

การใช้ใบจามจุรี *Samanea saman* Jacq. Merr. แห่งเป็นแหล่งคาร์บอน
เพื่อผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยแบคทีเรีย

นายจักรวรรธ ไม้ทิพย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

UTILIZATION OF DRIED RAIN TREE *Samanea saman* Jacq. Merr. LEAVES AS CARBON SOURCE
FOR POLYHYDROXYALKANOATE PRODUCTION BY BACTERIA

Mr. Jakkrawut Maitip

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การใช้ใบจามจุรี *Samanea saman* Jacq. Merr. แห่งเป็น
แหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดย
แบคทีเรีย

โดย

นายจักรวาล ไม้ทิพย์

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป

คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ฐนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชันัญ ผลประไพ)

จักรวาล ไม้ทิพย์ : การใช้ใบจามจุรี *Samanea saman* Jacq. Merr. แห่งเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยแบคทีเรีย. (UTILIZATION OF DRIED RAIN TREE *Samanea saman* Jacq. Merr. LEAVES AS CARBON SOURCE FOR POLYHYDROXYALKANOATE PRODUCTION BY BACTERIA.)

อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป, 141 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถเจริญและผลิต PHAs โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยใบจามจุรี โดยใบจามจุรีถูกนำไปปรับสภาพด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เพื่อกำจัดลิกนินและย่อยองค์ประกอบเซลลูโลสโดยกรดฟอสฟอริกเจือจาง ภาวะที่เหมาะสมคือการใช้ใบจามจุรีขนาด 20-40 เมช ร้อยละ 10 โดยมีผลต่อปริมาณ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 8 และกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ภายใต้อุณหภูมิและแรงดันไอน้ำสูงที่ 121°C และ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วทำให้น้ำตาลรีดิวิซ 8.85 กรัมต่อลิตร แบคทีเรียสองสายพันธุ์ได้รับการคัดเลือกจากความสามารถในการเจริญและผลิต PHAs เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารละลายน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ ผลการวิเคราะห์ยีนบริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus megaterium* LAMA 262 ร้อยละ 99.79 และ 99.47 จึงตั้งชื่อเป็น *Bacillus* sp. MSC-2 และ *Bacillus* sp. MSC-5 ตามลำดับ การเจริญและการผลิต PHAs ของ *Bacillus* sp. MSC-5 ในอาหารที่มีสารละลายน้ำตาลค่อนข้างต่ำเนื่องจากถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ข้างเคียงในสารละลายน้ำตาล ประสิทธิภาพการผลิต PHAs สูงขึ้นจากการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น และ/หรือ เจือจางสารละลายน้ำตาลด้วยอาหารที่เสริมด้วยกลูโคส โดยได้ชีวมวล 5.88 กรัมต่อลิตรและผลิต PHAs 0.628 กรัมต่อลิตร ผลการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีร่วมกับ ¹H-NMR และ 2D-¹H-COSY แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp. MSC-5 ผลิต PHB จากสารละลายน้ำตาลและผลิต PHAs สูงสุด 0.628 กรัมต่อลิตร เมื่อนำ PHB มาทำบริสุทธิ์และขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม ทดสอบสมบัติเชิงกล ความร้อน และค่าการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลของแผ่นฟิล์มที่ได้ เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์ม PHB ทางการค้า พบว่าแผ่นฟิล์ม PHB ที่ได้มีสมบัติดังกล่าวคล้ายกับ PHB ทางการค้า

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม...ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา...2553.....

5172237823 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : RAIN TREE LEAVES / HYDROLYSATE / POLYHYDROXYALKANOATE

JAKKRAWUT MAITIP : UTILIZATION OF DRIED RAIN TREE *Samanea saman*

Jacq. Merr. LEAVES AS CARBON SOURCE FOR

POLYHYDROXYALKANOATE PRODUCTION BY BACTERIA.

THESIS ADVISOR : ASST.PROF. SUCHADA CHANPRATEEP, Ph.D.,141 pp.

The aim of this study was to screen PHAs-producing bacteria which can utilize rain tree leaves hydrolysates for growth and PHAs production. Rain tree leaves were pretreated with diluted NH_4OH to remove lignin and subsequently hydrolyzed the remaining cellulose compounds with H_3PO_4 solution. Optimal condition for the pretreatment was 10% (w/v) substrate loading (20-40 mesh particle size), 8% (v/v) NH_4OH and 2.5% (v/v) H_3PO_4 under high temperature and steam pressure at 121°C and 15 psi for 60 min that yielded 8.85 g/l reducing sugars. Two isolated bacteria were selected based on their growth and PHAs production using a selective medium containing cellulosic hydrolysates. The 16S rRNA gene analysis of these bacteria showed that the bacteria strain MSC-2 and MSC-5 exhibited 99.79% and 99.47% similarity to *Bacillus megaterium* LAMA 262 and was named *Bacillus* sp. MSC-2 and *Bacillus* sp. MSC-5, respectively. Growth of *Bacillus* sp. MSC-5 on cellulosic hydrolysates was poor and led to low biomass and PHAs content due to inhibitory effect of by-product presented in cellulosic hydrolysates. Finally, PHA production was enhanced using a large inoculum and/or diluted hydrolysates with production medium supplemented with glucose. Under these conditions, 5.88 g/l biomass and 0.628 g/l PHB were obtained. The results obtained from GC analysis, $^1\text{H-NMR}$, and $2\text{D-}^1\text{H-COSY}$ spectroscopy demonstrated that *Bacillus* sp. MSC-5 was able to produce PHB from cellulosic hydrolysates. The PHB was purified and prepared as plastic films. The mechanical and thermal properties including molecular weight distribution of PHB film were tested and compared to commercial PHB. The results demonstrated that PHB possessed thermal and mechanical properties in common with those of commercial PHB and PS.

Department : Microbiology..... Student's Signature

Field of Study : Industrial Microbiology..... Advisor's Signature

Academic Year : 2010.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา-คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้นรวมถึงกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนัญ ผลประไพ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ คำปรึกษา-คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อสนับสนุนทุนวิจัยในระดับปริญญาโทบัณฑิต

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณน้องๆ ที่ห้อง 449 และ 448 พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย และทำให้มีช่วงเวลาที่น่าประทับใจตลอดการทำงานวิจัย ณ ภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ประวัติความเป็นมา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	3
1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2. ทัศนวิสัยวรรณกรรม.....	5
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพลาสติก.....	5
2.2 ประเภทของพลาสติก.....	6
2.3 พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastics).....	7
2.4 พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate:PHAs).....	12
2.5 การชีวสังเคราะห์ PHAs.....	17
2.6 การย่อยสลาย PHAs โดยชีววิถี.....	21
2.7 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHAs.....	23
2.8 จามจุรี.....	24
2.9 การผลิต PHAs จากแหล่งลิกโนเซลลูโลส.....	27
2.10 การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด.....	31
2.11 วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนการสังเคราะห์ PHAs โดยการใช้ลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน.....	34
2.12 การผลิต PHAs เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์.....	35

บทที่	หน้า
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง.....	40
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	40
3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	42
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	44
3.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไบจามจุรี.....	44
3.3.2 สภาพที่เหมาะสมของการปรับสภาพไบจามจุรีการใช้ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดฟอสฟอริกเจือจาง.....	44
3.3.3 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากกระบวนการปรับสภาพ ไบจามจุรี.....	46
3.3.4 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs โดยใช้สารละลาย น้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบจามจุรี.....	46
3.3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทางอนุกรมวิธาน..	48
3.3.6 การผลิต PHAs จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบ จามจุรีที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHAs ของ แบคทีเรียในระดับขวดเย้า.....	50
3.3.7 วิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของ PHAs ที่ผลิตได้.....	53
3.3.8 ศึกษาลักษณะแกรนูลภายในเซลล์แบคทีเรียโดยกล้อง จุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	54
3.3.9 การผลิต PHAs ในระดับถังหมัก.....	54
3.3.10 ทดสอบสมบัติทางกายภาพ และเชิงกลของ PHAs.....	55
4. ผลการทดลอง.....	58
4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไบจามจุรี.....	58
4.2 สภาพที่เหมาะสมของการปรับสภาพไบจามจุรีโดยการใช้ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และกรดฟอสฟอริกเจือจาง.....	59
4.2.1 ผลการแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์.....	59
4.2.2 ผลของความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริก.....	61

บทที่	หน้า
4.2.3 ผลของขนาดอนุภาคไบโຈามຈຸรี.....	63
4.2.4 ผลของปริมาณไบโຈามຈຸรี.....	64
4.3 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากกระบวนการปรับสภาพไบ ຈามຈຸรี.....	67
4.4 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHA โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จาก การย่อยไบโຈามຈຸรีที่ผ่านการปรับสภาพ.....	68
4.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทางอนุกรมวิธาน.....	71
4.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic).....	71
4.5.2 การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test).....	71
4.5.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA.....	74
4.6 หากภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จาก การปรับสภาพและการย่อยไบโຈามຈຸรีในระดับขวดเขย่า.....	76
4.7 ศึกษาลักษณะแกรนูลภายในเซลล์แบคทีเรียโดยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM)...	94
4.8 ทดสอบสมบัติทางกายภาพ และเชิงกลของ PHA.....	95
4.8.1 สกัดแยกพอลิเมอร์และทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Doi และคณะ (1995).....	95
4.8.2 เตรียมแผ่นฟิล์มสำหรับการทดสอบคุณภาพเชิงกลและทาง กายภาพบางชนิด ตามวิธีของ Yoshie และคณะ (1995).....	96
4.8.3 การวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว(Melting temperature, T_m) อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (Glass transition temperature, T_g) อุณหภูมิของการตกผลึก (Crystallization temperature, T_c) และ ความร้อนแฝงของการหลอมเหลว (Heat of fusion, ΔH_{fus}) ตาม วิธีของ Chanprateep และคณะ (2003).....	102
4.8.4 การศึกษาโครงสร้าง PHAs โดย $^1\text{H-NMR}$ และ $2\text{D-}^1\text{H-COSY}$ สเปกโทรสโกปี.....	105

บทที่	หน้า
4.7.6 วิเคราะห์สมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มโดยเตรียมตัวอย่างตามวิธีมาตรฐาน ASTM D882-91 (Annual Book of ASTM Standard, V08.01) และ Chanprateep และ Kulpreecha (2006).....	106
4.7.7 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ตามวิธีของ Abate และคณะ (1995).....	110
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	112
รายการอ้างอิง.....	123
ภาคผนวก.....	133
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	134
ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	136
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน.....	138
ภาคผนวก ง ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	140
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	141

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า	
2.1	พอลิเมอร์ชีวภาพทางการค้าที่สำคัญสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ต่างๆ.....	10
2.2	แสดงสกุลของจุลินทรีย์ที่มีรายงานการสะสมพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต.....	14
2.3	แสดงเอนไซม์และวิถีที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ PHAs แกรนูล.....	18
2.4	แหล่งคาร์บอนที่เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ ที่สามารถนำมาผลิต PHAs	25
2.5	แสดงองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสจากแหล่งต่างๆ และในพืชแต่ละชนิด.....	28
2.6	การผลิต PHAs โดยใช้แหล่งลิกโนเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	30
2.7	ตัวอย่างของบริษัทที่มีการผลิต PHAs ทางการค้าในปัจจุบัน.....	37
4.1	แสดงองค์ประกอบทางเคมีของไบจามจุรี (<i>Samanea saman</i> Jacq. Merr.) ซึ่งทำ การวิเคราะห์โดยกรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทดสอบตามวิธีมาตรฐานของ Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI).....	59
4.2	ผลของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในการปรับสภาพไบจามจุรี.....	60
4.3	ผลของกรดฟอสฟอริกในการปรับสภาพไบจามจุรี.....	62
4.4	ผลของขนาดอนุภาคของไบจามจุรี.....	64
4.5	ผลของปริมาณไบจามจุรีในการปรับสภาพไบจามจุรี.....	65
4.6	แสดงผลการหาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพไบจามจุรี.....	66
4.7	ปริมาณผลิตภัณฑ์ข้างเคียงในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการ ย่อยไบจามจุรีด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดฟอสฟอริกโดยเครื่อง HPLC.....	67
4.8	ผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5.....	73
4.9	ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งสูงสุด ปริมาณ PHAs สูงสุดและปริมาณ PHAs สูงสุดของ <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลจากการ ปรับสภาพไบจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบจามจุรีกับ อาหารเพื่อการผลิตในอัตราส่วน 100:0 80:20 60:40 40:60 20:80 และ 0:100 ตามลำดับ.....	86

ตาราง	หน้า
4.10 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด ปริมาณ PHAs สูงสุดและปริมาณ PHAs สูงสุดของ <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลจากรการปรับสภาพไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ	93
4.11 ปริมาณผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก เมื่อเลี้ยง <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 120 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC.....	93
4.12 สมบัติเชิงกลของ PHB ผลิตโดย <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับ PHB และพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิดอื่น.....	101
4.13 ค่า T_M T_G T_C และ ΔH_{fus} ของพอลิเมอร์ซึ่งผลิตโดย <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เปรียบเทียบกับ PHB ที่รายงานก่อนหน้าจากคณะวิจัยต่างๆ.....	107
4.14 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (M_w) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (M_n) และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (PDI) ของพอลิเมอร์ PHB จาก <i>Bacillus</i> sp. MSC-5.....	110

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
<p>2.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพระหว่างกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นฟิล์ม PHAs ที่ระยะเวลาต่างๆกัน (A) พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-3-hydroxybutyrate; P(3HB)) (B) พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต [Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate); P(3HB-co-3HHx 5 mol% 3HHx)] และ (C) พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-3-ไฮดรอกซี-4-เมทิลวาเลอเรต-โค-3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) [Poly(3-hydroxy-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate-co-3-hydroxyhexanoate); P(3HB-co-3HV-co-3H4MV-co-3HHx) 1 mol% 3HV 3 mol% 3H4MV 18 mol% 3HHx].....</p>	11
<p>2.2 ภาพตัดขวางของเซลล์ <i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04 จากกัลปังหัดจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM) แสดง PHAs ภายในแกรนูลของเซลล์ หมายเหตุ เส้นที่ขีดแสดงขนาด 200 นาโนเมตร.....</p>	12
<p>2.3 แสดงโครงสร้างของ PHA ชนิดต่างๆ ตามชนิดของโซ่กิ่งที่เป็นองค์ประกอบ (A) พอลิ (3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต) [Poly(3-hydroxypropionate); P(3HP)] (B) พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [Poly(3-hydroxybutyrate); P(3HB)] (C) พอลิ (3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [Poly(3-hydroxyvalerate); P(3HV)] (D) พอลิ (3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) [Poly(3-hydroxyoctanoate); P(3HO)] (E) พอลิ (4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [Poly(4-hydroxybutyrate); P(4HB)] (F) พอลิ (5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [Poly(4-hydroxyvalerate); P(4HV)] (G) พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) [Poly(3-hydroxyhexanoate); P(3HHx)] (H) พอลิ (5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [Poly(5-hydroxyvalerate); P(5HV)] (I) มาเลต (Malate) (J) พอลิ (3-ไฮดรอกซี-5-ฟีนีลวาเลอเรต) [Poly(3-hydroxy-5-phenylvalerate)] (K) พอลิ (7-ไซยาโน-3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต) [Poly(7-cyano -3-hydroxyheptanoate)] (L) พอลิ (3-ไฮดรอกซี-8-คลอโรออกตะโนเอต) [Poly(3-hydroxy-8-chlorooctanonate)].....</p>	13
<p>2.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต.....</p>	15
<p>2.5 โครงสร้างของจุลินทรีย์ที่มีการสะสม PHAs แกรนูล และกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ในชีวสังเคราะห์และสลาย PHAs.....</p>	17

รูปที่	หน้า	
2.6	แสดงลักษณะจำลองของ PHAs แกรนูล สีแดง คือ PHAs synthase สีน้ำเงิน คือ ฟาซิน (Phasin) สีม่วง คือ PHAs ดีพอลิเมอไรเซชัน สีเขียว คือ ตัวยับยั้งของฟาซิน และ สีเหลือง คือ ฟอสฟอริพิด.....	20
2.7	แสดงองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส.....	29
2.8	แสดงกระบวนการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสด้วยกรด.....	32
2.9	แสดงกระบวนการการเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซ์ เซลลูโลสด้วยกรด.....	32
2.10	กระบวนการปรับสภาพที่จำเป็นภายหลังการย่อยด้วยกรด.....	34
2.11	วัฏจักรของ PHAs ที่ใช้ลิกโนเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนและนำไปผลิตพอลิเมอร์ ผ่านกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์.....	35
2.12	ผลิตภัณฑ์ PHAs ทางการค้าภายใต้ชื่อสินค้า Biopol [®] (A) หมุดกอล์ฟ (B) ดำมีดโกน (C) แก้วน้ำ (D) ขวดแชมพู.....	39
4.1	ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในการปรับสภาพและย่อยไบจามจุรี.....	61
4.2	ผลของกรดฟอสฟอริกในการปรับสภาพและย่อยไบจามจุรี.....	63
4.3	ผลของขนาดอนุภาคไบจามจุรีในการปรับสภาพและย่อยไบจามจุรี.....	64
4.4	ผลของปริมาณไบจามจุรีในการปรับสภาพและย่อยไบจามจุรี.....	65
4.5	แสดงผลของขนาดอนุภาคไบจามจุรีในการปรับสภาพและย่อยไบจามจุรีโดยใช้ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร และกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร.....	67
4.6	แสดงแกรนูลภายในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 (รูป A) และ MSC-5 (รูป B) ที่เจริญบนอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลจากการปรับสภาพไบจามจุรีเป็น แหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อย้อมเซลล์ด้วย Sudan Black B และ Safranin O และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า.....	69

รูปที่	หน้า	
4.7	แสดงปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำหนักรวมของเชื้อจุลินทรีย์ (กรัมต่อลิตร) และปริมาณ PHAs (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรีดิวิซ์ 8 กรัมต่อลิตรที่ได้จากการปรับสภาพใบจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200.....	70
4.8	แสดงปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำหนักรวมของเชื้อจุลินทรีย์ (กรัมต่อลิตร) และปริมาณ PHAs (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของ <i>C. necator</i> A-04 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรีดิวิซ์ 8 กรัมต่อลิตรที่ได้จากการปรับสภาพใบจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200.....	70
4.9	ลักษณะสัณฐานวิทยาและสปอร์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 (A),(B) และ MSC-5 (C),(D) ภาพ (A) เป็นลักษณะการติดสีแกรมบวกเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า และภาพ (B) แสดงตำแหน่งสปอร์ภายในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า (C) เป็นลักษณะการติดสีแกรมบวกเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า และภาพ (D) แสดงตำแหน่งสปอร์ภายในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-5 เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า.....	72
4.10	Phylogenetic tree ของ 16S rRNA ของ <i>Bacillus megaterium</i> MSC-2 (HQ694774) และ <i>Bacillus megaterium</i> MSC-5 (HQ678105) โดยใช้ 16S rRNA ของ <i>Virgibacillus</i> sp. PEB03 (GU213159) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้งด้วย bootstrap.....	75
4.11	แสดงปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ของ <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 0:100.....	80
4.12	แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวิซ์และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักที่หมักต่าง ๆ ของ <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 0:100.....	80

รูปที่	หน้า
4.22 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวิซ์และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักที่ ชีวโม่งต่างๆ ของ <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่าง สารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 100:0.....	85
4.23 แสดงปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อน้ำหนักร เซลล์แห้ง ของ <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลาย น้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้หัว เชื้อเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร.....	90
4.24 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวิซ์และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักที่ ชีวโม่งต่างๆ ของ <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มี สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร.....	90
4.25 แสดงปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อน้ำหนักร เซลล์แห้ง ของ <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลาย น้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้หัว เชื้อเริ่มต้น 1.0 กรัมต่อลิตร.....	91
4.26 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวิซ์และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักที่ ชีวโม่งต่างๆ ของ <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มี สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1.0 กรัมต่อลิตร.....	91
4.27 แสดงปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อน้ำหนักร เซลล์แห้ง ของ <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลาย น้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้หัว เชื้อเริ่มต้น 2.0 กรัมต่อลิตร.....	92
4.28 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวิซ์และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักที่ ชีวโม่งต่างๆ ของ <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มี สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 2.0 กรัมต่อลิตร.....	92

รูปที่	หน้า
4.29 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของ <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 จากภาพจะเห็นเซลล์มีลักษณะกลม (สีเทาเข้ม) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-6 ไมโครเมตร และแกนรูปซึ่งอยู่ในเซลล์.....	94
4.30 พอลิเมอร์ที่สกัดได้จากเซลล์ของ <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพใบจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	96
4.31 การทำบริสุทธิ์โดยนำพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 มาตกตะกอนในเฮกเซน ภาพ (A) คือตะกอนพอลิเมอร์ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนในเฮกเซน (B) คือตะกอนพอลิเมอร์ที่ได้หลังจากกระเหยเฮกเซนจนแห้ง.....	97
4.32 ลักษณะของแผ่นฟิล์ม PHB ที่ผลิตจาก <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 หลังผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แล้ว.....	98
4.33 ลักษณะของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ PHB ที่ขึ้นรูปในแม่พิมพ์ขนาด กว้างxยาว เท่ากับ 5x10 เซนติเมตร.....	98
4.34 โครมาโทแกรมของ PHAs ที่ได้จาก <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 (B) และสารมาตรฐาน PHB (Sigma) (A) (Shrivastav และคณะ, 2010) จากโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$) ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....	104
4.35 โครมาโทแกรมของ PHAs ที่ผลิตได้จาก <i>Bacillus</i> sp. MSC-5 จาก 2D- $^1\text{H-NMR}$ (Two dimension- ^1H -correlation spectroscopy) ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....	105
4.36 โครมาโทแกรมของพอลิเมอร์ PHB จาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ MSC-5 ซึ่งทำการวิเคราะห์หาอุณหภูมิหลอมเหลว อุณหภูมิกลาสทรานซิชันอุณหภูมิของการตกผลึกและความร้อนแฝงของการหลอมเหลว ด้วยเครื่อง DSC ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.....	108
4.37 โครมาโทแกรมของพอลิเมอร์ PHB (Sigma) ซึ่งทำการวิเคราะห์หาอุณหภูมิหลอมเหลว อุณหภูมิกลาสทรานซิชันอุณหภูมิของการตกผลึกและความร้อนแฝงของการหลอมเหลว ด้วยเครื่อง DSC ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.....	109

รูปที่	หน้า
<p>4.38 โคโรมาโทแกรมของพอลิเมอร์ PHB จาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ MSC-5 ซึ่งทำการวิเคราะห์หาโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (M_w) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (M_n) และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (PDI) ของพอลิเมอร์ ด้วยเครื่อง GPC ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.....</p>	111

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

“พลาสติก” เป็นวัสดุที่มีผู้นิยมใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลก นับตั้งแต่ปีค.ศ. 1970 เป็นต้นมา โลกต้องพึ่งพาแหล่งเชื้อเพลิงฟอสซิลในการผลิตพลาสติก ทั้งยังมีปัญหาการขาดแคลนพื้นที่และวิธีในการกำจัดขยะพลาสติก รวมไปถึงความกังวลด้านสิ่งแวดล้อมที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากพลาสติกสังเคราะห์ไม่สามารถย่อยสลายตามธรรมชาติ พลาสติกจึงยังคงตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานานหลายร้อยปีภายหลังการใช้และฝังกลบ จากภาวะดังกล่าวจึงกระตุ้นให้เกิดการวิจัยและพัฒนาวัสดุพอลิเมอร์ชีวภาพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Khardenavis และคณะ, 2007) พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพเมื่อถูกทิ้งในสิ่งแวดล้อมจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียหรือรา นอกจากนี้ไซกิงของพอลิเมอร์ยังสามารถสลายได้โดยไม่ผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เช่น การย่อยสลายเชิงกล และทางเคมี

อัตราการใช้วัสดุในปัจจุบันยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้ปริมาณการผลิตพลาสติกทั่วโลกมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเพิ่มจาก 1.5 ล้านตันในปี 1950 เป็น 245 ล้านตันในปี 2008 หรือมีอัตราเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 9 เนื่องจากพลาสติกเป็นวัสดุที่นิยมใช้เป็นอย่างมาก เพราะมีสมบัติที่หลากหลาย น้ำหนักเบา มีความทนทาน สามารถขึ้นรูปได้หลากหลายผลิตภัณฑ์ และมีราคาถูก แนวทางในการลดปัญหาที่เกิดจากการใช้พลาสติกอย่างแพร่หลาย คือการเปลี่ยนมาใช้วัสดุที่มีสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่ผลิตจากแหล่งปิโตรเคมี แต่มีสมบัติอีกประการคือ สามารถถูกย่อยสลายได้ภายหลังการใช้งาน (Chanprateep, 2010)

พอลิเมอร์ชีวภาพเป็นพอลิเมอร์ที่ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเคมี นอกจากนี้วัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพส่วนใหญ่ผลิตจากพืช ซึ่งนอกจากช่วยลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศแล้วยังเป็นทรัพยากรที่สามารถผลิตขึ้นใหม่ได้ในเวลาอันสั้น เมื่อถูกย่อยสลายผ่านกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพจะให้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย

เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ ชีวมวล และกรดอินทรีย์ต่างๆ ขึ้นกับโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์ชีวภาพนั้น (Gross และ Kalra, 2002) ปัจจุบันพอลิเมอร์ชีวภาพที่ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องมากที่สุดคือ พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid; PLA) และพอลิไฮดรอกซีแอลคานอยด์ (Polyhydroxyalkanoates; PHAs) เนื่องจากมีสมบัติเชิงกล ความร้อน ภายภาพ และเคมี ที่มีความเป็นไปได้ในการนำมาพัฒนาเพื่อใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ นอกจากนี้ PHAs ยังเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วในหลายภาวะเมื่อเทียบกับพอลิแลคติกแอซิด (Sudesh และ Iwata, 2008)

จากปัญหาสิ่งแวดล้อมตลอดจนความตื่นตัวในการตระหนักถึงความสำคัญในการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม ทำให้ปัจจุบันทั่วโลกมีการใช้พอลิเมอร์ชีวภาพเพิ่มขึ้นจาก 14 ล้านกิโลกรัมใน ค.ศ. 1996 เป็น 68 ล้านกิโลกรัมใน ค.ศ. 2001 กลุ่มตลาดเป้าหมายของพอลิเมอร์ชีวภาพส่วนใหญ่เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหาร (Gross และ Kalra, 2002) อย่างไรก็ตามการใช้พอลิเมอร์ชีวภาพยังคงเพิ่มขึ้นในขอบเขตที่จำกัดเมื่อเทียบกับพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเคมี สาเหตุจากราคาที่แตกต่างกัน โดยปัญหาหลักของการผลิตพลาสติกชีวภาพคือ ต้นทุนการผลิตสูงเนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตส่วนใหญ่เป็นแป้ง น้ำตาล หรือน้ำมัน ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้วัตถุดิบเหล่านี้ยังเป็นที่ต้องการของตลาดในการนำไปผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น ไบโอดีเซลและไบโอดีเซล ดังนั้นทางเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับสนใจคือการใช้วัสดุที่ไม่เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ เช่น ลิกโนเซลลูโลส เพราะหาได้ง่าย มีราคาถูก และมีอยู่ในท้องถิ่น จึงช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้ (van Wyk, 2001)

ลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบสำคัญที่ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน พอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิดนี้จะเชื่อมต่อกันเป็นลิกโนเซลลูโลส โดยเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของดี-กลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 ไกลโคซิดิกทำให้โครงสร้างแข็งแรงมากขึ้น และลิกนินที่พบมากบริเวณผนังเซลล์ของพืชเป็นส่วนประกอบที่ทำให้พืชมีความทนทานต่อจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อม ดังนั้นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสามารถนำมาย่อยให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสตามลำดับ (Hendriks และ Zeeman, 2009)

การผลิต PHAs จากลิกโนเซลลูโลสแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 การย่อยวัตถุดิบ เพื่อให้ได้น้ำตาล และขั้นตอนที่ 2 การผลิต PHAs จากน้ำตาลที่ได้โดยจุลินทรีย์ เนื่องจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้นมีลิกนินเป็นองค์ประกอบและเป็นโครงสร้างที่ขัดขวางการย่อยเซลลูโลส ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีกระบวนการกำจัดลิกนินออกจากลิกโนเซลลูโลสเสียก่อนโดยกระบวนการนี้ เรียกว่ากระบวนการปรับสภาพ (pretreatment) (Prasad และคณะ, 2007)

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาศักยภาพของใบไม้แห้งเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHAs โดยผู้วิจัยเลือกใช้ใบจามจุรีเป็นการทดลองต้นแบบ ต้นจามจุรี (*Samanea saman* (Jacq.) Merr.) หรือ ต้นก้ามปู เป็นพืชที่พบมากและเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน และใช้เวลาในการเติบโตไม่นานนัก ทั้งยังทนต่อภาวะแวดล้อมได้ดี จามจุรีเป็นไม้ผลัดใบโดยปริมาณของใบขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำที่ได้รับ นิยมปลูกทางภาคเหนือของประเทศไทยเพื่อใช้เลี้ยงผึ้งและใช้เนื้อไม้ในงานแกะสลัก นับได้ว่าจามจุรีเป็นไม้เศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในปัจจุบัน

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาวิธีการย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในใบจามจุรีให้น้ำตาลและศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากดินและมีความสามารถในการผลิต PHAs จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยใบไม้แห้ง โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHAs ในปริมาณสูงและทนต่อสารยับยั้งต่างๆที่เกิดจากขั้นตอนการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสได้ดี

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพใบจามจุรีด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดฟอสฟอริกเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต PHAs และคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการผลิต PHAs จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพใบจามจุรี

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการ

1. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไบโจามจุรี
2. หาภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพไบโจามจุรีโดยการใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการใช้กรดฟอสฟอริกเจือจาง
3. คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโจามจุรีและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้
4. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากสารละลายน้ำตาลในระดับขวดเขย่า
5. วิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของ PHAs ที่ผลิตได้
6. ทดสอบสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกลของ PHAs

