลิเมตร) จากผลการทดลองพบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ของการไฮโดรไลซิสขานอ้อยแบบละเอียดจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 32.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าการไฮโดรไลซิสขานอ้อยแบบบดยาบซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 21.71 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.11ค) อาจจะทำให้จากอนุภาคขานอ้อยแบบละเอียดสามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีกว่าแบบบดยาบจึงทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลมากกว่า



ภาพที่ 4.11 สภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสขานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ก) เวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสขานอ้อยที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (ข) ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสขานอ้อยที่ 48 ชั่วโมง (ค) ผลของขนาดอนุภาคแบบหยาบ และแบบละเอียดของขานอ้อยในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

#### 4.8 ผลการผลิตพีเอชบีด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ และ กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

ในการทดลองนี้ได้ทดสอบการผลิตพีเอชบีของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SWU01 ในอาหาร modified M9 โดยใช้อากน้ำตาล และ น้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงในภาพที่ 4.12 พบว่าที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ และกากน้ำตาลซึ่งการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รายละเอียดในภาคผนวก ค-10) แต่สำหรับปริมาณพีเอชบีที่สกัดได้พบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง แบคทีเรียสามารถผลิตพีเอชบีจากน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยได้มากกว่ากากน้ำตาล ซึ่งได้ปริมาณพีเอชบีเท่ากับ 2.01 กรัมต่อลิตร โดยคิดเป็นสัดส่วนการสะสมพีเอชบี คือ 60.5 % ซึ่งแตกต่างจากช่วงเวลาอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ง่ายกว่าเนื่องจากเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ในขณะที่กากน้ำตาลมีน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ และมีสารประกอบอื่นๆเจือปนอยู่ (Browne, 1919) นอกจากนั้นการสะสมพีเอชบีพบมากในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่การเจริญเติบโตของแบคทีเรียคงที่โดยแหล่งคาร์บอนที่เหลืออยู่ในอาหารถูกนำมาใช้เป็นพลังงานสำรองเก็บอยู่ในเซลล์ในรูปของพีเอชบี ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ศึกษาการสะสมพีเอชบีในแบคทีเรีย *Bacillus aryabhatai* และพบว่าแบคทีเรียเริ่มมีการสะสมพีเอชบีในช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตหลังจากนั้นอัตราการสะสมพีเอชบีเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะคงที่ (stationary phase) ที่ 60 ชั่วโมง (Balakrishna Pillai, et al. 2017) จากการทดลองพบว่าแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดสามารถนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนน้ำตาลในการผลิตพีเอชบีได้ โดยแต่ละชนิดมีข้อดีต่างกัน โดยน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ง่าย ส่วนกากน้ำตาลนำมาใช้ได้ง่าย ไม่ต้องผ่านกระบวนการย่อย ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย



ภาพที่ 4.12 การผลิตพีเอชบีของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SWU 01 ในอาหาร modified M9 โดยใช้อากน้ำตาล และน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.9 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของพีเอชบีจากหมู่ฟังก์ชันภายในโมเลกุลด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)

ผลการทดสอบพีเอชบีที่สกัดได้ด้วยเครื่อง FT-IR โดยเปรียบเทียบลักษณะพิกของหมู่ฟังก์ชันกับพีเอชบีมาตรฐานพบหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญในพีเอชบีได้แก่ C=O ของหมู่คาร์บอนิล 1735-1730  $\text{cm}^{-1}$  และ CH stretch 3000-2840  $\text{cm}^{-1}$  (ภาพที่ 4.13) แสดงให้เห็นว่าสิ่งที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่ใช้กากน้ำตาลหรือน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นพีเอชบี

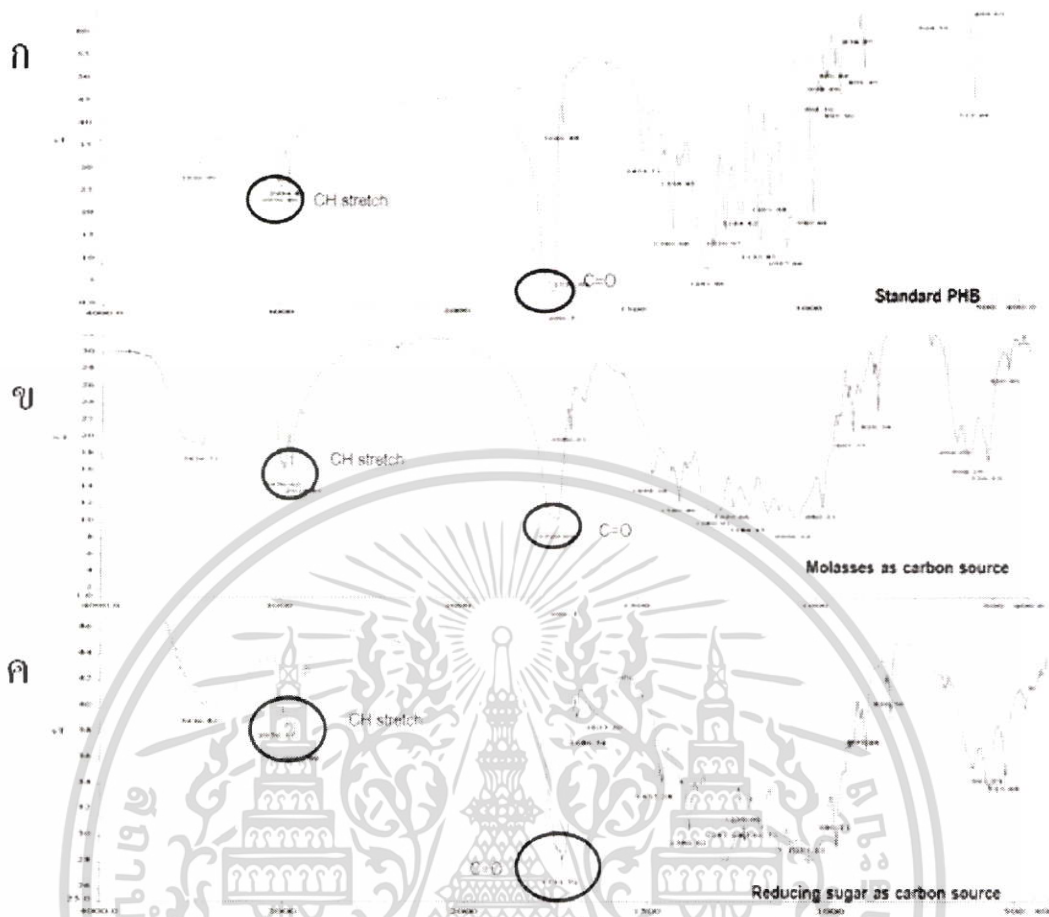
#### 4.10 สมบัติของพีเอชบีจากการวัดค่าพลังงานความร้อนของพอลิเมอร์ด้วยเครื่อง Different scanning calorimetry (DSC)

ผลการวิเคราะห์สมบัติของพีเอชบีที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SWU01 ที่ใช้กากน้ำตาล หรือน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับพีเอชบีมาตรฐานพบว่าพีเอชบีที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SWU01 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพีเอชบีมาตรฐาน ยกเว้นปริมาณผลึกของพอลิเมอร์ที่มีความแตกต่างโดยพีเอชบีที่สกัดจากแบคทีเรียมีความเป็นผลึกต่ำกว่า (ตารางที่ 4.2) เนื่องจากพอลิเมอร์เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่มีการจัดเรียงตัวแบบกึ่งผลึก (semi-crystalline) (Jendrossek. *et al.* 2007) พีเอชบีที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SWU01 มีปริมาณผลึกน้อยกว่าจึงทำให้ค่าพลังงานความร้อนแตกต่างจากพีเอชบีมาตรฐาน ซึ่งการเกิดผลึกของพีเอชบีจะขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของพันธะ CH-O ของหมู่  $\text{CH}_3$  และ C=O (Potter. *et al.* 2002) จากผล FTIR spectra พบว่า peak ดังกล่าว ยังมีขนาดต่ำกว่าพีเอชบีมาตรฐานซึ่งสอดคล้องกับ ค่า % crystallinity ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย DSC ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการสกัดไปทำลายพันธะไฮโดรเจนในโครงสร้าง และทำให้การเกิดผลึกน้อยลง อย่างไรก็ตามปัจจัยอื่น เช่น อุณหภูมิ และ pH ก็ส่งผลต่อการเกิดผลึกของพอลิเมอร์เช่นกัน

ตารางที่ 4.2 คุณสมบัติด้านอุณหภูมิของพีเอชบีที่สกัดจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SWU01

Carbon source	Tm (°C)	Tc (°C)	$\Delta H$ J/g	% Crystallinity
Standard PHB	178.18	88.00	68.30	46.57
Reducing sugar from bagasse	165.51	99.59	33.25	22.77
Molasses	172.37	98.43	19.05	13.01

Tm: melting temperature, Tc : crystallization temperature,  $\Delta H$ : melting enthalpy of sample



ภาพที่ 4.13 FT-IR-Spectra ของพีเอชบีมาตรฐาน (ก) และพีเอชบีที่สกัดจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SWU01 โดยใช้กากน้ำตาล (ข) หรือ น้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน (ค)

#### 4.11. การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์พีเอชบีซินเทสในแบคทีเรียที่คัดแยกจากมูลวัว

##### 4.11.1 ลักษณะของยีน *phaC* จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SWU44

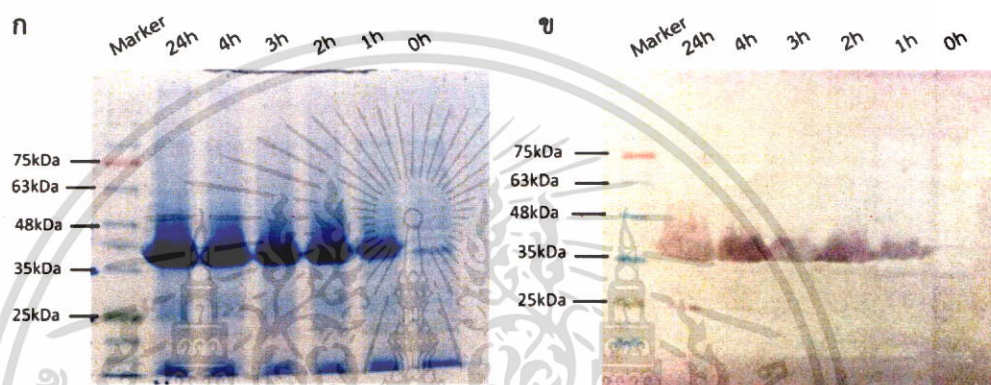
การเพิ่มปริมาณของยีน *phaC* ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU44 โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1089 bp ดังแสดงในภาพที่ 4.14ก ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับยีน *phaC* ของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* mm7 (El Rabey, 2017) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phaC* มีความเหมือนกับยีน *phaC* ของ *Bacillus megaterium* strain JX285 (CP018874.1) มีค่า identity เท่ากับ 99% หลังจากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนของพีเอชบีซินเทสที่ได้จากการแปลรหัสจากยีน *phaC* นำมาเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆในจีโนม *Bacillus* sp. ได้ผลดังแสดงในภาพ 4.14ข จากผลที่ได้พบว่าพีเอชบีซินเทสของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU44 ใกล้เคียงกับ *Bacillus* sp. (WP 013055939.1) มากที่สุดที่ 96.81% และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



#### 4.11.2 ผลการแสดงผลการออกของโปรตีนลูกผสมพีเอชบีซินเทสในแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3)

ในการศึกษาการแสดงผลการออกของโปรตีนลูกผสมพีเอชบีซินเทสพบว่าการแสดงผลการออกตั้งแต่ 1 ชั่วโมง หลังจากเหนี่ยวนำด้วย IPTG โดยมีการแสดงผลการออกมากที่สุดที่ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.15ก) เนื่องจากโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้มีการติด His-Tag เพื่อใช้ในการติดตาม และ ตรวจสอบขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot ร่วมกับ HisDetector™ Nickel-AP (KPL) ผลที่ได้พบว่าโปรตีนที่แสดงผลการออกมีขนาด 41.5 กิโลดาลตันซึ่งขนาดของโปรตีนใกล้เคียงกับพีเอชบีซินเทสของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* (Tsuge. et al. 2015)

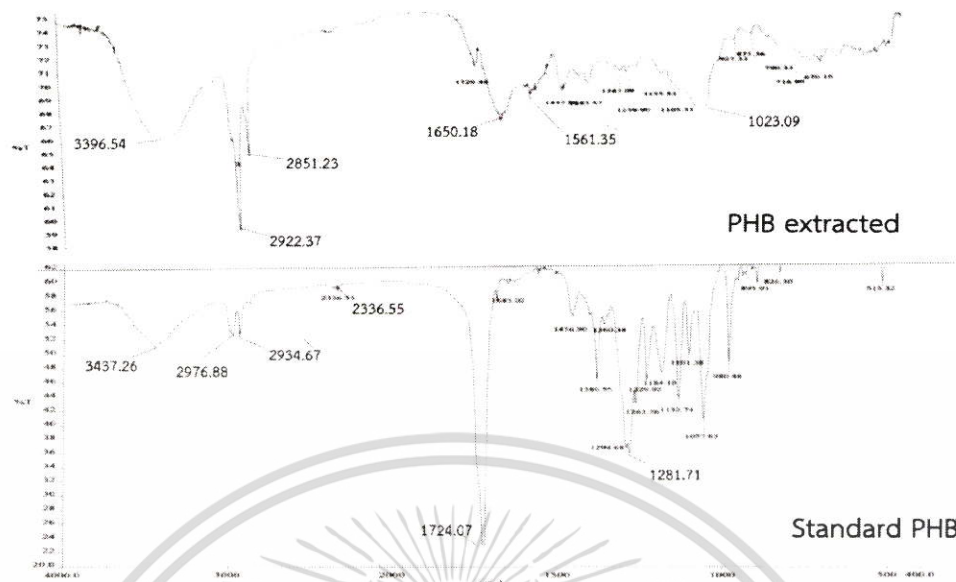


ภาพที่ 4.15 ตรวจสอบการแสดงผลการออกของโปรตีนลูกผสมพีเอชบีซินเทสที่ผลิตจาก *E. coli* BL21 (DE3) หลังจากเหนี่ยวนำด้วย IPTG ด้วยเทคนิค SDS-PAGE M (ก) และ เทคนิค western blot (ข)

#### 4.11.3 ผลการผลิตพีเอชบีในแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีการผลิตโปรตีนลูกผสม

ภายหลังจากสกัดพีเอชบีจากแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) ที่มีการผลิตโปรตีนลูกผสม ผลที่ได้พบของแข็งสีน้ำตาล หลังจากนำไปวิเคราะห์ด้วย FT-IR ปรากฏว่าไม่พบพีคของหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญของพีเอชบี เมื่อเทียบกับพีเอชบีมาตรฐานโดยหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ (ภาพที่ 4.16) ซึ่งการที่ *E. coli* BL21(DE3) ที่ผลิตโปรตีนลูกผสมพีเอชบีซินเทสไม่พบการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์อาจเนื่องจากการแสดงผลการออกของโปรตีนลูกผสมพีเอชบีซินเทสของ *E. coli* BL21(DE3) เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อกระบวนการสังเคราะห์พีเอชบี ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ใช้ชุดยีน *phaCAB* แสดงออกในเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* DH5 และ พบการสะสมของพีเอชบีในเซลล์ (Hiroe. et al. 2012) แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยของ (Mahishi. et al. 2003) ที่แสดงออกเฉพาะยีน *phaC<sub>sa</sub>* และ *phaB<sub>sa</sub>* จาก *Streptomyces aureofaciens* NRRL 2209 เพื่อดูการสะสมพีเอชบีของ *E. coli* ในแหล่งคาร์บอนต่างๆซึ่งพบว่าไม่มีการสะสมพีเอชบีเมื่อใช้ซูโครส และ กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจากงานวิจัยข้างต้นจึงเป็นไปได้ว่านอกจากยีนที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์แล้ว แหล่งคาร์บอนที่ใช้ก็มีผลต่อการสะสมพีเอชบีเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.16 FTIR-Spectra ของตัวอย่างพีเอชบีที่สกัดจาก *E. coli* BL21(DE3) ที่ผลิตโพรตีนลูกผสมพีเอชบีชนิดพิเศษเปรียบเทียบกับพีเอชบีมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย และ ข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีการสะสมโพลีไฮดรอกซิลที่เรตภายในเซลล์จากมูลวัว และกากตะกอนน้ำเสียเบื้องต้นโดยการย้อมด้วย Sudan black B พบโคโลนีแบคทีเรียที่ติดสีดำชัดเจนจำนวน 5 ไอโซเลท จากทั้งหมด 94 ไอโซเลท แบ่งเป็นคัดแยกจากมูลวัว 4 ไอโซเลท (SWU29, SWU44, SWU47 และ SWU48) และ กากตะกอนน้ำเสีย 1 ไอโซเลท (SWU01) จากนั้นนำมายืนยันการผลิตพีเอชบีโดยการย้อมด้วย Nile blue A พบการเรืองแสงสีส้มแดง และสังเกตการสะสมพีเอชบีในเซลล์ โดยนำแบคทีเรียมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM) พบพีเอชบีสะสมอยู่ในลักษณะแกรนูลภายในเซลล์ จากนั้นนำแบคทีเรียมาระบุสายพันธุ์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และสร้างความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *16s rDNA* จากไฟโลเจเนติกทรี พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ อยู่ในจีนัส *Bacillus* spp. โดยสายพันธุ์ SWU01, SWU44, SWU47 และ SWU48 มีบรรพบุรุษร่วมกับ *B. megaterium* IAM13418 (accession number: D16273) และ สายพันธุ์ SWU29 มีบรรพบุรุษร่วมกับ *B. cereus* IAM12605 (accession number: D16273) และ *B. cereus* PG1 (accession number: KX762294) เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์มาทำการผลิตพีเอชบี พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 สามารถผลิตพีเอชบีได้สูงสุด 0.15 กรัมต่อลิตร และ สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีมากที่สุดคือ อาหาร modified M9 pH7 ที่ใช้ 2% โซเดียมอะซิเตต และ ยีสต์เป็นแหล่งคาร์บอน และ ไนโตรเจน โดยมีการผลิตพีเอชบีสูงสุดเท่ากับ 0.91 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 7.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร modified M9 เริ่มต้น พีเอชบีที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้นำมาการวิเคราะห์โครงสร้าง และสมบัติด้านอุณหภูมิจากพอลิเมอร์ด้วย FT-IR , <sup>1</sup>H-NMR, DSC และ TGA พบว่าพอลิเมอร์ที่สกัดได้คือ พีเอชบีโดยเปรียบเทียบกับพีเอชบีมาตรฐาน

การนำแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 มาใช้ในการผลิตพีเอชบี โดยใช้ขานอ้อย และ กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตพีเอชบีได้เท่ากับ 2.01 และ 1.26 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งพอลิเมอร์ที่ผลิตได้เป็นชนิดพีเอชบี