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบความเป็นไปได้ในการผลิต PHAs ด้วยสารละลายน้ำตาลจากการปรับสภาพไบโจามจุรีแห้งโดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดฟอสฟอริกเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิต PHAs จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ นอกจากนี้ผลการวิจัยยังเป็นข้อมูลที่น่าไปใช้พัฒนาเพื่อลดต้นทุนการผลิต PHAs ได้อีกด้วย

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพลาสติก

พอลิเมอร์ (polymer) ได้รับการจำกัดความเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1830 โดย H. V. Regnault หมายถึงสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เกิดจากการรวมกันของโมเลกุลเล็กๆ จำนวนมาก ด้วยพันธะโควาเลนต์ ถ้าโมเลกุลเล็กๆ ซึ่งเรียกว่าโมโนเมอร์มีโครงสร้างเหมือนกันมารวมกันเรียกพอลิเมอร์นั้นว่า โฮมอพอลิเมอร์ (homopolymer) แต่ถ้าโมโนเมอร์ต่างชนิดกันมารวมกันเรียกพอลิเมอร์นั้นว่าโคพอลิเมอร์ (copolymer) ปฏิกริยาที่โมโนเมอร์รวมกันเรียกว่าพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) มนุษย์รู้จักและใช้พอลิเมอร์จากธรรมชาติตั้งแต่สมัยโบราณทั้งที่ไม่มีความรู้เรื่องโครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์ โดยนำมาเป็นวัสดุใช้งานต่างๆ อย่างง่าย พอลิเมอร์ธรรมชาติบางชนิดถูกนำมาทำปฏิกริยากับสารเคมีเพื่อให้มีสมบัติหลากหลายตามต้องการโดยขึ้นกับปฏิกริยาเคมีนั้นๆ Thomas Hancock (1819) ค้นพบพอลิเมอร์เป็นครั้งแรกจากยางธรรมชาติที่ได้จากการตกตะกอนน้ำยาง (Latex) จากต้น *Hevea brasiliensis* ซึ่งนับเป็นจุดเริ่มต้นของวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ นับแต่นั้นวิวัฒนาการของวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ และพอลิเมอร์สังเคราะห์มีอย่างต่อเนื่องในหลายประเทศตั้งแต่ก่อนสงครามโลกครั้งที่ 1 เช่น อังกฤษ อเมริกา และเยอรมนี แต่การพัฒนายังน้อยกว่าในช่วงก่อนสงครามโลกครั้งที่ 2 ความต้องการใช้วัสดุสังเคราะห์เพื่อทดแทนพอลิเมอร์จากธรรมชาติที่กำลังขาดแคลนในขณะนั้นได้กระตุ้นให้นักวิทยาศาสตร์ทุ่มเทความสามารถในการศึกษาหาโมโนเมอร์ชนิดใหม่ รวมทั้งคิดค้นพัฒนาเทคนิคการสังเคราะห์และตัวเร่งปฏิกริยาเพื่อให้ได้พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีสมบัติตามต้องการ หนึ่งในนั้นคือ พลาสติก (plastic) ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมที่แยกออกมาจากอุตสาหกรรมน้ำมัน ซึ่งมีการเจริญเติบโตและขยายตัวเป็นอย่างมาก จากการที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายนับตั้งแต่ช่วงหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 เป็นต้นมา (มาลินี ชัยศุกกิจสินธ์, 2546)

ถึงแม้ว่าการค้นพบพลาสติกสังเคราะห์จะก่อให้เกิดความสะดวกสบายต่อมนุษย์เป็นอย่างมาก แต่ในปัจจุบันมนุษย์ต้องเผชิญกับความลำบากในการดำรงชีวิตที่เพิ่มมากขึ้น วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมีความเจริญก้าวหน้าไปอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เป็นเพราะความต้องการของสังคมสมัยใหม่ส่วนใหญ่ไม่ว่าจะเป็น พลังงาน เชื้อเพลิง และวัสดุใช้สอยต่างๆ ล้วนขึ้นอยู่กับแหล่งฟอสซิลซึ่งกำลังจะหมดไปในไม่ช้านี้ ก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ ตามมา นอกจากนี้กิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ยัง

ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศในธรรมชาติโดยเกิดจากปริมาณขยะที่มากจากการบริโภคและอุปโภคของมนุษย์ ซึ่งขยะเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดบนโลก เช่น ปัญหาโลกร้อนและการหมดไปในไม่ช้าของแหล่งพลังงานฟอสซิล ปัญหาทั้งสองอย่างนี้เกิดขึ้นจากการใช้พลังงานในปริมาณมากอย่างสิ้นเปลือง ปัญหาเหล่านี้กระตุ้นให้ รัฐบาล อุตสาหกรรม และสถาบันการศึกษาต่างพยายามค้นหาวิธีการแก้ปัญหาที่ยั่งยืนต่อปัญหาวิกฤตพลังงาน อย่างไรก็ตามความพยายามในแก้ปัญหาต่างๆ ยังขาดการผลิตและการใช้วัสดุที่ผลิตจากแหล่งทรัพยากรที่ยั่งยืนที่สามารถผลิตขึ้นมาทดแทนได้ (Sudesh และ Iwata, 2008)

2.2 ประเภทของพลาสติก

พลาสติกสามารถแบ่งออกตามคุณลักษณะภายหลังจากได้รับความร้อนเป็น 2 ประเภท คือ เทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic) และ เทอร์โมเซตติงพลาสติก (Thermosetting plastic) (Peacock และ Calhoun, 2006)

2.2.1 เทอร์โมพลาสติก

เทอร์โมพลาสติก เป็นพลาสติกที่สามารถหลอมเหลวซ้ำได้เมื่อได้รับความร้อน จึงสามารถขึ้นรูปซ้ำได้หลายครั้ง และจะแข็งตัวเมื่อเย็น พลาสติกประเภทนี้มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโซ่ตรงยาว มีการเชื่อมต่อกันระหว่างโซ่พอลิเมอร์น้อยมาก และไม่มีพันธะเคมีแบบถาวรระหว่างโซ่พอลิเมอร์ เมื่อผ่านการอัดแรงมากจะไม่ทำลายโครงสร้างเดิม และเมื่อได้รับความร้อน เทอร์โมพลาสติกจะอยู่ในรูปของของเหลวหนืดที่สามารถไหลได้เมื่อเพิ่มความดัน และเมื่อลดอุณหภูมิลง เทอร์โมพลาสติกจะอยู่ในรูปทรงตามภาชนะหรือแม่พิมพ์นั้นจนกว่าจะได้รับความร้อนและแรงดันอีกครั้งหนึ่ง ดังนั้นจึงสามารถนำเทอร์โมพลาสติกมาขึ้นรูปกลับมาใช้ใหม่ได้ นอกจากนี้เทอร์โมพลาสติกยังสามารถละลายในตัวทำละลายได้โดยไม่ทำลายพันธะทางเคมีใดๆ ของพอลิเมอร์ การผลิต เทอร์โมพลาสติกทำได้โดยการเพิ่มความยาวของโซ่พอลิเมอร์ (Chain growth) ชนิดของพลาสติกในตระกูลเทอร์โมพลาสติก ได้แก่ พอลิเอทิลีน (Polyethylene; PE) พอลิโพรพิลีน (Polypropylene; PP) พอลิสไตรีน (Polystyrene; PS) แซน (styrene-acrylonitrile; SAN) เอบีเอส (Acrylonitrile-butadiene-styrene; ABS) พอลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinylchloride; PVC) ไนลอน (Nylon) พอลิเอทิลีนเทอร์ฟทาเลต (polyethylene terephthalate; PET)

และพอลิคาร์บอเนต (Polycarbonate; PC) พอลิแลคติก (Polylactic acid; PLA) และพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates; PHAs)

2.2.2 เทอร์โมเซตติงพลาสติก

เทอร์โมเซตติงพลาสติก เป็นพลาสติกที่มีสมบัติพิเศษคือ ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลง อุณหภูมิและทนปฏิกิริยาเคมีได้ดี เกิดความแข็งแรงและรอยเปื้อนได้ยาก คงรูปหลังการผ่านความร้อนหรือแรงดันเพียงครั้งเดียว เมื่อเย็นลงจะมีความแข็งมาก ทนความร้อนและความดัน ไม่อ่อนตัวและเปลี่ยนรูปร่างไม่ได้ แต่ถ้าอุณหภูมิสูงจะแตกและไหม้เป็นขี้เถ้าสีดำ ไม่ละลายในตัวทำละลาย แต่จะอ่อนตัวลงหรือบวมเมื่อแช่อยู่ในตัวทำละลาย พลาสติกประเภทนี้ประกอบด้วยส่วนผสมหลายชนิดทำปฏิกิริยาซึ่งกันและกัน เกิดการเชื่อมต่อกันไปมาระหว่างสายโซ่ของโมเลกุลพอลิเมอร์ (cross linking among polymer chains) เมื่อได้รับความร้อนแล้วเปลี่ยนสถานะจากของเหลวหนืดเป็นของแข็ง โมเลกุลจะเชื่อมโยงกันเป็นร่างแหจับกันแน่น แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลแข็งแรงมาก จึงไม่สามารถนำมาหลอมเหลวได้ ดังนั้นเมื่อพลาสติกเย็นจนแข็งตัวแล้วจะไม่สามารถทำให้อ่อนได้อีกโดยใช้ความร้อน หากแต่จะสลายตัวทันทีที่อุณหภูมิสูงถึงจุดหลอมเหลว จึงต่างจากเทอร์โมพลาสติก โดยเมื่อให้ความร้อนจนอยู่ในรูปของเหลวจะไม่สามารถไหลได้เมื่อเพิ่มความดันเหมือนกับเทอร์โมพลาสติก การทำพลาสติกชนิดนี้ให้เป็นรูปลักษณะต่างๆ ต้องใช้ความร้อนสูง และโดยมากต้องการแรงอัดด้วย เทอร์โมเซตติงพลาสติก ได้แก่ เมลามีนฟอร์มัลดีไฮด์ (melamine formaldehyde) ฟีนอลฟอร์มัลดีไฮด์ (phenol-formaldehyde) อีพ็อกซี (epoxy) พอลิเอสเทอร์ (polyester) ยูรีเทน (urethane) และพอลิยูรีเทน (polyurethane)

2.3 พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic)

ความหลากหลายของพลาสติกสังเคราะห์ได้ทำให้พลาสติกถูกนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยนำมาใช้แทนโลหะ ไม้ และยางธรรมชาติ อุตสาหกรรมการผลิตพอลิเมอร์สังเคราะห์ได้กลายมาเป็นพื้นฐานของอุตสาหกรรมในประเทศที่พัฒนาแล้ว โดยอุตสาหกรรมพลาสติกนับได้ว่าเป็นธุรกิจหนึ่งที่ให้ผลกำไรสูงและมีแนวโน้มที่จะเติบโตขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เนื่องจากความต้องการที่เพิ่มขึ้นจากการพัฒนาอย่างก้าวกระโดดของประเทศกำลังพัฒนา เช่น จีน และอินเดีย เช่นเดียวกับประเทศต่างๆ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Sudesh และ Iwata, 2008) นับตั้งแต่ต้นคริสต์ศตวรรษที่ 20 ปัจจุบันในแต่ละปีจะมีการผลิตพลาสติกมากกว่า 245 ล้านตันต่อปีในปี ค.ศ.

2008 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (Chanprateep, 2010) พลาสติกส่วนใหญ่ผลิตขึ้นมาจากแหล่งฟอสซิล การเพิ่มขึ้นของประชากรโลกทำให้ความต้องการในการใช้แหล่งฟอสซิลเพิ่มขึ้น เป็นผลให้แหล่งของฟอสซิลกำลังจะหมดลงในไม่ช้านี้ อีกปัญหาหนึ่งที่ตามมาคือ ปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากขยะพลาสติกที่เกิดขึ้นภายหลังการใช้ซึ่งต้องใช้เวลาหลายร้อยปีในการย่อยสลายและพลาสติกที่ทิ้งในสิ่งแวดล้อมจะปล่อยสารเคมีต่างๆ เช่น ไดออกซิน (Dioxin) ออกมาสู่สิ่งแวดล้อมนั้นๆ สำหรับการเผาขยะพลาสติกเป็นอีกวิธีในการกำจัดขยะพลาสติกแต่วิธีการนี้จะทำให้เกิดการปลดปล่อยแก๊สเรือนกระจกสู่สิ่งแวดล้อมสร้างปัญหามลภาวะทางอากาศและยังก่อให้เกิดปัญหาโลกร้อนตามมา ความพยายามในการแก้ปัญหาขยะพลาสติกเริ่มด้วยการนำพลาสติกที่ใช้แล้วนำกลับมาใช้ใหม่ (Recycling) อย่างไรก็ตามการนำพลาสติกกลับมาใช้ใหม่นั้นยังไม่เพียงพอในการแก้ปัญหาขยะพลาสติก เนื่องจากเป็นการยากในการนำขยะพลาสติกทั้งหมดเข้าสู่กระบวนการนำกลับมาใช้ใหม่ อีกทั้งในการนำพลาสติกกลับมาใช้ใหม่ต้องอาศัยกระบวนการที่ซับซ้อนและต้องใช้พลังงานปริมาณมาก และการนำพลาสติกที่ใช้แล้วกลับมาใช้ใหม่ยังส่งผลให้สมบัติทางกายภาพของพลาสติกด้อยลง เช่น ทำให้พลาสติกมีความเปราะมากขึ้น (Koller และคณะ, 2010)

ความพยายามในการค้นหาและวิจัยวัสดุที่มีความทนทานในการใช้งานและสามารถย่อยสลายได้ภายหลังการใช้ได้นำไปสู่การพัฒนาพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งนิยามของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพตามคำจำกัดความของ ASTM D-833 (2002) ได้ระบุไว้ดังนี้

- พลาสติกที่ย่อยสลายได้ หมายถึง พลาสติกที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีภายใต้ภาวะที่จำเพาะ ซึ่งเป็นผลให้พลาสติกนั้นสูญเสียสมบัติบางประการไป
- พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หมายถึง การย่อยสลายพลาสติกที่เกิดจากการย่อยของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และสาหร่าย

โดยปกติการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพจะเริ่มจากการแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ โดยกระบวนการทางเคมีหรือปฏิกิริยาจากเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้เกิดการสึกกร่อนบริเวณผิวหนังหน้าของพลาสติก หรือเกิดจากกระบวนการที่ไม่เกี่ยวข้องกันกับสิ่งมีชีวิตโดยผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ปัจจุบันพลาสติกชีวภาพกำลังได้รับความนิยมมากขึ้น เป็นผลจากการตระหนักถึงปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากพลาสติกสังเคราะห์ สำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม โดยใช้กระบวนการเหนียวน้ำและชนิดของพอลิเมอร์เป็นเกณฑ์ได้ ดังนี้

1. กระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชันของโมโนเมอร์ที่ได้จากกระบวนการชีวภาพ เช่น PLA
2. พอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยตรงจากจุลินทรีย์ เช่น PHAs

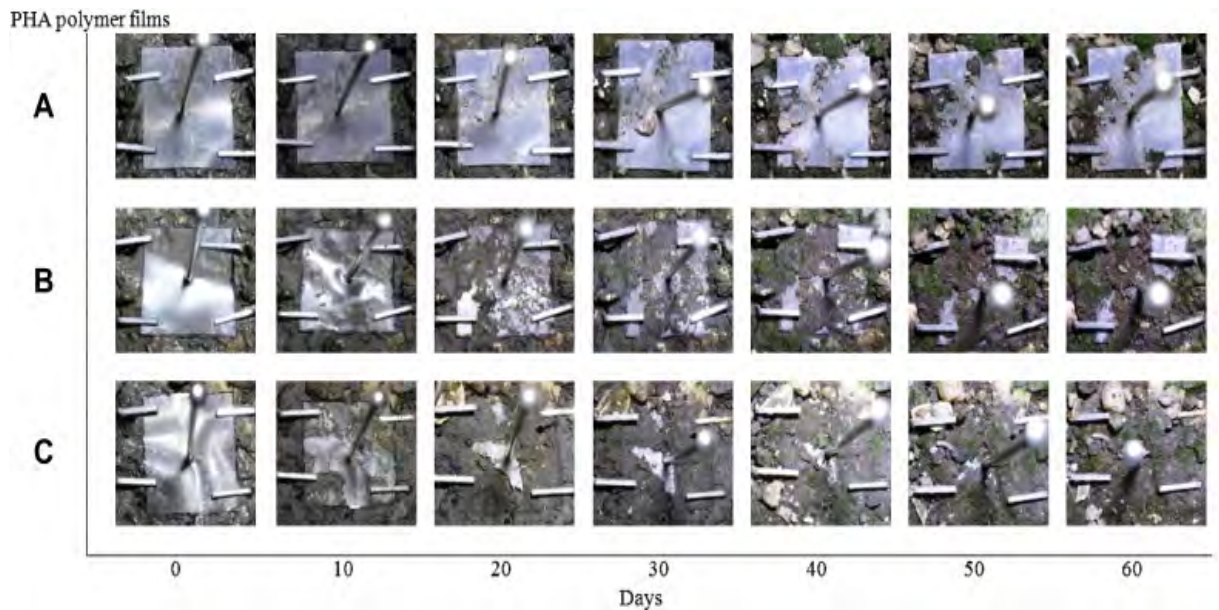
3. พอลิเมอร์ที่ได้จากกระบวนการปรับปรุงพอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น แป้ง และ เซลลูโลส

สำหรับพอลิเมอร์ชีวภาพทางการค้าที่สำคัญในตลาดโลกนับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

PHAs เป็นพอลิเมอร์ที่มีสมบัติที่สำคัญคือ สามารถย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วภายใต้ภาวะที่หลากหลายกว่าพลาสติกชนิด PLA โดยระยะเวลาในการย่อยสลายจะแตกต่างกันตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบและ PLA ต้องการอุณหภูมิที่สูงกว่าในการย่อยสลาย (ประมาณ 60 องศาเซลเซียส) ดังรูปที่ 2.1 แสดงการย่อยสลายทางชีวภาพซึ่งแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของแผ่นฟิล์ม PHAs ที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันซึ่งส่งผลต่อระยะเวลาในการย่อยสลายของแผ่นฟิล์มโดยสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลาที่น้อยกว่า 50 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของโมโนเมอร์ของแผ่นฟิล์ม

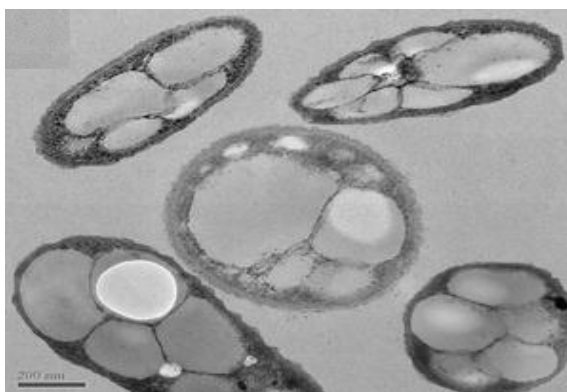
ตารางที่ 2.1 พอลิเมอร์ชีวภาพทางการค้าที่สำคัญสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ต่างๆ (Sudesh และ Iwata, 2008)

ชนิดของพอลิเมอร์	พอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ	ชื่อทางการค้า
พอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีและชีวภาพ	พอลิแลคติก (Polylactic acid)	NatureWork, U.S.	NatureWork [®]
		Hycail, Netherlands	Hycail HM
		Mitsui Chemical, Japan	Lacea [®]
		Toyota, Japan	U'z
	พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (Polybutylene succinate)	Mitsubishi Chemicals, Japan	GS Pla
		Showa High Polymer, Japan	Bionolla
พอลิเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางชีวภาพ	พอลิไฮดรอกซีแอลคานอยด์ (Polyhydroxyalkanoate)	Biomer, Germany	Biomer [®]
		Telles, USA	Mirel [™]
		Mitsubishi Gas, Japan	Biogreen [®]
		PHB Industrial S/A, Brazil	Biocycle [®]
		Metabolix, U.S.	Biopol [®]
		Kaneka, Japan	-
พอลิเมอร์ที่ได้จากการดัดแปลงพอลิเมอร์จากธรรมชาติ	พอลิเมอร์จากแป้ง (Starch polymers)	Novamont, Italy	Mater-Bi [®]
		Rodenburg, Netherlands	Solanyl [®]
		BIOP, Germany	BIOPar [®]
		Japan Corn Starch, Japan	Cornpol [®]
	อนุพันธ์ของเซลลูโลส (Cellulose derivatives)	Daicel Chemical Industries, Japan	Cellgreen



รูปที่ 2.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพระหว่างกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นฟิล์ม PHAs ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน (A) พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-3-hydroxybutyrate; P(3HB)) (B) พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต [Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate); P(3HB-co-3HHx 5 mol% 3HHx)] และ (C) พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-3-ไฮดรอกซี-4-เมทิลวาเลอเรต-โค-3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) [Poly(3-hydroxy-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate-co-3-hydroxyhexanoate); P(3HB-co-3HV-co-3H4MV-co-3HHx) 1 mol% 3HV 3 mol% 3H4MV 18 mol% 3HHx] (Chia และคณะ, 2010)

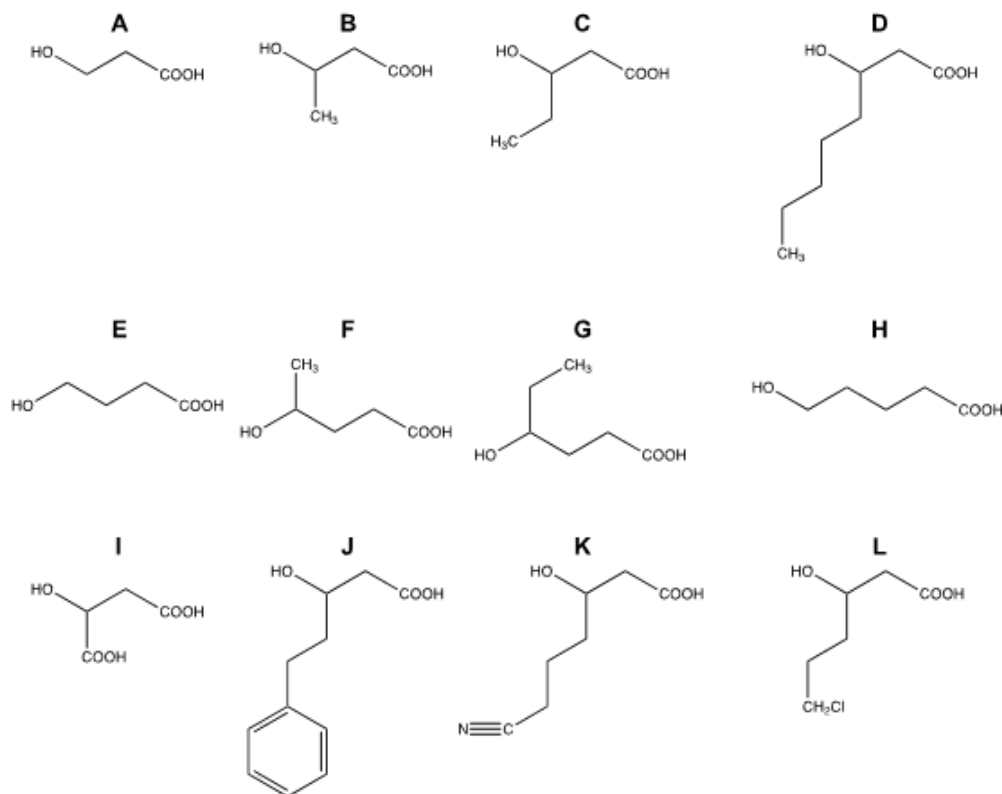
2.4 พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate; PHAs)



รูปที่ 2.2 ภาพตัดขวางของเซลล์ *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM) แสดง PHAs ภายในแกรนูลของเซลล์ หมายเหตุ เส้นที่ขีดแสดงขนาด 200 นาโนเมตร (Chanprateep และคณะ, 2008)

PHAs เป็นพอลิเอสเทอร์ซึ่งถูกสร้างและสะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ ดังรูปที่ 2.2 โดยมีรายงานการผลิต PHAs ในจุลินทรีย์กว่า 107 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.2 PHAs จะถูกสร้างและสะสมอยู่ในเซลล์ได้ถึงร้อยละ 90 ของน้ำหนักเซลล์ภายใต้ภาวะที่มีการขาดธาตุอาหารบางชนิดและมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ โดย PHAs จะทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนสำรอง (Madison และ Huisman, 1999) ซึ่งจะอยู่ในไซโทพลาซึมในรูปแบบของแกรนูลที่ไม่ละลายน้ำ PHAs มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติกและอีลาสโตเมอร์ คล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ได้จากแหล่งปิโตรเลียมชนิด PP (Steinbüchel และ Schlegel, 1991; Müller และ Seebach, 1993) และด้วยเหตุที่ PHAs สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติและผลิตขึ้นจากแหล่งที่สามารถผลิตขึ้นได้ใหม่ จึงทำให้ PHAs ได้รับความสนใจอย่างมาก และได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน (Williams และ Martin, 2003) นับตั้งแต่การค้นพบพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly(3-hydroxybutyrate) ; PHB) ใน *Bacillus megaterium* โดย Lemoigne (1926) และมีการค้นพบอนุพันธ์ของ PHAs อีกหลายชนิด ซึ่งพบว่า PHAs จะมีองค์ประกอบของไซกิงคาร์บอนที่ต่างกันระหว่าง 3-16 อะตอมที่บริเวณหมู่อัลคิล ปัจจุบันมีการค้นพบอนุพันธ์ของ PHAs มากกว่า 150 ชนิดซึ่งองค์ประกอบของโมโนเมอร์มีความหลากหลาย ทั้งนี้เนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตและภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ดังรูปที่ 2.3 และจากการที่ PHAs มีอนุพันธ์ที่หลากหลายนั้นยังทำให้มีสมบัติที่ต่างกันอีกด้วย โดยสามารถจัดจำแนกชนิดของ PHAs ได้จากความยาวของกิ่งโซ่ ได้แก่

medium-chain-length ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 6-14 อะตอม ส่วนใหญ่สร้างโดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* และ short-chain-length ซึ่งผลิตในแบคทีเรียหลายชนิด (Rehm, 2010)



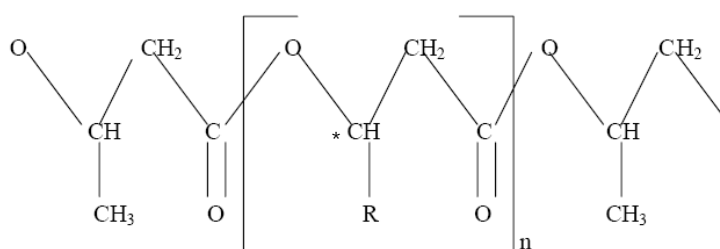
รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของ PHA ชนิดต่างๆ ตามชนิดของโซ่กิ่งที่เป็นองค์ประกอบ (A) พอลิ (3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต) [Poly(3-hydroxypropionate; P(3HP)] (B) พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [Poly(3-hydroxybutyrate); P(3HB)] (C) พอลิ (3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [Poly(3-hydroxyvalerate); P(3HV)] (D) พอลิ (3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต) [Poly(3-hydroxyoctanoate); P(3HO)] (E) พอลิ (4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [Poly(4-hydroxybutyrate); P(4HB)] (F) พอลิ (5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [Poly(4-hydroxyvalerate); P(4HV)] (G) พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต) [Poly(3-hydroxyhexanoate); P(3HHx)] (H) พอลิ (5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [Poly(5-hydroxyvalerate); P(5HV)] (I) มาเลต (Malate) (J) พอลิ (3-ไฮดรอกซี-5-ฟีนิลวาเลอเรต) [Poly(3-hydroxy-5-phenylvalerate)] (K) พอลิ (7-ไซยาโน-3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต) [Poly(7-cyano-3-hydroxyheptanoate)] (L) พอลิ (3-ไฮดรอกซี-8-คลอโรออกตะโนเอต) [Poly(3-hydroxy-8-chlorooctanoate)] (Pötter และ Steinbüchel, 2006)

ตารางที่ 2.2 แสดงสกุลของจุลินทรีย์ที่มีรายงานการสะสมพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Koller และคณะ, 2010)

<i>Acidovorax</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Methanomonas</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Actinobacillus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Actinomycetes</i>	<i>Cupriavidus</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Cyanobacterium</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Rubrivivax</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Defluviicoccus</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>Saccharophagus</i>
<i>Allochromatium</i>	<i>Derxia</i>	<i>Methylovibrio</i>	<i>Shinorhizobium</i>
<i>Anabaena</i>	<i>Delftia</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Aphanothece</i>	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Asticcaulus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Microlunatus</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Azomonas</i>	<i>Ferrobacillus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Stella</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Gamphospheria</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Gloeocapsa</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Synechococcus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Gloeothece</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Thiococcus</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Haloarcula</i>	<i>Oceanospirillum</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Brachymonas</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Haloquadratum</i>	<i>Paucispirillum</i>	<i>Thiosphaera</i>
<i>Caryophanon</i>	<i>Haloterrigena</i>	<i>Pedomicrobium</i>	<i>Variovorax</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Chloroflexus</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Protomonas</i>	<i>Wautersia</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Lamprocystis</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Zoogloea</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Rhizobium</i>	

2.4.1 โครงสร้างของ PHAs

PHAs มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (linear polyesters) ประกอบด้วยคาร์บอนออกซิเจน และไฮโดรเจน สูตรโครงสร้างทั่วไปแสดงดังรูปที่ 2.4 โมโนเมอร์ของสายพอลิเมอร์ต่อกันแบบหัวต่อหาง โดยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวแรกกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์ตัวถัดไป ตรงตำแหน่งปีต้าคาร์บอนจะเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration (Madison และ Huisman, 1999)



*C แสดงตำแหน่งปีต้าคาร์บอน

n = 1	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต)	หรือ P(3HP)
	R = เมทิล (CH ₃)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	หรือ P(3HB)
	R = เอทิล (C ₂ H ₅)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	หรือ P(3HV)
	R = โพรพิล (C ₃ H ₇)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต)	หรือ P(3HHX)
	R = บิวทิล (C ₄ H ₉)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต)	หรือ P(3HH)
	R = เพนทิล (C ₅ H ₁₁)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต)	หรือ P(3HO)
	R = เฮกซิล (C ₆ H ₁₃)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโนนาโนเอต)	หรือ P(3HN)
	R = เฮปทิล (C ₇ H ₁₅)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีเดคะโนเอต)	หรือ P(3HD)
	R = ออกทิล (C ₈ H ₁₇)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีอันเดคะโนเอต)	หรือ P(3HUD)
	R = โนทิล (C ₉ H ₁₉)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโดเดคะโนเอต)	หรือ P(3HDD)
n = 2	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ (4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	หรือ P(4HB)
n = 3	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ (5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	หรือ P(5HV)

รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Khanna และ Srivastava, 2005)

2.4.2 การจำแนกชนิดของ PHAs

2.4.2.1 การจัดจำแนกกลุ่มโดยแบ่งตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์ แบ่งเป็น 2 ประเภทดังนี้ (สุชาติ จันทรประทีป, 2539)

2.4.2.1.1 โฮมอพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย โมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน เช่น พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-3-hydroxybutyrate) และ พอลิ-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxyvalerate) เป็นต้น

2.4.2.1.2 เฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย โมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ตัวอย่างเช่น โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) หรือ PHBV] พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB-co-4HB)] เป็นต้น สำหรับพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกัน เรียกว่า เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ตัวอย่างเช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB-co-3HV-co-4HB)] เป็นต้น

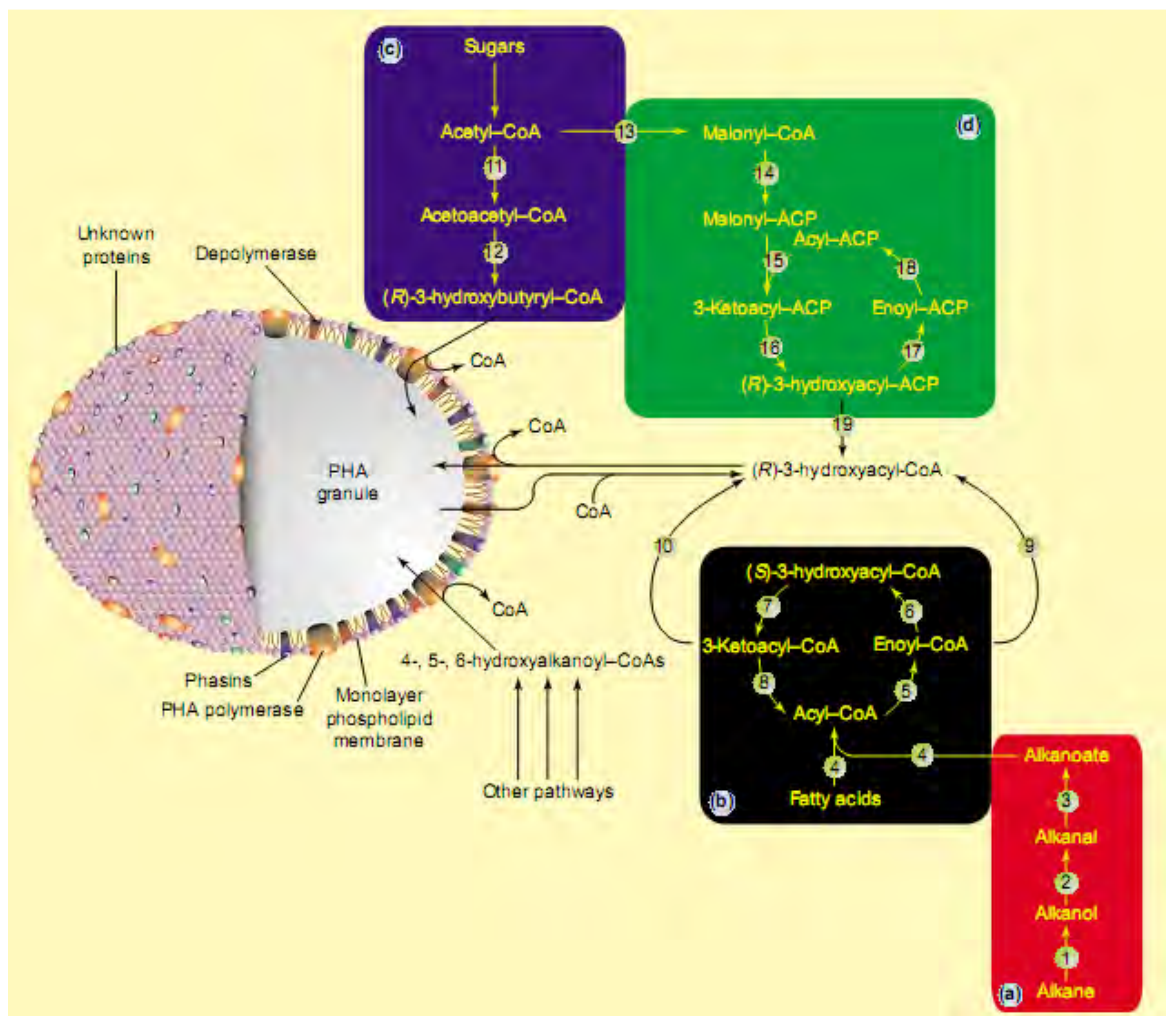
2.4.2.2 การจัดจำแนกกลุ่มโดยแบ่งตามจำนวนคาร์บอนในหน่วยโมโนเมอร์ แบ่งออกเป็น 2 ประเภทดังนี้ (Li และคณะ, 2007)

2.4.2.2.1 PHAs สายสั้น (short chain length, SCL) หรือ scl-PHAs เป็น PHAs ที่มีคาร์บอน 3-5 อะตอม

2.4.2.2.2 PHAs สายกลาง (medium chain length, MCL) หรือ mcl-PHAs เป็น PHAs ที่มีคาร์บอน 6-14 อะตอม

2.5 การชีวสังเคราะห์ PHAs

การชีวสังเคราะห์ PHAs จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ มีรายงานการศึกษาจำนวนมาก กล่าวว่า อะเซทิลโคเอ (acetyl-CoA) เป็นส่วนประกอบสำคัญที่จะทำให้เกิด 3-ไฮดรอกซีแอลคานอยล์โคเอ (3-hydroxyalkanoyl-CoA) ที่มีความยาวต่างกันขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นและเอนไซม์ที่จำเพาะในชีวสังเคราะห์ PHAs เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ PHAs ทั้งทางตรงและทางอ้อมของชีวสังเคราะห์ PHAs สรุปได้เป็น 4 วิธีหลักๆ ตามชนิดของสับสเตรท ดังแสดงในรูปที่ 2.5 และตารางที่ 2.3



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของจุลินทรีย์ที่มีการสะสม PHAs แกรนูล และกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ในชีวสังเคราะห์และสลาย PHAs (Luengo และคณะ, 2003)

ตารางที่ 2.3 แสดงเอนไซม์และวิธีที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ PHAs แกรนูล (Luengo และคณะ, 2003)

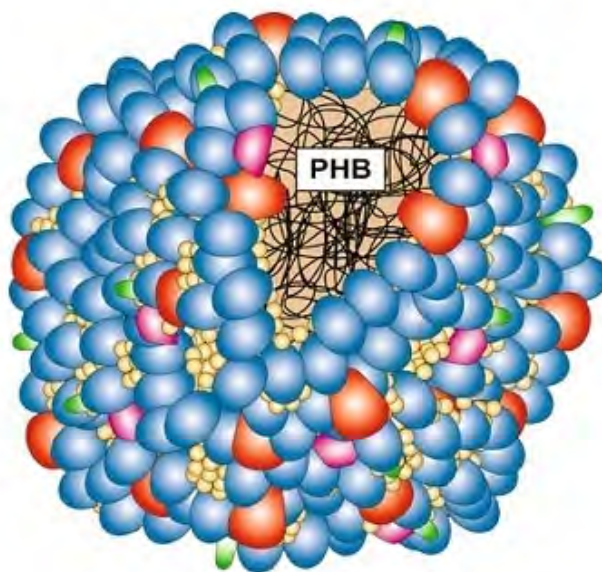
หมายเลข	วิธีการสังเคราะห์	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง
1	แอลเคนออกซิเดชัน (Alkane oxidation)	แอลเคน-1-โมนอกซิจีเนส (alkane 1-monooxygenase)
2		แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase)
3		แอลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase)
4	บีตา-ออกซิเดชัน ของกรดไขมัน (Fatty-acid β -oxidation)	เอซิล-โคเอ ไลเกส (acyl-CoA ligase)
5		เอซิล-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (acyl-CoA dehydrogenase)
6		อีโนอิล-โคเอ ไฮเดรเตส (enoyl-CoA hydratase)
7		3-ไฮดรอกซีเอซิล-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)
8		3-คีโตไทโอเลส (3-ketothiolase)
9		(R)-อีโนอิล-โคเอ ไฮเดรเตส ((R)-enoyl-CoA hydratase)
10		3-คีโตเอซิล-โคเอ รีดักเตส (3-ketoacyl-CoA reductase)
11	การสังเคราะห์จาก คาร์โบไฮเดรต	บีตา-คีโตไทโอเลส (β -ketothiolase)
12		อะซิโตอะซีทิล-โคเอ รีดักเตส แบบพึ่งพา NADPH (NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase)

ตารางที่ 2.3 แสดงเอนไซม์และวิธีที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHAs แกรนูลิวีต่างๆ (Luengo และคณะ, 2003) (ต่อ)

หมายเลข	วิธีการสังเคราะห์	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง
13	ดีโนโว-ชีวสังเคราะห์ ของกรดไขมัน (De novo fatty acid synthesis)	อะซิติล-โคเอ คาร์บอกซิเลส (acetyl-CoA carboxylase)
14		ACP-มาโลนิลทรานเฟอเรส (ACP-malonyltransferase)
15		3-คีโตเอซิล-ACP ซินเทส (3-ketoacyl-ACP synthase)
16		3-คีโตเอซิล-ACP รีดักเทส (3-ketoacyl-ACP reductase)
17		3-ไฮดรอกซีเอซิล-ACP รีดักเทส (3-hydroxyacyl-ACP reductase)
18		อีโนอิล-ACP รีดักเทส (Enoyl- ACP reductase)
19		3-ไฮดรอกซีเอซิล-ACP-โคเอ ทรานเอซิลเลส (3-hydroxyacyl-ACP-CoA transacylase)

2.5.1 กระบวนการสังเคราะห์และโครงสร้างของ PHAs แกรนูล

กระบวนการสังเคราะห์ PHAs ในจุลินทรีย์นั้น PHAs จะอยู่ในรูปของแกรนูลอยู่ในไซโทพลาซึมของเซลล์ โดยแกรนูลที่มีการสะสม PHAs อย่างสมบูรณ์แล้วจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 200 – 500 นาโนเมตร แกรนูลของ PHAs ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Williamson และ Wilkinson (1958) ภายในแกรนูลของ PHAs ประกอบไปด้วย PHAs 97.5% โปรตีน 2% และฟอสฟอลิพิด 0.5% โดยประมาณ (Griebel และคณะ, 1968) แต่บางครั้งก็อาจพบว่ามีปริมาณไขมันมากกว่า 0.5% (Steinbüchel และ Valentin, 1995) Lundgren และคณะ (1964) ได้ทำการศึกษาลักษณะพื้นผิวของ PHAs แกรนูลของ *B. megaterium* และ *B. cereus* โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าผิวหน้าของแกรนูลถูกปกคลุมด้วยเยื่อหุ้มที่มีความหนาประมาณ 15-20 นาโนเมตร (Griebel และ Merrick, 1971) ต่อมา De Koning และ Maxwell (1993) ได้จำลองโครงสร้างของแกรนูลซึ่งล้อมรอบไปด้วยฟอสฟอลิพิด ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะจำลองของ PHAs แกรนูล สีแดงคือ PHAs synthase สีน้ำเงินคือ ฟาซิน (Phasin) สีม่วงคือ PHAs ดีพอลิเมอร์ สีเขียวคือ ตัวบ่งชี้ของฟาซิน และสีเหลืองคือ ฟอสฟอลิพิด (Pötter และ Steinbüchel, 2006)

เป็นที่ทราบกันว่าแกรนูลของ PHAs จะประกอบไปด้วยโปรตีนที่บริเวณผิวของแกรนูล ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีผลต่อโครงสร้างและขนาดของแกรนูล (Steinbüchel และคณะ, 1995) Mayer และ Hoppert (1997) และ Boatman (1964) ได้ทำการศึกษาโปรตีนที่ผิวของแกรนูลเหล่านี้ พบว่าชั้นของโปรตีนบริเวณผิวของแกรนูลมีความหนา 4 นาโนเมตร แต่ถ้ารวมชั้นของไขมันจะมีความหนา 8 นาโนเมตร ลักษณะทางกายภาพของแกรนูลมี 2 แบบ คือ เป็นแกรนูลที่มีลักษณะอัสัฐาน และแกรนูลที่มีลักษณะเป็นผลึกบางส่วน (Jendrossek และ Handrick, 2002) ลักษณะโดยทั่วไปของผิวแกรนูลจะล้อมรอบไปด้วยชั้นของโปรตีนและพอสฟอลิพิด เมื่อชั้นเหล่านี้ถูกทำลายระหว่างกระบวนการคัดแยก ค่าความเป็นผลึกของพอลิเมอร์จะเพิ่มสูงขึ้น 50-60% แกรนูลที่มีลักษณะเป็นผลึกจะหลอมละลายที่อุณหภูมิระหว่าง 170-180 องศาเซลเซียส

โปรตีนที่อยู่บริเวณผิวของแกรนูล (Granule-associated proteins; GAPs) ของแบคทีเรียมีด้วยกัน 4 ชนิด คือ PHAs ซินเทส (PHAs synthase; PhaC) PHAs ดีพอลิเมอร์ส (PHAs depolymerases; PhaZi) ฟาซิน (Phasin; PhaP) และตัวควบคุมการแสดงออกของฟาซิน (regulator of phasin expression; PhaR)

2.6 การย่อยสลาย PHAs โดยชีววิถี (Biodegradation of PHAs)

ข้อดีที่ได้เปรียบเหนือพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดอื่นๆ ของ PHAs นั้นคือความสามารถในการย่อยสลายทั้งภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายได้โดยใช้ความร้อนและการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดยการย่อยสลาย PHAs โดยชีววิธินั้นขึ้นอยู่กับสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของพอลิเมอร์ เช่น PHAs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะสามารถย่อยสลายได้เร็วกว่า PHAs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เป็นต้น และเราสามารถแบ่งภาวะของการย่อยสลาย PHAs ได้ ออกเป็น 2 ภาวะ ดังนี้

2.6.1 การย่อยสลายโดยชีววิถีในสิ่งแวดล้อม (Biodegradation in the environment)

ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตและสะสม PHAs ในภาวะที่ธาตุอาหารถูกจำกัด จะนำ PHAs ที่ผลิตและสะสมไว้นั้นสะสมมา่อยและนำไปใช้เมื่อธาตุอาหารเพียงพอ (Williams และ Peoples, 1996) อย่างไรก็ตามความสามารถในการสะสม PHAs ไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้ว่าจุลินทรีย์ชนิดนั้นจะมีความสามารถในการย่อย PHAs ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม (Gilmore และคณะ, 1990) พอลิเมอร์แต่ละชนิดนั้นมีขนาดที่ใหญ่และไม่สามารถผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ แต่

จุลินทรีย์จะค่อยๆ ปล่อยเอนไซม์ออกมาเรื่อยๆ ซึ่งจะย่อยให้กลายเป็นโมโนเมอร์ เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย PHB คือ 3HB (Doi และคณะ, 1992) และถ้าย่อย PHBV จะได้ผลิตภัณฑ์สองชนิดคือ 3HB และ 3HV (Luzier, 1992) ซึ่งโมโนเมอร์เหล่านี้มีความสามารถในการละลายในน้ำและมีขนาดเล็กพอที่จะแทรกตัวผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เข้าไปในเซลล์ได้ โมโนเมอร์เหล่านี้เมื่อเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์จะถูกย่อยสลายผ่านวิถีปิตาออกซิเดชัน (β -oxidation) และ Tricarboxylic Acid Cycle (TCA) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ ภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจน และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นแก๊สมีเทนในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถย่อยสลาย PHAs ได้ ในภาวะที่มีออกซิเจน หรือในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ในปี 1996 Lee ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียและเชื้อราที่สามารถย่อยสลาย PHAs ได้จากสิ่งแวดล้อมต่างๆ จากการทดลองสามารถคัดแยก *Acidovorax faecilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Comamonas* sp., *Pseudomonas lemoignei* และ *Variovorax paradoxus* จากดิน *Alcaligenes faecalis* และ *Pseudomonas* sp. จากตะกอนบำบัด *Comamonas testosterone* จากน้ำทะเล *Ilyobacter delafieldii* จากตะกอนบำบัดในระบบที่ไม่มีออกซิเจน

ทั้งนี้อัตราการย่อยสลายโดยชีววิถีของ PHAs ขึ้นอยู่กับภาวะของสิ่งแวดล้อมนั้นๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น pH ธาตุอาหาร รวมไปถึงสมบัติของ PHAs เช่น องค์ประกอบของ โมโนเมอร์ ความเป็นผลึก และพื้นที่ผิว เป็นต้น โดยปกติ PHAs จะมีความสามารถในการย่อยสลายในธรรมชาติได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ PLA ที่จะสลายตัวอย่างสมบูรณ์ในภาวะที่จำเพาะ (Philip และคณะ, 2007)

2.6.2 การย่อยสลายโดยชีววิถีในระบบสิ่งมีชีวิต (Biodegradation in living systems)

โดยปกติแล้วเราจะพบ 3HB ในเลือดของสัตว์ชั้นสูงในส่วนของพลาสมา (Lee, 1996) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ PHAs ได้รับความสำคัญในการนำมาใช้ทางการแพทย์ เช่น การนำมาใช้เป็นตัวควบคุมในการปลดปล่อยยาในระยะยาว การนำมาใช้เป็นหมุดและด้ายในการเย็บแผล และใช้เป็นกระดูกและหลอดเลือดเทียม ดังนั้นกระบวนการย่อยสลายทางชีววิถีของ PHAs จึงมีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากอัตราการเกิดใหม่ของเนื้อเยื่อต้องเท่ากันกับอัตราการสลายของ PHAs ในการนำไปใช้ปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ ซึ่งจากการศึกษาของ Duvernoy และคณะ (1995) พบว่าแผ่นฟิล์ม PHB จะมีการย่อยสลายประมาณร้อยละ 30-80 ภายในเวลา 1 ปี โดยอัตราการย่อยสลายขึ้นกับสมบัติของ PHAs นั้นๆ การย่อยสลายโดยชีววิถีของ PHAs ในระบบสิ่งมีชีวิตนั้นจะเริ่มจาก PHAs ถูกย่อยโดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในเลือดและเนื้อเยื่อของสัตว์ โดยจากการศึกษาของ Atkins

และคณะ (1996) พบว่าอัตราการย่อยสลายของ PHAs ในน้ำเลือดนั้นมากที่สุด รองลงมาคือน้ำย่อยจากตับอ่อน และน้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร ตามลำดับ

2.7 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHAs

แม้ว่าการประยุกต์ทางกระบวนการชีวภาพในการผลิต PHAs ระดับอุตสาหกรรมมีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดไปสู่การพัฒนาแบบยั่งยืน ก็ยังถือว่าไม่มีความคุ้มค่าในด้านเศรษฐกิจ เนื่องจากราคาของ PHAs โดยเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกทั่วไปที่ผลิตจากแหล่งฟอสซิล เมื่อพิจารณาต้นทุนที่ใช้ในการผลิต PHAs สามารถแบ่งประเภทของต้นทุนการผลิตที่สำคัญ ได้แก่

- ราคาของแหล่งคาร์บอน
- ราคาของแหล่งไนโตรเจน
- ราคาสารตั้งต้น (Precursor)
- ต้นทุนในกระบวนการคัดแยกและทำให้บริสุทธิ์

ในปี 1995 Hänggi ศึกษาต้นทุนในการผลิต PHAs พบว่าวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเป็นปัจจัยหลักของต้นทุนในการผลิต PHAs โดยเป็นสัดส่วนที่สูงกว่า 50% โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งคาร์บอน เนื่องจากกระบวนการผลิต PHAs ส่วนใหญ่ใช้แหล่งคาร์บอนบริสุทธิ์ เช่น แป้ง ซูโครส กลูโคส และฟรักโทส แต่ในกระบวนการผลิต PHAs จุลินทรีย์จะสร้างและสะสม PHAs ภายใต้ภาวะที่มีออกซิเจนทำให้สูญเสียคาร์บอนบางส่วนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ดังนั้นปริมาณคาร์บอนที่น้อยกว่าครึ่งหนึ่งของปริมาณคาร์บอนทั้งหมดจะถูกนำไปชีวะสังเคราะห์เป็น PHAs และชีวมวลของจุลินทรีย์ (Koller และคณะ, 2010) ดังนั้นการนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต PHAs นับเป็นกลยุทธ์หนึ่งที่อาจลดต้นทุนการผลิต PHAs และลดต้นทุนในกระบวนการจัดการของเหลือทิ้งจากการเกษตรหรืออุตสาหกรรมอีกด้วย ตารางที่ 2.4 แสดงตัวอย่างวัสดุเหลือทิ้งจากภาคการผลิตต่างๆ ที่มีรายงานด้านการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิต PHAs

ด้วยเหตุนี้จึงเป็นมูลเหตุจูงใจในการทำวิจัยครั้งนี้ ในการนำลิกโนเซลลูโลสมาพัฒนากระบวนการปรับสภาพที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHAs โดยผู้วิจัยเลือกใช้ไบจามจรีเป็นต้นแบบในการศึกษาศักยภาพและความเป็นไปได้ในการนำลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาอย่างยั่งยืน ในการนำแหล่งคาร์บอนที่

เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร หรืออุตสาหกรรม ซึ่งสามารถปลูกทดแทนขึ้นใหม่ได้และมีอยู่ภายในประเทศไทยในการผลิต PHAs ที่อาจมีต้นทุนการผลิตที่ลดลง

2.8 จามจุรี



จามจุรี (Rain tree) เป็นพืชสกุล *Samanea* เป็นไม้ยืนต้น สูง 10–25 เมตร เรือนยอดแผ่กว้างคล้ายร่มเมื่อเจริญในที่โล่ง เปลือกแตกลอนเป็นสะเก็ด เมื่อเจริญเต็มที่มีความสูงประมาณ 15-25 เมตร และสามารถสูงได้มากถึง 40-50 เมตร เมื่อเจริญในพื้นที่ที่มีไม้ยืนต้นเจริญอยู่อย่างหนาแน่น ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกสองชั้น เรียงสลับ แกนก้านยาวประมาณ 15 เซนติเมตร ใบประกอบย่อย 2-5 คู่ มีต่อมระหว่างก้านใบประกอบย่อย ใบย่อย 3–10 คู่ รูปรี รูปไข่ หรือรูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปอน กว้าง 0.7–4 เซนติเมตร ยาว 1.5–6 เซนติเมตร คู่บนมีขนาดใหญ่กว่าคู่ด้านล่าง ปลายใบมน มีติ่งแหลม โคนใบกลมหรือตัด เบี้ยว แผ่นใบด้านล่างมีขนละเอียด ช่อดอกออกใกล้ปลายกิ่งมี 1 หรือหลายช่อ ดอกตรงกลางช่อไว้ก้าน กลีบเลี้ยงติดกันเป็นหลอด ยาว 8-9 มิลลิเมตร ปลายเป็นหยักตื้นๆ กลีบดอกติดกันเป็นหลอด ยาวประมาณ 1.2 เซนติเมตร ปลายหยักรูปสามเหลี่ยม มีขนด้านบน หลอดก้านเกสรเพศผู้ยาวกว่ากลีบดอกเล็กน้อย ดอกด้านข้างมีก้านดอกสั้นๆ กลีบเลี้ยงยาว 5-7 มิลลิเมตร หลอดก้านเกสรเพศผู้สั้นกว่ากลีบดอก รังไข่เกลี้ยงไว้ก้าน ผลเป็นฝักรูปโค้งเล็กน้อย ยาว 15–20 เซนติเมตร เมื่อแก่จะกลายเป็นสีดำ ภายในฝักมีเมล็ด 15–25 เมล็ด (Elevitch และ Staples, 2006)

จามจุรีมีถิ่นกำเนิดในอเมริกาใต้เขตร้อน นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ ใช้ร่มเงาของต้นจามจุรีในการบังแสงแดดให้แก่พืชของเกษตรกร ใช้เป็นอาหารให้แก่ปศุสัตว์และไม้เศรษฐกิจในการเลี้ยงกุ้งและงานแกะสลัก บางครั้งพบกระจายพันธุ์เองตามริมน้ำ และที่ราบลุ่มทั่วประเทศ สกุลจามจุรีมีสมาชิกประมาณ 18 ชนิด มีเขตการกระจายพันธุ์เฉพาะในแถบอเมริกาเหนือและใต้ ในไทยนำเข้ามาปลูก 1 ชนิด คือ จามจุรี *Samanea saman* (Jacquin) Merrill

ตารางที่ 2.4 แหล่งคาร์บอนที่เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ ที่สามารถนำมาผลิต PHAs

แหล่งคาร์บอน	จุลินทรีย์	ชนิดของ PHAs	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณPHAs (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์)	รายงานอ้างอิง
ของเสียจากกระบวนการผลิตน้ำเชื่อมจากอินทผลัม	<i>B. megaterium</i>	PHB	3	50	Omar และคณะ, 2001
กลีเซอรอล	<i>Zobellella denitrificans</i> strain MW1	PHB	5	87	Ibrahim และ Steinbüchel, 2009
สารละลายน้ำตาลจากการย่อยชานอ้อยด้วยกรด	<i>Ralstonia eutropha</i>	PHB	11.1	56.5	Yu และ Stahl, 2008
ของเสียจากกระบวนการผลิตน้ำเชื่อมจากอินทผลัม	<i>B. megaterium</i>	PHB	3.3	52	Ataei และคณะ, 2008
	<i>Bacillus</i> sp.	PHBV	3.6	71	
	<i>Ralstonia eutropha</i>	PHB	0.98	35	
กลีเซอรอลดิบ	<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134	PHB	50	48	Mothes และคณะ, 2007
กากน้ำตาล	Mixed culture	PHBV	-	30	Albuquerque และคณะ, 2007

ตารางที่ 2.4 แหล่งคาร์บอนที่เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ ที่สามารถนำมาผลิต PHAs (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	จุลินทรีย์	ชนิดของ PHAs	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณPHAs (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์)	รายงานอ้างอิง
หางนม	<i>Pseudomonas hydrogenovora</i>	PHBV	10.58	1.27	Koller และคณะ, 2008
หางนม	Recombinant <i>E. coli</i>	PHBV	11	49.6	Koller และคณะ, 2005
กลีเซอรอล			21.3	76	
กากน้ำตาล	Mixed culture	PHBV	-	37	Bengtsson และคณะ, 2010
น้ำมันจากเนื้อปาล์ม	<i>C. necator</i> PHB-4	PHBV	7.9	79	Bhubalan และคณะ, 2008
กากน้ำตาล	recombinant <i>Klebsiella aerogenes</i>	PHB	-	65	Zhang และคณะ, 1994
น้ำมันปาล์มดิบ	<i>Erwinia</i> sp. USMI-20	PHB	-	46	Majid และคณะ, 1999
ของเสียจาก อุตสาหกรรม แป้งมันฝรั่ง	<i>R. eutropha</i> NCIMB 11599	PHB	179	55	Haas และคณะ, 2008

2.9 การผลิต PHAs จากแหล่งลิกโนเซลลูโลส

ถึงแม้ว่าปัจจุบันนักวิจัยต่างสนใจศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต PHAs ในระดับอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น โดยเน้นการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกลงหรือเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ มาเป็นวัตถุดิบเพื่อลดต้นทุนการผลิต แต่งานวิจัยด้านการผลิต PHAs จากแหล่งลิกโนเซลลูโลสยังมีอยู่น้อยมาก ดังแสดงในตารางที่ 2.6