ในการแสดงออกของโปรตีนพีเอชบีซินเทสจากแบคทีเรีย สายพันธุ์ SWU044 ในระบบของแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21(DE3) ไม่สามารถกระตุ้นให้แบคทีเรีย *E. coli* ผลิตพีเอชบีได้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาปัจจัยอื่นที่สามารถเพิ่มการสะสมพีเอชบีในแบคทีเรีย
2. ทดลองวิธีสกัดพีเอชบีแบบอื่นๆเพื่อเพิ่มคุณภาพของพีเอชบี
3. นำของเสียหรือวัสดุทางการเกษตรอื่นๆมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน
4. ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพีเอชบีเพิ่มเติมเพื่อการพัฒนาสายพันธุ์ และการสังเคราะห์พีเอชบี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- จตุพร วุฒิกนกกาญจน์. 2558. การวิเคราะห์พอลิเมอร์ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี. [online]. Available : [www.seem.kmutt.ac.th/.../MTT656-Chapter%20%20Polymer%20...](http://www.seem.kmutt.ac.th/.../MTT656-Chapter%20%20Polymer%20...)
- ดารณี ปัดดา. 2012. FTIR-Raman Spectrometer. [online]. Available : <http://www.mfu.ac.th/center/stic/index.php/chemical-analysis-instrument-menu/item/139-ftir-raman-spectrometer.html>
- บัญชา พูลโกคา. 2559. สเปกโตรสโกปีและการพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสาร. กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บริษัท Wardpackaging. 2561. Bags Plastic & Other. [online]. Available : <https://www.wardpackaging.com.au/product-range/bags-plastic-other/>
- ประเวช อรรถวัฒน์วงศ์. 2561. Molecular Phylogenetic I Concepts and Terminology. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยมหิดล.
- พรเทพ ถนนแก้ว. 2553. “โพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต:พลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้.” *วารสารศูนย์บริการวิชาการ*. ปีที่18 : 27-30
- วิระพล วงศ์ชนะพิบูลย์. 2556. เคมีพอลิเมอร์. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- วชิระ ยมาภัย และคณะ. 2012. พลาสติกชีวภาพ. [Online]. Available : <https://enchemcom1po.wordpress.com/bioplastics>
- ศูนย์เทคโนโลยีโลหะ และวัสดุแห่งชาติ. 2010. การศึกษาลักษณะและการวิเคราะห์พอลิเมอร์. . [online]. Available : [www.thaiplastics.org/content.../thailand\\_polymer\\_instrument\\_di.pdf](http://www.thaiplastics.org/content.../thailand_polymer_instrument_di.pdf).
- สถาบันพลาสติก. 2013. “Bioplastics Polymer of The Future.” *Plastics foresight*. Vol.08 -02 july-august : 1-80 [Online]. Available: [www.thaiplastics.org/content\\_attachment/attach/plasticsforesight\\_vol.8\\_.pdf](http://www.thaiplastics.org/content_attachment/attach/plasticsforesight_vol.8_.pdf)
- สรัญญา ขวพันธ์ และธรา มานะงาน. 2010. “การศึกษากระบวนการสกัด และหาคุณสมบัติเฉพาะของพอลิ-3-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตจากเชื้อ *Alcaligenes latus*.” *KKU Res J*. 15 (9) : 809-817
- สุพัฒน์ ชมใจ และสรมนต์ จงเจริญ. 2555. “อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ของ *Alcaligenes latus* ATCC 29714.” หน้า 32-39. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สมชาย แสงอำนาจเดช. 2008. “ขั้นตอนง่ายๆในการสร้างไฟโลเจเนติกทรี.” *Naresuan University Journal*. 16(2) : 181-188
- สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. 2558. **อุตสาหกรรมไบโอพลาสติก**. [online]. Available : <http://www.nesdb.go.th/portals/0/tasks/dev.../อุตสาหกรรมไบโอพลาสติก.pdf>
- Ajawatanawong, P. Atkinson, G.C. Watson-Haigh, N.S. MacKenzie, B. and Baldauf, S L. 2012. “SeqFIRE: A web application for automated extraction of indel regions and conserved blocks from protein multiple sequence alignments.” *Nucleic Acids Research* . 40(W1) : 340–347
- Altschul, S.F. Gish, W. Miller, W. Myers, E W. and Lipman, D J. 1990. “Basic local alignment search tool.” *Journal of Molecular Biology*. 215(3) : 403–410.
- Aramvash, A. Akbari Shahabi, Z. Dashti Aghjeh, S. and Ghafari , M.D. 2015. “Statistical physical and nutrient optimization of bioplastic polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator*.” *International Journal of Environmental Science and Technology*. 12(7) : 2307–2316.
- Anis, S. Iqbal, N.M. Kumar, S. and Al-Ashraf, A. 2013. “Increased recovery and improved purity of PHA from recombinant *Cupriavidus necator*.” *Bioengineered*. 4(2) : 115–118.
- Babruwad, P.R. Prabhu, S.U. Upadhyaya, K.P. and Hungund, B.S. 2015. “Production and Characterization of a Thermostable Bioplastic ( Poly-β-Hydroxybutyrate ) From *Bacillus Cereus* PW3A.” *J Biochem Tech*. 48(1) : 349–356
- Bagheriasl, S. 2012. “Development and Characterisation of PHB from Selected Baterial Species.” Ph.D.Dissertation, University of Birmingham.
- Balakrishna Pillai, A. Jaya Kumar, A. Thulasi, K. and Kumarapillai, H. 2017. “Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhatai*.” *Brazilian J. Microbiol*. 48(3) : 451–460.
- Bhuwal, K.A. Singh, G. Aggarwal, K.N. Goyal, V. and Yadav, A. 2013. “Isolation and Screening of Polyhydroxyalkanoates Producing Bacteria from Pulp, Paper, and Cardboard Industry Wastes.” *BioMed Research International*. Vol. 2013 : 1-11
- Bonilla, E. and Prella, A. 1987. “Application of Nile Blue and Nile red, two fluorescent probes, for detection of lipid droplets in human skeletal muscle.”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : *Official Journal of the Histochemistry Society*. 35(5) : 619–621

Borah, B. Thakur, P.S. Nigam, J.N. 2002. “The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017.” *Journal of Applied Microbiology*. 92(4) : 776–783.

Browne, C.A. 1919. “The Composition and Calorific Value of Sirups and Molasses Derived From Sugar Cane.” *J. Am. Chem. Soc.* 41(9) : 1432–1440.

Bujanga, N. Najwa, M. Rodhia, M. Musaa, M. Subaria, F. Idrisa, N. Mohd Makhtara, N.S. and Ku Hamid, K.H. 2013. “Effect of dilute sulfuric acid hydrolysis of coconut dregs on chemical and thermal properties.” *Procedia Engineering*. 68 ( 2013 ) : 372 – 378

Cameron, S. 2002. “Phenotypic and genotypic investigations into fluoroquinolone resistance in the genus *Acinetobacter*.” Ph.D.Thesis, University of Dundee

Chakraborty, P. Gibbons, W. and Muthukumarappan, K. 2009. “Conversion of volatile fatty acids into polyhydroxyalkanoate by *Ralstonia eutropha*.” *Journal of Applied Microbiology*. 106(6) : 1996–2005.

Chen, G-Q. 2010. “Plastics Completely Synthesized by Bacteria : Polyhydroxyalkanoates.” *Microbiology Monographs*. 14 : 17-37

Edgar, R.C. 2004. “MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.” *Nucleic Acids Research*. 32(5) : 1792–1797.

El Rabey, H.A. Albureikan, M.O. Aly, M.M. Kabli, A.S. Schneider, K. and Nölke G. 2017. “Isolation, Cloning and Sequencing of Poly 3-Hydroxybutyrate Synthesis Genes from Local Strain of *Bacillus cereus* mm7 and Expressing them in *E. coli*.” *J Investig Genomics*. 4(1) : 2-8

Endres, H-J. and Siebert-Raths, A. 2011. **Basic of PHA**. [Online]. Available : [https://issuu.com/bioplastics/docs/bioplasticsmagazine\\_1103](https://issuu.com/bioplastics/docs/bioplasticsmagazine_1103)

European Commission. 2011. “Plastic Waste: Ecological and Human Health Impacts.” **Science for Environmental Policy, In-Depth Reports**. November.41. [Online]. Available : [ec.europa.eu/environment/integration/research/newsalert/pdf/IR1\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/environment/integration/research/newsalert/pdf/IR1_en.pdf)

Gomaa, E.Z. 2014. “Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol.” *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 57(1) : 145–154.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Gouda, K.M. Swellam, E.A. and Omar, H.S. 2001. "Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources". *Microbiol. Res.* 156 : 201–207
- Granum, P.E. and Lund, T. 1997. "*Bacillus cereus* and its food poisoning toxins." *FEMS Microbiology letters.* 157: 223-228
- Guindon, S. Dufayard, J.F. Lefort, V. Anisimova, M. Hordijk, W. and Gascuel, O. 2010. "New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0." *Systematic Biology.* 59(3) : 307–321.
- Gouy, M. Guindon, S. Gascuel, O. 2010. "SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building." *Molecular Biology and Evolution.* 27(2) : 221–224.
- Hahn, S.K. Chang, Y.K. Kim, B.S. and Chang, H.N. 1994. "Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform." *Biotechnology and Bioengineering.* 44(2) : 256–261.
- Hanajima, D. Fukumoto, Y. Yasuda, T. Suzuki, K. Maeda, K. and Morioka, R. 2011. "Bacterial community dynamics in aerated cow manure slurry at different aeration intensities." *Journal of Applied Microbiology.* 111(6) : 1416–1425.
- Hiroe, A. Tsuge, K. Nomura, C.T. Itaya, M. and Tsuge, T. 2012. "Rearrangement of Gene Order in the *phaCAB* Operon Leads to Effective Production of Ultrahigh-Molecular-Weight poly [(R)-3-Hydroxybutyrate] in Genetically Engineered *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology.* 78(9) : 3177–84.
- Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F. 2001. "MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees." *Bioinformatics.* 17(8) : 754–755.
- Jendrossek, D. Selchow, O. and Hoppert, M. 2007. "Poly (3-hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane in *Caryophanon latum*." *Applied and Environmental Microbiology.* 73(2) : 586–593.
- Kung, S.S. Chuang, Y.C. Chen, C.H. and Chien, C.C. 2007. "Isolation of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria using a combination of phenotypic and genotypic approach." *Letters in Applied Microbiology.* 44(4) : 364–371.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lathwal, P. Nehra, K, Singh, M. Jamdagni, P. and Rana, J.S. 2015. "Optimization of culture parameters for maximum polyhydroxybutyrate production by selected bacterial strains isolated from rhizospheric soils." *Polish Journal of Microbiology*. 64(3) : 227–239.
- Lemey, P. Salemi, M. Vandamme, A-M. 2009. "Methods for inferring phylogenetic trees." **The Phylogenetic Handbook 2<sup>nd</sup>**. Cambridge University Press : New York
- Lemoigen, M. 1926. "Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acid ,B-oxybutyrique." *Bull. soc. chim. biol.* 8 : 770-782.
- Luengo, J.M. Garcia, B. Sandoval, A. Naharro, G. and Olivera, E.R. 2003. "Bioplastics from microorganisms." *Curr. Opin Microbiol.* 6 : 251–260
- Mahishi, L.H. Tripathi, G. and Rawal, S.K. 2003. "Poly (3-Hydroxybutyrate) (PHB) Synthesis by Recombinant *Escherichia coli* Harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB Biosynthesis Genes: Effect of Various Carbon and Nitrogen Sources." *Microbiological Research*. 158(1) : 19–27.
- Michael, D. 2004. "Biodegradable plastics" **Biodegradable Polymer Supply Chains: Implications and Opportunities for Australian Agriculture**. Wondu Holdings Pty Limited : Australia
- Miller, D.N. and Varel, V.H. 2001. "In vitro study of the biochemical origin and production limits of odorous compounds in cattle feedlots." *Journal of Animal Science* 79(12) : 2949–2956.
- Miller, G. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars." *Analytical Chemistry*. 31 : 426-429.
- Mizuno, K. Ohta, A. Hyakutake, M. Ichinomiya, Y. and Tsuge, T. 2010. "Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4." *Polymer Degradation and Stability*. 95(8) : 1335–1339.
- Montaser, N. Heidarinasab, A. and Arjmand, M. 2011. "Optimization of microbial culture for production of poly hydroxy butyrate (PHB) by *azotobacter beijerinckii* DSMZ-1041." *Petroleum Research*. Vol. 22(69) : 73 – 85
- Mudgal, S. Lyons, L. and Bain, J. 2011. "Plastic Waste in the Environment – Revised Final Report for European Commission DG Environment." [Online]. Available : <http://www.ec.europa.eu/enviromental/waste/studies/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pdf/plastics.

Noda, I. Marchessault, R.H. and Terda, M. 1999 . **Polymer Data Handbook**. Oxford England. University Press, Inc.

Nurbas, M. and Kutsal, T. 2004. “Production of PHB and P(HB-co-HV) Biopolymers by Using *Alcaligenes Eutrophus*.” *Iranian Polymer Journal*. 13 (1) : 45-51

Ostle, A.G and Holt, J. 1982. “Fluorescent Stain for Poly-3- Hydroxybutyrate.” *Applied and Environmental Microbiology*. 44(1) : 238–241

Palleroni, N.J. and Palleroni, A.V. 1978. “*Alcaligenes latus* , a New Species of Hydrogen-Utilizing Bacteria.” *International journal of systematic bacteriology*. vol. (July) : 416–424.

PlasticsEurope. 2013. **Plastics – the Facts 2013 An analysis of European plastics production, demand and waste data**. [online]. Available : [https://www.plasticseurope.org/download\\_file/view/479/179](https://www.plasticseurope.org/download_file/view/479/179)

PlasticsEurope. 2015. **Plastics – the Facts 2014/2015 An analysis of European plastics production, demand and waste data**. [online]. Available : [https://www.plasticseurope.org/download\\_file/view/479/179](https://www.plasticseurope.org/download_file/view/479/179)

Preethi, R. Sasikata, P. and Aravind, J. 2012. “Microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) utilizing fruit waste as a substrate.” *Research in Biotechnology*. 3(1) : 61-69

Potter, M. Madkour, M.H. Mayer, F. and Steinbüchel, A. 2002. “Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16.” *Microbiology*. 148 : 2413–2426

Porter, M. and Yu, J. 2011. “Crystallization Kinetics of Poly (3-hydroxybutyrate) Granules in Different Environmental Conditions.” *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2(3) : 301–310.

Rambaut, A. 2007. “**molecular evolution, phylogenetics and epidemiology**” [online]. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Rehm, B.H.A and Steinbüchel, A. 1999. “Biochemical and Genetic Analysis of PHA Synthases and Other Proteins Required for PHA Synthesis.” *International Journal of Biological Macromolecules*. 25(1) : 3–19.

Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P. 2003. “MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.” *Bioinformatics*. 19(12) : 1572–1574.

Schlegel, H.G. Lafferty, R. and Krauss, I. 1970. “ The isolation of mutants not accu-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- mulating poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid.” *Arch. Mikrobiologie* . 71(3) : 283–294.
- Sindhu, R. Ammu, B. Binod, P. Deepthi, K.S. Ramachandran, K. B. Soccol, R.C. and Pandey, A. 2011. “Production and Characterization of Poly-3-hydroxybutyrate from Crude Glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and Improving Its Thermal Properties by Blending with Other Polymers.” *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 54(4) : 783-794
- Singh, A.K. and Mallick, N. 2008. “Enhanced production of SCL-LCL-PHA co-polymer by sludge-isolated *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925.” *Applied Microbiology* . 1-8
- Singh, G. Kumari, A. Mittal, A. Yadav, A. and Aggarwal, K. N. 2013. “Poly  $\beta$ -Hydroxybutyrate Production by *Bacillus subtilis* NG220 Using Sugar Industry Waste Water.” *BioMed Research International*. Vol. 2013 : 1-11
- Smith, K. 2016. **Microplastics in the Ocean Now Outnumber Stars in Our Galaxy.** [Online]. Available: [www.onegreenplanet.org/news/microplastics-in-the-ocean](http://www.onegreenplanet.org/news/microplastics-in-the-ocean)
- Šprajcar, M. Horvat, P. and Kržan, A. 2012. **Biopolymers and Bioplastics Plastics Aligned With Nature.** National Institute of Chemistry, Ljubljana. 32. [Online]. Available : [www.plasticsindustry.org/sites/plastics.dev/files/2016PMWBioplasticsIA.pdf](http://www.plasticsindustry.org/sites/plastics.dev/files/2016PMWBioplasticsIA.pdf)
- Sudesh, K. Abe, H. and Doi, Y. 2000. “Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates:biological polyesters.” *Prog. Polym. Sci.* 25 : 1503-1555
- Suriyamongkol, P. Weselake, R. Narine, S. Moloney, M. and Shah, S. 2007. “Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants.” *Biotechnology Advances*. 25 : 148–175
- The Plastics Industry Trade Association . 2016. **PLASTICS MARKET WATCH: BIOPLASTICS. Summer 2016. Issue 6.** [Online]. Available : [www.plasticsindustry.org/sites/plastics.dev/files/2016PMWBioplasticsIA.pdf](http://www.plasticsindustry.org/sites/plastics.dev/files/2016PMWBioplasticsIA.pdf)
- Theobald, D. 2012. **The parts of a phylogenetic tree.** [Online]. Available : <http://www.talkorigins.org/faqs/comdesc/phylo.ht>
- Tsuge, T. Hyakutake, M and Mizuno, K. 2015. “Class IV Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthases and PHA-Producing *Bacillus*.” *Applied microbiology and biotechnology*. 99(15) : 6231-6240

- Wattanaphon, H.T. and Pisutpaisal N. 2011. "Production Production of Polyhydroxy dyroxyalkanoate Biopolyester from Glycerol using UASB Seed Culture." *The Journal of Applied Science*. 10(1) : 1-11
- Wei, L. and Mcdonald, A. 2015. "DSC and TMDSC : Multiple Melting Behavior In Annealed Bioplastic : Poly (3-hydroxybutyrate )." *TA Instruments*. December 2014 : 2-5.
- Wei, Y.H. Chen, W.C. Huang, C.K. Wu, H.S. Sun, Y.M. Lo, C.W. and Janarthanan, O.M. 2011. "Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains." *International Journal of Molecular Sciences*. 12 : 1252-1265.
- Wikimedia. 2015. **Polyhydroxybutyrate** . [online]. Available: <https://en.wikipedia.org/wiki/Polyhydroxybutyrate>
- Xiao, Z. Zhang, X. Gregg, D.J. and Saddler, J.N. 2004. "Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates." *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 113(116) : 1115-1126.
- Yuan, Q. Sparling, R. and Oleszkiewicz, J. 2015. "Polyhydroxybutyrate production from municipal wastewater activated sludge with different carbon sources". *Air, Soil and Water Research*. 8 : 53-58.
- Zhang, Y.P. 2015. "The Influence of Different Carbon Sources for Polyhydroxy alkanoates Storage." *Advanced Materials Research*. 1088 : 587-590.
- Zhang, Y. Sun, W. Wang, H. and Geng, A. 2013. "Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11". *Bioresource Technology*. 147 : 307-314.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

#### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

##### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani

ประกอบด้วย เปปโตน 10 กรัม 5 กรัม และ โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งเตรียมโดยใส่ Agar 1.5 % นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

##### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ NB (Nutrient Broth)

ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 3 กรัม เปปโตน 5 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งเตรียมโดยใส่ Agar 1.5 % นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

##### 3. อาหาร modified M9

ประกอบด้วย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  64 กรัม  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 กรัม  $\text{NaCl}$  2.5 กรัม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 กรัม  $\text{MgSO}_4$  1 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร (ปริมาตรต่อปริมาตร)  $\text{CaCl}_2$  1 โมลาร์ 100 ไมโครลิตร (ปริมาตรต่อปริมาตร) pH 7 ในน้ำ 1 ลิตร โดย 1 โมลาร์  $\text{MgSO}_4$  และ 1 โมลาร์  $\text{CaCl}_2$  ต้องเคลปฆ่าเชื้อแยกเพื่อป้องกันการตกตะกอนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมทั้งหมดจะถูกฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที