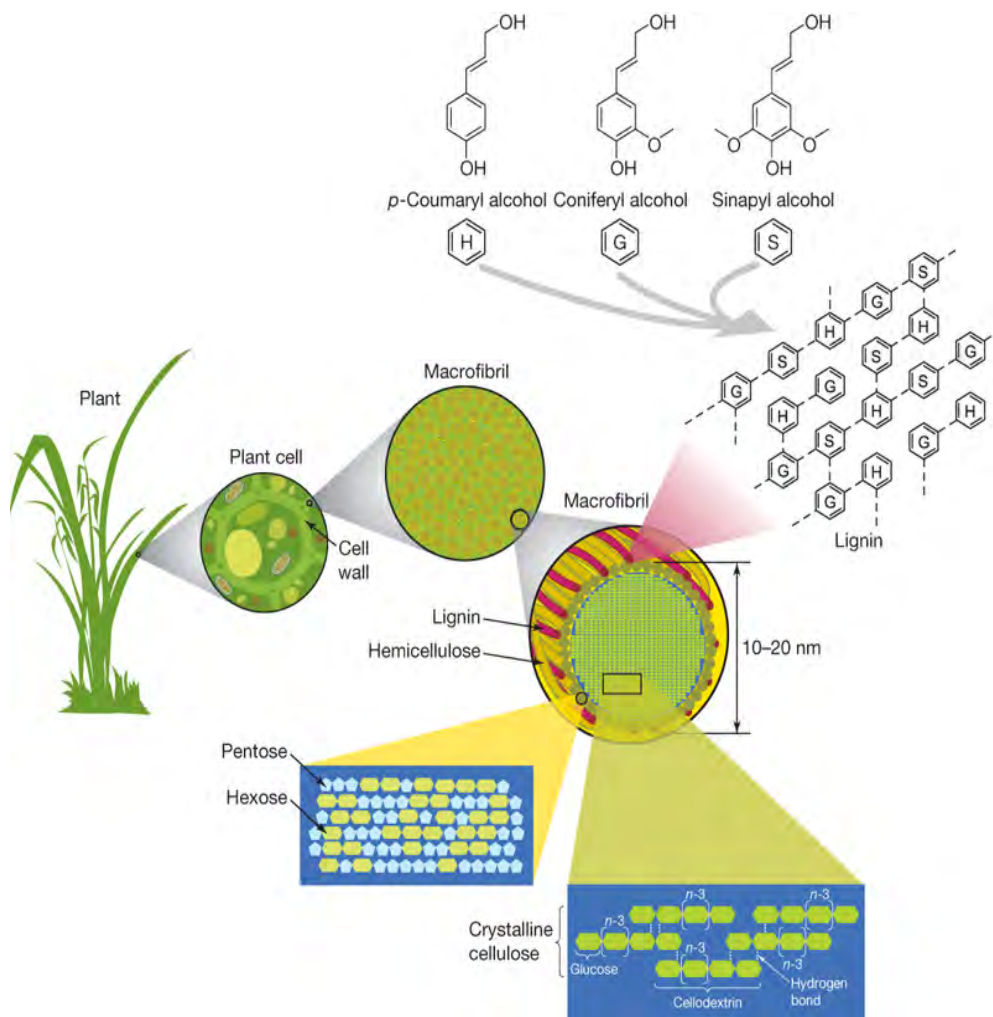
ลิกโนเซลลูโลสถือเป็นแหล่งคาร์บอนที่ได้จากธรรมชาติ ที่มีปริมาณมาก สามารถผลิตขึ้นได้ใหม่ หาได้ง่ายตามแต่ละท้องถิ่น ทำให้ราคาถูกไม่ขึ้นกับกลไกราคาตลาดโลก ซึ่งต่างจากแหล่งปิโตรเคมีที่มีอย่างจำกัด ซึ่งหากนำลิกโนเซลลูโลสมาผลิตพลาสติกชีวภาพ จะช่วยลดปริมาณการใช้แหล่งปิโตรเคมี ลดการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ และช่วยลดปัญหาโลกร้อน ลิกโนเซลลูโลสจึงเป็นแหล่งที่น่าสนใจและมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ลิกโนเซลลูโลสยังสามารถเปลี่ยนให้เป็นที่ตั้งสถานะของแข็ง ของเหลว และแก๊ส การเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสนิยมนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานไฟฟ้า ความร้อน เชื้อเพลิง และสารเคมีต่างๆ ดังนั้นแหล่งลิกโนเซลลูโลสจึงมีความน่าสนใจเมื่อพิจารณาจากประโยชน์ที่ได้รับ (Saxena และคณะ, 2009) โดยแหล่งของลิกโนเซลลูโลสสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 แหล่งที่สำคัญ คือ แหล่งป่าไม้ แหล่งการเกษตร วัชพืช และขยะที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ (van Wyk, 2001) โดยองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสแต่ละแหล่งแสดงในตารางที่ 2.5 โดยส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืชนั้นๆ ซึ่งชนิดและองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสมีผลต่อกระบวนการเปลี่ยนสภาพลิกโนเซลลูโลสในการนำมาใช้งาน โดยองค์ประกอบหลักๆ ของลิกโนเซลลูโลส คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ดังรูปที่ 2.7 อัตราส่วนโดยเฉลี่ยจะอยู่ที่ เซลลูโลสร้อยละ 30-60 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 20-40 และลิกนินร้อยละ 20-25 ดังแสดงในตารางที่ 2.5

Prasad และคณะ (2007) รายงานการผลิต PHAs จากลิกโนเซลลูโลสโดยแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน เริ่มจากขั้นตอนที่ 1 การย่อยวัตถุดิบเพื่อให้ได้น้ำตาล และขั้นตอนที่ 2 การผลิต PHAs โดยจุลินทรีย์จากน้ำตาลที่ได้ แต่เนื่องจากลิกโนเซลลูโลสมีลิกนินเป็นองค์ประกอบและเป็นโครงสร้างที่ขัดขวางการย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีกระบวนการกำจัดลิกนินออกจากลิกโนเซลลูโลสเสียก่อน โดยกระบวนการนี้เรียกว่า กระบวนการปรับสภาพ (pretreatment) ปัจจุบันการย่อยเอนไซม์และการย่อยด้วยกรดเป็นวิธีหลักในการแปรสภาพลิกโนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล อย่างไรก็ตามการย่อยลิกโนเซลลูโลสโดยใช้กรดเจือจางเป็นวิธีที่เร็วและง่ายที่สุด และสามารถขยายขนาดการผลิตได้ต่างจากเอนไซม์ที่เมื่อขยายขนาดการผลิตจะเกิดสาร

ยับยั้งซึ่งจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ อีกทั้งเอนไซม์มีราคาแพงจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้กับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ตารางที่ 2.5 แสดงองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสจากแหล่งต่างๆ และในพืชแต่ละชนิด (van Wyk, 2001 และ Koller และคณะ, 2010)

	เซลลูโลส (ร้อยละ)	เฮมิเซลลูโลส (ร้อยละ)	ลิกนิน (ร้อยละ)
จำแนกตามแหล่งของลิกโนเซลลูโลส			
วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	38	32	17
ขยะที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ	45	9	10
แหล่งป่าไม้ และไม้เนื้อแข็ง	50	23	22
วัชพืชที่ใช้เป็นพืชพลังงาน	45	30	15
จำแนกตามชนิดของพืช			
ใบจามจุรีในการทดลองนี้	40	-	26
ซังข้าวโพด	42-45	33-35	10-15
ใบและซังข้าวโพด	35	25-38	35
ฟางข้าว	39	36	10
ฟางข้าวสาลี	33-47	22-30	13-19
ชานอ้อย	40	29	13
ต้นปอ	44-45	19-21	20-22



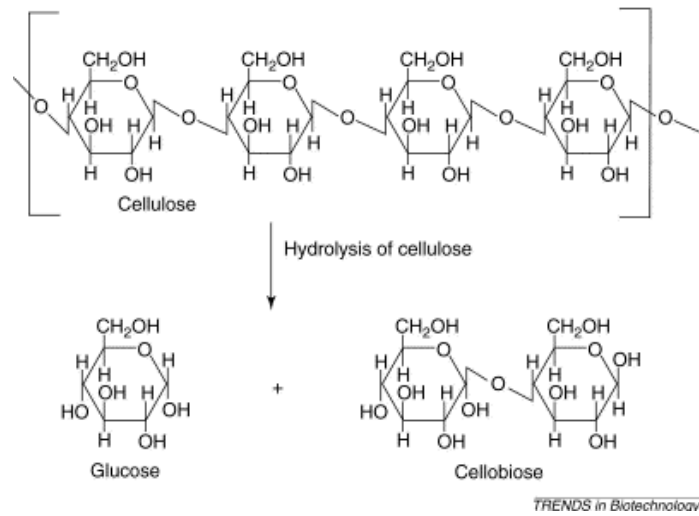
รูปที่ 2.7 แสดงองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส

ตารางที่ 2.6 การผลิต PHAs โดยใช้แหล่งลิกโนเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

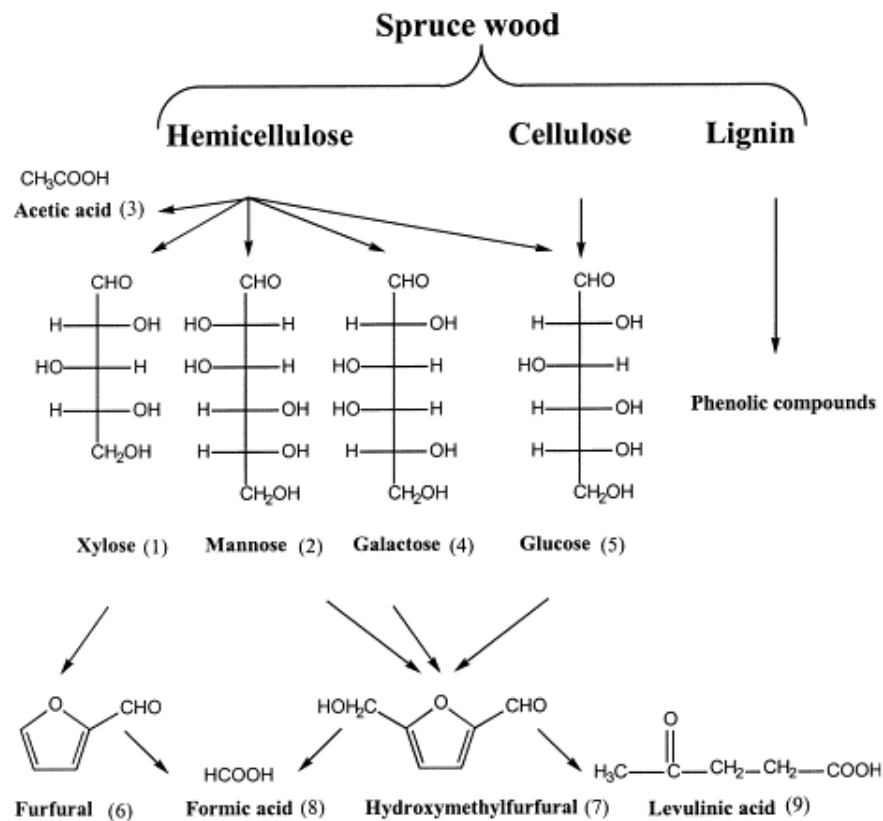
แหล่งคาร์บอน	จุลินทรีย์	ชนิดของ PHAs	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณPHAs (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์)	อ้างอิง
กากของต้นอากาเว่ (Agavae)	<i>Saccharophagus degradans</i> (ATCC 43961)	PHB	-	-	Munoz และ Riley, 2008
เปลือกถั่ว	<i>Bacillus</i> sp.	PHB	0.70	62	Kumar และคณะ, 2008
ซีเลื่อย	<i>Brevundimonas vesicularis</i> LMG P-23615	3HP 3HB	0.253	64	Silva และคณะ, 2007
	<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i> LMG 17324	และ 3HV	0.320	72	
ชานอ้อย	<i>Ralstonia eutropha</i>	PHB	0.65	1.4	Yu และ Stahl, 2008
	<i>Ralstonia eutropha</i> (Tolerant inoculums)		11.1	56.5	
รำข้าว	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1	PHB	3.19	33.8	Van-Thuoc และคณะ, 2007

2.10 การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด

การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดนั้นจะเกิดจากกรดทั้งที่เจือจางและเข้มข้นจะเข้าไปย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสซึ่งต่อกันเป็นพอลิเมอร์สายยาวอยู่ในชีวมวลของลิกโนเซลลูโลส ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งของพอลิเมอร์ที่ถูกกรดย่อย เช่น เมื่อย่อยเซลลูโลสด้วยกรด จะได้น้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอส (รูปที่ 2.8) โดยเฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อยได้ง่ายกว่าเซลลูโลส ข้อดีของการย่อยด้วยกรด คือ การที่กรดสามารถแทรกซึมเข้าไปย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสโดยที่ยังมีลิกนินอยู่ได้ และอัตราการย่อยด้วยกรดยังมีค่าที่สูงกว่าการย่อยโดยใช้เอนไซม์ แต่เนื่องจากกรดไม่มีความจำเพาะเหมือนเอนไซม์ทำให้ในภาวะที่มีกรด น้ำตาลที่ได้อาจถูกกรดย่อยต่อไปด้วย ในกระบวนการย่อยด้วยกรดส่วนใหญ่มักจะนิยมใช้กรดซัลฟิวริกและกรดไฮโดรคลอริก ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-10 ที่อุณหภูมิปานกลาง (100 -150 องศาเซลเซียส) แต่การย่อยด้วยกรดจะมีประสิทธิภาพต่ำในการผลิตน้ำตาลเฮกโซส เนื่องจากในระหว่างการย่อยด้วยกรด น้ำตาลเฮกโซสที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะถูกย่อยต่อด้วยกรด กลายเป็นผลิตภัณฑ์ไม่ต้องการ ได้แก่ ฟิวฟูรัล (furfural) ซึ่งเกิดจากการย่อยน้ำตาลเพนโทสด้วยกรด และ 5-hydroxymethylfurfural (HMF) ซึ่งเกิดจากการย่อยน้ำตาลเฮกโซสด้วยกรด นอกจากนี้ยังเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงชนิดอื่นๆ ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid) วานิลลิน (Vanillin) ซิงรัลดีไฮด์ (Syringaldehyde) และ 4-ไฮดรอกซีเบนซัลดีไฮด์ (4-hydroxybenzaldehyde) ดังแสดงในรูปที่ 2.9 โดยกรดอะซิติกจะเกิดในช่วงแรกของการย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วยกรด ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่อะซิทิลของน้ำตาล กลายเป็นสารยับยั้งกระบวนการหมัก ทำให้เชื้อเจริญได้ช้า และได้ผลิตภัณฑ์ลดลง โดยผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเหล่านี้จะมีปริมาณที่มากขึ้นหากภาวะที่ใช้ในการย่อยมีอุณหภูมิและปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น กรดซัลฟิวริกและไฮโดรคลอริกเป็นกรดที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลส แต่ในทางกลับกัน กรดฟอสฟอริกอาจจะทำให้เกิดข้อได้เปรียบมากกว่าหากนำมาใช้ในการย่อยลิกโนเซลลูโลส เนื่องจากกรดฟอสฟอริกมีความรุนแรงที่น้อยกว่ากรดชนิดอื่นๆ ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ฟิวฟูรัล และกรดอะซิติก ดังเช่นการทดลองของ Gámez และคณะ (2004) รายงานว่าการใช้กรดฟอสฟอริกเจือจางความเข้มข้นร้อยละ 6 ย่อยชานอ้อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 300 นาที ได้น้ำตาลรีดิทซ์ 21.4 กรัมต่อลิตร และเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงน้อยกว่า 4 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Romero และคณะ (2007) ใช้กรดฟอสฟอริกเจือจางความเข้มข้นร้อยละ 8 ย่อยกิ่งของต้นมะกอก ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที ซึ่งสามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสในวัตถุดิบให้กลายเป็นน้ำตาลได้ถึงร้อยละ 77

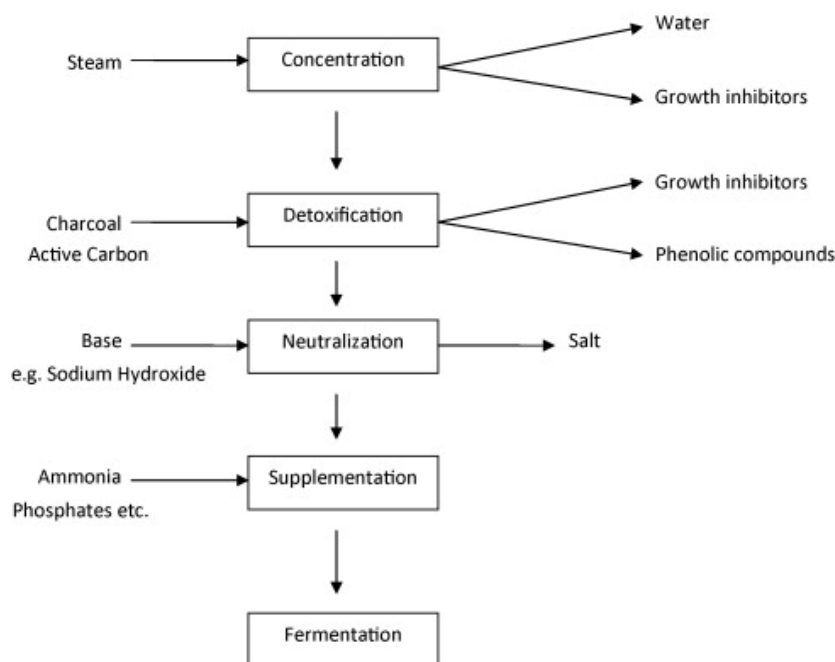


รูปที่ 2.8 แสดงกระบวนการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสด้วยกรด (van Wyk, 2001)



รูปที่ 2.9 แสดงกระบวนการการเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสด้วยกรด (Palmqvist และ Hahn-Hagerdal, 2000)

โดยทั่วไปสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยกรดจำเป็นต้องผ่านกระบวนการต่างๆ ภายหลังจากการย่อยหากต้องการนำสารละลายนั้นมาใช้สำหรับเป็นอาหารของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปกระบวนการที่นิยมเพื่อกำจัดสารยับยั้งที่เกิดขึ้นภายหลังจากการย่อยลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด คือ การทำให้ผลิตภัณฑ์เข้มข้นขึ้น (concentration) กระบวนการกำจัดสารพิษที่เกิดขึ้นจากการย่อยด้วยกรด (detoxification) ทำให้สารละลายเป็นกลาง (neutralization) และการเติมธาตุอาหารอื่นๆ (supplementation) ดังรูปที่ 2.10 กระบวนการทำให้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยกรดเข้มข้นขึ้นนั้นจะใช้การระเหยน้ำออกเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลในสารละลาย และกระบวนการกำจัดสารพิษที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยด้วยกรดจะใช้ผงถ่านกัมมันต์ในการดูดซับสารพิษออกจากสารละลาย และการปรับค่า pH ของสารละลายให้เป็นกลางทำได้โดยการเติมด่างลงไปในสารละลาย ซึ่งจากกระบวนการนี้จะเกิดเกลือที่มีความสามารถในการละลายได้ในน้ำที่ต่ำ และสามารถถูกกำจัดออกโดยการกรอง ยกตัวอย่างเช่น ในสารละลายที่ได้จากการย่อยลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดซัลฟิวริกและนำมาปรับให้เป็นกลางด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) จะเกิดเกลือแคลเซียมซัลเฟต (CaSO_4) ขึ้น และขั้นตอนสุดท้ายการเติมธาตุอาหารอื่นๆ ได้แก่ ไนโตรเจน และธาตุอาหารต่างๆที่จะเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยง และจุดเด่นอีกประการของกรดฟอสฟอริก คือหลังจากกระบวนการปรับให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จะได้เกลือโซเดียมฟอสเฟต ซึ่งเกลือที่เกิดขึ้นนี้ไม่จำเป็นต้องกำจัดออกเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งของโซเดียมและฟอสเฟตได้ ทำให้สามารถลดขั้นตอนการกรองตะกอนของเกลือออก ลดขั้นตอนและต้นทุนของกระบวนการเพราะไม่ต้องเติมแหล่งของโซเดียมและฟอสเฟตและยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากไม่เกิดขยะที่มาจากตะกอนของเกลืออีกด้วย (Gámeza และคณะ, 2006)

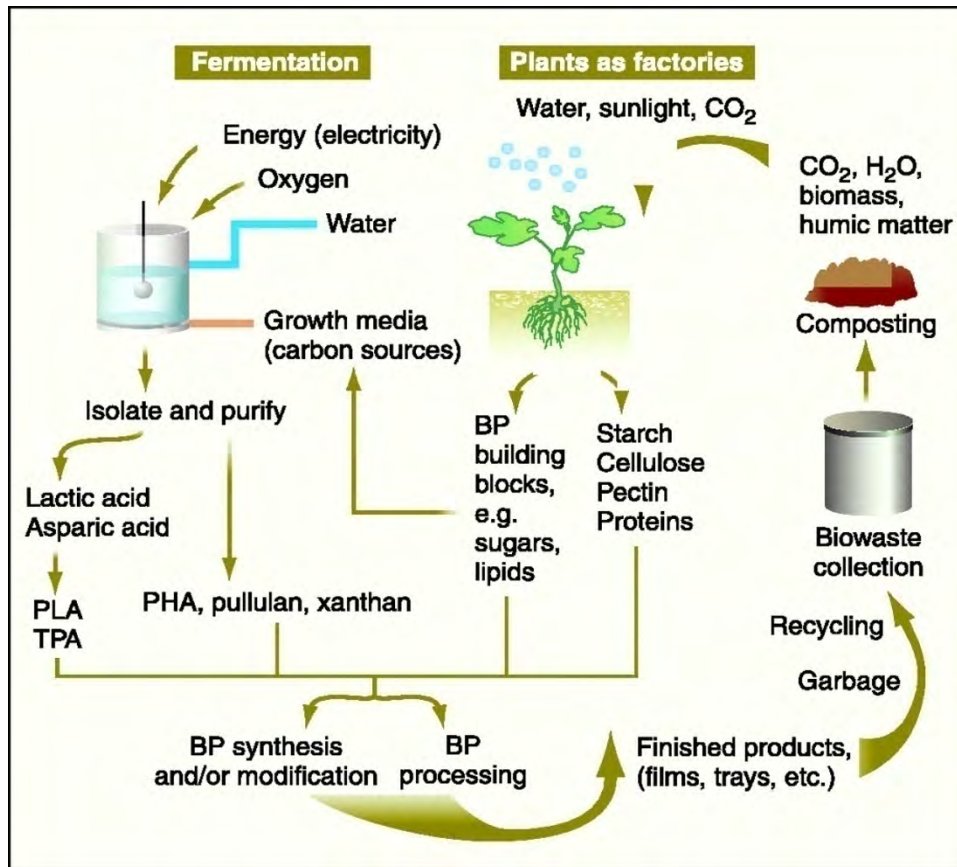


รูปที่ 2.10 กระบวนการปรับสภาพที่จำเป็นภายหลังการย่อยด้วยกรด (Gámez andคณะ, 2006)

2.11 วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนการสังเคราะห์ PHAs โดยการใช้ลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมกระดาษเป็นแหล่งคาร์บอน

วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของ PHAs จากแหล่งลิกโนเซลลูโลส ดังแสดงในรูปที่ 2.11 เป็นการนำลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตกระดาษอุตสาหกรรมป่าไม้ และการเกษตรซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสซึ่งสามารถเปลี่ยนให้กลายเป็นน้ำตาลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ที่จะสร้างและสะสมแกรนูล PHAs เมื่อสกัดและทำให้บริสุทธิ์ นำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกชนิดต่างๆ หลังจากผ่านการใช้งานแล้ว PHAs สามารถกำจัดเช่นเดียวกับขยะประเภทของแข็งทั่วไป เมื่อเกิดการย่อยสลายโดยธรรมชาติอย่างสมบูรณ์ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้สำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช และนำกลับมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิต PHAs ต่อไป ดังนั้นจึงมั่นใจได้ว่า PHAs

สามารถหมუნเวียนเป็นวัฏจักรได้ทางกระบวนการชีวภาพอย่างแท้จริง (Verlinden และคณะ, 2007)



รูปที่ 2.11 วัฏจักรของ PHAs ที่ใช้ลิกโนเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนและนำไปผลิตพอลิเมอร์ผ่านกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ (Gross และ Kalra, 2002)

2.12 การผลิต PHAs เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

การนำ PHAs ไปใช้งานนั้นไม่ได้จำกัดอยู่ที่นำไปเป็นวัสดุห่อหุ้มหรือบรรจุเท่านั้น แต่ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับงานประเภทต่างๆ ได้อย่างหลากหลายไม่ว่าจะเป็นวัสดุสำหรับการเกษตร เกษษกรรม และการแพทย์ สำหรับข้อได้เปรียบของ PHAs ที่ทำให้ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ถึงแม้จะมีราคาที่สูงกว่า โดยการนำ PHAs มาใช้เชิง

พาณิชย์เริ่มตั้งแต่ปลายปี ค.ศ. 1982 บริษัทอิมพีเรียล เคมีเคิล อินดัสตรี (Imperial Chemical Industries, ICI) ได้พัฒนาการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งผลิต PHB จาก *R. eutropha* H16 โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Biopol® (Reddy และคณะ, 2003) นำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตขวดแชมพูโดยบริษัท Wella AG ซึ่งนับเป็นจุดเริ่มต้นของ PHAs ในทางการค้าและต่อมา Biopol® ได้ถูกซื้อลิขสิทธิ์โดยบริษัท Zeneca ให้แก่บริษัท Monsanto ในปี 1996 และในปี 1998 บริษัท Metabolic Inc. ได้ซื้อลิขสิทธิ์และพัฒนา PHAs ร่วมกับโรงพยาบาลเด็กในบอสตัน ภายใต้เครื่องหมายการค้า Tephra ในการพัฒนา PHAs สำหรับใช้ในทางการแพทย์ เช่น ลึนหัวใจเทียม ด้ยสำหรับเย็บแผล และวัสดุสำหรับช่วยยึดกระดูก (Philip และคณะ, 2007) ต่อมีการพัฒนาการผลิต PHAs ในระดับอุตสาหกรรมมากขึ้น โดยบริษัทระดับโลกต่างๆ ที่มีชื่อเสียง ดังแสดงในตารางที่ 2.7

ในปี 2006 ราคา PHB อยู่ในช่วง 10-12 ยูโรต่อกิโลกรัม ซึ่งมีราคาสูงกว่าพอลิเมอริกที่ทำจากแป้ง และพอลิเมอริกที่ทำจากวัสดุธรรมชาติอื่นๆ เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตที่สูง เช่น ราคาวัตถุดิบที่สูงขึ้น (Kosior และคณะ, 2006) การที่จะนำ PHB ไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางหรือไม่ขึ้นอยู่กับต้นทุนการผลิต โดยต้นทุนของการผลิต PHB ในปัจจุบัน (2010) มีราคาถูกลงเนื่องจากมีเทคโนโลยีที่มีการพัฒนาเพิ่มขึ้น และมีหลายบริษัทที่สามารถผลิต PHAs ชนิดต่างๆ ได้ เช่น บริษัท Telles เป็นบริษัทร่วมทุนระหว่าง Metabolix และ Archer Daniels Midland Company (ADM) สามารถผลิต PHB โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Mirel™ โดยมีอัตราการผลิต 50,000 ตันต่อปี โดย Telles ประกาศราคาขายที่ 1.50 ยูโรต่อกิโลกรัม บริษัท P&G สามารถผลิต PHBH โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Nodax™ โดยมีอัตราการผลิต 20,000-50,000 ตันต่อปี และประกาศราคาขายที่ 2.50 ยูโรต่อกิโลกรัม เป็นต้น และมีแนวโน้มที่จะขยายระดับการผลิตในอนาคตต่อไป (Kosior และคณะ, 2006)

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างของบริษัทที่มีการผลิต PHA ทางการค้าในปัจจุบัน (Chanprateep, 2010)

บริษัท	ชนิดของ PHA	ระดับการผลิต (ตัน)	ชื่อทางการค้า	ราคา (ยูโรต่อกิโลกรัม)
Mitsubishi Gas Chemical Company Inc. (Japan)	PHB	10,000	Biogreen [®]	2.5 - 3.0
Telles (USA)	PHB	50,000	Mirel [™]	1.50
PHB Industrial Company (Brazil)	PHB	50	Biocycle [®]	-
Biomer Inc. (Germany)	PHB และ PHBV	50	Biomer [®]	3.0 - 5.0
Tianan Biologic, Ningbo (China)	PHBV และ PHBV ผสม กับ Ecoflex	10,000	Enmat [®]	3.26
P&G (US)	PHBH	20,000 - 50,000	Nodax [™]	2.50
Lianyi Biotech (China)	PHBH	2000	Nodax [™]	3.70
Kaneka Corporation (Japan)	PHBH	1000	Kaneka PHBH [™]	-
Tianjin Green Bioscience Co/DSM	P(3HB-co-4HB)	10,000	Green Bio	-
Meridian (US)	PHBH	272,000 (2013)	Meridian	-

2.12.1 การประยุกต์ใช้ทางด้านการเกษตรและปศุสัตว์

การนำ PHAs ไปประยุกต์ใช้กับการเกษตร ได้แก่การนำ PHAs ไปทำแคปซูลสำหรับบรรจุแบคทีเรียในกลุ่มที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะปลูก (Lopez และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังได้มีการนำ PHAs ไปทำแคปซูลบรรจุยาฆ่าวัชพืช ยาฆ่าแมลง หรือผลิตเป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยารักษาโรคของสัตว์ และบรรจุยาประเภทที่มีกลไกการออกฤทธิ์นาน (Reddy และคณะ, 2003) อีกทั้ง PHB ยังได้รับการรับรองจากการทดสอบความเป็นพิษในการนำไปใช้ในรูปอนุภาคนาโนกับสัตว์ทดลองตามมาตรฐาน ISO 10993 (Pötter และ Steinbüchel, 2006) และเมื่อไม่นานมานี้บริษัท P&G ได้ผลิตแผ่นฟิล์ม PHB โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Nodax™ สำหรับใช้บรรจุปุ๋ย ยาฆ่าแมลงและวัชพืช สำหรับใช้ในนาข้าว (Philip และคณะ, 2007)

2.12.2 การประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์

เนื่องจาก PHAs มีสมบัติเข้ากันได้ทางชีวภาพกับสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility) ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ด้านการแพทย์และทางเภสัชกรรมได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง P(3HB) P(3HB-3HV) P(4HB) P(3HO) และ P(3HB-3HHx) ซึ่งได้มีการทดสอบแล้วว่าสามารถเข้ากับได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อสัตว์หลายชนิด (Valappil และคณะ, 2007) จึงได้มีการนำมาใช้ในงานด้านการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ และวัสดุในงานศัลยกรรม เช่น ใช้ทำหลอดเลือดเทียม กระดูกเทียม เข็มเย็บผ้า ผ้าซับเลือด (Chen และ Wu, 2005) การใช้เป็นวัสดุในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ (Williams และ Martin, 2002) เป็นต้น ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ดังเช่นการทดลองของ Sevastianov และคณะ (2003) ได้ทดสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ P(3HB) และ P(3HB-3HV) พบว่าพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดไม่ส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันและการตอบสนองระดับเซลล์ แต่มีการตอบสนองในระบบคอมพลีเมนต์และการเหนี่ยวนำแข็งตัวของเลือด ทั้งนี้เนื่องจากพอลิเมอร์มีลิโปพอลิแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS) ปะปนมากับพอลิเมอร์ทำให้เกิดการตอบสนองต่อระบบคอมพลีเมนต์ ดังนั้นการนำ PHAs มาใช้ในทางการแพทย์ กระบวนการผลิตและทำบริสุทธิ์ PHAs มีความสำคัญอย่างยิ่ง แต่เนื่องจาก PHAs ที่มีขายในทางการค้านั้นเป็น PHAs ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมากกว่าใช้ในทางการแพทย์ จึงทำให้ PHAs ยังคงมีโปรตีน สารลดแรงตึงผิว และเอนโดทอกซิน (Endotoxin) ซึ่งเป็นไพโรเจน

(Pyrogen) ปะปนอยู่ ดังนั้นในกระบวนการสกัด PHAs เพื่อใช้สำหรับการแพทย์ จะต้องได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ไม่มีสารเคมีที่ใช้ในการสกัด หรือสารอื่นๆ ปะปนอยู่ และพอลิเมอร์ที่ได้ต้องมีประสิทธิภาพ สามารถย่อยสลายได้ทั้งหมด และการที่จะได้รับอนุญาตจาก FDA เพื่อใช้ในทางการแพทย์ PHAs ที่ได้จะต้องพบเอนโดทอกซินไม่เกิน 0.5 US Pharmacopeia endotoxin units ต่อมิลลิลิตร (EU) (Valappil และคณะ, 2007)

2.12.3 การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

ใช้ทำบรรจุภัณฑ์ประเภทถุง ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป และแผ่นฟิล์มถนอมอาหาร และวัสดุอื่นๆ เช่น หมุดกอล์ฟ ด้ามมีดโกน แก้วน้ำ และขวดแชมพู ดังแสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 ผลิตภัณฑ์ PHAs ทางการค้าภายใต้ชื่อสินค้า Biopol[®] (A) หมุดกอล์ฟ (B) ด้ามมีดโกน (C) แก้วน้ำ (D) ขวดแชมพู (Pötter และ Steinbüchel, 2006)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความเป็นกรด เบส-(Digital pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA
3. เครื่องชั่งหยาบ (Laboratory balance) รุ่น PG 2002-S, รุ่น PB 3002 และรุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
4. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) รุ่น AG203 และ AG285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
5. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25, บริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
6. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow ISSCO รุ่น BV-124, บริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clean, รุ่น V 3-4 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
7. ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) -20 องศาเซลเซียส บริษัท Sanyo Electric, Japan
8. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) -80 องศาเซลเซียส บริษัท Forma Scientific, USA
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W 760 และรุ่น WB 14 บริษัท Memmert, Germany
10. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น INE500 บริษัท Memmert, Germany
11. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA

12. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น UE 600 และรุ่น UL 80 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I บริษัท Beckman Coulter, Germany
14. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
15. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 200 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
16. ตู้เย็น (Freezer) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท Mitsubishi Electric, Japan
17. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
18. ถังหมักขนาด 5 ลิตร และชุดควบคุมถังหมักรุ่น EPC-1000 บริษัท EYELA, Japan
19. เครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC) รุ่น CLASS-VP V6.14 บริษัท Shimadzu, Japan
20. เครื่องวิเคราะห์ Nuclear magnetic resonance (NMR) analyzer บริษัท Varian Inova, USA และ บริษัท Bruker Biospin, USA
21. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น CP-3800 บริษัท Varian, USA
22. แคปิลลารีคอลัมน์ (Capillary column) ชนิด CP-WAX 52CB ขนาด 30mm x 25 mm (ID) x 0.25 μ m Df
23. เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential Scanning Calorimeter) รุ่น DSC 7 บริษัท Perkin-Elmer
24. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope:TEM) with EDX Attachment and Specimen Heating Holder รุ่น JEM-2100 บริษัท JEOL, Japan
25. เครื่องวัดปริมาณแรงต่อพื้นที่หน้าตัด (Universal Testing Machine) รุ่น 4206 บริษัท Instron
26. เครื่องวิเคราะห์ High Performance Liquid Chromatography รุ่น LC 200 บริษัท Perkin-Elmer
27. ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane) ขนาด 0.45 μ m บริษัท Sartorius, Germany

28. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ 2 บริษัท Whatman International Ltd., England
29. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (Cryotube) บริษัท Bioadvance, Thailand
30. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) บริษัท PYREX, USA
31. หลอดทดลอง (Test tube) บริษัท PYREX, USA
32. กระบอกตวง (Cylinder) บริษัท PYREX, USA
33. ปีกเกอร์ (Beaker) บริษัท PYREX, USA
34. หลอดทดลองฝาเกลียว (screw-cap tube) บริษัท PYREX, USA
35. กระบอกเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge ware) บริษัท Nalgene, USA

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Biospringer, France
2. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Ireland
3. ทริปโตส (tryptose) บริษัท Difco Laboratories, USA
4. เปปโตน (peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
5. ฐุ่นผง (agar) บริษัท บิกเบน โปรดักตอรา เดอ อะการ์ เอส.เอส., Chile
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
7. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
8. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Merck, Germany
9. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
10. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, Germany
11. กรดเบนโซอิก ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$) บริษัท Nacalai tesque, Japan
12. ซูโครส (Sucrose; $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) บริษัท Merck, Germany
13. กลูโคส (Glucose; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
14. กาแลคโทส (Galactose; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
15. แมนโนส (Mannose; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) บริษัท Fluka, Switzerland
16. กลีเซอรอล ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) บริษัท Merck, Germany
17. คลอโรฟอร์ม (CHCl_3) บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Ireland

18. เฮกเซน (C_6H_{14}) บริษัท Merck, Germany
19. เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
20. คอปเปอร์ไดคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) บริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
21. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
22. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
23. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
24. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck, German
25. แมงกานีสไดคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) บริษัท Merck, Germany
26. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
27. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
28. โซเดียมซีเตรท ($C_6H_5Na_3O_7$) บริษัท Merck, Germany
29. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Merck, Germany
30. เอทานอล (C_2H_5OH) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand
31. โซเดียมคลอไรด์ ($NaCl$) บริษัท Merck, Germany
32. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) บริษัท Merck, Germany
33. สารมาตรฐาน PHB บริษัท Sigma Chemical Co., USA
34. สารมาตรฐาน Furfural ($C_5H_4O_2$) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
35. สารมาตรฐาน 5-Hydroxymethylfurfural ($C_6H_6O_3$) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
36. สารมาตรฐาน Vanillin ($C_8H_8O_3$) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
37. กรดอะซิติก (CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
38. แก๊สไฮโดรเจน (H_2) บริษัท PRAXAIR, Thailand
39. แก๊สออกซิเจน (O_2) บริษัท TIG (Thai Industrial Gas), Thailand
40. แก๊สไนโตรเจน (N_2) บริษัท PRAXAIR, Thailand
41. Sudan Black B ($C_{26}H_{24}N_4O$) บริษัท Merck, Germany
42. Nystatin ($C_{47}H_{75}NO_{17}$) บริษัท MP Biomedicals, France

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของใบจามจุรี

เก็บใบจามจุรีสดจากบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำใบจามจุรีแห้งปริมาณ 500 กรัมส่งวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีคือ เซลลูโลส ไฮโดรเซลลูโลส แอลฟาเซลลูโลส บีตาเซลลูโลส แกมมาเซลลูโลส ลิกนิน และค่าการละลายในเบนซีน ที่กรมวิทยาศาสตร์บริการโดยเซลลูโลสทดสอบตามมาตรฐาน TAPPI T 203 om-93 ไฮโดรเซลลูโลส แอลฟาเซลลูโลส บีตาเซลลูโลส และแกมมาเซลลูโลสทดสอบตามมาตรฐาน TAPPI section และ ลิกนินทดสอบตามมาตรฐาน TAPPI T 222 om-88

3.3.2 หาภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพใบจามจุรีโดยการใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดฟอสฟอริกเจือจาง

3.3.2.1 ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

บดใบจามจุรีที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงจากนั้นนำไปร่อนผ่านตะแกรงร่อนคัดแยกขนาดเพื่อคัดเลือกให้ได้ใบจามจุรีขนาดเล็กกว่า 20 เมช ชั่งใบจามจุรี 3 กรัมนำไปปรับสภาพโดยแช่ในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0 4 8 10 และ 12 โดยปริมาตร 10 มิลลิลิตรซึ่งคิดเป็นร้อยละ 10 (ดัดแปลงจาก Laopaiboon และคณะ, 2010) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรอง นำใบจามจุรีที่กรองได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำใบจามจุรีที่ได้ไปปรับสภาพโดยการใช้กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ปริมาตร 75 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องหนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้มาปรับ pH ให้เป็น 7 และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด (3,5-Dinitrosalicylic acid, DNSA) (Miller, 1959) (ภาคผนวก ก1)

3.3.2.2 ผลของความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริก

บดใบจามจุรีที่ผ่านการอบแห้งให้มีขนาดเล็กกว่า 20 เมช ชั่งใบจามจุรี 3 กรัม นำไปปรับสภาพโดยแช่สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองที่ 3.3.2.1 จากนั้นนำไปกรอง นำใบจามจุรีที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำใบจามจุรีที่ได้ไปปรับสภาพโดยใช้กรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 0 1 2 2.5 และ 3 โดยปริมาตรปริมาตร 75 มิลลิลิตรนำเข้าเครื่องหนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 60 นาที หลังจากการหนึ่งฆ่าเชื้อแล้วทำการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้มาปรับ pH ให้เป็น 7 และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดย DNSA (Miller, 1959) (ภาคผนวก ก1)

3.3.2.3 ผลของขนาดอนุภาคใบจามจุรี

บดใบจามจุรีที่ผ่านการอบแห้งจากนั้นนำไปร่อนผ่านตะแกรงร่อนเพื่อคัดเลือกให้มีขนาด 20-40 เมชและขนาดน้อยกว่า 20 เมช ชั่งใบจามจุรี 3 กรัม นำไปปรับสภาพโดยแช่สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.2.1 จากนั้นนำไปกรอง นำใบจามจุรีที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำใบจามจุรีที่ได้ไปปรับสภาพโดยการใช้กรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.2.2 ปริมาตร 75 มิลลิลิตรนำเข้าเครื่องหนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 60 นาที หลังจากการหนึ่งฆ่าเชื้อแล้วทำการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้มาปรับ pH ให้เป็น 7 และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดยวิธี DNSA (Miller, 1959) (ภาคผนวก ก1)

3.3.2.4 ผลของปริมาณใบจามจุรี

บดใบจามจุรีที่ผ่านการอบแห้งจากนั้นนำไปร่อนผ่านตะแกรงร่อนเพื่อคัดเลือกให้มีขนาด 20-40 เมชและขนาดน้อยกว่า 20 เมช ชั่งใบจามจุรี 3 6 และ 10 กรัม นำไปปรับสภาพโดยแช่ในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองที่ 3.3.2.1 จากนั้นนำไปกรอง แล้วนำใบจามจุรีที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับ

สภาพโดยใช้กรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองที่ 3.3.2.2 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 60 นาที หลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วทำการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้มาปรับ pH ให้เป็น 7 และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNSA (Miller, 1959) (ภาคผนวก ก1)

3.3.3 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากกระบวนการปรับสภาพไบโอมจุลินทรีย์

วิเคราะห์หาปริมาณสารซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการปรับสภาพ ลิกโนเซลลูโลส เช่น เฟอรัล (Furfural) 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัล (5-Hydroxymethyl-furfural) วานิลลิน (Vanillin) และกรดอะซิติก (Acetic acid) ในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อย ไบโอมจุลินทรีย์ผ่านการปรับสภาพจากข้อ 3.3.2 โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) (Yu และ Stahl, 2008) ใช้คอลัมน์ชนิด Universal อุณหภูมิคอลัมน์ 65 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายกรดซัลฟิวริก pH 2 เป็น สารละลายตัวพา อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดโดย UV detectors ที่ความยาวคลื่น 284 นาโนเมตร ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้ เปรียบเทียบชนิดของสารมาตรฐานจากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์

3.3.4 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยไบโอมจุลินทรีย์ผ่านการปรับสภาพ

3.3.4.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทยได้แก่กรุงเทพมหานคร สมุทรปราการ นครนายก นครราชสีมา สระบุรี เชียงใหม่ และลำปาง บันทึกวันและเวลาที่เก็บ ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อทันทีหรือเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะดำเนินการแยกเชื้อ

3.3.4.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs โดยใช้ สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพใบจามจุรี

นำตัวอย่างดิน 2 กรัม เติมลงในอาหารสังเคราะห์ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่มีกากมันสำปะหลังปริมาณ 2 กรัมเป็นแหล่งคาร์บอน (ดัดแปลงจาก Chanprateep และคณะ, 2008) ปรับ pH เท่ากับ 7 ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยเติม Nystatin (ภาคผนวก ข5) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เติมนบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นกระจายเชื้อบนอาหารแข็ง แยกโคโลนีเดี่ยวและทำให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ นำเชื้อที่บริสุทธิ์มาข้อมด้วย Sudan Black B (ภาคผนวก ข4) เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถผลิต PHAs ได้หรือไม่ จากการข้อมแกรนูล PHAs แบคทีเรียที่มีแกรนูล PHAs จะถูกนำมาศึกษาต่อไปโดยนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตและนำเซลล์ที่ได้มาสกัดและหาปริมาณ PHAs โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีดังวิธีตามข้อ 3.3.7 และเปรียบเทียบกับ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ A-04 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถผลิต PHAs ได้ในปริมาณสูง (Chanprateep, 2010)

3.3.4.3 การข้อมแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ด้วย Sudan Black B ตามวิธีของ Burdon (1946)

นำแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วมากระจายตัวลงบนสไลด์หยดสารละลาย Sudan Black B ร้อยละ 1 (ภาคผนวก ข4) ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยไซลีน และหยด Safranin O ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ถ้ามี PHAs ซึ่งสะสมอยู่ในรูปของแกรนูล โดยแกรนูลจะติดสีดำของ Sudan Black B และเซลล์ของแบคทีเรียจะติดสีแดงของ Safranin O

3.3.4.4 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.3.4.4.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

เชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อลาก (streak) บนอาหารแข็งเลี้ยง LB เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ และถ่ายลงในอาหารใหม่ทุกๆ 1 เดือน

3.3.4.4.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (ภาคผนวก ก1) นำไปเลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปราศจากเชื้อ (ภาคผนวก ข7) จากนั้นปั่นแยกเซลล์และทำซ้ำอีกรอบ กระจายเซลล์ในกลีเซอรอลร้อยละ 10 (ภาคผนวก ข6) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปรับให้อยู่ในช่วง 0.8-1.0 บรรจุลงในหลอดเยือกแข็ง (cryotube) ที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน หรือเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

3.3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทางอนุกรมวิธาน

3.3.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบชีวเคมีเบื้องต้น

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.4.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ภาคผนวก ก2) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี หลังจากนั้นทำการย้อมสีเซลล์แบคทีเรีย โดยวิธีย้อมสีแกรม เพื่อศึกษารูปร่าง และลักษณะการติดสีแกรมของแบคทีเรีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.5.2 การศึกษาสมบัติทางชีวเคมี

แปรผลการทดสอบต่างๆ โดยการอ้างอิงต่อคู่มือการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรีย Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) เตรียมแบคทีเรียที่มีอายุ 18-24 ชม. เชื้อโคโลนีเดี่ยว ลงในอาหารชนิดต่างๆ และทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ความสามารถในการหมักน้ำตาล ความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลส (Catalase test) ความสามารถในการผลิต indole (Indole test) การทดสอบ Methyl Red–Vogesprokauer tests (MR-VP test) การทดสอบการใช้ซิเตรต (citrate utilization test) การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI) reaction ความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Lysine decarboxylase Lysine deaminase และ Ornithine decarboxylase

3.3.5.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA (16S rRNA)

3.3.5.3.1 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA

คัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโฆมาจัวร์และสะสมแกรนูล PHAs จากข้อ 3.3.4.2 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในรูปของโคโลนีในจานเพาะเชื้อ ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ Macrogen., Inc ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ไพรเมอร์ 518F และ 800R เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแล้ว นำไปเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac software version 2.05 (Hitachi Software Engineering Co.Ltd, Japan) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อที่คัดแยกได้

3.3.5.3.2 สร้าง Phylogenetic tree

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากการปรับแนว มาคำนวณ distance matrix สร้าง phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์แบบ neighbor-joining และ bootstrap ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package version 3.6 ซึ่งประกอบไปด้วย DNADIST.EXE NEIGHBOR.EXE SEQBOOT.EXE และ CONSENSE.EXE ตามลำดับ phylogenetic tree ที่ถูกสร้างขึ้น นำเสนอโดยใช้โปรแกรม TREEVIEW (Kimura, 1980)

3.3.6 การผลิต PHAs จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโจามจุรีในระดับขวดเขย่า

3.3.6.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อโดยทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเตรียมกล้าเชื้อ โดยใช้อาหารเตรียมกล้าเชื้อ (ภาคผนวก ก1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาดปริมาตร 250 มิลลิลิตรเต็ม หัวเชื้อที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลร้อยละ 10 ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อ 1 ฟลาสก์เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บตะกอนเซลล์มาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ ทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง จากนั้นละลายเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อเตรียมสำหรับการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า

3.3.6.2 การผลิตในระดับขวดเขย่า

3.3.6.2.1 ศึกษาหาปริมาณสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโจามจุรีที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHAs ของแบคทีเรียในระดับขวดเขย่าตามวิธีของ Chanprateep และคณะ (2008)

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.6.1 ถ่ายลงสู่อาหารเพื่อการผลิต (ดัดแปลงจาก Chanprateep และคณะ, 2008) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 7 ในพลาสติกขนาด ปริมาตร 500 มิลลิลิตร แปรผันปริมาณสารละลายน้ำตาลในอาหารเพื่อการผลิต PHAs (ภาคผนวก ก3) ร้อยละ 0 20 40 60 80 และ 100 โดยปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต และ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์ แห่งตามข้อ 3.3.6.2.2 ปริมาณไนโตรเจนตามข้อ 3.3.6.2.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามข้อ 3.3.6.2.4 และปริมาณและองค์ประกอบของ PHAs ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.7

3.3.6.2.2 ศึกษาผลของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิต PHAs ของแบคทีเรียในระดับขวดเขย่าตามวิธีของ Yu และ Stahl (2008)

เตรียมอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพ ไบโຈມຈຸຣີເປັນແຫຼ່ງຄາຣ໌ບອນ (ภาคผนวก ก3) ปรับค่า pH เท่ากับ 7 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาดปริมาตร 500 มิลลิลิตร แปรผันปริมาณกล้าเชื้อที่ใช้ 0.2 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 200 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห่งตามข้อ 3.3.6.2.2 ปริมาณ ไนโตรเจนตามข้อ 3.3.6.2.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามข้อ 3.3.6.2.4 และปริมาณและองค์ประกอบ ของ PHAs ตามขั้นตอนในข้อ 3.3.7

3.3.6.2.3 วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

อบเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร จนได้น้ำหนัก คงที่ กรองน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บไว้ใน เดซิเคเตอร์จนได้น้ำหนักคงที่คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.3.6.2.4 วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตามวิธีของ Kemper (1974)

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำน้ำหมักที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมนิเตรตซีมคลอไรด์ (ภาคผนวก ข2) ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมนิเตรตเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซิติก (EDTA) (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมนิเตรตไนโตรพัสไซด์รีเอเจนท์ (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมนิเตรตไฮโปคลอไรต์รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น ปลอดภัย ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอ่านในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตรแล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) (ภาคผนวก ค3) คำนวณปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.3.6.2.5 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธี DNSA (Miller, 1959)

นำน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ขณะเดียวกันทำชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมนิเตรตละลาย DNSA (ภาคผนวก ข1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นและเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0 – 2 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค1)

3.3.6.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956)

นำน้ำหมักที่แยกเซลล์เบคทีเรียออกมาแล้ว 1 มิลลิลิตร ขณะเดียวกันทำชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมนิเตรตละลายฟีนอล (Phenol reagent) ความเข้มข้น

ร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.7 วิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของ PHAs ที่ผลิตได้

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography: GC) ตามวิธีของ Comeau และคณะ (1998) แยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 20 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดฝาเกลียว เต็มคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตรและเติมเมทานอลปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดซัลฟูริกร้อยละ 3 และมีกรดเบนโซอิก 2 กรัมต่อลิตรเป็นสารมาตรฐานภายใน (ภาคผนวก ข3) ปิดฝาเกลียวให้แน่น นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เขย่าด้วยเครื่องเขย่าทุก 30 นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด ทิ้งให้เย็นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าอย่างรุนแรงเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น เก็บเฉพาะสารละลายชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของคลอโรฟอร์มเก็บในขวดฝาเกลียวขนาดเล็ก ปิดฝาให้แน่น นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณ PHAs โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีโดยใช้ภาวะการวิเคราะห์และการคำนวณตามวิธีของสุชาติา จันทรประทีป (2539) ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ชนิด CP-WAX 52CB ยาว 30 mm., 25 mm.(ID), 0.25 μ m. (df)
อุณหภูมิของ injector	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของ column	: 130 องศาเซลเซียสนาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 160 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 160 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิของ detector (FID)	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
Split ratio	: 10 ต่อ 1
แก๊สตัวพา (carrier gas)	: N ₂ อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรฉีด	: 1 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์ โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารมาตรฐาน การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ PHAs (กรัมต่อลิตร) คำนวณปริมาณโมโนเมอร์ (ที่มีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน

3.3.8 ศึกษาลักษณะแกรนูลภายในเซลล์แบคทีเรียโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron micrograph; TEM)

เพื่อศึกษาลักษณะของแกรนูลภายในเซลล์แบคทีเรียโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน โดยทำการเลี้ยงแบคทีเรียที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.6.2 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และตรึงเซลล์ที่ได้โดยแช่ในกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาโคไดเลท (sodium cacodylate buffer) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง ล้างโดยแช่เซลล์ในบัฟเฟอร์โซเดียมคาโคไดเลทความเข้มข้น 0.1 โมลาร์เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.9 การผลิต PHAs ในระดับถังหมัก

เพื่อให้ได้ปริมาณ PHAs เพียงพอสำหรับทำการทดสอบสมบัติทางกายภาพและเชิงกล จึงต้องผลิต PHAs จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในระดับถังหมัก โดยในการทดลองนี้จะใช้ถังหมัก EYELA รุ่น EPC-1000 ขนาด 5 ลิตร เลี้ยงเชื้อแบบแบช (batch) โดยเตรียมกล้าเชื้อตามข้อ 3.3.6.1 ถ่ายลงสู่อาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบจามจุรีที่มี

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 8 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 2.5 ลิตร ภาวะที่ใช้ในการผลิต คือ อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที pH เท่ากับ 7.00 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.3.10 ทดสอบสมบัติเชิงกล และทางกายภาพของ PHAs

3.3.10.1 สกัดแยกพอลิเมอร์และทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Doi และคณะ (1995)

ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ทั้งหมดไปอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บรรจุเซลล์อบแห้งในกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 เย็บปิดด้วยด้ายให้สนิททุกด้าน บรรจุลงในขวด Duran และสกัดพอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเทใส่ภาชนะ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้คลอโรฟอร์มระเหยในตู้ดูดไอระเหย จะได้ PHAs ที่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์ม จากนั้นละลายแผ่นฟิล์มที่ได้ด้วยคลอโรฟอร์มร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นำมาตกตะกอนพอลิเมอร์ในเฮกเซนปริมาตร 4 เท่า ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตะกอนพอลิเมอร์มาละลายในคลอโรฟอร์มแล้วทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเฮกเซนทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นอบผงพอลิเมอร์ที่ได้ให้แห้งแล้วเก็บรักษาไว้ในเดซิเคเตอร์

3.3.10.2 เตรียมแผ่นฟิล์มสำหรับการทดสอบสมบัติเชิงกล และทางกายภาพ

ตามวิธีของ Yoshie และคณะ (1995)

ละลายพอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมแผ่นฟิล์มโดยวิธีการเทสารละลายพอลิเมอร์ลงในแม่พิมพ์ที่ปรับระดับให้เท่ากันทุกด้าน ปริมาตรของสารละลายพอลิเมอร์ขึ้นอยู่กับขนาดของแม่พิมพ์โดยแผ่นฟิล์มในงานวิจัยนำไปอบแห้งในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วทิ้งให้แผ่นฟิล์มตกผลึกที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้มีการตกผลึกอย่างสมบูรณ์เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 7 วัน นำแผ่นฟิล์มที่

ได้ส่งวิเคราะห์ตามข้อ 3.3.9.3 ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และข้อ 3.3.9.4 ข้อ 3.3.9.5 ข้อ 3.3.9.6 ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.10.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

นำ PHAs ที่ได้จากข้อ 3.3.8.2 ปริมาณ 10 มิลลิกรัมมาละลายในดิคลอโรคลอโรฟอร์ม (CDCl_3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$) ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometer) ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ Two dimension- ^1H -correlation spectroscopy (2D- ^1H - COSY) ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ความถี่ 400 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.10.4 วิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature, T_M) อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (Glass transition temperature, T_G) ตามวิธีของ Chanprateep และคณะ (2003)

ซึ่งพอลิเมอร์ให้มือน้ำหนักในช่วง 5-10 มิลลิกรัมต่อชิ้นใส่ในถ้วยอะลูมิเนียม (aluminium crucible) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร วิเคราะห์ภายใต้ภาวะไนโตรเจน โดยวิเคราะห์เป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

1) หาค่า T_M และค่าความร้อนของการหลอมเหลว (Heat of fusion, ΔH_{fus}) โดยเพิ่มอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียส ถึง 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียส ต่อนาที

2) ลดอุณหภูมิตั้งแต่ 180 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์หาค่า T_G โดยเพิ่มอุณหภูมิจาก -80 องศาเซลเซียส ถึง 180 องศาเซลเซียส ด้วย

อัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายใต้ภาวะไนโตรเจนโดยมีสารมาตรฐานเปรียบเทียบ คือ Al_2O_3

3.3.10.5 วิเคราะห์สมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มด้วยเครื่องทดสอบยูนิเวอร์แซล (Universal Testing Machine) ตามวิธีมาตรฐาน ASTM D882-91 (Annual Book of ASTM Standard, V08.01) และ Chanprateep และ Kulpreecha (2006)

มาตรฐาน ASTM D882-91 กำหนดให้แผ่นฟิล์มมีความหนาไม่ต่ำกว่า 0.025 มิลลิเมตร กว้าง 50 มิลลิเมตรยาว 150 มิลลิเมตร โดยเป็นระยะทดสอบ 100 มิลลิเมตร ที่เหลือ ด้านละ 25 มิลลิเมตร เป็นระยะยึดของเขี้ยวจับสำหรับเครื่องทดสอบยูนิเวอร์แซล ดึงด้วยอัตรา 10 มิลลิเมตรต่อนาที จนขึ้นตัวอย่าง (specimen) ขนาด ทั้งนี้ต้องทดสอบ 5 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง ค่าทดสอบที่ได้คือ Load at Max.Load (N), Displacement at Max.Load (mm), Stress at Max.Load (MPa), %Strain at Max.Load (%), Toughness (MPa) และ Modulus (MPa) นำค่าทดสอบที่ได้เปรียบเทียบกับค่าทดสอบของ Polyhydroxybutyrate (PHB) (Sigma-Aldrich) ซึ่งทดสอบภายใต้ภาวะเดียวกัน

3.3.10.6 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของตามวิธีของพอลิเมอร์ด้วยวิธีเจลเพอมีเอชันโครมาโทกราฟี Abate และคณะ (1995)

ละลายพอลิเมอร์ในคลอโรฟอร์มชนิดเกรด HPLC เข้มข้นร้อยละ 1 กรองด้วยเมมเบรน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอนนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีเจลเพอมีชันโครมาโทกราฟี (Gel Permeation Chromatography; GPC) รุ่น Shimadzu CLASS-VP V6.14 ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้คอลัมน์ Water Styragel HT 6E มีตัวพาเป็นคลอโรฟอร์ม อัตราการชะที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพอลิสไตรีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 96,400 ดาลตัน (Da) ถึง 456 ดาลตัน (Da) ซึ่งวิเคราะห์ภายใต้ภาวะเดียวกัน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของใบจามจุรี

นำใบจามจุรีที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ปริมาณ 500 กรัม ส่งวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose) ไฮโลเซลลูโลส (holocellulose) แอลฟาเซลลูโลส (α -cellulose) บีตาเซลลูโลส (β -cellulose) แกมมาเซลลูโลส (γ -cellulose) และลิกนิน (lignin) ที่กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทดสอบตามวิธีมาตรฐานของ Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) โดยเซลลูโลสทดสอบตามมาตรฐาน TAPPI T 203 om-93 ไฮโลเซลลูโลสทดสอบตามมาตรฐาน TAPPI Section และลิกนินทดสอบตามมาตรฐาน TAPPI T 222 om-88 ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่าองค์ประกอบหลักของใบจามจุรีคือ เซลลูโลส (ร้อยละ 40.3) รองลงมาคือ ลิกนิน (ร้อยละ 25.8) โดยชนิดของเซลลูโลสที่มีมากที่สุด คือ แอลฟาเซลลูโลส (ร้อยละ 26.5) รองลงมาคือ แกมมาเซลลูโลส (ร้อยละ 8.5) และบีตาเซลลูโลส (ร้อยละ 5.2) ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์เห็นได้ว่าใบจามจุรีมีเซลลูโลสและลิกนินในปริมาณสูง ซึ่งลิกนินเป็นสารประกอบอะโรมาติกเชิงซ้อนที่มีมวลโมเลกุลสูง มักพบอยู่ร่วมกับเซลลูโลส ลิกนินมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ไม่มีความยืดหยุ่นและทำหน้าที่ช่วยป้องกันโครงสร้างของพืช โดยทำให้โครงสร้างของพืชมีความแข็งแรง นอกจากนี้ลิกนินยังมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิดด้วย (van Wyk, 2001) ดังนั้นเพื่อช่วยให้ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส (hydrolysis) ด้วยกรดฟอสฟอริกเกิดขึ้นได้ดีและลดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดฟอสฟอริกกับลิกนิน จึงจำเป็นที่จะต้องกำจัดลิกนินที่มีอยู่ในใบจามจุรีออกไปบางส่วนดังการทดลองขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของใบจามจุรี (*Samanea saman* (Jacq.) Merr.) วิเคราะห์โดยกรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทดสอบตามวิธีมาตรฐานของ Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI)

ชนิดขององค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละของน้ำหนักตัวอย่างอบแห้ง
ลิกนิน (Lignin)	25.8
ไฮโดรเซลลูโลส (Holocellulose)	40.3
▪ แอลฟาเซลลูโลส (α -cellulose)	26.5
▪ บีตาเซลลูโลส (β -cellulose)	5.2
▪ แกมมาเซลลูโลส (γ -cellulose)	8.5

4.2 หากภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพและการย่อยใบจามจุรีโดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดฟอสฟอริกเจือจาง

4.2.1 ผลการแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของใบจามจุรีโดยกรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พบว่าในตัวอย่างใบจามจุรีมีปริมาณลิกนินเป็นองค์ประกอบอยู่มาก (ร้อยละ 25.8) จึงจำเป็นที่จะต้องกำจัดลิกนินบางส่วนออกจากใบจามจุรีก่อนที่จะนำไปปรับสภาพด้วยกรดฟอสฟอริก