##### 4. การเตรียมกากน้ำตาล

ความเข้มข้นเริ่มต้น 77% (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำมาเจือจางให้ได้ 40% (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000xg เก็บส่วนที่เป็นน้ำแล้วทิ้งตะกอน จากนั้นนำแหล่งคาร์บอนที่เตรียมไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

##### 5. สารละลาย Sudan black B 0.5 %

ซังสีย้อม Sudan black B 0.5 g ละลายใน 70% เอทานอล 100 มิลลิลิตร

##### 6. สารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.85 %

ซังโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

##### 7. สารละลาย Nile Blue A 1%

ซังสีย้อม Nile Blue A 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา

## ภาคผนวก ข

ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *16s rDNA* และ Plasmid: pET-28 b (+)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *16s rDNA* ของแบคทีเรียที่คัดแยกจากกากตะกอนน้ำเสีย และ  
มูลวัว

>SWU44 accession number MH109380

GCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGTGGTTTTATGGGATTGGCTTGA  
CCTCGCGGTCTTGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGG  
GCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGC  
CCAACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC  
ACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGAACGCTCTA  
TCTCTAGAGTTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACC  
ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTA  
CCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGAAACCTCTAACACTTAG  
CACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCG  
CCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGC  
ATTTACCGCTACACGTGGAATTCCGCTTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGA  
CCCTCCACGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTACG  
CCCAATAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCC  
GTGGCTTCTGTTAGGTACCGTCAAGGTACAAGCAGTACTCTGTACTTGTCTTCCCTAAC  
AACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTC  
CATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGT  
GGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCCTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTA  
GCTAATGCACCGCGGGCCCATCTGTAAGTGATAGCCGAAACCATCTTCAATCATCTCCCATGA  
AGGAGAAGATCCTATCCGGTATTAGCTTCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGT  
TGCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACGTATAGAAGCA

>SWU47 accession number MH109381

GCGATTGAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGTGGTTTTATGGGAT  
TGGCTTGACCTCGCGGTCTTGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGT  
CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCT  
TAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC  
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGGA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ACGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGA  
 ATTA AACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCG  
 ACCGTA CTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTA  
 ACACCTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACG  
 CTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACAT  
 CTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCGCTTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTT  
 TCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGC  
 GCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGT  
 AGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACAAGCAGTTACTCTCGTACTTGTTCT  
 TCCCTAACACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGA  
 CTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGT  
 CCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTC  
 ACCAACTAGCTAATGCACCCGCGGGCCCATCTGTAAGTGATAGCCGAAACCATCTTCAATCATC  
 TCCCATGAAGGAGAAGATCCTATCCGGTATTAGCTTCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTAC  
 AGGCAGGTTGCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACGTCATAGAAGCAG

>SWU48 accession number MH109382

TTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGTTTATGGGATTGGCTTGACC  
 TCGCGGTCTTGACGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGC  
 ATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCC  
 AACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC  
 GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTGTCCCCGAAGGGGAACGCTCTATC  
 TCTAGAGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCAC  
 ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCC  
 CCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTTAACACTTAGCA  
 CTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGTTTCGCGCC  
 TCAGCGTCAGTTACAGACCAAAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCAT  
 TTCACCGCTACACGTGGAATTCCGCTTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACC  
 CTCCACGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTACGCC  
 CAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGT  
 GGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACAAGCAGTTACTCTTGTACTTGTTCTTCCCTAACAA  
 CAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCA  
 TTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCACTAGC  
 TAATGCACCGCGGGCCCATCTGTAAGTGATAGCCGAAACCATCTTCAATCATCTCCCATGAAG  
 GAGAAGATCCTATCCGGTATTAGCTTCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTG  
 CCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTCATAGAAGCAAG

**>SWU01 accession number MH109383**

CTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGTTTTATGGGATTGGCTTGAC  
 CTCGCGGTCTTGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGG  
 CATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCC  
 CAACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCA  
 CGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCCGAAGGGGAACGCTCTAT  
 CTCTAGAGTTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTGAATTAACCA  
 CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCACCGTACTC  
 CCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTTAGC  
 ACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCGC  
 CTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCA  
 TTTACCGCTACACGTGGAATTCCGCTTTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGAC  
 CCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTACGC  
 CCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCG  
 TGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACAAGCAGTTACTCTTGTACTTGTCTTCCCTAACAA  
 CAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCA  
 TTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGG  
 CCGATCACCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCACTAGC  
 TAATGCACCGCGGGCCCATCTGTAAGTGATAGCCGAAACCATCTTCAATCATCTCCCATGAAG  
 GAGAAGATCCTATCCGGTATTAGCTTCGGTTTCCCGAAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTG  
 CCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTC

**>SWU29 accession number MH109384**

GCGATTCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGTTTTATGAGAT  
 TAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGT  
 CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCT  
 TAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC  
 AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCTCCCCGAAGGAGAA

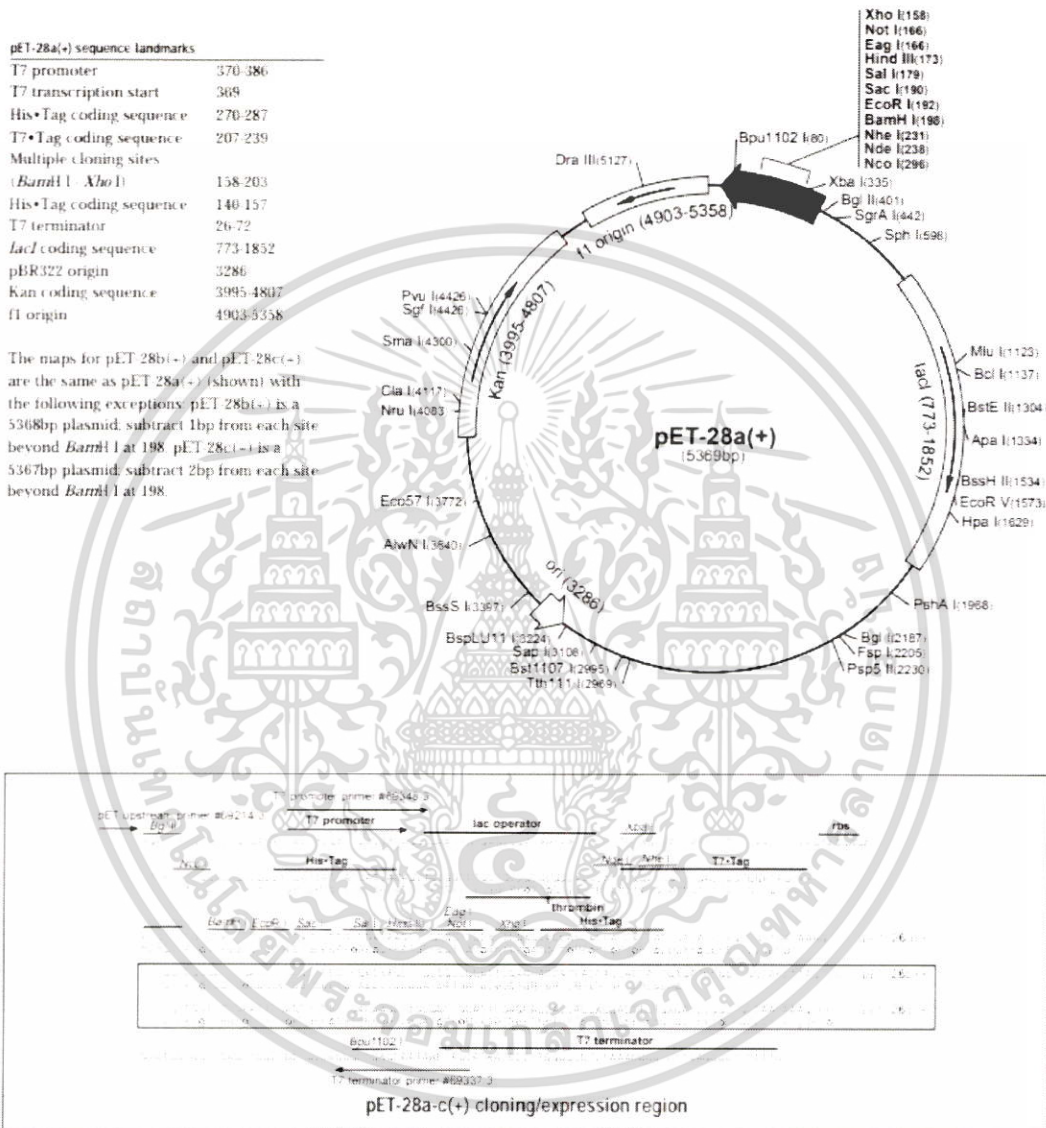
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAAT  
 TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGC  
 CGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCCTAAC  
 ACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCT  
 TTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCT  
 CTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTC  
 CAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGC  
 TTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG  
 TTAGCCGTGGCTTTCTGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTTCCT  
 CCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGAC  
 TTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTC  
 CCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCA  
 CCAACTAGCTAATGCGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCTTTCAATTTCGA  
 ACCATGCGGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGA



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ข-1 Plasmid: pET-28 b (+)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ค-1 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักฟิเอชบีของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร modified M9 ที่มีกลูโคส 2 % เป็นแหล่งคาร์บอนที่ 24 ชั่วโมง ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะสม

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักฟิเอชบีและน้ำหนักเซลล์แห้ง

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable:PHB

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	29	.08000	.02724	.015	.0193	.1407
		44	.10667	.02724	.003	.0460	.1674
		47	-.07667	.02724	.018	.0160	.1374
		48	.06000	.02724	.052	-.0007	.1207
	29	1	-.08000	.02724	.015	-.1407	-.0193
		44	.02667	.02724	.351	-.0340	.0874
		47	-.00333	.02724	.905	-.0640	.0574
		48	-.02000	.02724	.480	-.0807	.0407
	44	1	-.10667	.02724	.003	-.1674	-.0460
		29	-.02667	.02724	.351	-.0874	.0340
		47	-.03000	.02724	.297	-.0907	.0307
		48	-.04667	.02724	.118	-.1074	.0140
	47	1	-.07667	.02724	.018	-.1374	-.0160
		29	.00333	.02724	.905	-.0574	.0640
		44	.03000	.02724	.297	-.0307	.0907
		48	-.01667	.02724	.554	-.0774	.0440
48	1	-.06000	.02724	.052	-.1207	.0007	
	29	.02000	.02724	.480	-.0407	.0807	
	44	.04667	.02724	.118	-.0140	.1074	
	47	.01667	.02724	.554	-.0440	.0774	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable:CDW

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	29	-.06000	.03293	.098	-.1334	.0134
		44	.26333	.03293	.000	.1900	.3367
		47	.02667	.03293	.437	-.0467	.1000
		48	.17000	.03293	.000	.0966	.2434

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

29	1	.06000	.03293	.098	-.0134	.1334
	44	.32333	.03293	.000	.2500	.3967
	47	.08667	.03293	.025	.0133	.1600
	48	.23000	.03293	.000	.1566	.3034
44	1	-.26333	.03293	.000	-.3367	-.1900
	29	-.32333	.03293	.000	-.3967	-.2500
	47	-.23667	.03293	.000	-.3100	-.1633
	48	-.09333	.03293	.018	-.1667	-.0200
47	1	-.02667	.03293	.437	-.1000	.0467
	29	-.08667	.03293	.025	-.1600	-.0133
	44	.23667	.03293	.000	.1633	.3100
	48	.14333	.03293	.001	.0700	.2167
48	1	-.17000	.03293	.000	-.2434	-.0966
	29	-.23000	.03293	.000	-.3034	-.1566
	44	.09333	.03293	.018	.0200	.1667
	47	-.14333	.03293	.001	-.2167	-.0700

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพีเอชบี

cdw  
Duncan

bact	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
44	3	.4733			
48	3		.5667		
47	3			.7100	
1	3			.7367	.7367
29	3				.7967
Sig.		1.000	1.000	.437	.098

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	1,29,44, 47,48	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan <sup>a</sup>	44	3	.0467	
	29	3	.0733	
	47	3	.0767	
	48	3	.0933	.0933
	1	3		.1533
Sig.			.141	.052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ค-2 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพีเอชบีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 ที่เลี้ยงในอาหาร modified M9 ที่มีกลูโคส 2 % เป็นแหล่งคาร์บอน ในการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักพีเอชบี และน้ำหนักเซลล์แห้ง

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: PHB

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	24	24,36,48	-.03000	.02608	.277	-.0881	.0281
		24,60,72	-.09333	.02608	.005	-.1514	-.0352
		24,36,60	.06333	.02608	.036	.0052	.1214
		24,36,72	-.03667	.02608	.190	-.0948	.0214
	36	24,36,48	.03000	.02608	.277	-.0281	.0881
		24,36,60	-.06333	.02608	.036	-.1214	-.0052
		24,36,72	.09333	.02608	.005	.0352	.1514
		24,36,72	-.00667	.02608	.803	-.0648	.0514
	48	24,36,48	.09333	.02608	.005	.0352	.1514
		24,36,60	.06333	.02608	.036	.0052	.1214
		24,36,72	.15667	.02608	.000	.0986	.2148
		24,36,72	.05667	.02608	.055	-.0014	.1148
	60	24,36,48	-.06333	.02608	.036	-.1214	-.0052
		24,36,60	-.09333	.02608	.005	-.1514	-.0352
		24,36,72	-.15667	.02608	.000	-.2148	-.0986
		24,36,72	-.10000	.02608	.003	-.1581	-.0419
72	24,36,48	.03667	.02608	.190	-.0214	.0948	
	24,36,60	.00667	.02608	.803	-.0514	.0648	
	24,36,72	-.05667	.02608	.055	-.1148	.0014	
	24,36,72	.10000	.02608	.003	.0419	.1581	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Multiple Comparisons

Dependent Variable:PHB

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	24	36	-.03000	.02608	.277	-.0881	.0281
		48	-.09333	.02608	.005	-.1514	-.0352
		60	.06333	.02608	.036	.0052	.1214
		72	-.03667	.02608	.190	-.0948	.0214
	36	24	.03000	.02608	.277	-.0281	.0881
		48	-.06333	.02608	.036	-.1214	-.0052
		60	.09333	.02608	.005	.0352	.1514
		72	-.00667	.02608	.803	-.0648	.0514
	48	24	.09333	.02608	.005	.0352	.1514
		36	.06333	.02608	.036	.0052	.1214
		60	.15667	.02608	.000	.0986	.2148
		72	.05667	.02608	.055	-.0014	.1148
	60	24	-.06333	.02608	.036	-.1214	-.0052
		36	-.09333	.02608	.005	-.1514	-.0352
		48	-.15667	.02608	.000	-.2148	-.0986
		72	-.10000	.02608	.003	-.1581	-.0419
72	24	-.03667	.02608	.190	-.0214	.0948	
	36	.00667	.02608	.803	-.0514	.0648	
	48	-.05667	.02608	.055	-.1148	.0014	
	60	.10000	.02608	.003	.0419	.1581	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Multiple Comparisons

Dependent Variable:CDW

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	24	36	.04667	.16566	.784	-.3225	.4158
		48	-.77333	.16566	.001	-1.1425	-.4042
		60	-.31333	.16566	.088	-.6825	.0558
		72	-.23667	.16566	.184	-.6058	.1325
	36	24	-.04667	.16566	.784	-.4158	.3225
		48	-.82000	.16566	.001	-1.1891	-.4509
		60	-.36000	.16566	.055	-.7291	.0091
		72	-.28333	.16566	.118	-.6525	.0858
	48	24	.77333	.16566	.001	.4042	1.1425
		36	.82000	.16566	.001	.4509	1.1891
		60	.46000	.16566	.020	.0909	.8291
		72	.53667	.16566	.009	.1675	.9058

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

60	24	.31333	.16566	.088	-.0558	.6825
	36	.36000	.16566	.055	-.0091	.7291
	48	-.46000	.16566	.020	-.8291	-.0909
	72	.07667	.16566	.653	-.2925	.4458
72	24	.23667	.16566	.184	-.1325	.6058
	36	.28333	.16566	.118	-.0858	.6525
	48	-.53667	.16566	.009	-.9058	-.1675
	60	-.07667	.16566	.653	-.4458	.2925

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพีเอชบี

#### CDW

24,36, 48,60, 72	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan <sup>a</sup> 36	3	.6533	
24	3	.7000	
72	3	.9367	
60	3	1.0133	
48	3		1.4733
Sig.		.070	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

#### PHB

24,36, 48,60, 72	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan <sup>a</sup> 60	3	.0567		
24	3		.1200	
36	3		.1500	
72	3		.1567	.1567
48	3			.2133
Sig.		1.000	.209	.055

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-3 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักรเซลล์แห้ง และน้ำหนักรพีเอชบีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 ที่เลี้ยงในอาหาร modified M9 ที่มีกลูโคส 2 % เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 ชั่วโมง ในการหาความเป็นกรด-ด่าง (pH) เหมาะสมของอาหาร modified M9 ในการผลิตพีเอชบี

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักรพีเอชบีและน้ำหนักรเซลล์แห้ง

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable:PHB

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
LSD	5,6,7,8,9	5,6,7,8,9						
		5	6	-.00333	.02547	.898	-.0601	.0534
			7	-.03333	.02547	.220	-.0901	.0234
			8	.05667	.02547	.050	.0000	.1134
		9	.05333	.02547	.063	-.0034	.1101	
		6	5	.00333	.02547	.898	-.0534	.0601
			7	-.03000	.02547	.266	-.0868	.0268
			8	.06000	.02547	.040	.0032	.1168
			9	.05667	.02547	.050	.0000	.1134
		7	5	.03333	.02547	.220	-.0234	.0901
			6	.03000	.02547	.266	-.0268	.0868
			8	.09000	.02547	.005	.0332	.1468
			9	.08667	.02547	.007	.0299	.1434
		8	5	-.05667	.02547	.050	-.1134	.0001
			6	-.06000	.02547	.040	-.1168	-.0032
			7	-.09000	.02547	.005	-.1468	-.0332
		9	-.00333	.02547	.898	-.0601	.0534	
	9	5	-.05333	.02547	.063	-.1101	.0034	
		6	-.05667	.02547	.050	-.1134	.0001	
		7	-.08667	.02547	.007	-.1434	-.0299	
		8	.00333	.02547	.898	-.0534	.0601	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable:CDW

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
LSD	5,6,7,8,9	5,6,7,8,9						
		5	6	-.23000	.05861	.003	-.3606	-.0994
			7	-.18667	.05861	.010	-.3173	-.0561
			8	-.17000	.05861	.016	-.3006	-.0394
		9	-.27333	.05861	.001	-.4039	-.1427	
		6	5	.23000	.05861	.003	.0994	.3606
			7	.04333	.05861	.477	-.0873	.1739
			8	.06000	.05861	.330	-.0706	.1906
			9	-.04333	.05861	.477	-.1739	.0873

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7	5	.18667	.05861	.010	.0561	.3173
	6	-.04333	.05861	.477	-.1739	.0873
	8	.01667	.05861	.782	-.1139	.1473
	9	-.08667	.05861	.170	-.2173	.0439
8	5	.17000	.05861	.016	.0394	.3006
	6	-.06000	.05861	.330	-.1906	.0706
	7	-.01667	.05861	.782	-.1473	.1139
	9	-.10333	.05861	.108	-.2339	.0273
9	5	.27333	.05861	.001	.1427	.4039
	6	.04333	.05861	.477	-.0873	.1739
	7	.08667	.05861	.170	-.0439	.2173
	8	.10333	.05861	.108	-.0273	.2339

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักพีเอชบี

CDW			
5,6,7,8,9	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan <sup>a</sup>	5	3	.5600
	8	3	.7300
	7	3	.7467
	6	3	.7900
	9	3	.8333
Sig.			1.000 .131