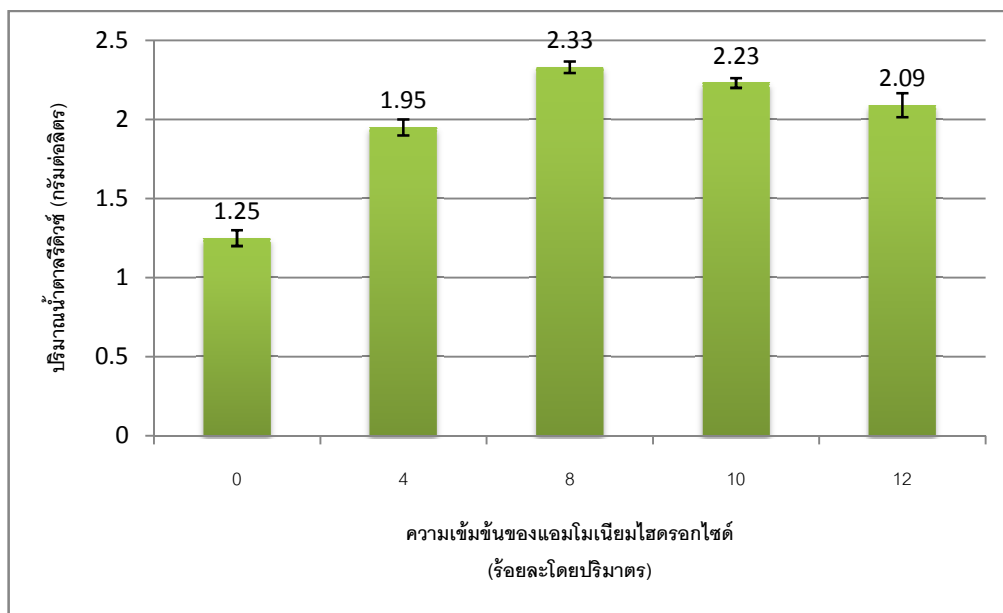
Laopaiboon และคณะ (2010) ทดลองกำจัดลิกนินออกจากชานอ้อยก่อนนำไปย่อยด้วยกรดเพื่อนำไปใช้ในการผลิตกรดแลคติก โดยเลือกใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในการปรับสภาพ เนื่องจากมีสมบัติในการฟอกสีและสกัดลิกนินออกมาได้ ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 10 สามารถกำจัดลิกนินออกจากชานอ้อยได้มากที่สุดและได้น้ำตาลจากชานอ้อยมากที่สุดเมื่อนำชานอ้อยที่ได้ไปย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก ดังนั้นในการทดลองนี้ผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในการกำจัดลิกนินที่มีในใบจามจุรี โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 0 4 8 10 และ 12 โดยปริมาตร เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม

ในการกำจัดลิกนินออกจากไบโຈามจຸຣີก่อนนำไปย่อยด้วยกรดฟอสฟอริก โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากไบโຈามจຸຣີที่ละลายอยู่ในสารละลายเป็นตัวชี้วัด ดังผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1

จากผลการวิจัยพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์จากร้อยละ 0 ถึงร้อยละ 8 โดยปริมาตร ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจาก 1.25 กรัมต่อลิตรเป็น 2.33 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมที่สุด คือ ร้อยละ 8 โดยปริมาตร ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 2.33 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นร้อยละ 10 และ 12 โดยปริมาตร พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลง คือ 2.23 และ 2.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมมีผลในการลดปริมาณลิกนินและช่วยให้กรดฟอสฟอริกสามารถย่อยไบโຈามจຸຣີได้ดีขึ้นและได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นด้วย

ตารางที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในการปรับสภาพและย่อยไบโຈามจຸຣີ

แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	กรดฟอสฟอริก (ร้อยละโดยปริมาตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	2	1.25
4		1.95
8		2.33
10		2.23
12		2.09



รูปที่ 4.1 ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในการปรับสภาพและย่อยใบจามจรี

4.2.2 ผลของความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกในการปรับสภาพและย่อยใบจามจรี

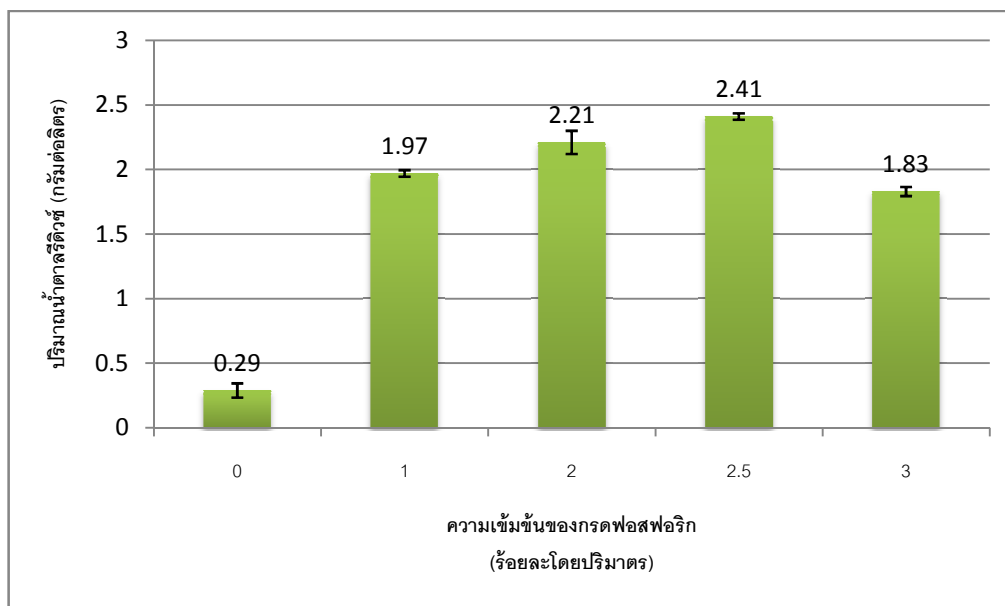
วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อหาความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยใบจามจรี โดยแปรผันความเข้มข้นกรดฟอสฟอริกร้อยละ 0 1 2 2.5 และ 3 โดยปริมาตรและใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 8 ที่ได้จากการทดลองข้อ 4.2.1 ในการปรับสภาพใบจามจรีก่อนนำมาย่อยด้วยกรดฟอสฟอริก จากนั้นนำสารละลายน้ำตาลที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.3 และ รูปที่ 4.2

จากผลการวิจัยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกที่ใช้ในการปรับสภาพและย่อยจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น โดยปริมาณกรดฟอสฟอริกที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยใบจามจรี คือ ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 2.45 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกเป็นร้อยละ 3 โดยปริมาตร น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ลดลง คือ 1.87 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้กรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 2 โดยปริมาตร ซึ่งได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1.95 และ 2.30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเกิดจากกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตรที่ใช้มีปริมาณของกรดมากเกินไป ทำให้

กรดฟอสฟอริกส่วนเกินทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์กลายเป็นเฟอฟูรอล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรอล (Lenihan และคณะ, 2010) ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง และในชุดควบคุมที่ไม่มีกรดฟอสฟอริก ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.29 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าการปรับสภาพและย่อยไบโຈามจุรีโดยใช้กรดฟอสฟอริกในทุกความเข้มข้น ดังนั้นการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้กรดฟอสฟอริกสามารถนำมาใช้ในการปรับสภาพและย่อยไบโຈามจุรีได้ เห็นได้จากชุดควบคุมที่ไม่มีกรดฟอสฟอริก น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ ที่มีการเติมกรดฟอสฟอริกในการปรับสภาพไบโຈามจุรี โดยกรดฟอสฟอริกจะย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในไบโຈามจุรีได้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งจะอยู่ในส่วนของสารละลายที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนภายหลังกระบวนการปรับสภาพ

ตารางที่ 4.3 ผลของกรดฟอสฟอริกในการปรับสภาพและย่อยไบโຈามจุรี

แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	กรดฟอสฟอริก (ร้อยละโดยปริมาตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
8	0	0.29
	1	1.97
	2	2.21
	2.5	2.41
	3	1.83



รูปที่ 4.2 ผลของกรดฟอสฟอริกในการปรับสภาพและย่อยใบจามจรี

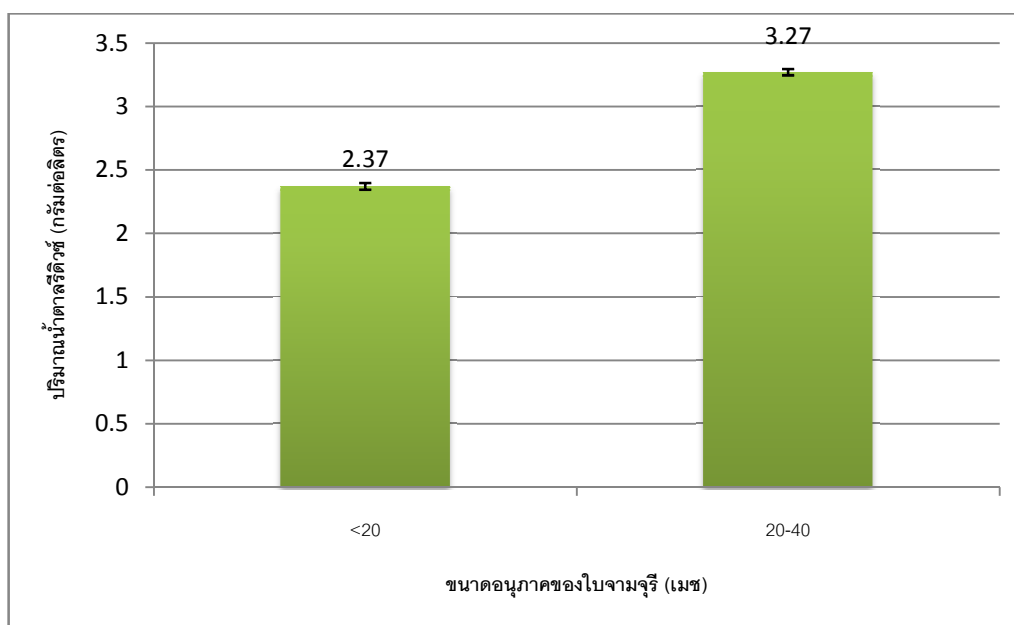
4.2.3 ผลของขนาดอนุภาคใบจามจรีในการปรับสภาพและย่อยใบจามจรี

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของขนาดอนุภาคใบจามจรีในการปรับสภาพและย่อยใบจามจรี โดยแปรผันขนาดอนุภาคใบจามจรีระหว่างขนาด 20-40 เมช และขนาดน้อยกว่า 20 เมช โดยใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดฟอสฟอริกที่ได้จากการทดลองที่ 4.2.1 และการทดลองที่ 4.2.2

ผลการวิจัยพบว่าอนุภาคใบจามจรีขนาด 20-40 เมชมีความเหมาะสมมากกว่าใบจามจรีที่มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 20 เมช ได้ปริมาณน้ำตาเลรีดิวิซ์ 3.27 และ 2.37 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.3 ซึ่งขนาดของอนุภาคใบจามจรีขนาด 20-40 เมช มีความเหมาะสมกับความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ร้อยละ 8 โดยปริมาตร และความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกที่ร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร ดังนั้นการทดลองต่อจากนี้จะใช้ใบจามจรีที่มีขนาดอนุภาค 20-40 เมช ร่วมกับแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร และกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร

ตารางที่ 4.4 ผลของขนาดอนุภาคไบจามจุรี

แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	กรดฟอสฟอริก (ร้อยละโดยปริมาตร)	ขนาดอนุภาคของไบจามจุรี (เมช)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
8	2.5	20-40	3.27
		< 20	2.37



รูปที่ 4.3 ผลของขนาดอนุภาคไบจามจุรีในการปรับสภาพและย่อยไบจามจุรี

4.2.4 ผลของปริมาณไบจามจุรี

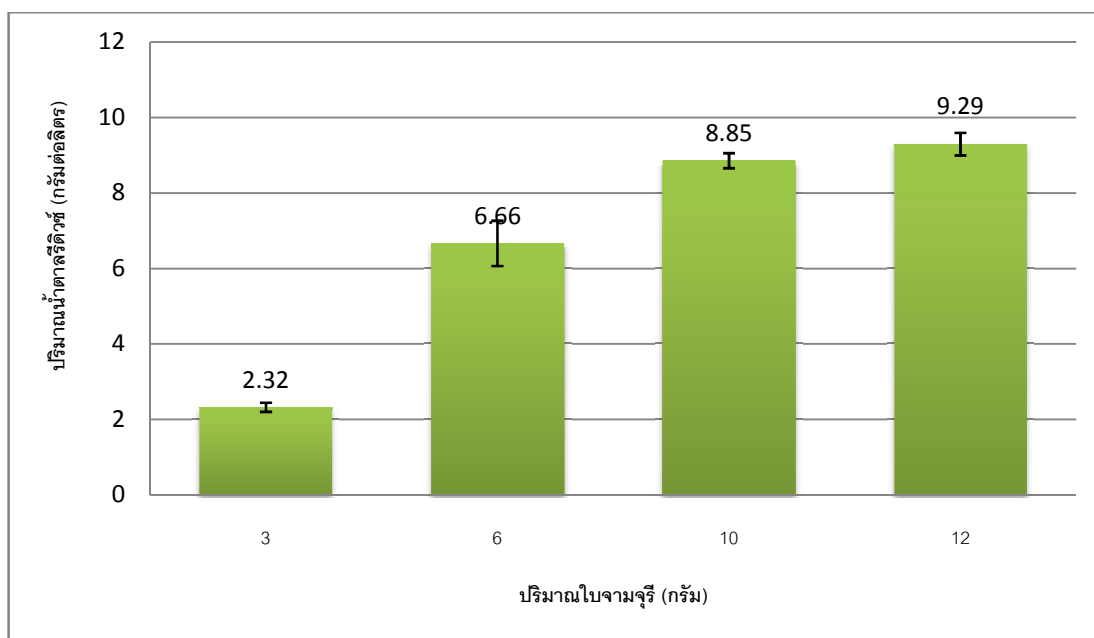
ในการทดลองที่ 4.2.3 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของไบจามจุรีกับปริมาณของกรดฟอสฟอริกที่ใช้นั้นพบว่าสัดส่วนระหว่างสารเคมีที่ใช้ในการปรับสภาพกับปริมาณไบจามจุรีมีสัดส่วนที่ต่างกันมาก เพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดฟอสฟอริกในกระบวนการปรับสภาพและย่อยไบจามจุรี ดังนั้นการทดลองนี้จะแปรผันปริมาณไบจามจุรีที่ใช้

โดยใช้ใบจามจุรีขนาด 20-40 เมช ปริมาณ 3 6 และ 10 กรัม โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.2.1 ข้อ 4.2.2 และข้อ 4.2.3 ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.4

ผลการวิจัยพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของใบจามจุรีจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ได้ คือ 8.85 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ใบจามจุรีขนาด 20-40 เมช ปริมาณ 10 กรัม

ตารางที่ 4.5 ผลของปริมาณใบจามจุรีในการปรับสภาพใบจามจุรี

แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	กรดฟอสฟอริก (ร้อยละโดยปริมาตร)	ขนาดอนุภาคของใบจามจุรี (เมช)	ปริมาณใบจามจุรี (กรัม)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
8	2.5	20-40	3	2.32
			6	6.66
			10	8.85

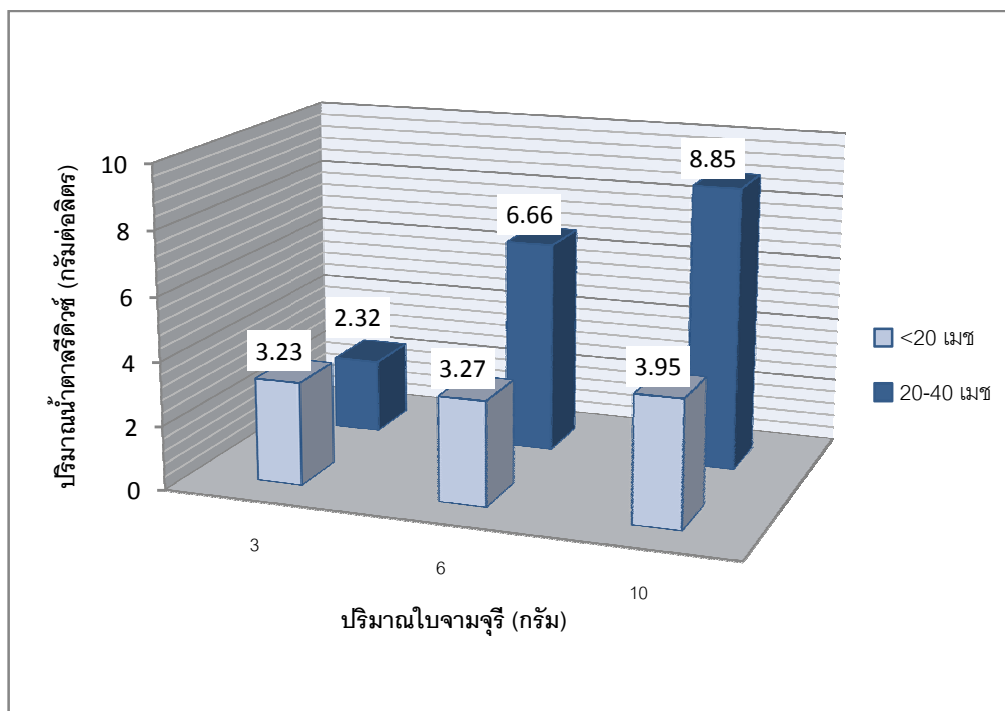


รูปที่ 4.4 ผลของปริมาณใบจามจุรีในการปรับสภาพและย่อยใบจามจุรี

จากผลที่ได้จากข้อ 4.2.1 ข้อ 4.2.2 ข้อ 4.2.3 และข้อ 4.2.4 พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพไบจามจุรีโดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดฟอสฟอริกคือ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 8 กรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ขนาดอนุภาคของไบจามจุรีเท่ากับ 20-40 เมช และปริมาณไบจามจุรีเท่ากับ 12 กรัม จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 9.29 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5 แต่จะได้ปริมาณสารละลายน้ำตาลในปริมาณต่ำเนื่องจากถูกดูดซับไว้โดยการไบจามจุรีที่เหลือ เพื่อให้มีปริมาณสารละลายน้ำตาลในการนำไปทดลองมากพอ ดังนั้นจึงเลือกใช้ไบจามจุรีปริมาณ 10 กรัม เพื่อใช้ในการปรับสภาพและย่อยไบจามจุรีสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพื่อการผลิตสำหรับการทดลองต่างๆ ต่อจากนี้

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการหาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพไบจามจุรี

ขนาดอนุภาค ของไบ จามจุรี (เมช)	แอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	กรดฟอสฟอริก (ร้อยละโดยปริมาตร)	ปริมาณ ไบจามจุรี (กรัม)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
< 20	8	2.5	3	3.23
			6	3.27
			10	3.95
20-40			3	2.32
			6	6.66
			10	8.85



รูปที่ 4.5 แสดงผลของขนาดอนุภาคไบโอมจุรีในการปรับสภาพและย่อยไบโอมจุรีโดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร และกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร

4.3 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากกระบวนการปรับสภาพไบโอมจุรี

นำสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการทดลองที่ 4.2.4 ไปวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ข้างเคียง ได้แก่ เฟอรัล (Furfural) 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัล (5-Hydroxymethyl-furfural) วานิลลิน (Vanillin) และกรดอะซิติก (Acetic acid) โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และนำโครมาโทแกรมที่ได้มาเปรียบเทียบกับชนิดของสารมาตรฐานจากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ ผลการทดลองพบว่าในสารละลายน้ำตาลที่ได้นั้นมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดจากการปรับสภาพและการย่อยไบโอมจุรีด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดฟอสฟอริก โดยพบ เฟอรัล 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัล วานิลลิน และกรดอะซิติก ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ปริมาณผลิตภัณฑ์ข้างเคียงในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดฟอสฟอริกโดยเครื่อง HPLC

ผลิตภัณฑ์ข้างเคียง	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
เฟอร์ฟูรัล	0.0037
5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล	0.0029
วานิลลิน	ไม่พบ
กรดอะซิติก	0.023

4.4 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยไบโຈามจุรีที่ผ่านการปรับสภาพ

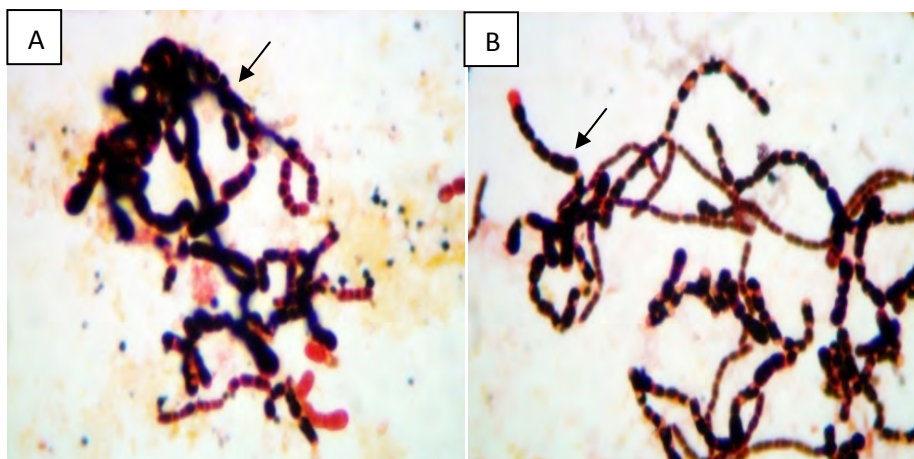
เก็บตัวอย่างดินบริเวณที่มีเศษใบไม้เน่าเปื่อยจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย ได้แก่ เขตจตุจักร จังหวัดกรุงเทพมหานคร อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ อำเภอเมืองนครนายก จังหวัดนครนายก อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง และอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ นำตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรอุดม (ภาคผนวก ก1) ที่มีกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและเติม Nystatin ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ผลการทดลองสามารถแยกจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในอาหารนี้ทั้งหมด 26 สายพันธุ์

นำจุลินทรีย์ทั้ง 26 สายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถในการผลิต PHAs เบื้องต้นโดยนำไปย้อมแกรนูล พบว่ามีแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่มองเห็นแกรนูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า โดยให้แบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์นั้นชื่อว่า MSC-1 MSC-2 MSC-3 MSC-4 และ MSC-5 นำจุลินทรีย์ทั้ง 5 สายพันธุ์เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโຈามจุรีที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 8 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

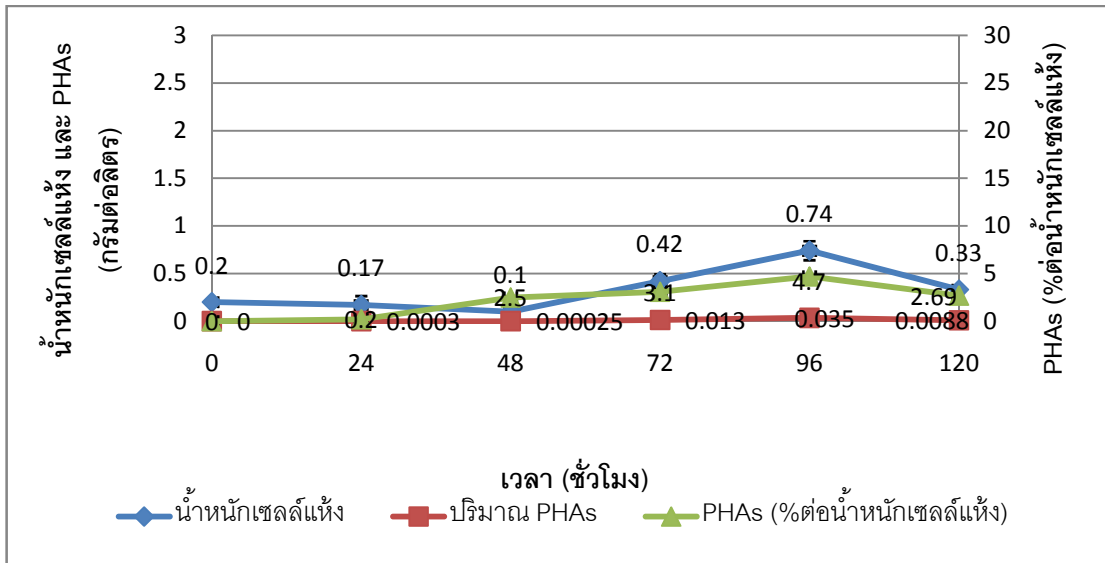
จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารนี้ คือ แบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5 จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ไปย้อมด้วย Sudan Black B

ตามวิธีของ Burdon (1946) โดยสามารถตรวจพบแกรนูล PHAs ภายในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5 โดยแกรนูลจะติดสีดำของ Sudan Black B และเซลล์ของแบคทีเรียจะติดสีแดงของ Safranin O ดังรูปที่ 4.6 จากนั้นทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHAs เบื้องต้น โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการผลิต PHAs สูงที่สุดโดยการวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของ PHAs ตามวิธีในข้อ 3.3.7 โดยเปรียบเทียบกับการเจริญของ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ A-04 ในอาหารชนิดเดียวกัน

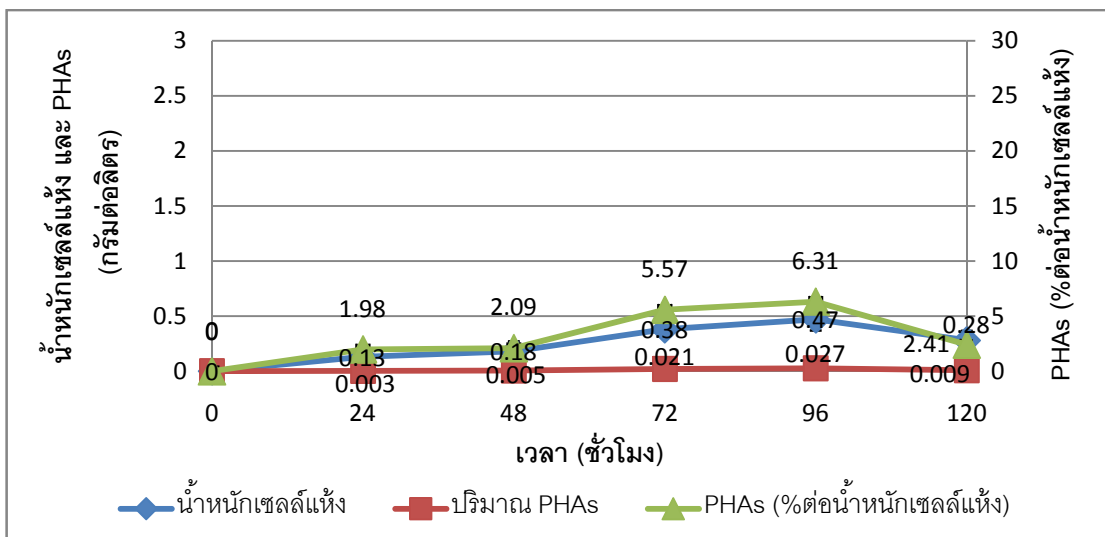
จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-5 มีประสิทธิภาพในการผลิต PHAs สูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ MSC-2 โดยสามารถผลิต PHAs ได้ 0.035 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 4.7 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ 96 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.7) และเมื่อเปรียบเทียบกับ *C. necator* A-04 พบว่า *C. necator* A-04 มีการเจริญและการสะสม PHAs ที่ต่ำ (รูปที่ 4.8) เนื่องจากความเป็นพิษของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโอมจุลินทรีย์ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดฟอสฟอริก ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-5 ในการศึกษาต่อจากนี้ไป



รูปที่ 4.6 แสดงแกรนูลภายในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 (รูป A) และ MSC-5 (รูป B) ที่เจริญบนอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลจากการปรับสภาพไบโอมจุลินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อย้อมเซลล์ด้วย Sudan Black B และ Safranin O และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำหนักชีวมวลสุทธิ (กรัมต่อลิตร) และ ปริมาณ PHAs (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 8 กรัมต่อลิตรที่ได้จากการปรับสภาพใบจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำหนักชีวมวลสุทธิ (กรัมต่อลิตร) และ ปริมาณ PHAs (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ของ *C. necator* A-04 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 8 กรัมต่อลิตรที่ได้จากการปรับสภาพใบจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200

4.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทางอนุกรมวิธาน

4.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

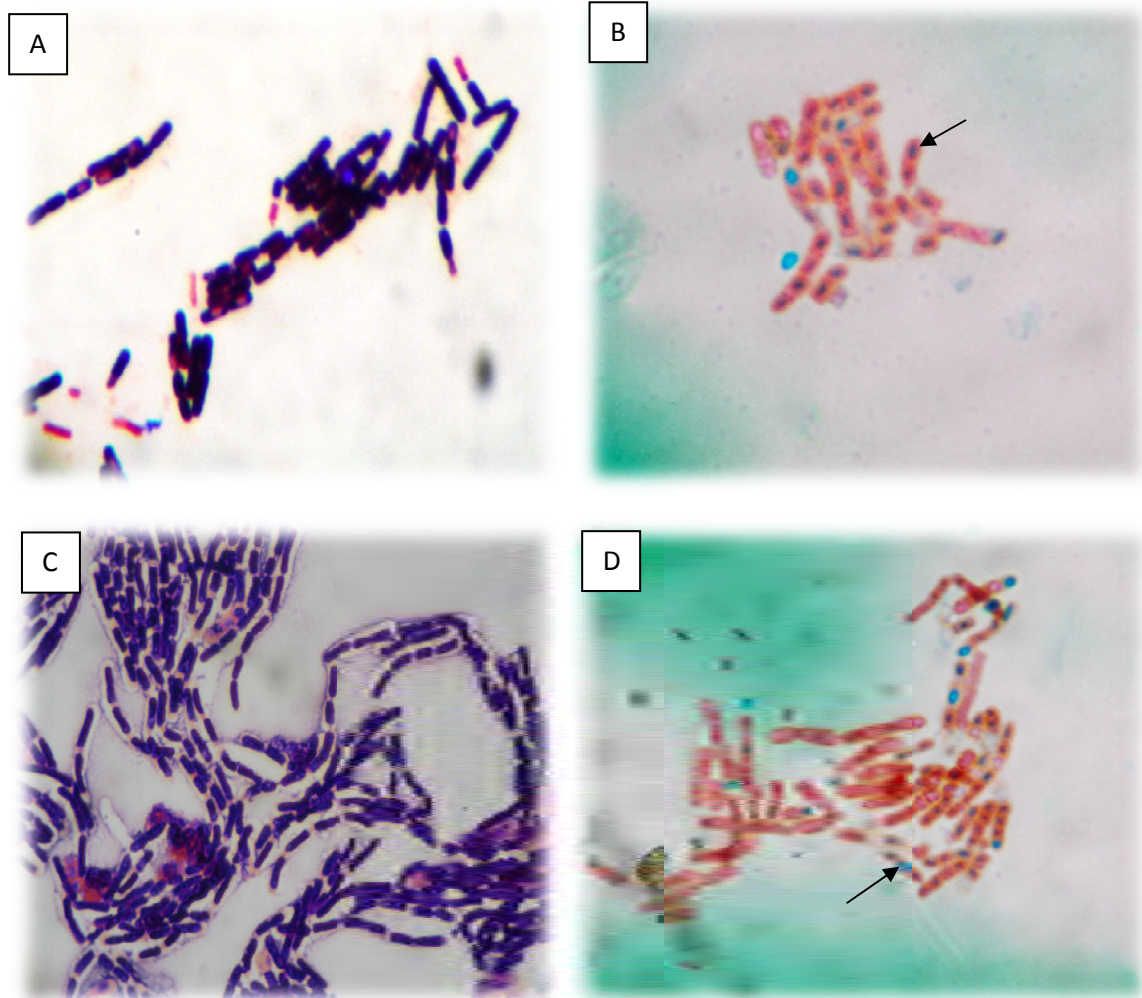
จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5 พบว่าลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5 บนอาหาร MSM โคโลนีมีขนาดใหญ่ มีลักษณะกลม สีขาวครีม ขอบเรียบ และมีลักษณะด้าน และจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีลักษณะรูปร่างแท่งสั้น ติดสีแกรมบวก และสร้างสปอร์ ดังแสดงในรูปที่

4.9

4.5.2 การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test)

เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของจุลินทรีย์สายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ความสามารถในการเคลื่อนที่ (mobility test) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลส (catalase test) ความสามารถในการผลิตอินโดล (indole test) การทดสอบ Methyl Red-Vogesprokauer test (MR-VP test) การทดสอบการใช้ซิเตรต (citrate utilization test) การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI) reaction ความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส (lysine decarboxylase) ไลซีนดีอะมิเนส (lysine deaminase) และ ornithine decarboxylase) ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส (urease test) ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 4.8

จากตารางที่ 4.8 พบว่าเมื่อนำผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5 อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ในเบื้องต้น คาดว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5 จัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp.



รูปที่ 4.9 ลักษณะสัณฐานวิทยาและสปอร์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 (A),(B) และ MSC-5 (C),(D) ภาพ (A) เป็นลักษณะการติดสีแกรมบวกเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า และภาพ (B) แสดงตำแหน่งสปอร์ภายในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า (C) เป็นลักษณะการติดสีแกรมบวกเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า และภาพ (D) แสดงตำแหน่งสปอร์ภายในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-5 เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5

การทดสอบ	แบคทีเรียสายพันธุ์	
	MSC-2	MSC-5
Motility	+	+
Catalase	+	+
Indole production	-	-
Methyl red	-	-
Voges-Proskauer	-	+
Citrate (Simmons)	+	+
TSI reaction	A/N	A/N
H ₂ S production (TSI)	-	-
Lysine decarboxylase	+	+
Lysine deaminase	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+
Urease	+	+
Nitrate reduction	+	+
การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต		
กลูโคส	+ / NG	+ / NG
กาแลคโทส	+ / NG	+ / NG
ฟรักโทส	+ / NG	+ / NG
แมนนิทอล	+ / NG	+ / NG
มอลโทส	+ / NG	+ / NG
ซูโครส	+ / NG	+ / NG
ซอร์บิทอล	+ / NG	+ / NG
ไซลิทอล	+ / NG	+ / NG

หมายเหตุ + สามารถใช้ได้ เจริญได้ หรือเกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ

- ไม่สามารถใช้ได้ ไม่เจริญ หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ, A/N สร้างกรดที่ผิวหน้าอาหาร, NG ไม่เกิดแก๊ส

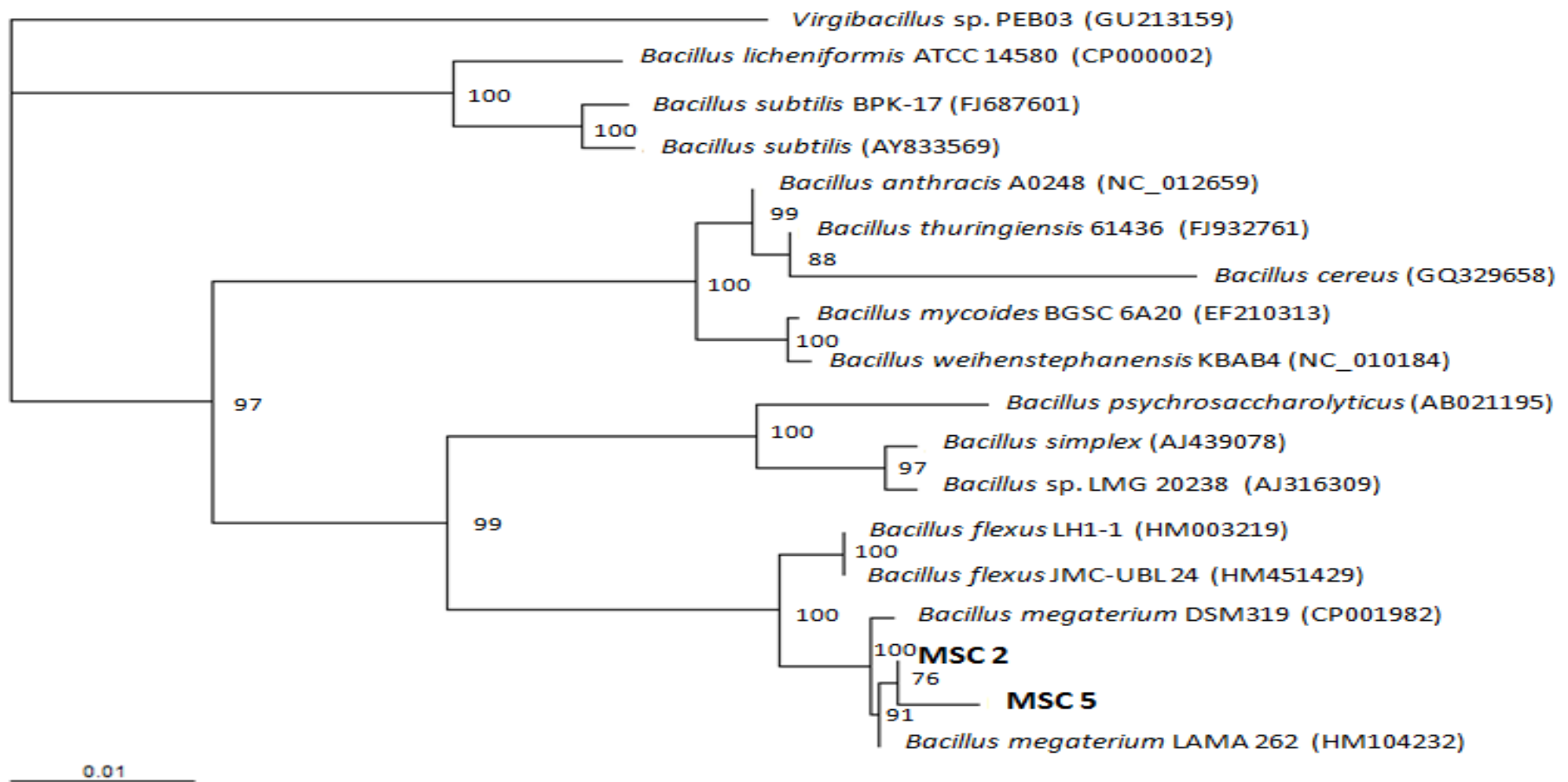
4.5.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA

4.5.3.1 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ตามวิธีในข้อ 3.5.3.1 ของแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5 มีความยาว 1,449 และ 1,333 bps ตามลำดับ (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์แสดงในภาคผนวก ง) เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *B. megaterium* สายพันธุ์ LAMA 262 99.79 และ 99.47% ตามลำดับ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ไปเสนอใน Genbank เพื่อให้ได้ accession number จึงให้แบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5 ชื่อว่า *Bacillus* sp. MSC-2 (HQ694774) และ *Bacillus* sp. MSC-5 (HQ678105) ตามลำดับ

4.5.3.2 สร้าง Phylogenetic tree

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. MSC-2 และ *Bacillus* sp. MSC-5 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn) โดยทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X และนำข้อมูลผ่านการปรับแนวมาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package พบว่า *Bacillus* sp. MSC 2 และ *Bacillus* sp. MSC 5 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *B. megaterium* สายพันธุ์ LAMA 262 ดังแสดงในรูป 4.10



รูปที่ 4.10 Phylogenetic tree ของ 16S rRNA ของ *Bacillus megaterium* MSC 2 (HQ694774) และ *Bacillus megaterium* MSC 5 (HQ678105) โดยใช้ 16S rRNA ของ *Virgibacillus* sp. PEB03 (GU213159) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้งด้วย bootstrap

4.6 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพ และการย่อยไบโຈามจุรีในระดับขวดเขย่า

4.6.1 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHAs ของ *Bacillus* sp. MSC-5 ในระดับขวดเขย่า

จากผลการทดลองในข้อ 4.4 พบว่าการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโຈามจุรีมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHAs โดย *Bacillus* sp. MSC-5 มีอัตราการผลิต PHAs ในปริมาณน้อย คือ 0.035 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 4.7 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งเกิดจากสารยับยั้งที่มีอยู่ในสารละลายน้ำตาล เนื่องจากในระหว่างกระบวนการปรับสภาพและย่อยไบโຈามจุรีนอกจากจะปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวิซแล้วยังปล่อยสารอื่นๆ ที่เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ออกมาด้วย ได้แก่ กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ (volatile organic acids) Furfural และ aromatic compounds (Yu และ Stahl, 2008) และจากผลการวิเคราะห์โดย HPLC ในข้อ 4.3 พบว่าในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีมี เพอร์ฟิวรอล 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรอล และกรดอะซิติก เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ดังนั้นเพื่อเป็นการลดความเป็นพิษและความเข้มข้นของสารยับยั้งที่มีอยู่ในสารละลายน้ำตาล ในการทดลองนี้จึงได้ทำการเจือจางสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยไบโຈามจุรีที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ 8 กรัมต่อลิตร ด้วยอาหารเพื่อการผลิตที่มีปริมาณธาตุอาหารเท่ากันและจำลองปริมาณน้ำตาลให้ใกล้เคียงกันโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณ 8 กรัมต่อลิตร ทำการแปรผันอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโຈามจุรีต่ออาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอัตราส่วนร้อยละ 100:0 80:20 60:40 40:60 20:80 และ 0:100 โดยปริมาตร และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซและปริมาณ PHAs ต่อไป

4.6.1.1 วิเคราะห์การเจริญเติบโตของ *Bacillus* sp. MSC-5 จากน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้โดยแก๊สโครมาโทกราฟี

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.11 - 4.22 พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. MSC-5 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง *Bacillus* sp. MSC-5 มีแนวโน้มการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ โดยพิจารณาจากน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในแต่ละภาวะ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.73 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 และมีการสะสม PHAs ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป โดยปริมาณ PHAs สูงสุด คือ 0.67 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 24.73 ของน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 72 เช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.11 แต่เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. MSC-5 ในอาหารเพื่อการผลิตที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีเพียงอย่างเดียว พบว่า *Bacillus* sp. MSC-5 มีการเจริญน้อยโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 0.74 กรัมต่อลิตร การสะสม PHAs มีปริมาณต่ำ โดยมีปริมาณสูงสุด 0.035 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 4.7 ของน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 96 ดังแสดงในรูปที่ 4.21 และเมื่อเจาะจงความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีด้วยอาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเจริญและการสะสม PHAs มีปริมาณเพิ่มขึ้นแปรผันตามอัตราส่วนของอาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เพิ่มขึ้น โดยที่อัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีต่ออาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 80:20 *Bacillus* sp. MSC-5 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 0.74 กรัมต่อลิตร การสะสม PHAs มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 0.07 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 5.8 ของน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 96 ดังแสดงในรูปที่ 4.19 ที่อัตราส่วน 60:40 *Bacillus* sp. MSC-5 มีการเจริญที่ดีขึ้น โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 1.42 กรัมต่อลิตร การสะสม PHAs มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 0.174 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 12.24 ของน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 96 ดังแสดงในรูปที่ 4.17 ที่อัตราส่วน 40:60 *Bacillus* sp. MSC-5 มีการเจริญที่ดี โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 1.72 กรัมต่อลิตร การสะสม PHAs มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 0.41 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 23.69 ของน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 96 ดังแสดงในรูปที่ 4.15 และที่อัตราส่วน 20:80 *Bacillus*

sp. MSC-5 มีการเจริญที่ดีที่สุดในการที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีเป็นองค์ประกอบ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 2.20 กรัมต่อลิตร การสะสม PHAs มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 0.64 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 29.1 ของน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 96 ดังแสดงในรูปที่ 4.13

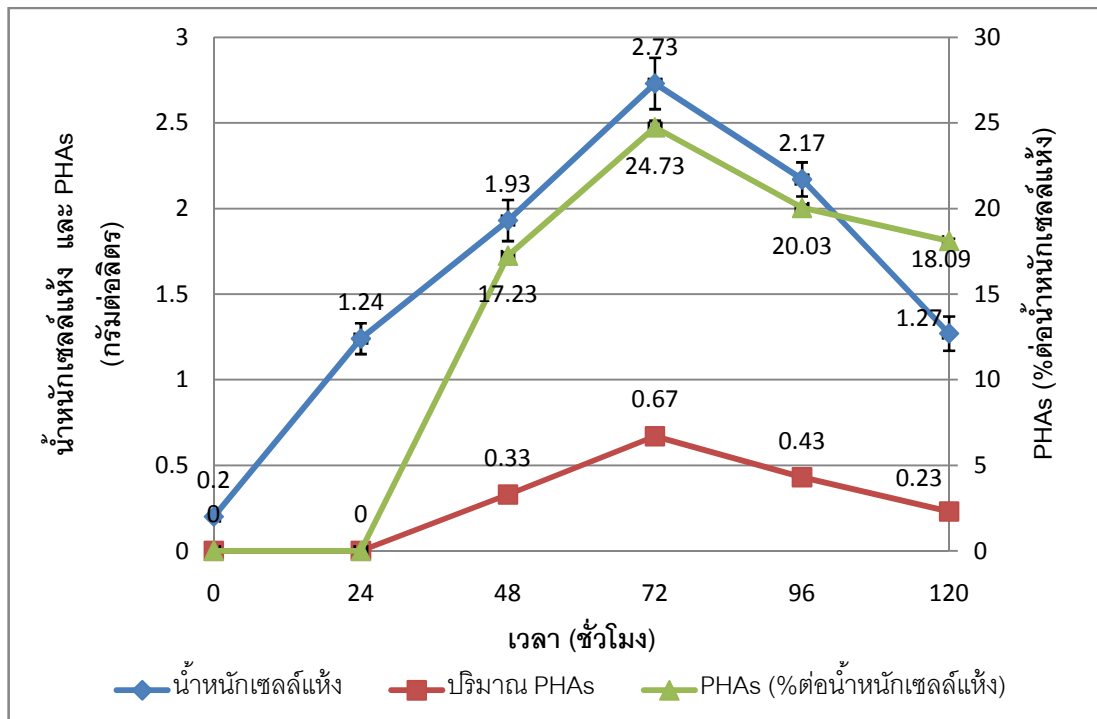
จากผลการทดลองพบว่าการเจือจางสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีด้วยอาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถช่วยลดความเป็นพิษลงได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ส่งผลในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* sp. MSC-5 มีความเข้มข้นลดลง โดยสามารถเห็นการเจริญของเซลล์ได้ชัดเจนขึ้นเมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้น แต่ทั้งนี้การเจริญและการสะสม PHAs ของ *Bacillus* sp. MSC-5 ยังคงถูกยับยั้งอยู่บ้างเล็กน้อย เห็นได้จากเวลาในการเจริญและสะสม PHAs สูงสุดใช้เวลานานขึ้นจาก 72 ชั่วโมงเป็น 96 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 4.9

4.6.1.2 ศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือทั้งหมดในน้ำหมัก

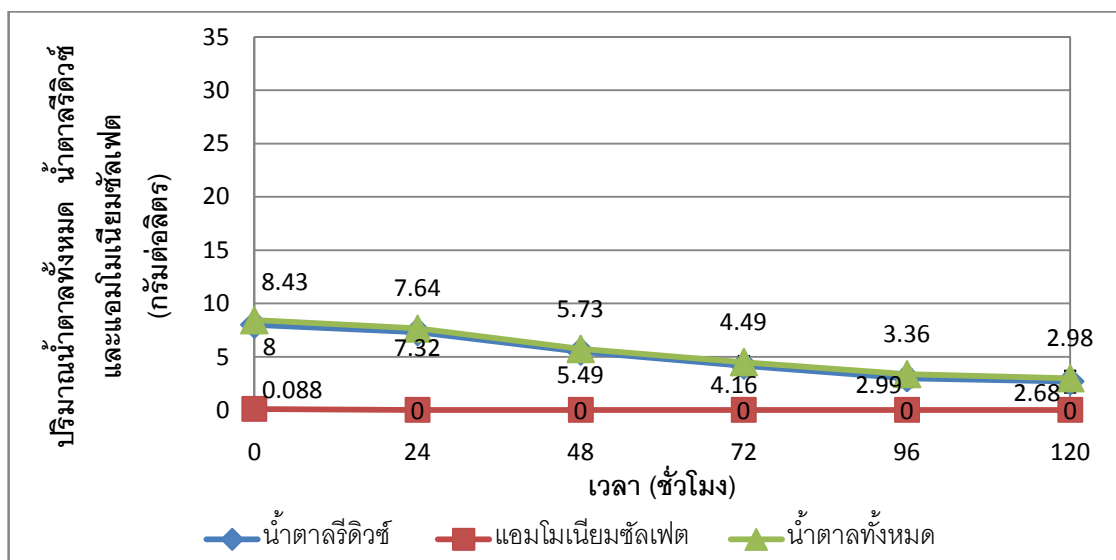
ผลการทดลองพบว่าในอาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมงที่ 120 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ 2.98 และ 2.68 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มหมดไปในชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 4.12 และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลต่ออาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอัตราส่วน 20:80 พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 120 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 8 กรัมต่อลิตรเป็น 9.58 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงจาก 12.8 กรัมต่อลิตร เหลือ 10.67 กรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตหมดลงในชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ที่อัตราส่วน 40:60 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 8 กรัมต่อลิตรเป็น 11.70 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงจาก 15.23 กรัมต่อลิตร เหลือ 11.87 กรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตหมดลงในชั่วโมงที่ 24 เช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.16 ที่อัตราส่วน 60:40 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันจาก 8 กรัม

ต่อลิตรเป็น 10.19 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงจาก 19.34 กรัมต่อลิตร เหลือ 10.79 กรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตหมดลงในชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 4.18 ที่อัตราส่วน 80:20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันจาก 8 กรัมต่อลิตรเป็น 12.26 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงจาก 24.63 กรัมต่อลิตร เหลือ 12.57 กรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตหมดลงในชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 4.20 และในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว หรือที่อัตราส่วน 100:0 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันจาก 8 กรัมต่อลิตรเป็น 11.12 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงจาก 30.7 กรัมต่อลิตร เหลือ 17.87 กรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตหมดลงในชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 4.22

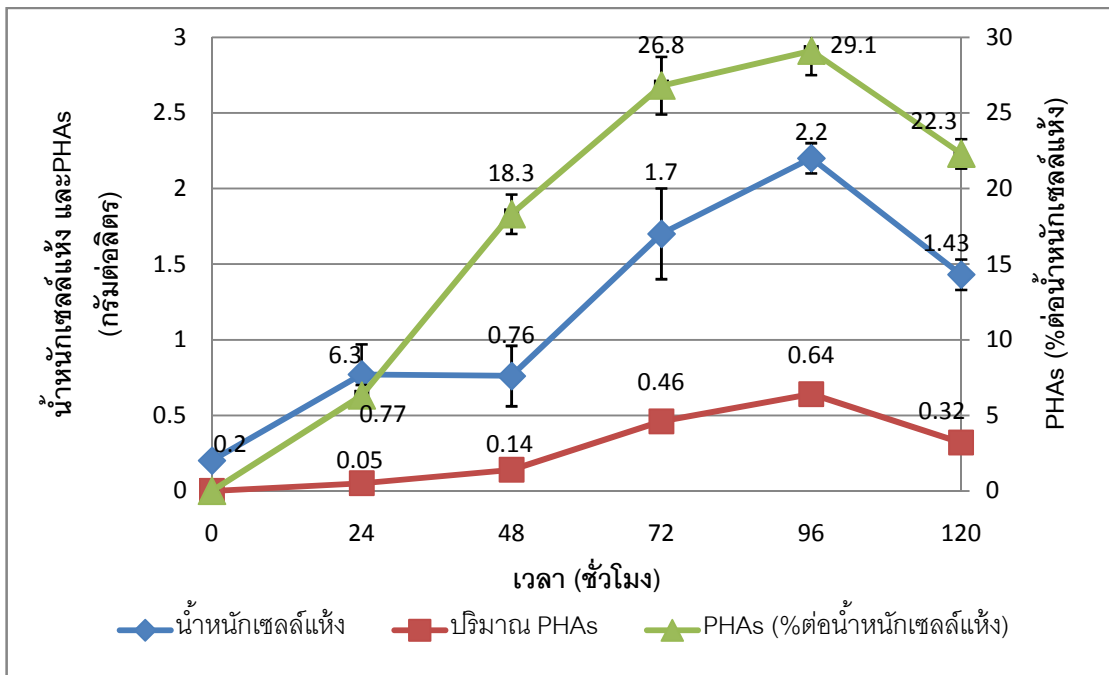
ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบจามจุรีมีผลต่อการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของ *Bacillus* sp. MSC-5 จากการทดลองที่ใช้อาหารเพื่อการผลิตที่กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง แต่ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยไบจามจุรีเป็นส่วนประกอบที่อัตราส่วนต่างๆ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเกิดจาก *Bacillus* sp. MSC-5 ใช้น้ำตาลรีดิวซ์พร้อมกับย่อยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ชนิดอื่นที่มีอยู่ในสารละลายน้ำตาลแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าลดลง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มมากขึ้น หรืออาจเกิดจากการถูกขัดขวางการใช้น้ำตาลจากผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการปรับสภาพและย่อยไบจามจุรี ได้แก่ เฟอร์ฟิวรอล 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล และกรดอะซิติก ทั้งนี้เนื่องจากกรดอะซิติกจะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส ส่งผลให้การใช้น้ำตาลลดลง เฟอร์ฟิวรอลจะลดประสิทธิภาพในการผลิต ATP ภายในเซลล์ส่งผลให้การเจริญของเซลล์ถูกยับยั้ง และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล จะส่งผลต่อการเจริญโดยจะทำให้ lag-phase มีระยะเวลานานขึ้นเนื่องจากไปลดสมบัติความเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (Palmqvast และ Hahn-Hägerdal, 2000) ซึ่งส่งผลให้การใช้น้ำตาลลดลง จุลินทรีย์จึงย่อยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ชนิดอื่นแทน ซึ่งยังส่งผลให้การเจริญลดลงอีกด้วย



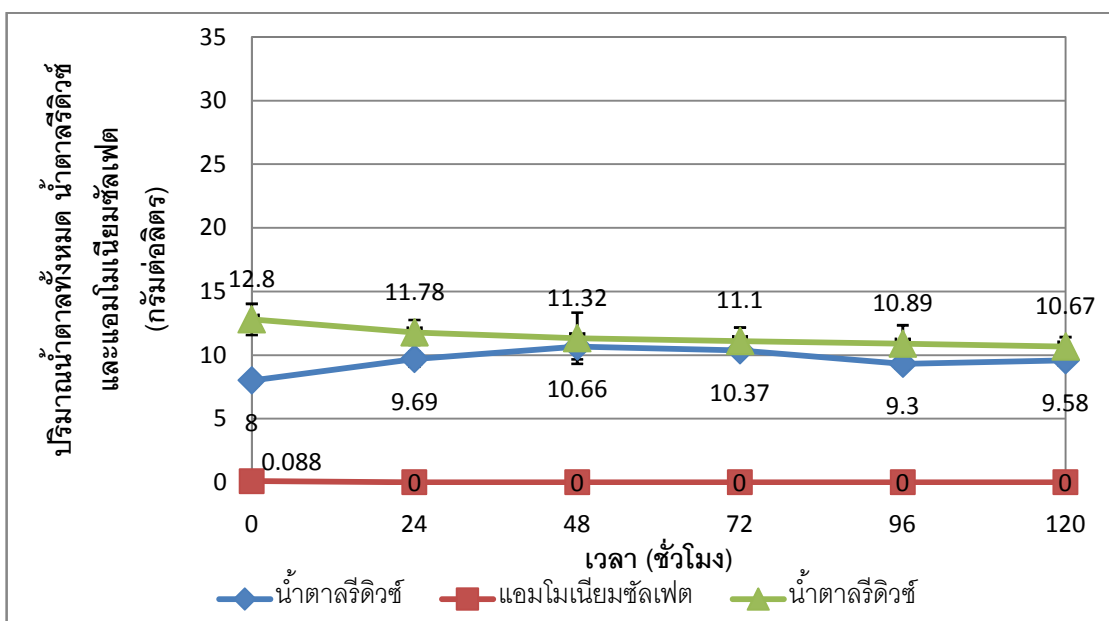
รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณน้ำหนักรวมของน้ำตาลที่ละลายได้ ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อ น้ำหนักรวมของน้ำตาลที่ละลายได้ ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 0:100



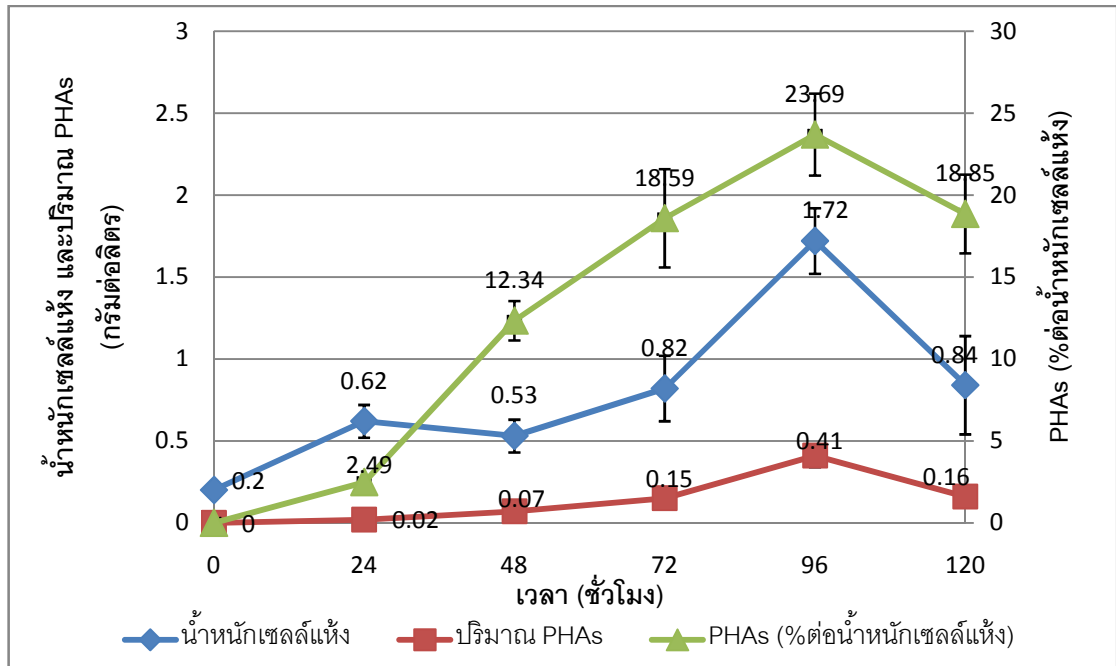
รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาสรวมและแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหนักรวมที่ชั่วโมงต่างๆ ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 0:100



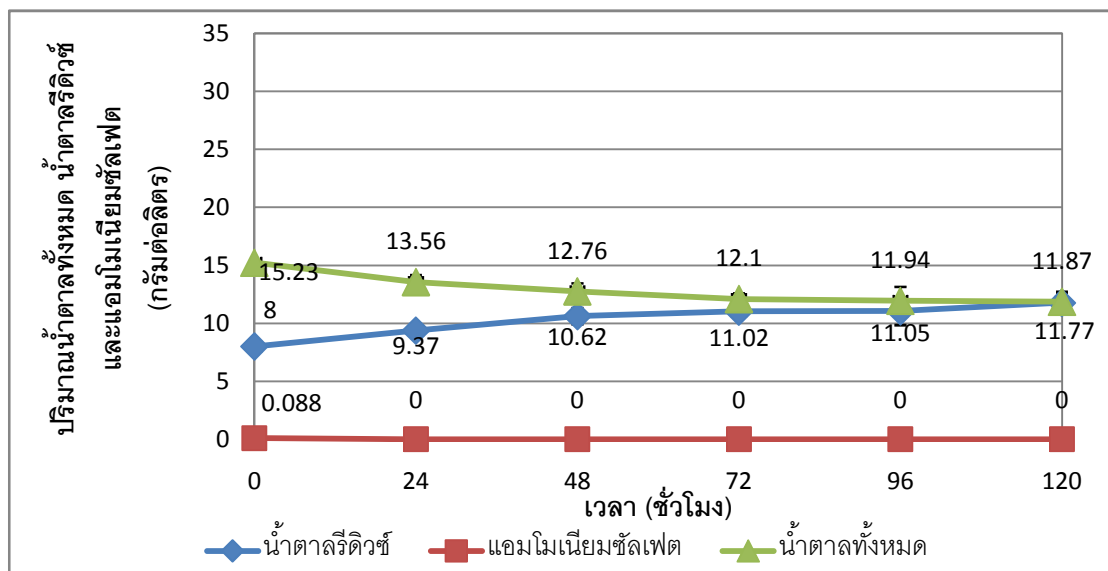
รูปที่ 4.13 แสดงปริมาณน้ำหนักรวมคาร์โบไฮเดรต ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อน้ำหนักรวมคาร์โบไฮเดรต ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 20:80