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PHB			
5,6,7,8,9	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan <sup>a</sup>	8	3	.1100
	9	3	.1133
	5	3	.1667 .1667
	6	3	.1700 .1700
	7	3	.2000
Sig.			.053 .240

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-4 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพีเอชบีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 ที่เลี้ยงในอาหาร modified M9 pH 7 ที่ 48 ชั่วโมง ในการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักพีเอชบีและน้ำหนักเซลล์แห้ง

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable:PHB

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	.15667*	.04773	.011	.0466	.2667
		3	-.17333	.04773	.007	-.2834	-.0633
		4	.08000	.04773	.132	-.0301	.1901
	2	1	-.15667*	.04773	.011	-.2667	-.0466
		3	-.33000*	.04773	.000	-.4401	-.2199
		4	-.07667	.04773	.147	-.1867	.0334
	3	1	.17333	.04773	.007	.0633	.2834
		2	.33000*	.04773	.000	.2199	.4401
		4	.25333	.04773	.001	.1433	.3634
	4	1	-.08000	.04773	.132	-.1901	.0301
		2	-.07667	.04773	.147	-.0334	.1867
		3	-.25333*	.04773	.001	-.3634	-.1433

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable:CDW

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	.81000*	.02789	.000	.7457	.8743
		3	.88667*	.02789	.000	.8224	.9510
		4	.04667	.02789	.133	-.0176	.1110
	2	1	-.81000*	.02789	.000	-.8743	-.7457
		3	.07667	.02789	.025	.0124	.1410
		4	-.76333*	.02789	.000	-.8276	-.6990
	3	1	-.88667*	.02789	.000	-.9510	-.8224
		2	-.07667	.02789	.025	-.1410	-.0124
		4	-.84000*	.02789	.000	-.9043	-.7757
	4	1	-.04667	.02789	.133	-.1110	.0176
		2	.76333*	.02789	.000	.6990	.8276
		3	.84000*	.02789	.000	.7757	.9043

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักพีเอชบี

**CDW**

	1=glu,2 =fluc,3= SA,4=S u	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan <sup>a</sup>	3	3	.7000		
	2	3		.7767	
	4	3			1.5400
	1	3			1.5867
Sig.			1.000	1.000	.133

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**PHB**

	1=glu,2 =fluc,3= SA,4=S u	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan <sup>a</sup>	2	3	.0700		
	4	3	.1467	.1467	
	1	3		.2267	
	3	3			.4000
Sig.			.147	.132	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ค-5 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำหนักพีเอชบีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 ที่เลี้ยงในอาหาร modified M9 pH 7 ใช้โซเดียมอะซิเตดเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 48 ชั่วโมง ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมอะซิเตดในการผลิตพีเอชบี

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักพีเอชบีและน้ำหนักเซลล์แห้ง

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: PHB

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	0,1,2,3, 4,5	0,1,2,3, 4,5					
		1	-.41000	.04895	.000	-.5167	-.3033
		2	-.56000	.04895	.000	-.6667	-.4533
		3	-.49667	.04895	.000	-.6033	-.3900
	4	-.50667	.04895	.000	-.6133	-.4000	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	5						
1	0	.41000	.04895	.000	.3033	.5167	
	2	-.15000	.04895	.010	-.2567	-.0433	
	3	-.08667	.04895	.102	-.1933	.0200	
	4	-.09667	.04895	.072	-.2033	.0100	
	5	.20000	.04895	.002	.0933	.3067	
2	0	.56000	.04895	.000	.4533	.6667	
	1	.15000	.04895	.010	.0433	.2567	
	3	.06333	.04895	.220	-.0433	.1700	
	4	.05333	.04895	.297	-.0533	.1600	
	5	.35000	.04895	.000	.2433	.4567	
3	0	.49667	.04895	.000	.3900	.6033	
	1	.08667	.04895	.102	-.0200	.1933	
	2	-.06333	.04895	.220	-.1700	.0433	
	4	-.01000	.04895	.842	-.1167	.0967	
	5	.28667	.04895	.000	.1800	.3933	
4	0	.50667	.04895	.000	.4000	.6133	
	1	.09667	.04895	.072	-.0100	.2033	
	2	-.05333	.04895	.297	-.1600	.0533	
	3	.01000	.04895	.842	-.0967	.1167	
	5	.29667	.04895	.000	.1900	.4033	
5	0	.21000	.04895	.001	.1033	.3167	
	1	-.20000	.04895	.002	-.3067	-.0933	
	2	-.35000	.04895	.000	-.4567	-.2433	
	3	-.28667	.04895	.000	-.3933	-.1800	
	4	-.29667	.04895	.000	-.4033	-.1900	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: CDW

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	0	1	-.88333	.06793	.000	-1.0313	-.7353
		2	-.99333	.06793	.000	-1.1413	-.8453
		3	-.89000	.06793	.000	-1.0380	-.7420
		4	-.68667	.06793	.000	-.8347	-.5387
		5	-.27667	.06793	.002	-.4247	-.1287
1	0	2	.88333	.06793	.000	.7353	1.0313
		3	-.11000	.06793	.131	-.2580	.0380
		4	-.00667	.06793	.923	-.1547	.1413
		5	.19667	.06793	.013	.0487	.3447
		5	.60667	.06793	.000	.4587	.7547
2	0	1	.99333	.06793	.000	.8453	1.1413
		1	.11000	.06793	.131	-.0380	.2580

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	3	.10333	.06793	.154	-.0447	.2513
	4	.30667	.06793	.001	.1587	.4547
	5	.71667	.06793	.000	.5687	.8647
3	0	.89000	.06793	.000	.7420	1.0380
	1	.00667	.06793	.923	-.1413	.1547
	2	-.10333	.06793	.154	-.2513	.0447
	4	.20333	.06793	.011	.0553	.3513
	5	.61333	.06793	.000	.4653	.7613
4	0	.68667	.06793	.000	.5387	.8347
	1	-.19667	.06793	.013	-.3447	-.0487
	2	-.30667	.06793	.001	-.4547	-.1587
	3	-.20333	.06793	.011	-.3513	-.0553
	5	.41000	.06793	.000	.2620	.5580
5	0	.27667	.06793	.002	.1287	.4247
	1	-.60667	.06793	.000	-.7547	-.4587
	2	-.71667	.06793	.000	-.8647	-.5687
	3	-.61333	.06793	.000	-.7613	-.4653
	4	-.41000	.06793	.000	-.5580	-.2620

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล หน้าหนักเซลล์แห้งและหน้าหนักพีเอชบี

cdw

Duncan

0,1,2,3, 4,5	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	.1467			
5	3		.4233		
4	3			.8333	
1	3				1.0300
3	3				1.0367
2	3				1.1400
Sig.		1.000	1.000	1.000	.149

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## PHB

	0,1,2,3, 4,5	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan <sup>a</sup>	0	3	.0300			
	5	3		.2400		
	1	3			.4400	
	3	3			.5267	.5267
	4	3			.5367	.5367
	2	3				.5900
	Sig.		1.000	1.000	.084	.242

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ค-6 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักรเซลล์แห้ง และน้ำหนักรพีเอชบีของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01 ที่เลี้ยงในอาหาร modified M9 pH 7 ใช้ 2 % โซเดียมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 48 ชั่วโมง ในการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักรพีเอชบี และน้ำหนักรเซลล์แห้ง

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: PHB

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	-.23333	.03291	.000	-.3092	-.1574
		3	.52667	.03291	.000	.4508	.6026
		4	.33667	.03291	.000	.2608	.4126
	2	1	.23333	.03291	.000	.1574	.3092
		3	.76000	.03291	.000	.6841	.8359
		4	.57000	.03291	.000	.4941	.6459
	3	1	-.52667	.03291	.000	-.6026	-.4508
		2	-.76000	.03291	.000	-.8359	-.6841
		4	-.19000	.03291	.000	-.2659	-.1141
	4	1	-.33667	.03291	.000	-.4126	-.2608
		2	-.57000	.03291	.000	-.6459	-.4941
		3	.19000	.03291	.000	.1141	.2659

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Multiple Comparisons

Dependent Variable:CDW

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	-.23333	.02571	.000	-.2926	-.1740
		3	.83667	.02571	.000	.7774	.8960
		4	.47000	.02571	.000	.4107	.5293
	2	1	.23333	.02571	.000	.1740	.2926
		3	1.07000	.02571	.000	1.0107	1.1293
		4	.70333	.02571	.000	.6440	.7626
	3	1	-.83667	.02571	.000	-.8960	-.7774
		2	-1.07000	.02571	.000	-1.1293	-1.0107
		4	-.36667	.02571	.000	-.4260	-.3074
	4	1	-.47000	.02571	.000	-.5293	-.4107
		2	-.70333	.02571	.000	-.7626	-.6440
		3	.36667	.02571	.000	.3074	.4260

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักพีเอชบี

## PHB

	1=NH4 Cl,2=(N H4)2SO 4,3=yes st,4=pe ptone	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan <sup>a</sup>	3	3	.1533			
	4	3		.3433		
	1	3			.6800	
	2	3				.9133
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## CDW

	1=NH4 Cl,2=(N H4)2SO 4,3=yes st,4=pe ptone	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan <sup>a</sup>	3	3	.3133			
	4	3		.6800		
	1	3			1.1500	
	2	3				1.3833
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ค-7 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกที่เวลาต่างๆ

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

## Multiple Comparisons

Dependent Variable:reducingsugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	-.32333	.23522	.199	-.8474	.2008
		3	-1.09000	.23522	.001	-1.6141	-.5659
		4	-1.40000	.23522	.000	-1.9241	-.8759
		5	-1.93333	.23522	.000	-2.4574	-1.4092
	2	1	.32333	.23522	.199	-.2008	.8474
		3	-.76667	.23522	.009	-1.2908	-.2426
		4	-1.07667	.23522	.001	-1.6008	-.5526
		5	-1.61000	.23522	.000	-2.1341	-1.0859
	3	1	1.09000	.23522	.001	.5659	1.6141
		2	.76667	.23522	.009	.2426	1.2908
		4	-.31000	.23522	.217	-.8341	.2141
		5	-.84333	.23522	.005	-1.3674	-.3192
	4	1	1.40000	.23522	.000	.8759	1.9241
		2	1.07667	.23522	.001	.5526	1.6008
		3	.31000	.23522	.217	-.2141	.8341
		5	-.53333	.23522	.047	-1.0574	-.0092
	5	1	1.93333	.23522	.000	1.4092	2.4574
		2	1.61000	.23522	.000	1.0859	2.1341
		3	.84333	.23522	.005	.3192	1.3674
		4	.53333	.23522	.047	.0092	1.0574

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำตาลรีดิวซ์

reducingsugar

time	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Duncan <sup>a</sup> 1	3	1.5000		
2	3	1.8233		
3	3		2.5900	
4	3		2.9000	
5	3			3.4333
Sig.		.199	.217	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ค-8 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วย เอนไซม์เซลลูเลสที่เวลาต่างๆในการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

Multiple Comparisons

Dependent Variable:reducingsugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	0	24	-13.67667	.12028	.000	-13.9540	-13.3993
		48	-18.63667	.12028	.000	-18.9140	-18.3593
		72	-19.11667	.12028	.000	-19.3940	-18.8393
	24	0	13.67667	.12028	.000	13.3993	13.9540
		48	-4.96000	.12028	.000	-5.2374	-4.6826
		72	-5.44000	.12028	.000	-5.7174	-5.1626
	48	0	18.63667	.12028	.000	18.3593	18.9140
		24	4.96000	.12028	.000	4.6826	5.2374
		72	-.48000	.12028	.004	-.7574	-.2026
72	0	19.11667	.12028	.000	18.8393	19.3940	
	24	5.44000	.12028	.000	5.1626	5.7174	
	48	.48000	.12028	.004	.2026	.7574	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำตาลรีดิวซ์

		reducingsugar				
time	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Duncan <sup>a</sup>	0	3	.0000			
	24	3		13.6767		
	48	3			18.6367	
	72	3				19.1167
Sig.			1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ค-9 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสขาน้อยด้วย  
เอนไซม์เซลลูเลสที่เวลา 48 ชั่วโมงในการหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส  
ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

Multiple Comparisons

Dependent Variable:reducingsugar

	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	0	0.1122	-5.26667	.28353	.000	-5.8984	-4.6349
		0.2242	-21.67667	.28353	.000	-22.3084	-21.0449
		0.4484	-32.32333	.28353	.000	-32.9551	-31.6916
		0.8968	-33.27333	.28353	.000	-33.9051	-32.6416
	0.1122	0	5.26667	.28353	.000	4.6349	5.8984
		0.2242	-16.41000	.28353	.000	-17.0418	-15.7782
		0.4484	-27.05667	.28353	.000	-27.6884	-26.4249
		0.8968	-28.00667	.28353	.000	-28.6384	-27.3749
	0.2242	0	21.67667	.28353	.000	21.0449	22.3084
		0.1122	16.41000	.28353	.000	15.7782	17.0418
		0.4484	-10.64667	.28353	.000	-11.2784	-10.0149
		0.8968	-11.59667	.28353	.000	-12.2284	-10.9649
	0.4484	0	32.32333	.28353	.000	31.6916	32.9551
		0.1122	27.05667	.28353	.000	26.4249	27.6884
		0.2242	10.64667	.28353	.000	10.0149	11.2784
		0.8968	-.95000	.28353	.007	-1.5818	-.3182
0.8968	0	33.27333	.28353	.000	32.6416	33.9051	
	0.1122	28.00667	.28353	.000	27.3749	28.6384	
	0.2242	11.59667	.28353	.000	10.9649	12.2284	
	0.4484	.95000	.28353	.007	.3182	1.5818	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำตาลรีดิวซ์

**reducingsugar**

time	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Duncan <sup>a</sup>						
0	3	.0000				
0.1122	3		5.2667			
0.2242	3			21.6767		
0.4484	3				32.3233	
0.8968	3					33.2733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ค-10 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำหนักรีดิวซ์และน้ำหนักรีดิวซ์ที่ 24 และ 48 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณน้ำหนักรีดิวซ์และรีดิวซ์

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable:cdw

	(I)	(J)	95% Confidence Interval				
			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
LSD	1.24	1.48	-.55333	.69982	.452	-2.1671	1.0604
		2.24	-.33667	.69982	.643	-1.9504	1.2771
		2.48	-1.05333	.69982	.171	-2.6671	.5604
	1.48	1.24	.55333	.69982	.452	-1.0604	2.1671
		2.24	.21667	.69982	.765	-1.3971	1.8304
		2.48	-.50000	.69982	.495	-2.1138	1.1138
	2.24	1.24	.33667	.69982	.643	-1.2771	1.9504
		1.48	-.21667	.69982	.765	-1.8304	1.3971

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	2.48						
2.48	1.24	1.05333	.69982	.171	-5604	2.6671	
	1.48	.50000	.69982	.495	-1.1138	2.1138	
	2.24	.71667	.69982	.336	-.8971	2.3304	

### Multiple Comparisons

Dependent Variable:phb

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1.24	1.48	-.64667*	.22252	.020	-1.1598	-.1335
		2.24	-.24667	.22252	.300	-.7598	.2665
		2.48	-1.39333*	.22252	.000	-1.9065	-.8802
	1.48	1.24	.64667*	.22252	.020	.1335	1.1598
		2.24	.40000	.22252	.110	-.1131	.9131
		2.48	-.74667*	.22252	.010	-1.2598	-.2335
	2.24	1.24	.24667	.22252	.300	-.2665	.7598
		1.48	-.40000	.22252	.110	-.9131	.1131
		2.48	-1.14667*	.22252	.001	-1.6598	-.6335
	2.48	1.24	1.39333*	.22252	.000	.8802	1.9065
		1.48	.74667*	.22252	.010	.2335	1.2598
		2.24	1.14667*	.22252	.001	.6335	1.6598

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้งและฟิเอซบี

**phb**

1.24=molasses24h, 2.24=reducing sugar24h,1.48=mol asses48h,2.48= reducing sugar48h		N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan <sup>a</sup>	1.24	3	.6167		
	2.24	3	.8633	.8633	
	1.48	3		1.2633	
	2.48	3			2.0100
	Sig.		.300	.110	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**cdw**

1.24=molasses2 4h,2.24=reducin g sugar24h,1.48= molasses48h,2.4 8= reducing sugar48h		N	Subset for alpha = 0.05
			1
Duncan <sup>a</sup>	1.24	3	2.2667
	2.24	3	2.6033
	1.48	3	2.8200
	2.48	3	3.3200
	Sig.		.195

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

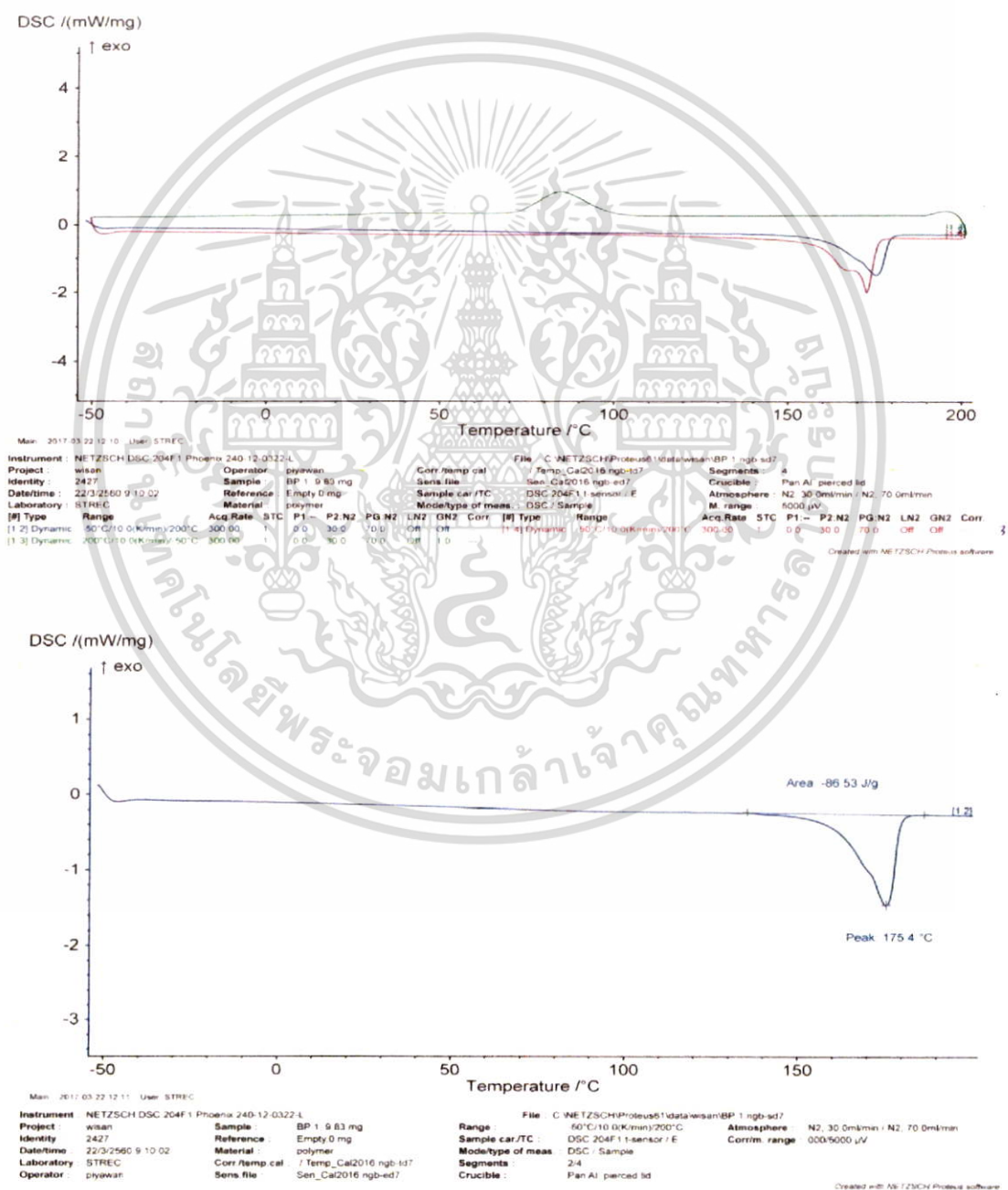
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

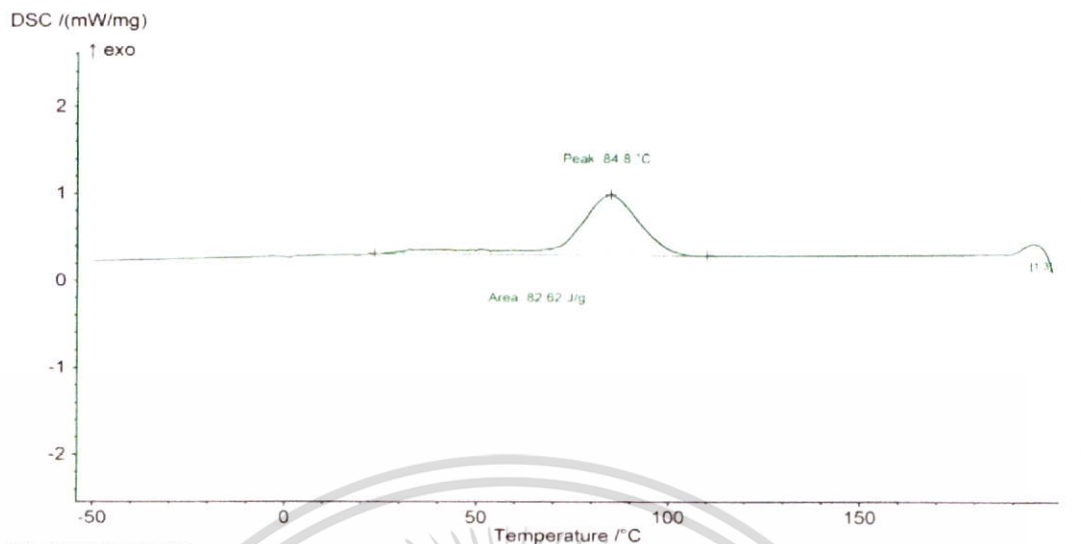
### ผลการวิเคราะห์โครงสร้าง และ คุณสมบัติด้านอุณหภูมิจ

1. การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านอุณหภูมิจของพอลิเมอร์ด้วยเครื่องDifferential scanning calorimetry (DSC) รุ่น model 204 F1 Phoenix®

ภาพที่ ง-1 DSCเทอร์โมแกรมแบบที่เรียสายพันธุ์ SWU01



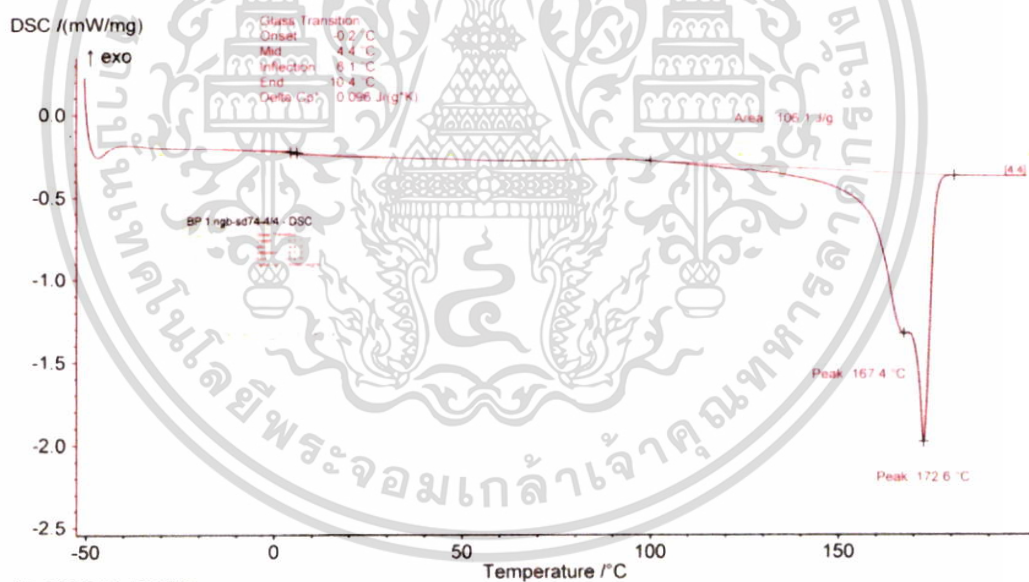
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Main: 2017-03-22 12:13 User: STREC

Instrument: NETZSCH DSC 204F1 Phoenix 240-12-0322-L	Sample: BP1_9.83 mg	Range: 200°C/10.0(K/min)/50°C	File: C:\NETZSCH\Proteus61\data\wisan\BP1.ngb-ed7	Atmosphere: N2 30.0ml/min / N2 70.0ml/min
Project: wisan	Reference: Empty 0 mg	Sample car./TC: DSC 204F1 I-sensor / E		Corr.im. range: 000/5000 uV
Identity: 2427	Material: polymer	Mode/type of meas: DSC / Sample		
Date/Time: 22/3/2560 9 10 02	Corr./temp cal: / Temp_Cal2016.ngb-ed7	Segments: 4/4		
Laboratory: STREC	Sens./file: Sen_Cal2016.ngb-ed7	Crucible: Pan Al pierced lid		
Operator: piyawan				

Created with NETZSCH Proteus software



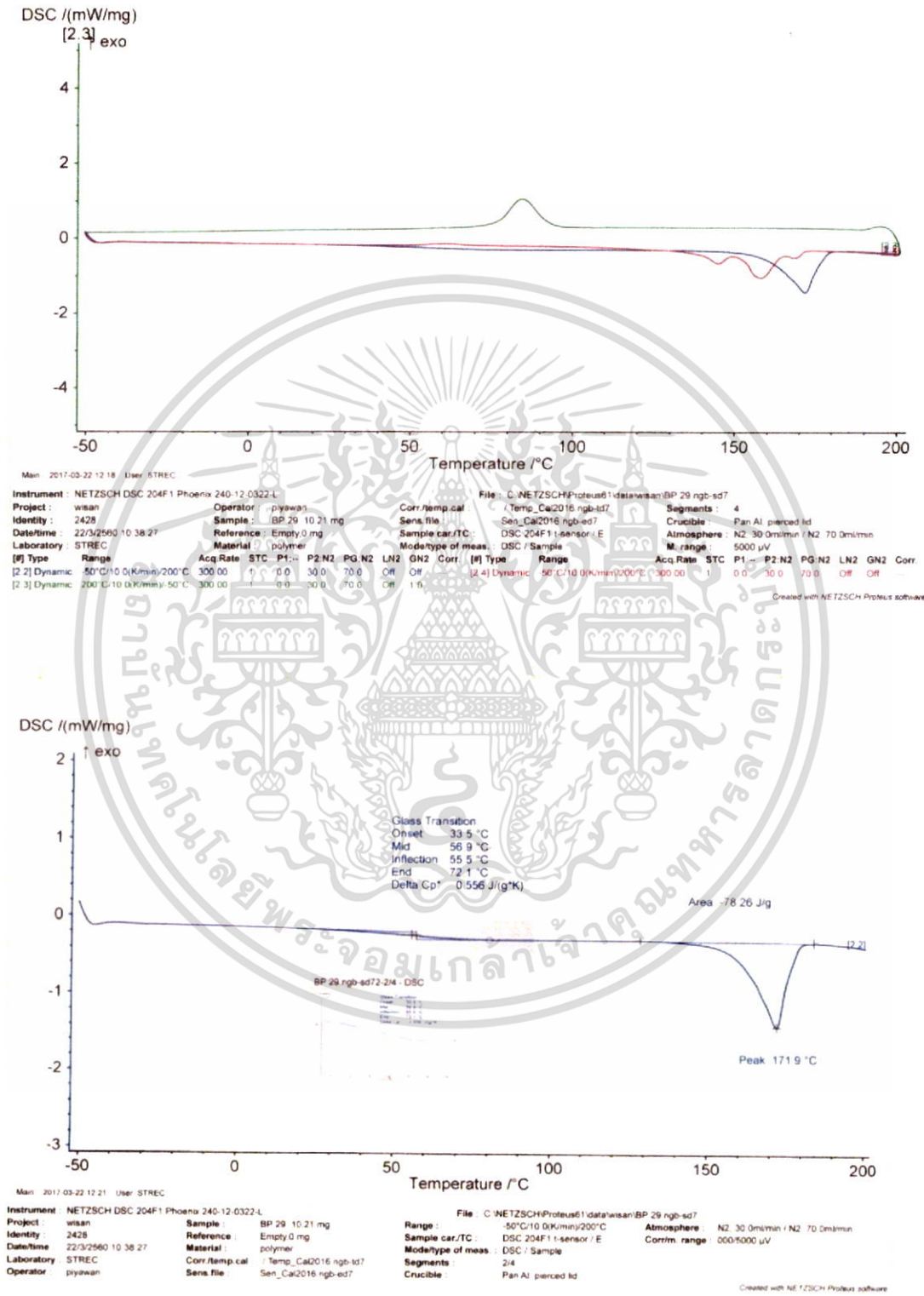
Main: 2017-04-27 11:11 User: STREC

Instrument: NETZSCH DSC 204F1 Phoenix 240-12-0322-L	Sample: BP1_9.83 mg	Range: -50°C/10.0(K/min)/200°C	File: C:\NETZSCH\Proteus61\data\wisan\BP1.ngb-ed7	Atmosphere: N2 30.0ml/min / N2 70.0ml/min
Project: wisan	Reference: Empty 0 mg	Sample car./TC: DSC 204F1 I-sensor / E		Corr.im. range: 000/5000 uV
Identity: 2427	Material: polymer	Mode/type of meas: DSC / Sample		
Date/Time: 22/3/2560 9 10 02	Corr./temp cal: / Temp_Cal2016.ngb-ed7	Segments: 4/4		
Laboratory: STREC	Sens./file: Sen_Cal2016.ngb-ed7	Crucible: Pan Al pierced lid		
Operator: piyawan				

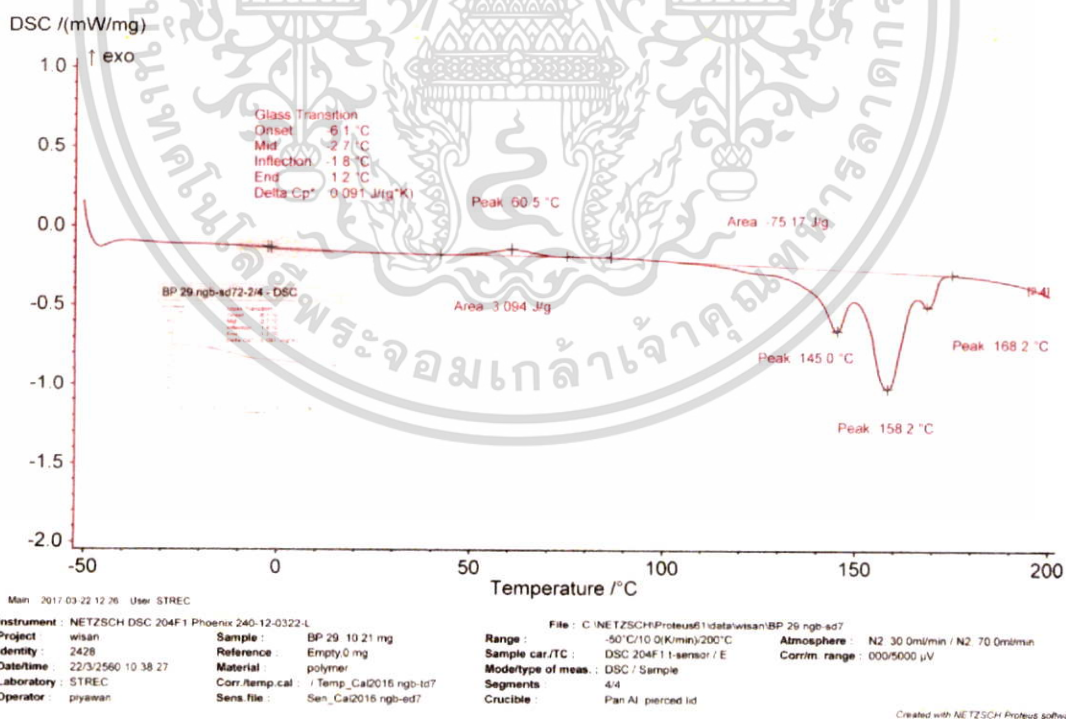
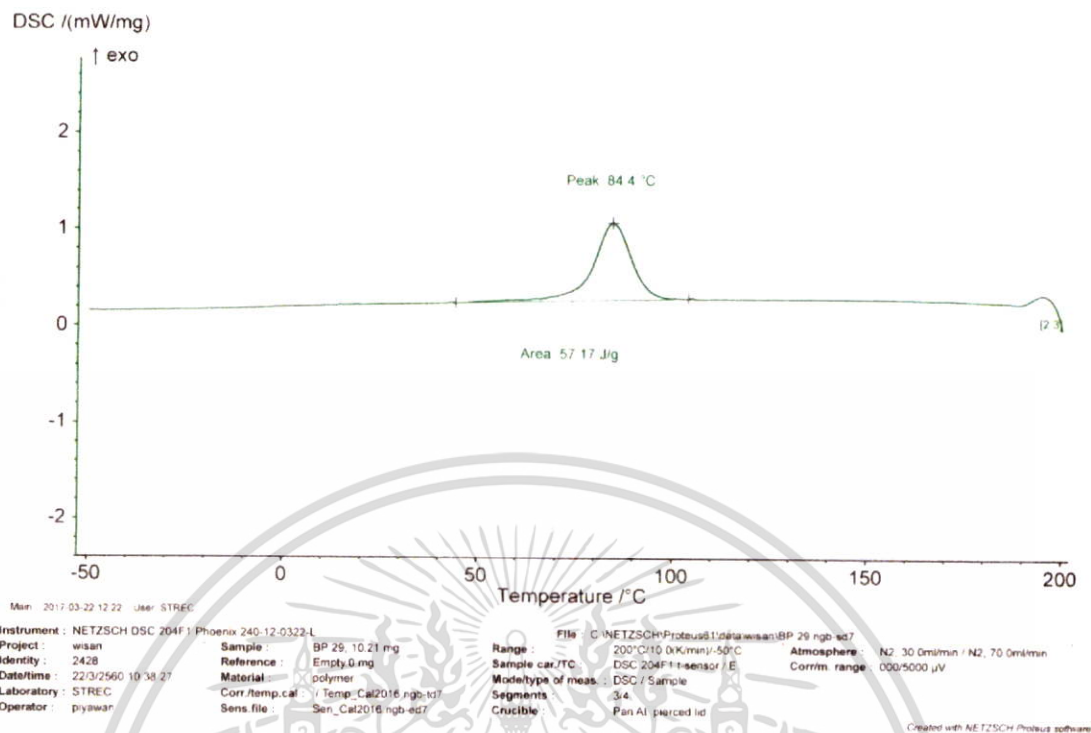
Created with NETZSCH Proteus software

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ง-2 DSC เทอร์โมแกรมแบบคทีเรียสายพันธุ์ SWU29

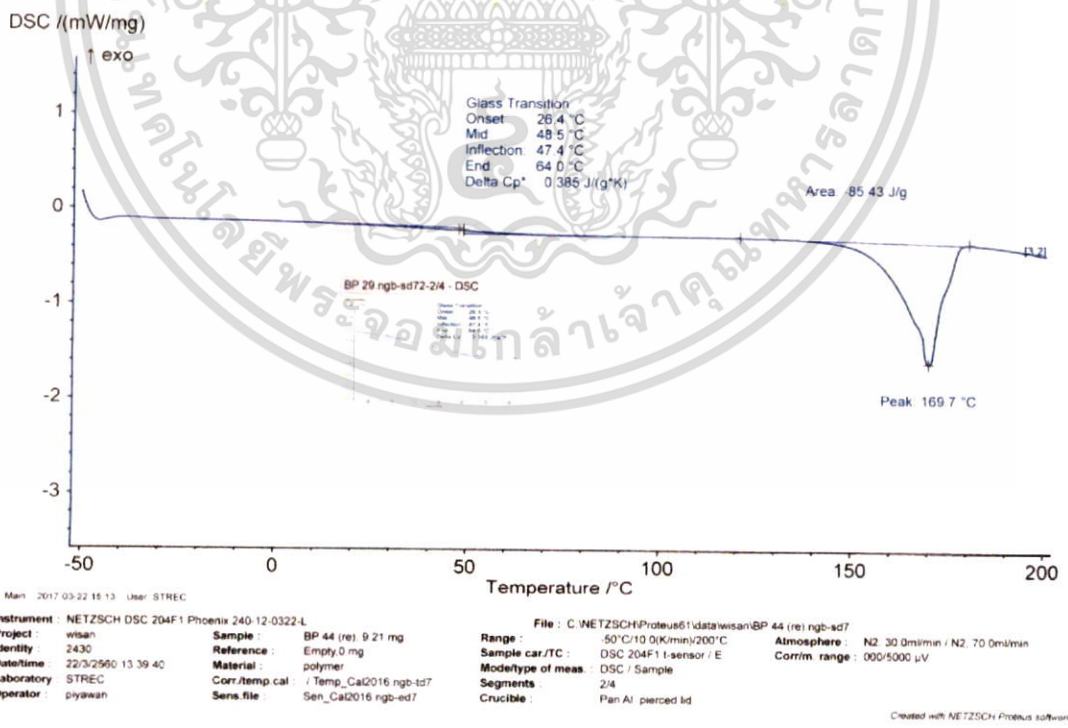
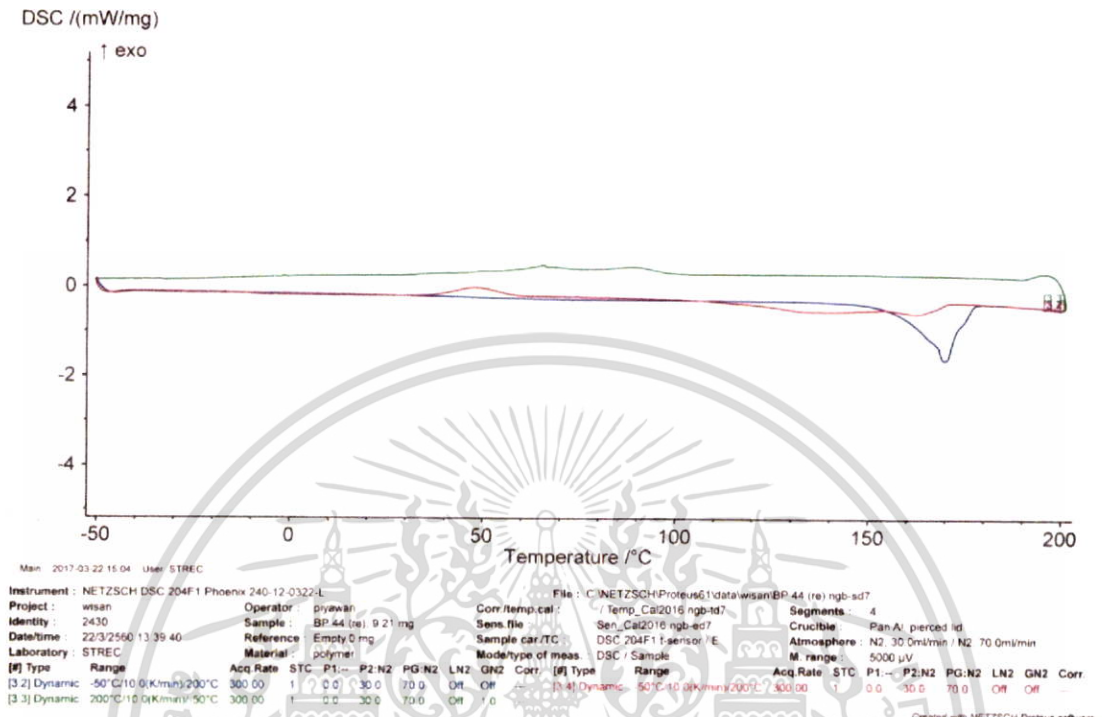


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

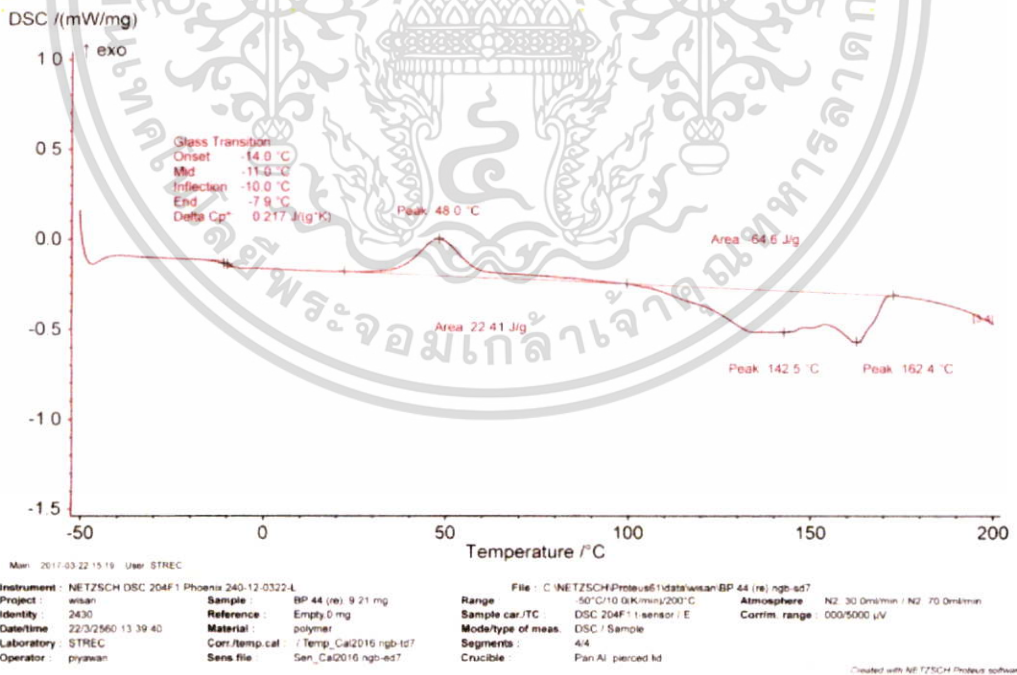
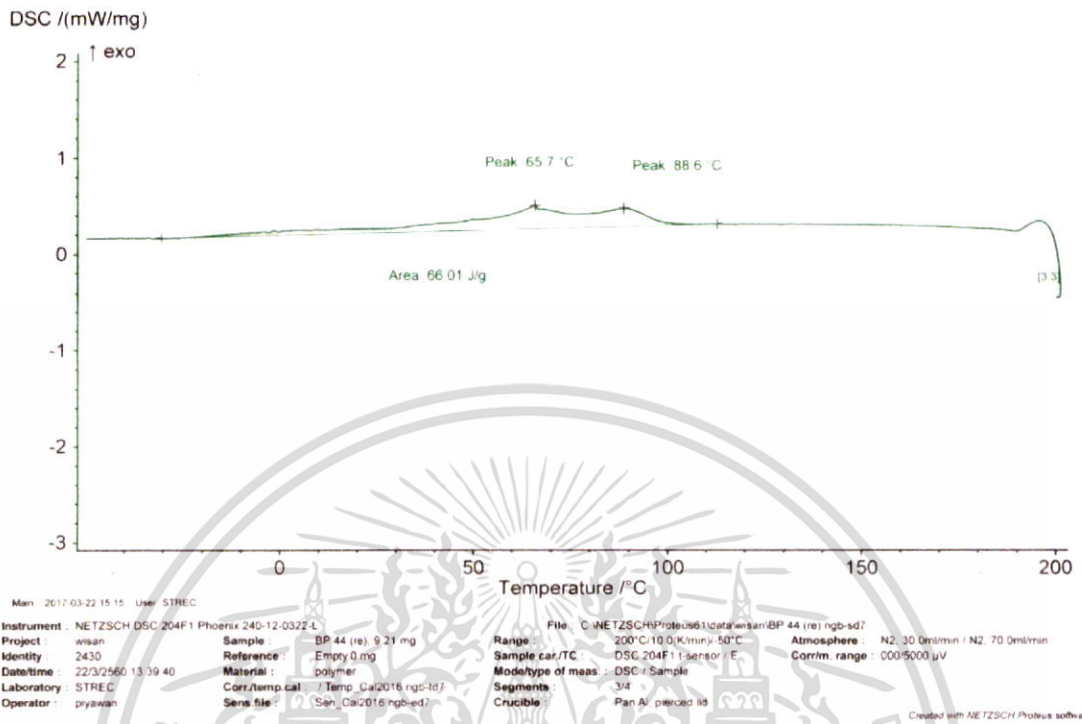


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ง-3 DSC เทอร์โมแกรมแบบคทีเรียสายพันธุ์ SWU44

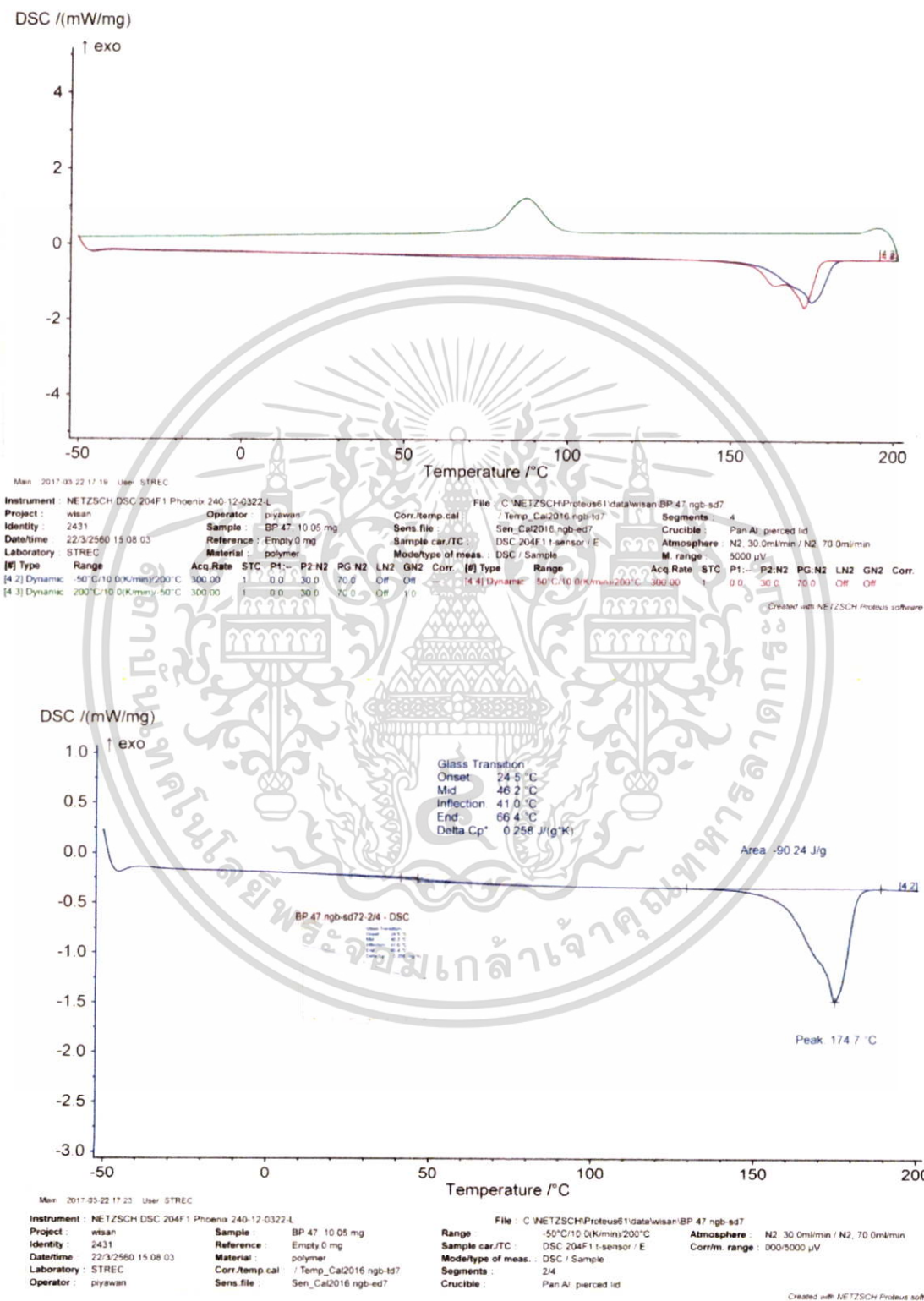


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

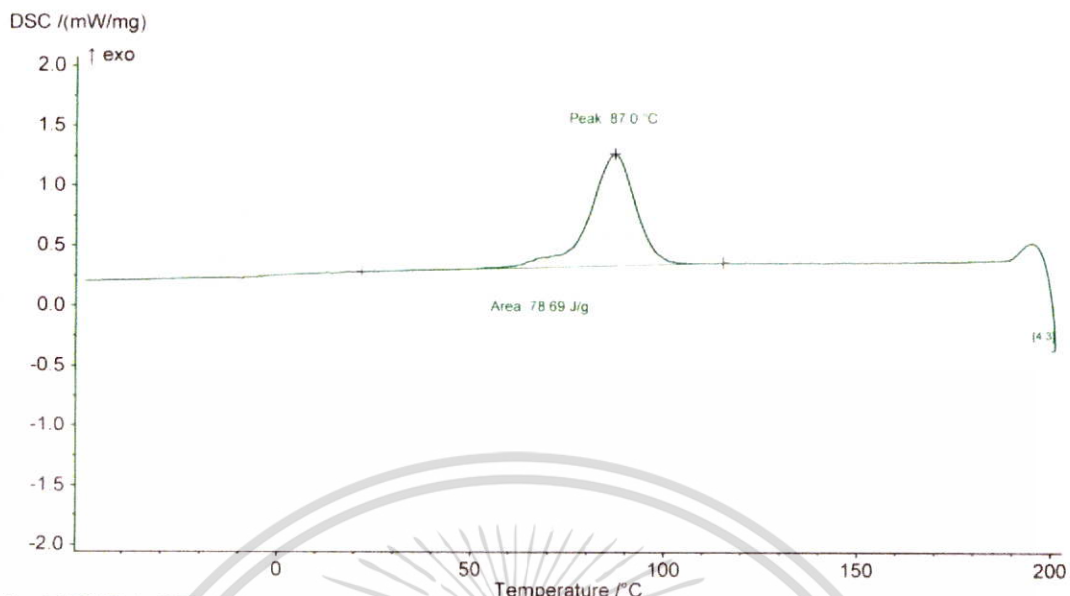


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ง-4 DSC เทอร์โมแกรมแบบคทีเรียสายพันธุ์ SWU47



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

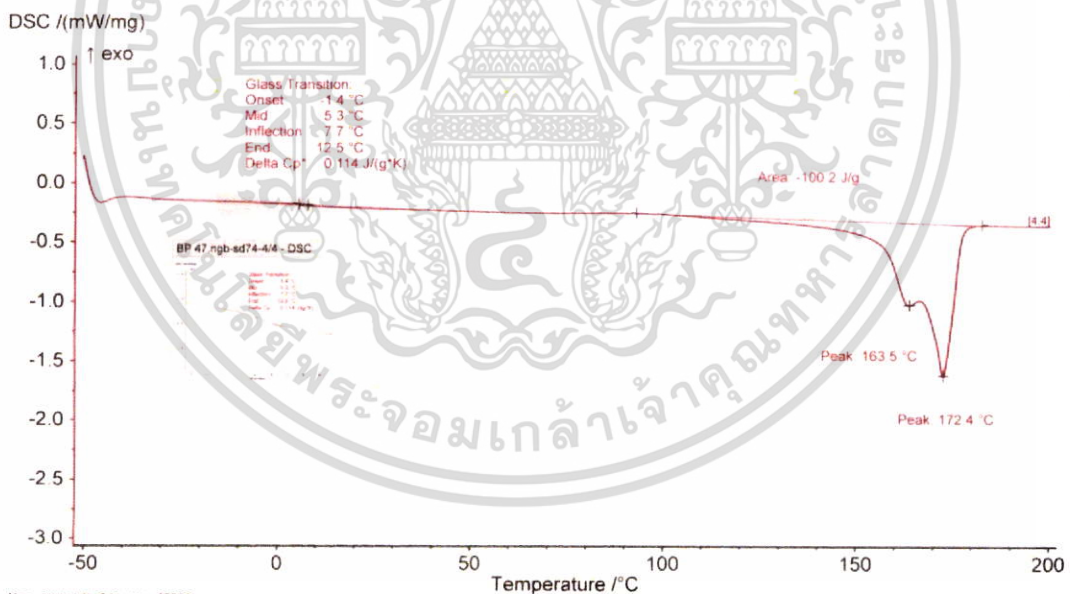


Man: 2017/03/22 17:25 User: STREC

Instrument: NETZSCH DSC 204F1 Phoenix 240-12-0322-L	Sample: BP 47 10.05 mg	File: C:\NETZSCH\Proteus61\data\wisani\BP 47 ngb-ed7
Project: wisani	Reference: Empty 0 mg	Range: 200°C/10.0(K/min)/50°C
Identity: 2431	Material: polymer	Sample car./TC: DSC 204F1 t-sensor / E
Date/time: 22/3/2560 15:08:03	Corr./temp.cal: / Temp_Cal2016 ngb-td7	Mode/type of meas.: DSC / Sample
Laboratory: STREC	Sens. file: Sen_Cal2016 ngb-ed7	Segments: 4/4
Operator: piyawan		Crucible: Pan Al, pierced lid

Atmosphere: N2 30.0ml/min / N2 70.0ml/min  
Corr./m. range: 000/5000 µV

Created with NETZSCH Proteus software



Man: 2017/03/22 17:29 User: STREC

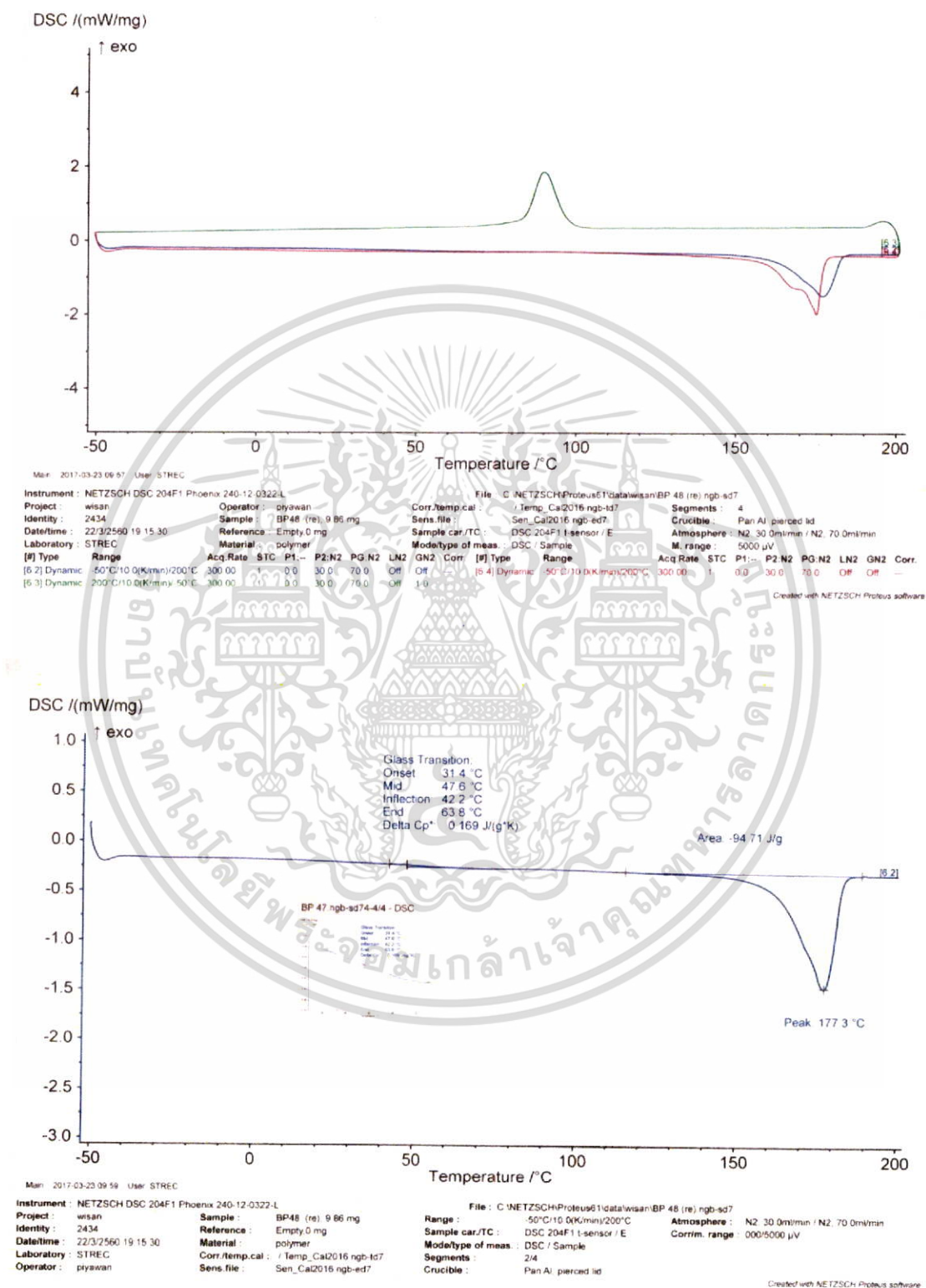
Instrument: NETZSCH DSC 204F1 Phoenix 240-12-0322-L	Sample: BP 47 10.05 mg	File: C:\NETZSCH\Proteus61\data\wisani\BP 47 ngb-ed7
Project: wisani	Reference: Empty 0 mg	Range: 50°C/10.0(K/min)/200°C
Identity: 2431	Material: polymer	Sample car./TC: DSC 204F1 t-sensor / E
Date/time: 22/3/2560 15:08:03	Corr./temp.cal: / Temp_Cal2016 ngb-td7	Mode/type of meas.: DSC / Sample
Laboratory: STREC	Sens. file: Sen_Cal2016 ngb-ed7	Segments: 4/4
Operator: piyawan		Crucible: Pan Al, pierced lid

Atmosphere: N2 30.0ml/min / N2 70.0ml/min  
Corr./m. range: 000/5000 µV

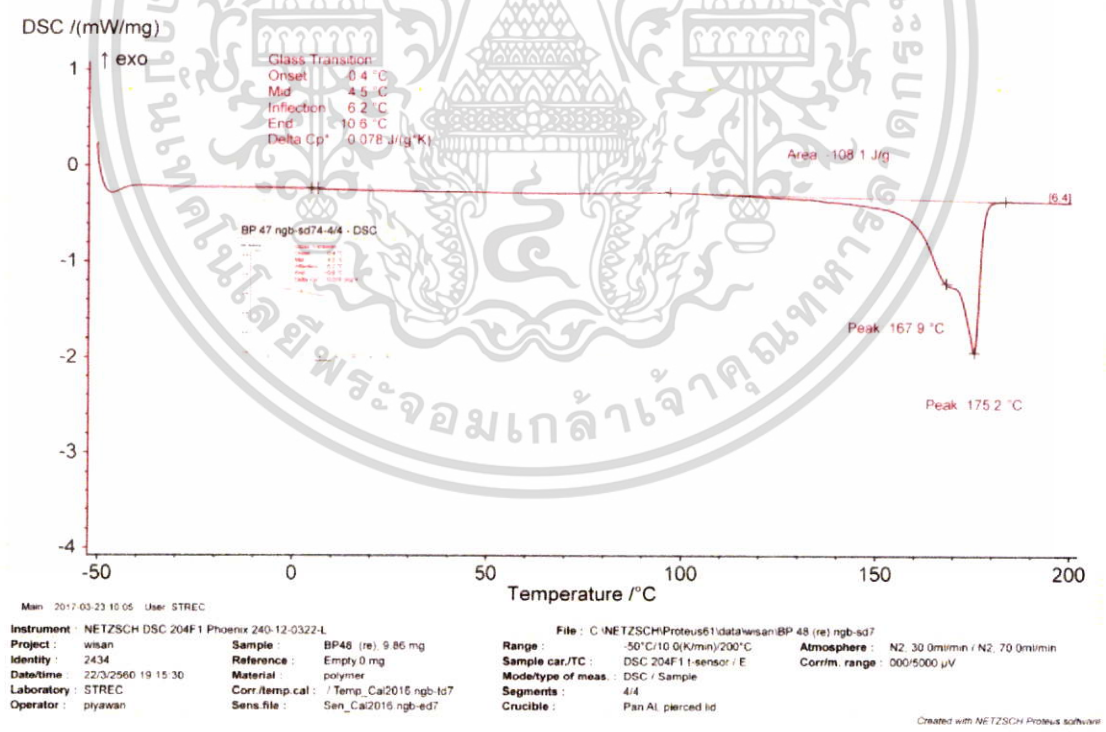
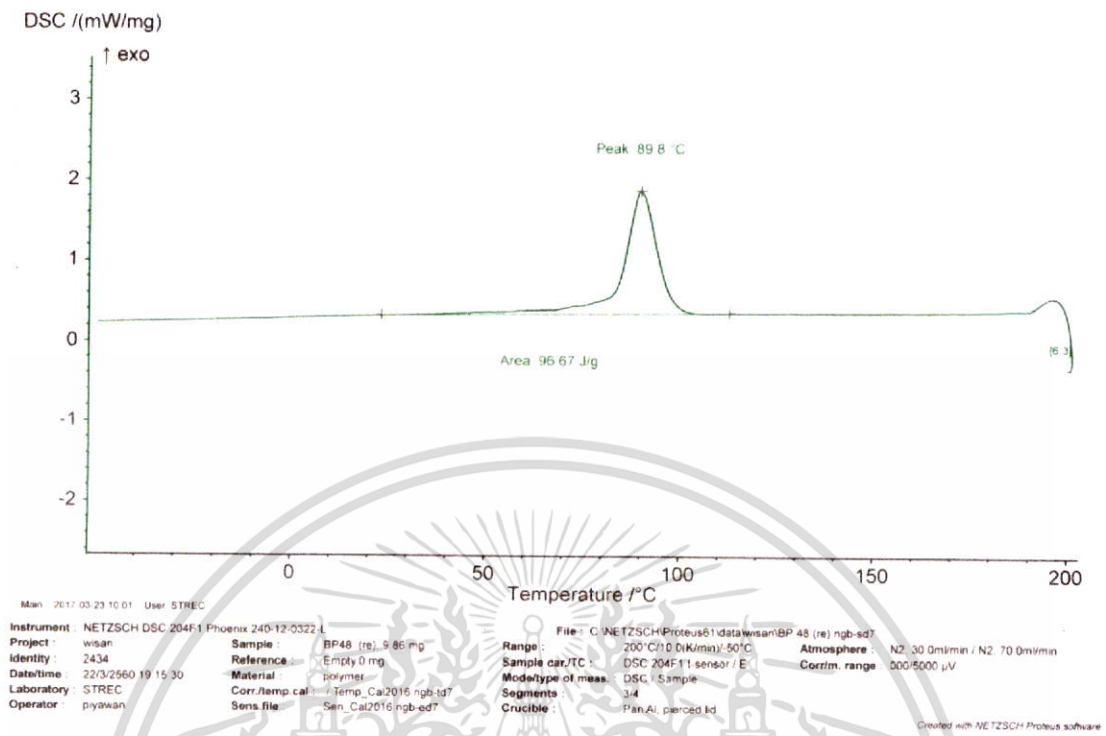
Created with NETZSCH Proteus software

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาพที่ ง-5 DSC เทอร์โมแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU48

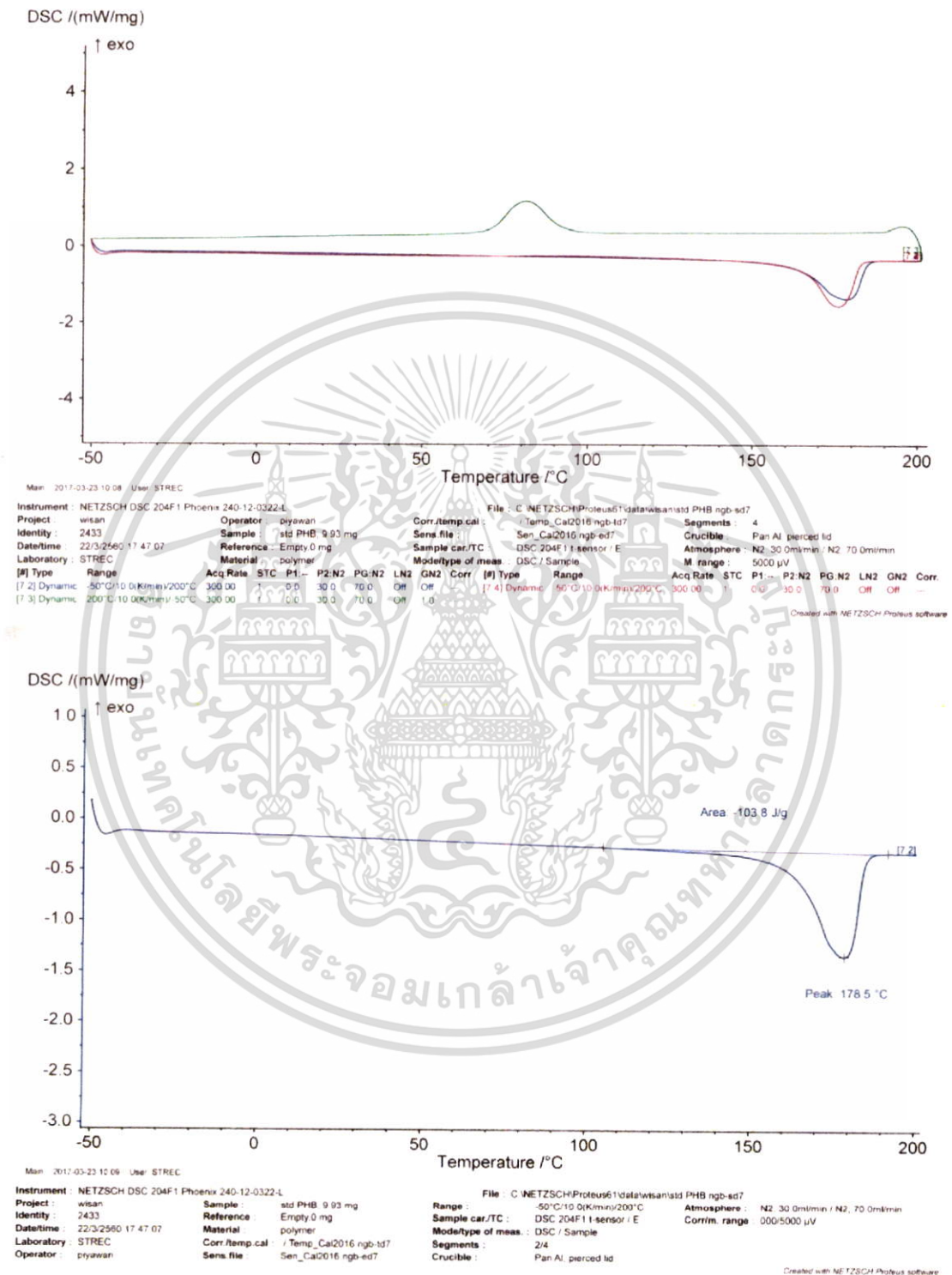


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

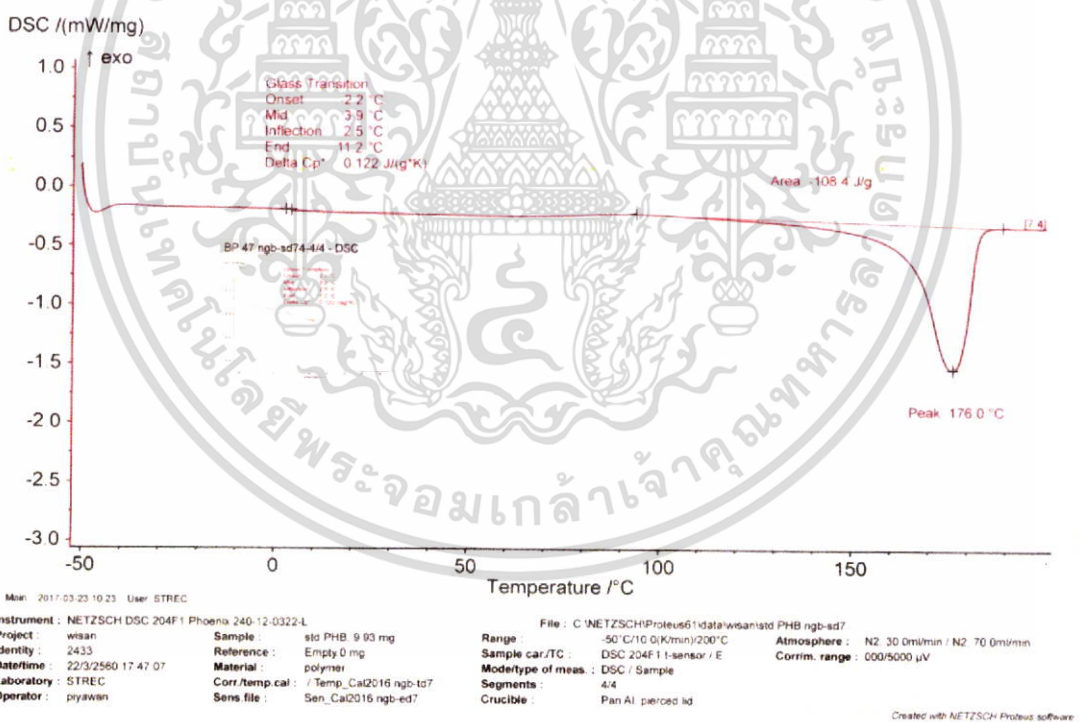
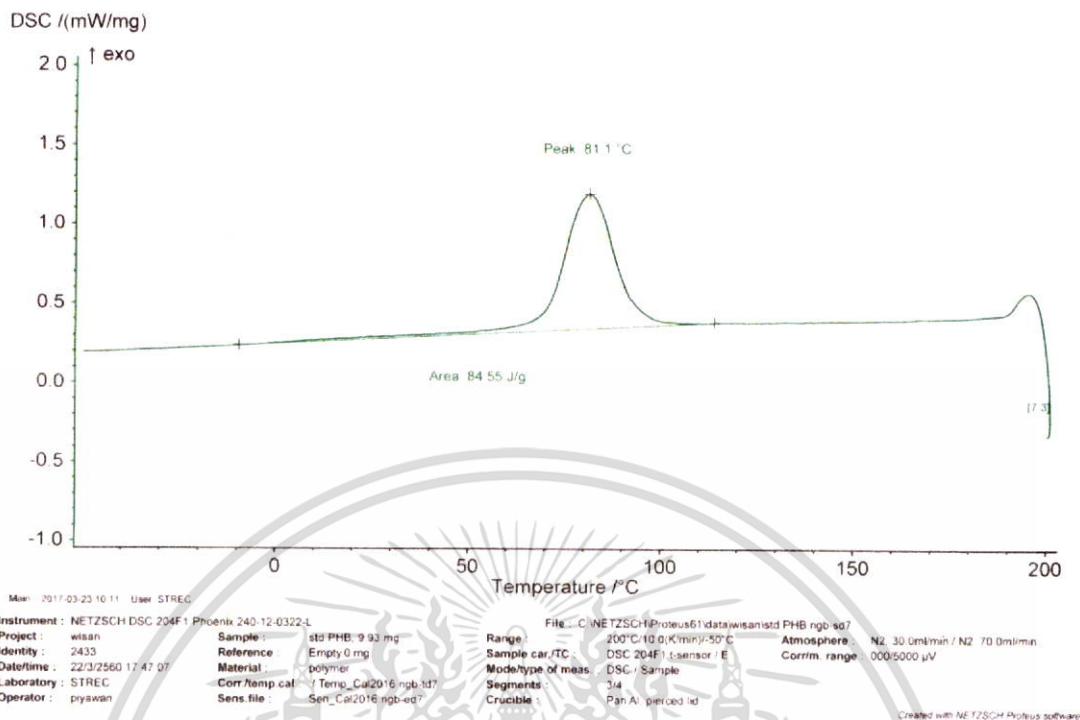


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาพที่ ง-6 DSC เทอร์โมแกรมของพีเอชบีมาตรฐาน



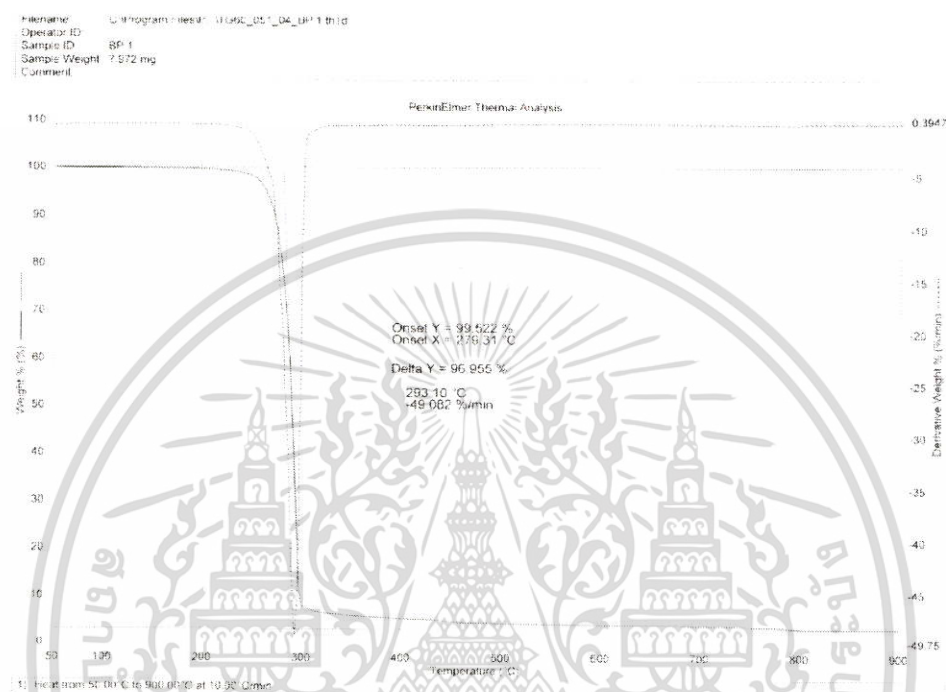
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. ผลวิเคราะห์ความเสถียรของพอลิเมอร์ด้วยเครื่อง Thermogravimetric analysis รุ่น Perkin Elmer PYRIS 1

ภาพที่ ง-7 TGA เทอร์โมแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01

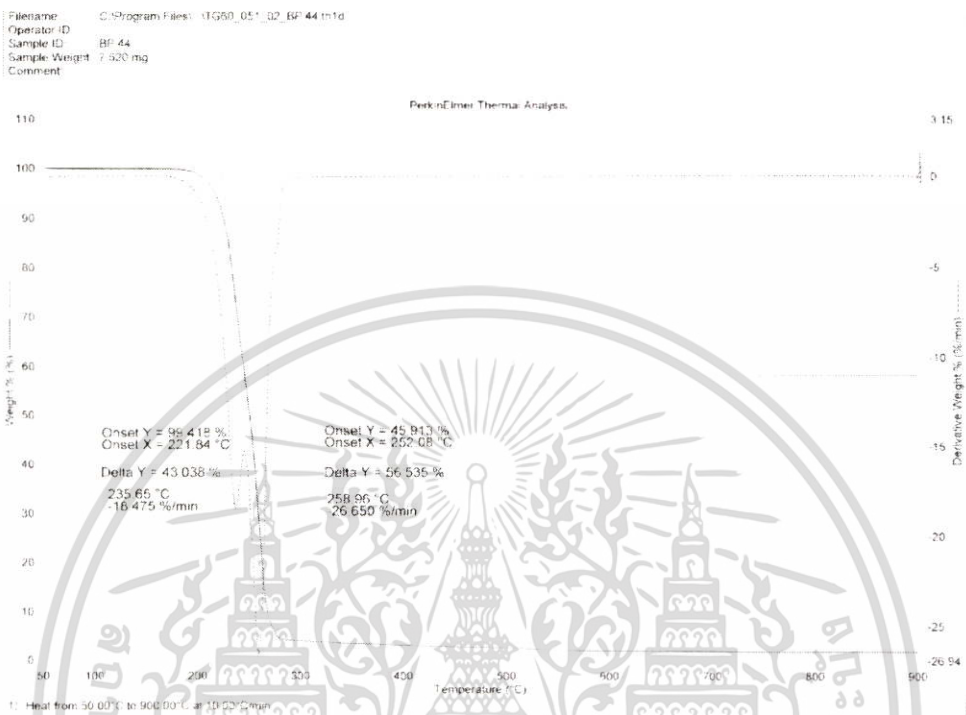


ภาพที่ ง-8 TGA เทอร์โมแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU29



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ง-9 TGA เทอร์โมแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU44

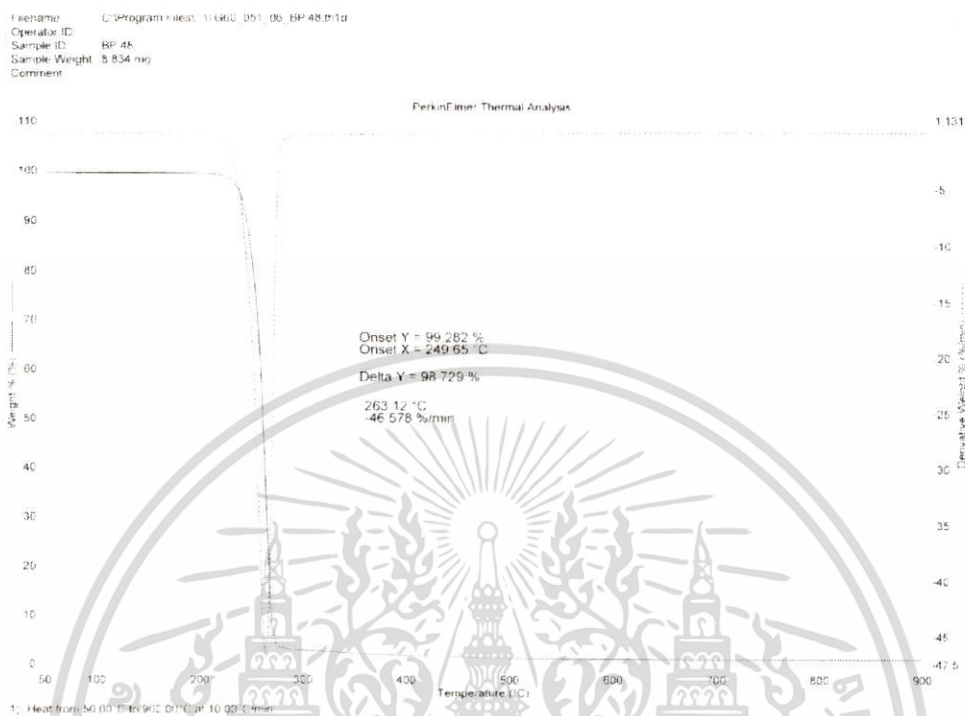


ภาพที่ ง-10 TGA เทอร์โมแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU47



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ง-11 TGA เทอร์โมแกรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU48



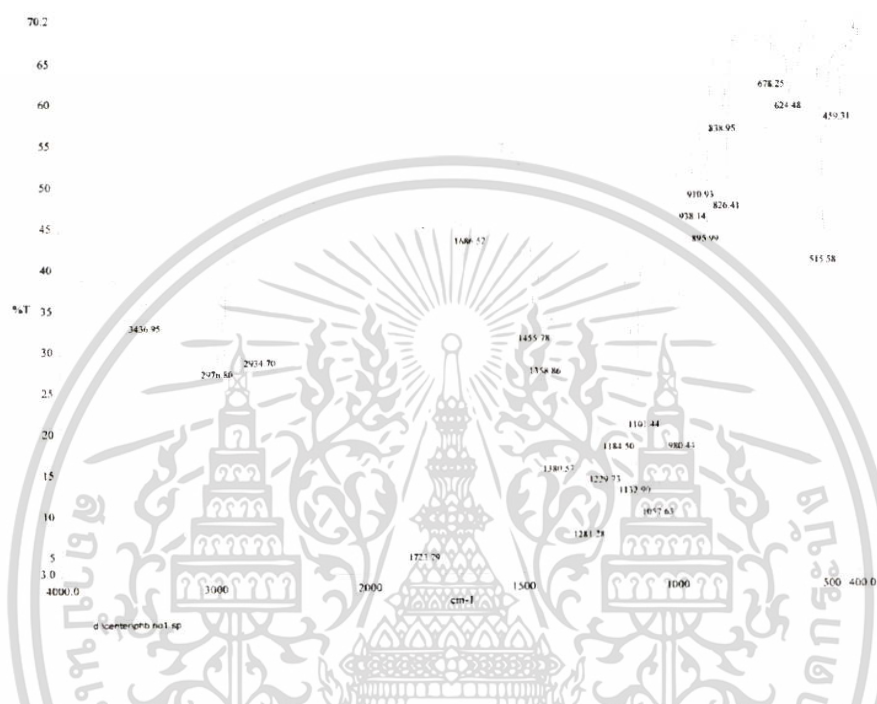
ภาพที่ ง-12 TGA เทอร์โมแกรมของพีไอซีบีมาตรฐาน



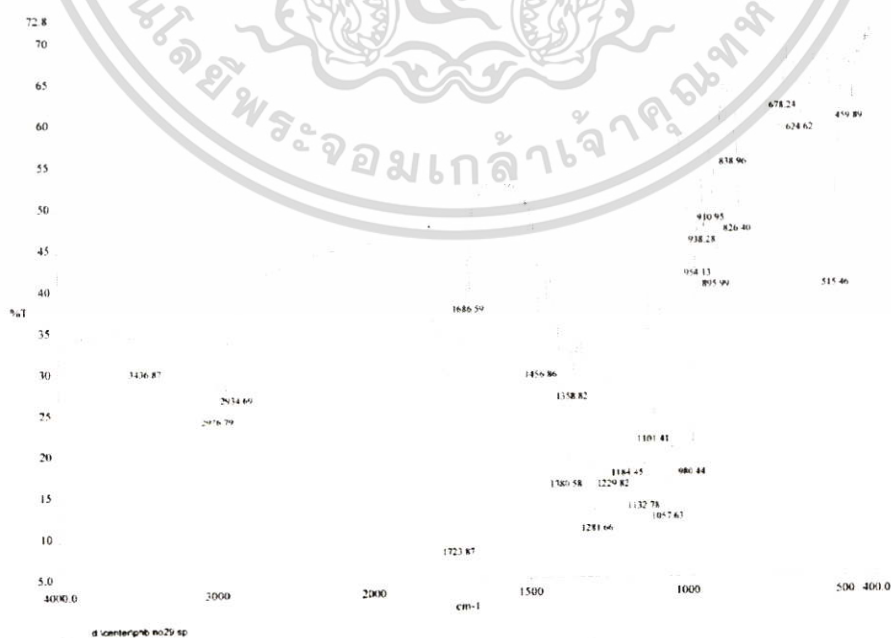
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. การวิเคราะห์โครงสร้างของพีเอชบีด้วยด้วยเครื่อง Perkin Elmer SPECTRUM GX FTIR System

ภาพที่ ง-13 FT-IR spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU01

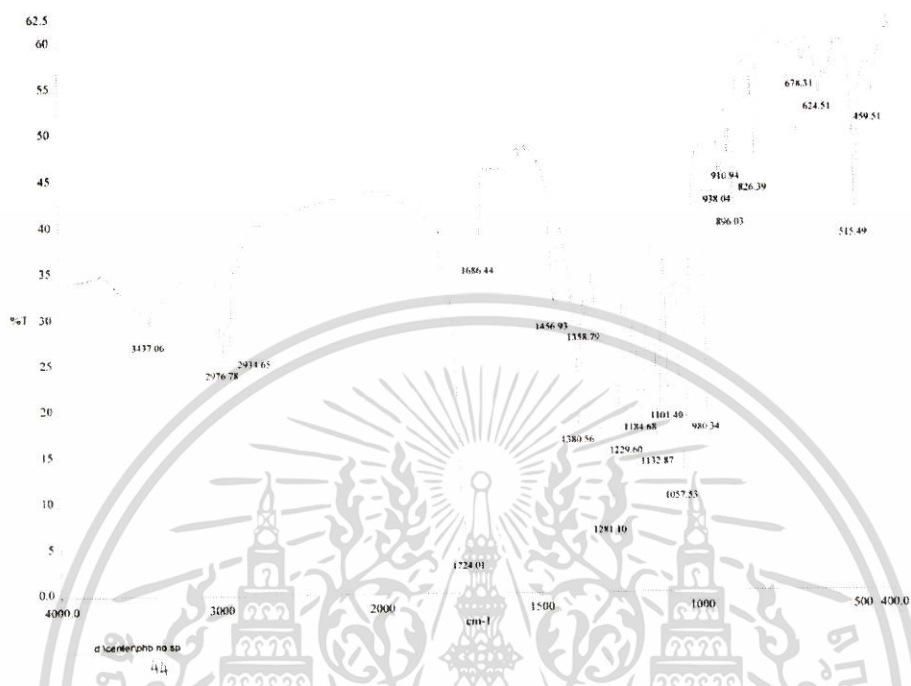


ภาพที่ ง-14 FT-IR spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU29

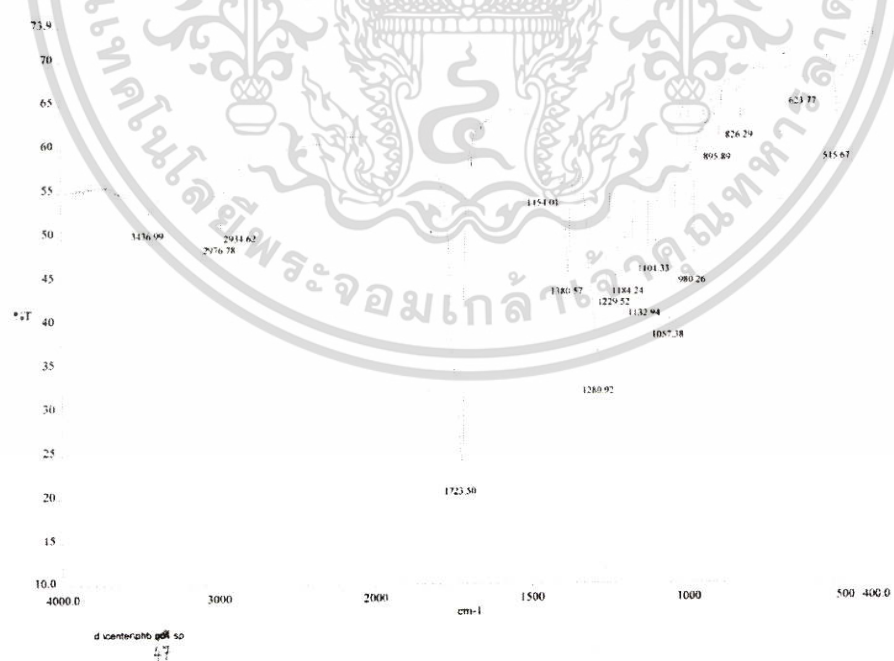


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ง-15 FT-IR spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU44

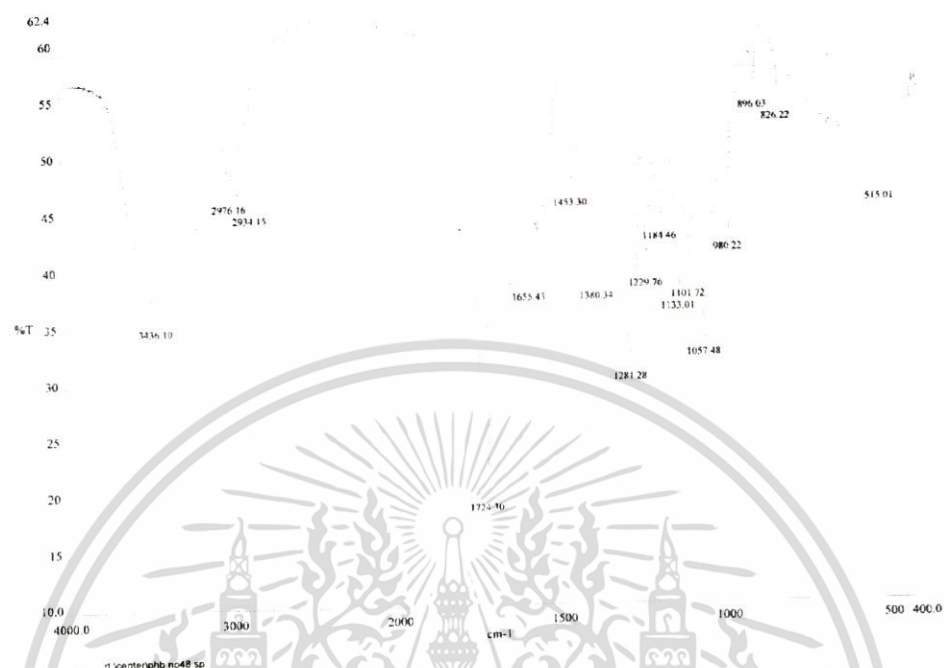


ภาพที่ ง-16 FT-IR spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU47

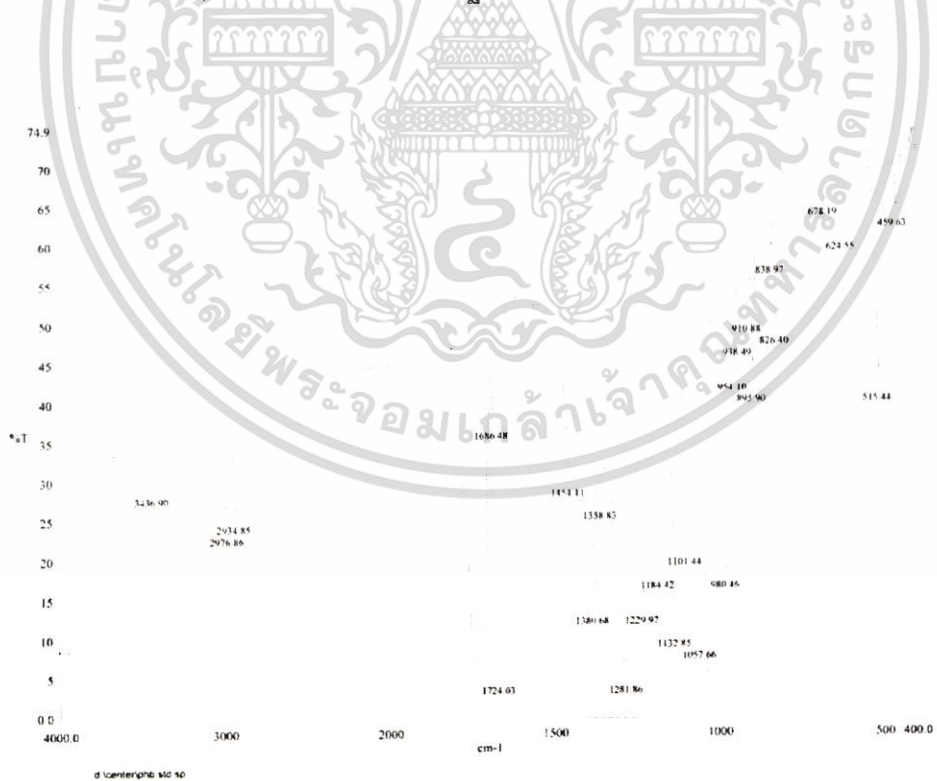


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ง-17 FT-IR spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU48



ภาพที่ ง-18 FT-IR spectra ของฟิโอสปีมาตรฐาน



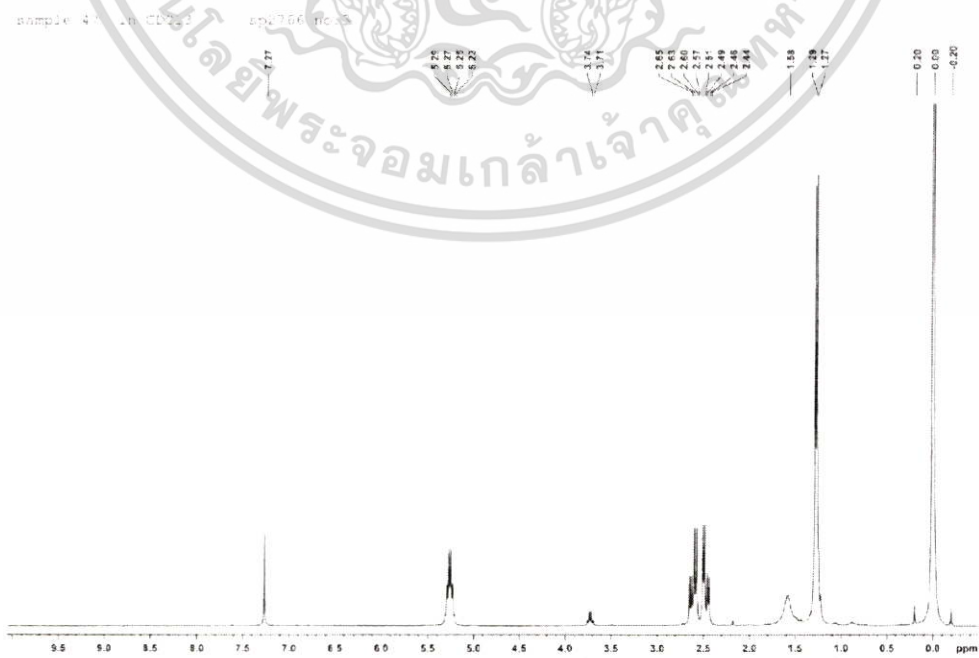
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ง-21 <sup>1</sup>H-NMR spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU44



ภาพที่ ง-22 <sup>1</sup>H-NMR spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU47

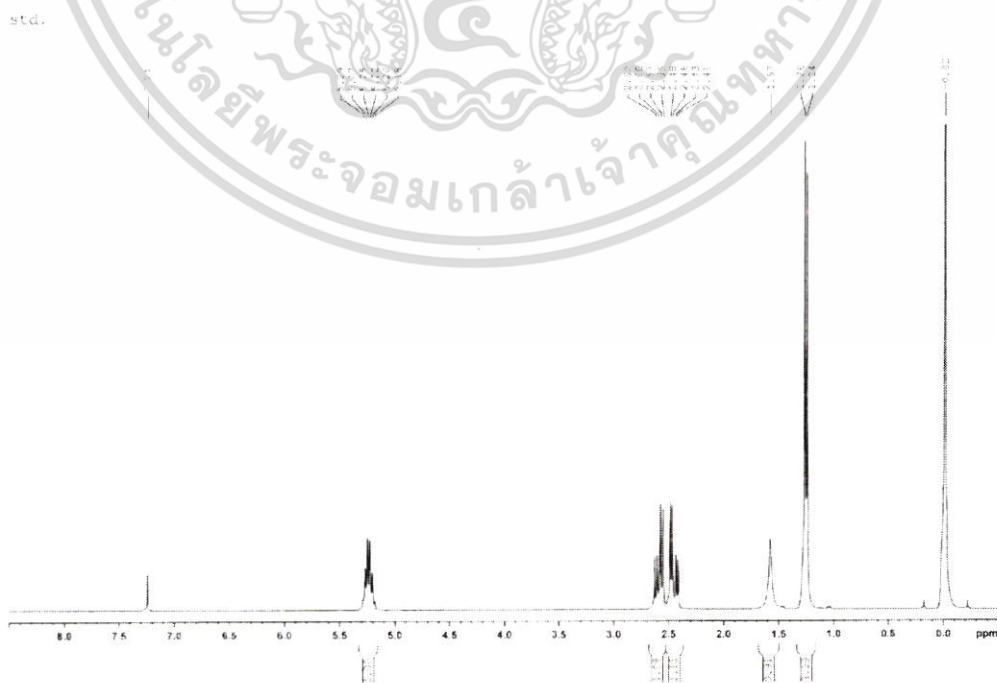


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ง-23  $^1\text{H-NMR}$  spectra ของแบคทีเรียสายพันธุ์ SWU48



ภาพที่ ง-24  $^1\text{H-NMR}$  spectra ของพีเอชบีมาตรฐาน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววิสันต์ เชื้อวงศ์ อายุ 27 ปี
วันเดือนปีเกิด	10 กุมภาพันธ์ พ.ศ 2534
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 1 ซอย ประวิทย์และเพื่อน 17 ถนนสุขุมวิท 101/1 บางจาก พระโขนง กรุงเทพฯ 10260
ประวัติการศึกษา	(2553-2556) วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2557-ปัจจุบัน) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนค่าศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า คุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	1. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติ การประชุมวิชาการ ระดับชาติ ครั้งที่ 3 (The 3rd National Conference on Informatics, Agriculture, Management, Business Administration, Engineering, Sciences and Technology) ในระหว่างวันที่ 24-25 พฤษภาคม 2561 เรื่อง การโคลนยีน <i>phaC</i> จากแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ SWU44 เพื่อผลิตโปรตีนลูกลูสมโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรตซินเทส และ การสะสมพีเอชบี ใน <i>Escherichia coli</i> 2. ตีพิมพ์บทความวิจัยในวารสารวิทยาศาสตร์ มศว. เรื่อง การใช้ชานอ้อย และ กากน้ำตาลในการผลิตโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรตโดยแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. SWU01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้