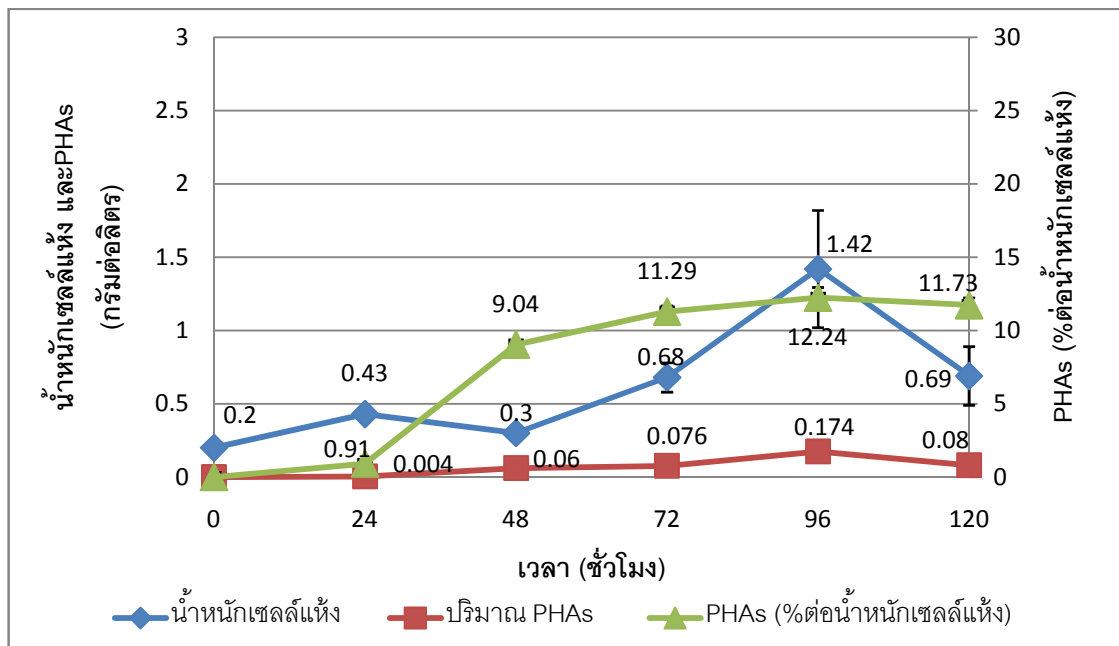
รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักที่ชั่วโมงต่างๆ ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 20:80



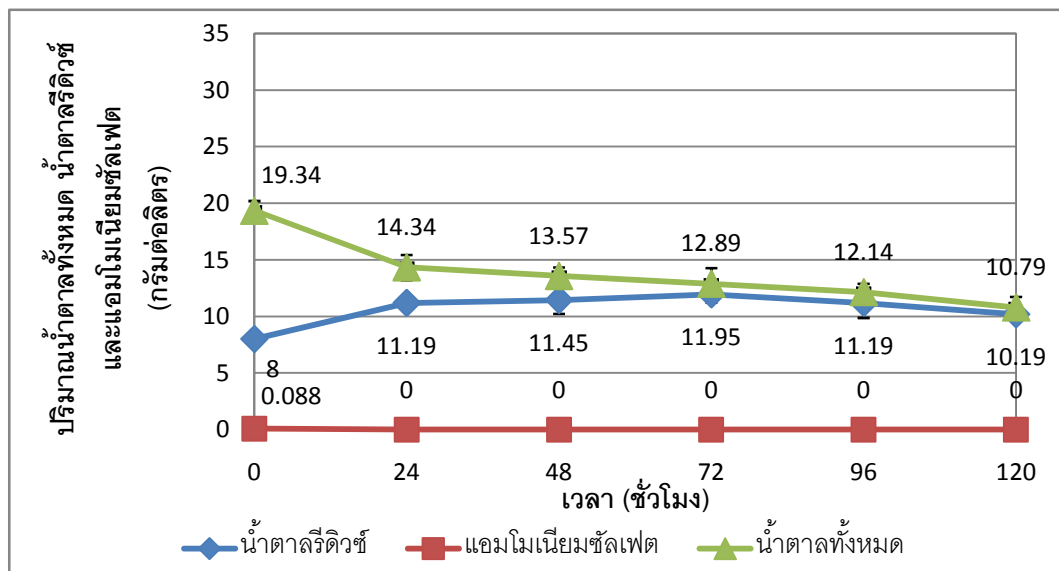
รูปที่ 4.15 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 40:60



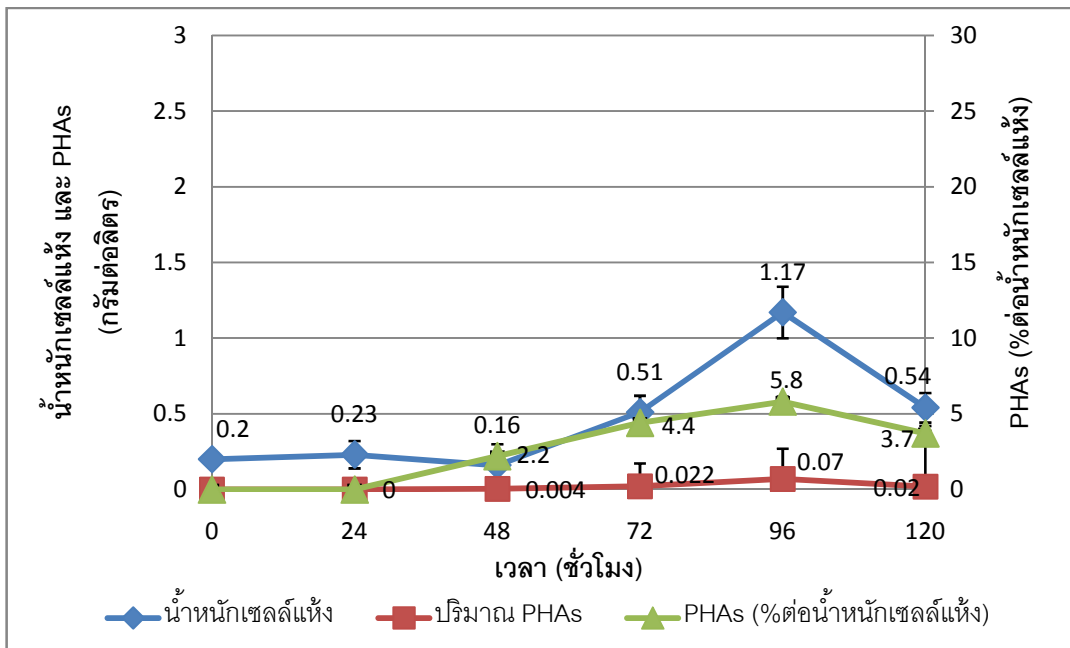
รูปที่ 4.16 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักที่ชั่วโมงต่างๆ ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 40:60



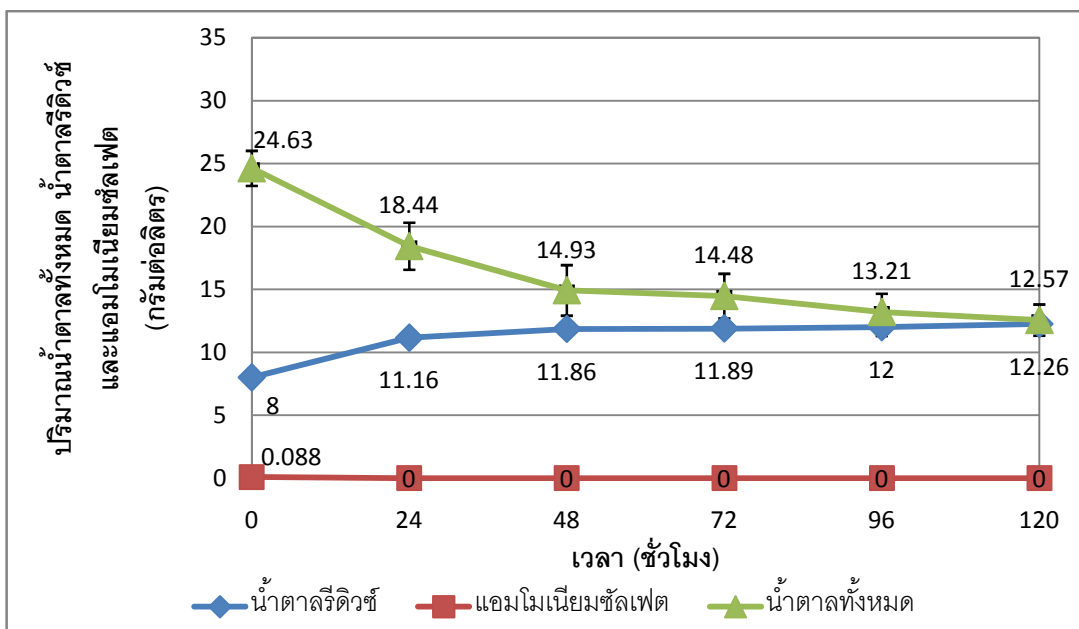
รูปที่ 4.17 แสดงปริมาณน้ำหนักรีดน้ำน้ำตาล ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อน้ำหนักรีดน้ำน้ำตาลของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 60:40



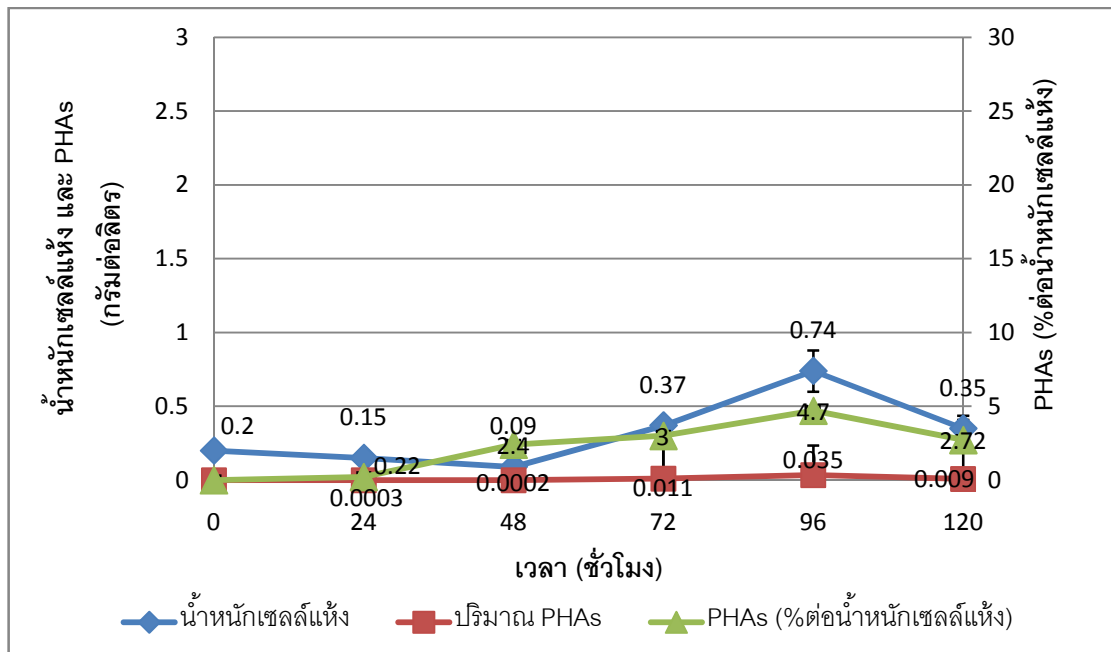
รูปที่ 4.18 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักที่ชั่วโมงต่างๆ ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 60:40



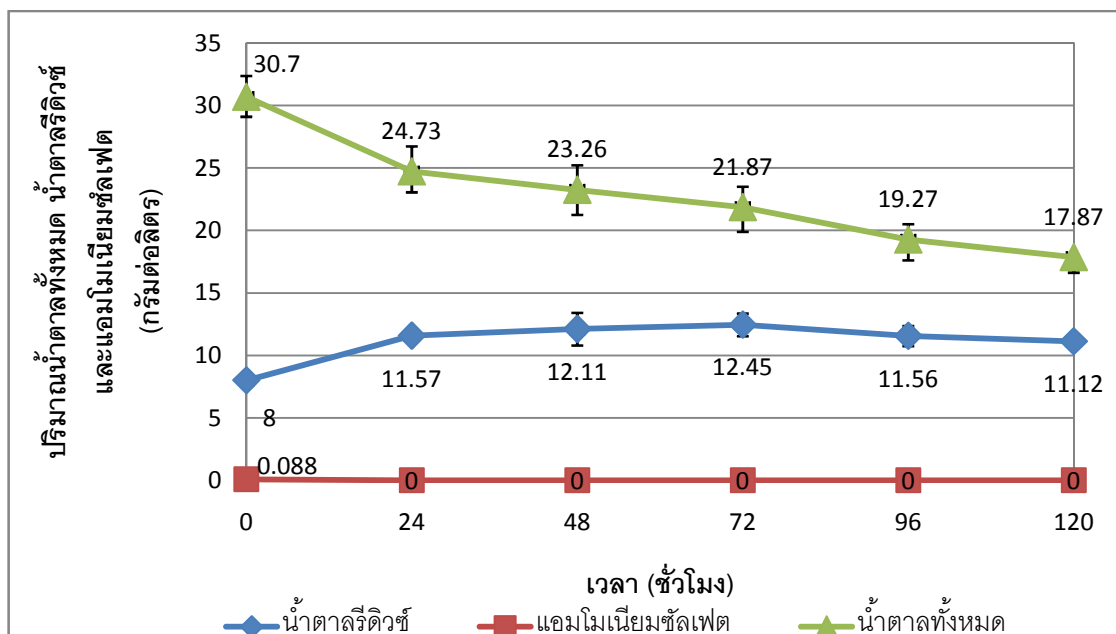
รูปที่ 4.19 แสดงปริมาณน้ำหนักรวมคาร์โบไฮเดรต ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อ น้ำหนักคาร์โบไฮเดรต ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 80:20



รูปที่ 4.20 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลีควิวซ์ และแอมโมเนียมซัลเฟต ในน้ำหมักที่ชั่วโมงต่างๆ ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 80:20



รูปที่ 4.21 แสดงปริมาณน้ำนั้กเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อ น้ำนั้กเซลล์แห้ง ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 100:0



รูปที่ 4.22 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวิ้และแอมโมเนี่ยมซัลเฟตในน้ำนั้กที่ชั่วโมงต่างๆ ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลกับอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 100:0

ตารางที่ 4.9 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด ปริมาณ PHAs สูงสุดและปริมาณ PHAs สูงสุดของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลจากการปรับสภาพไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโຈามจุรีกับอาหารเพื่อการผลิตในอัตราส่วน 100:0 80:20 60:40 40:60 20:80 และ 0:100 ตามลำดับ

อัตราส่วนระหว่าง สารละลายน้ำตาลต่อ อาหารเพื่อการผลิต	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHAs (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHAs (%ของน้ำหนักเซลล์แห้ง)
0:100	2.73 (72 h)	0.670 (72 h)	24.73 (72 h)
20:80	2.20 (96 h)	0.640 (96 h)	29.10 (96 h)
40:60	1.72 (96 h)	0.410 (96 h)	23.69 (96 h)
60:40	1.42 (96 h)	0.174 (96 h)	12.24 (96 h)
80:20	1.17 (96 h)	0.070 (96 h)	5.80 (96 h)
100:0	0.74 (96 h)	0.035 (96 h)	4.70 (96 h)

4.6.2 ศึกษาหาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHAs ของ *Bacillus* sp. MSC-5 ในระดับขวดเขย่า

จากการทดลองที่ 4.6.1 พบว่าการเจือจางสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีนั้นสามารถช่วยลดความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีได้ แต่จากผลการทดลองที่ได้พบว่าต้องทำการเจือจางสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีด้วยอาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอัตราส่วน 40:60 เพื่อลดความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นต่อการผลิตและสะสม PHAs ลักษณะดังกล่าวไม่ตอบสนองต่อวัตถุประสงค์ของการ

ทดลองที่ตั้งไว้ได้มากนักเพราะยังคงใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตในปริมาณมาก ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิต PHAs ของ *Bacillus* sp. MSC-5 โดยทำการแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลจากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 8 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เท่ากับ 200 เลี้ยงในภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณ PHAs ต่อไป

4.6.2.1 วิเคราะห์การเจริญเติบโตของ *Bacillus* sp. MSC-5 จากน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้โดยแก๊สโครมาโทกราฟี

ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. MSC-5 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และมี C/N เท่ากับ 200 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs เพิ่มขึ้นตามปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ โดยที่ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรี โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 0.92 กรัมต่อลิตรและมีการสะสม PHAs ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป โดยมีปริมาณ PHAs สูงสุด 0.045 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 4.94 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 96 ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 4.23 เมื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 1.0 กรัมต่อลิตร พบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงขึ้น โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 3.78 กรัมต่อลิตร มีปริมาณ PHAs สูงสุด 0.453 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 11.99 ของน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 96 ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 4.25 และเมื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 2.0 กรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 5.88 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 โดยมีปริมาณ PHAs สูงสุด คือ 0.628 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 10.68

ของน้ำหนักรีดแห้งในชั่วโมงที่ 72 ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 4.27

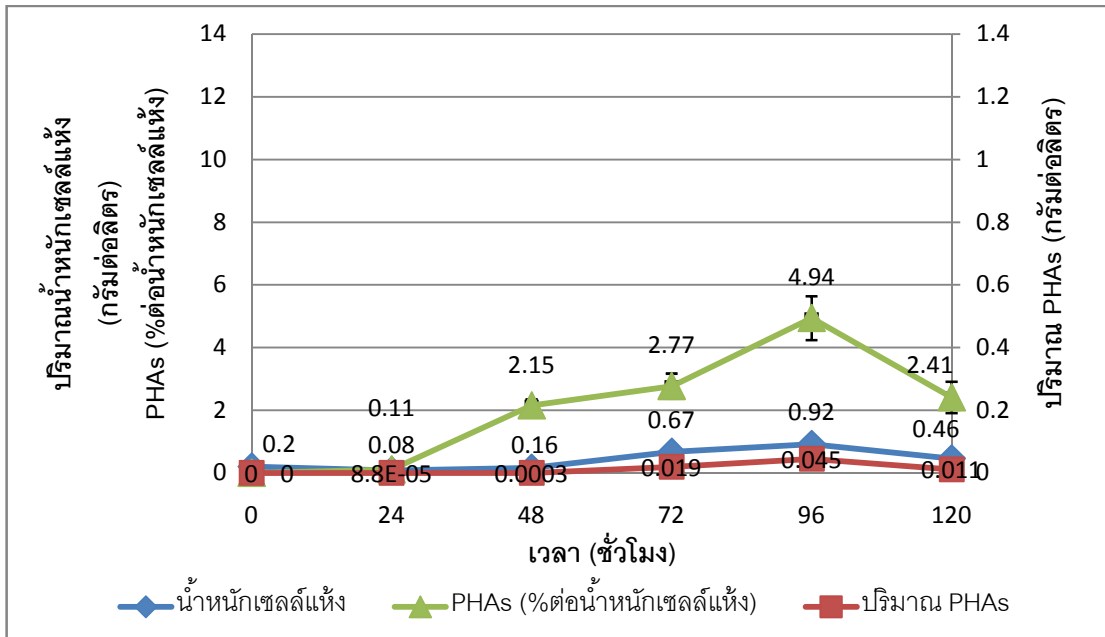
จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.23 4.25 และ 4.27 และตารางที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต PHAs และได้ชีวมวลสูงขึ้น

4.6.2.2 ศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณเฟอร์ริฟอรอล 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ริฟอรอล และกรดอะซิติก

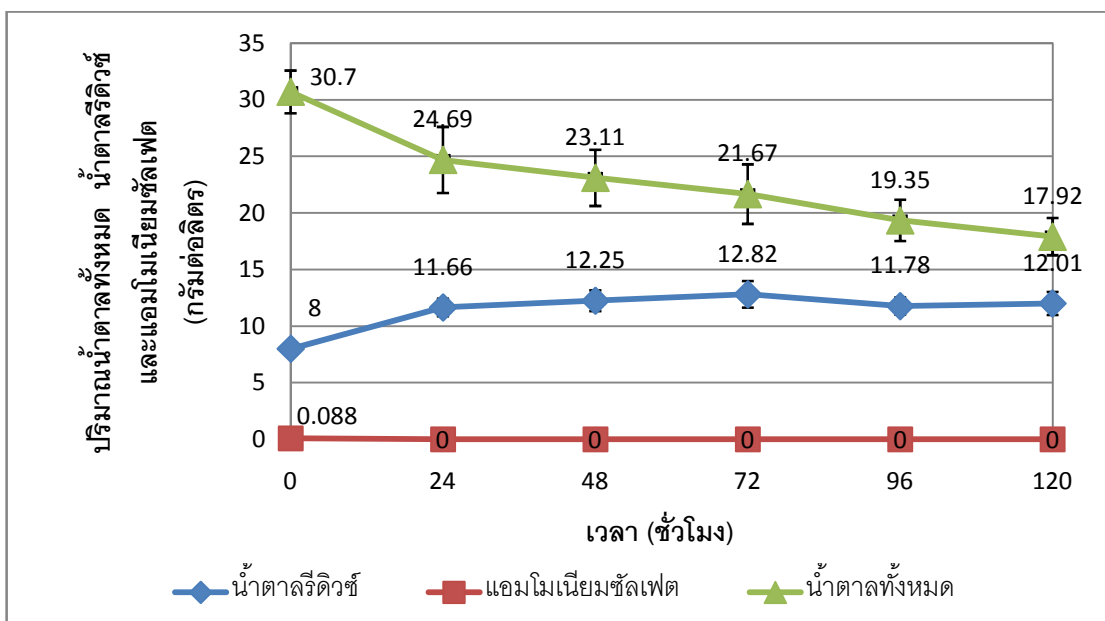
ผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. MSC-5 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈມຈຸຣີເປັນແຫຼ່ງคาร์บอน โดยเมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 120 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 8 กรัมต่อลิตรเป็น 12.01 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงจาก 30.7 กรัมต่อลิตร เหลือ 17.92 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาจเนื่องมาจาก *Bacillus* sp. MSC-5 ถูกยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่มีอยู่ในสารละลายน้ำตาลทำให้ไม่สามารถนำน้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้ได้ จึงย่อยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ได้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ จึงพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กลับมีค่าเพิ่มขึ้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตหมดลงในชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 4.24 เมื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 1.0 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมงที่ 120 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 8 กรัมต่อลิตรเป็น 11.34 กรัมต่อลิตรภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงจาก 30.7 กรัมต่อลิตร เหลือ 23.57 กรัมต่อลิตร ภายหลังจาก 24 ชั่วโมง ซึ่งอาจเนื่องมาจาก *Bacillus* sp. MSC-5 นำน้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้พร้อมกับย่อยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ จึงพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกับน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต หมดลงในชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 4.26 และเมื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 2.0 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 120 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันจาก 8 กรัมต่อลิตรเป็น 9.25 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 และลดลงอย่างต่อเนื่องจนเหลือปริมาณ 3.6 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 120 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างต่อเนื่องจาก 30.7 กรัมต่อลิตร เหลือ 9.47 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 120 ซึ่งอาจเนื่องมาจาก *Bacillus* sp. MSC-

5 นำน้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้พร้อมกับย่อยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ จึงพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกับน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแอมโมเนียมีค่าลดลงในชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 4.28

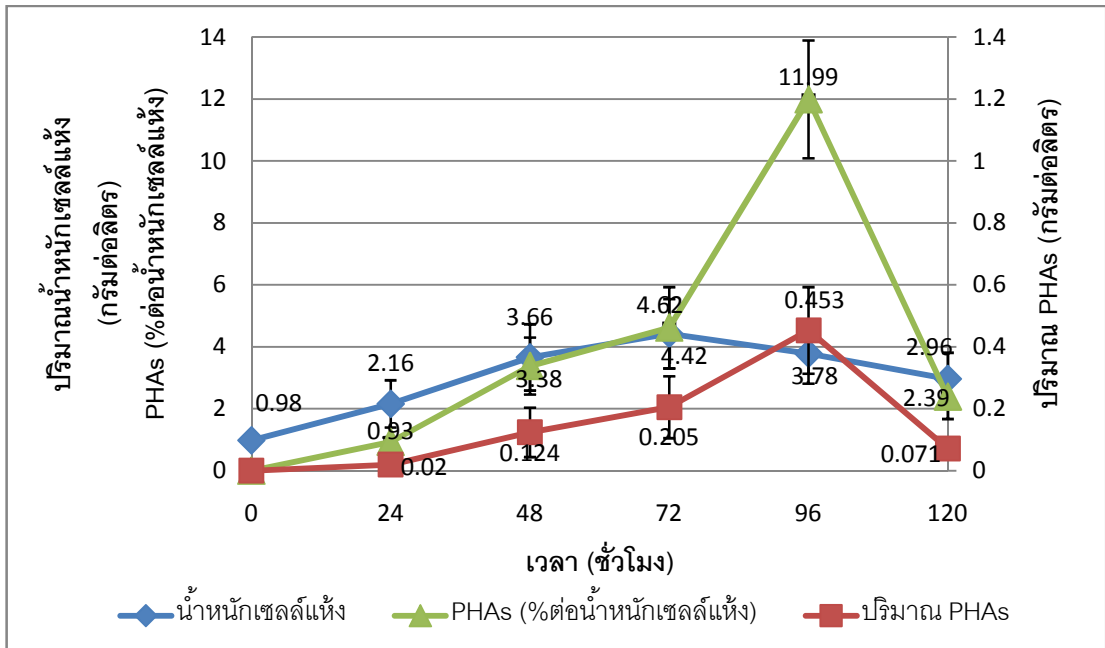
ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญของ *Bacillus* sp. MSC-5 โดยเมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆลดลง แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งอาจเกิดจาก *Bacillus* sp. MSC-5 ย่อยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์และใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไปพร้อมกันเพื่อการเจริญและการผลิต PHAs แต่เนื่องจากหัวเชื้อมีปริมาณน้อยทำให้เกิดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการปรับสภาพและการย่อยไบโຈຈຸລີที่มีอยู่ในสารละลายน้ำตาล (Wierckx และคณะ, 2009) เมื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นตั้งแต่ 1.0 กรัมต่อลิตรขึ้นไปพบว่า น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลงซึ่งอาจเกิดจากปริมาณหัวเชื้อมีมากพอและอาจใช้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่อยู่ในสารละลายน้ำตาลและเมื่อทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เหลืออยู่ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 120 โดยเครื่อง HPLC พบว่าในน้ำหมักมีปริมาณเฟอร์ฟิวรอล 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล และกรดอะซิติกลดลง โดยอัตราการลดของผลิตภัณฑ์ข้างเคียงสัมพันธ์กับปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ ดังตารางที่ 4.11 นั้นแสดงว่า *Bacillus* sp. MSC-5 สามารถใช้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่มีอยู่ในสารละลายน้ำตาล เช่น เฟอร์ฟิวรอล 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล และกรดอะซิติก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wierckx และคณะ (2009) ที่ได้ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยฟางข้าวสาลีในการผลิต PHAs โดยใช้ *C. basilensis* HMF14 และ Yu และ Stahl (2008) ที่ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยชานอ้อยในการผลิต PHAs โดย *R. eutropha* ซึ่งรายงานทั้งสองพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองปริมาณน้ำตาลมีค่าเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณผลิตภัณฑ์ข้างเคียง ได้แก่ เฟอร์ฟิวรอล 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติกมีปริมาณลดลง



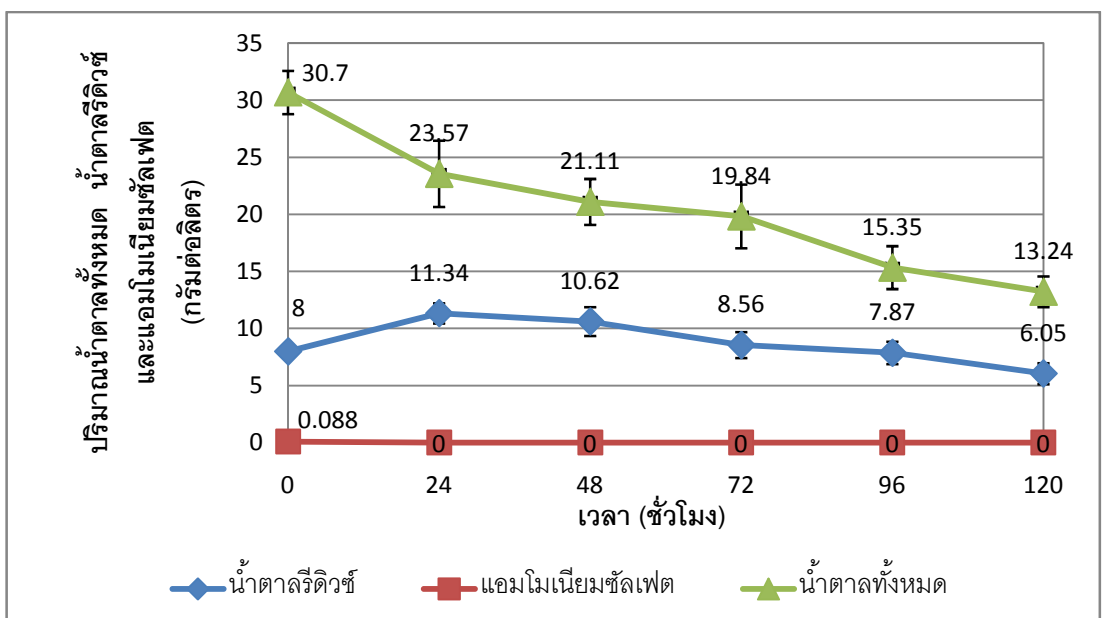
รูปที่ 4.23 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร



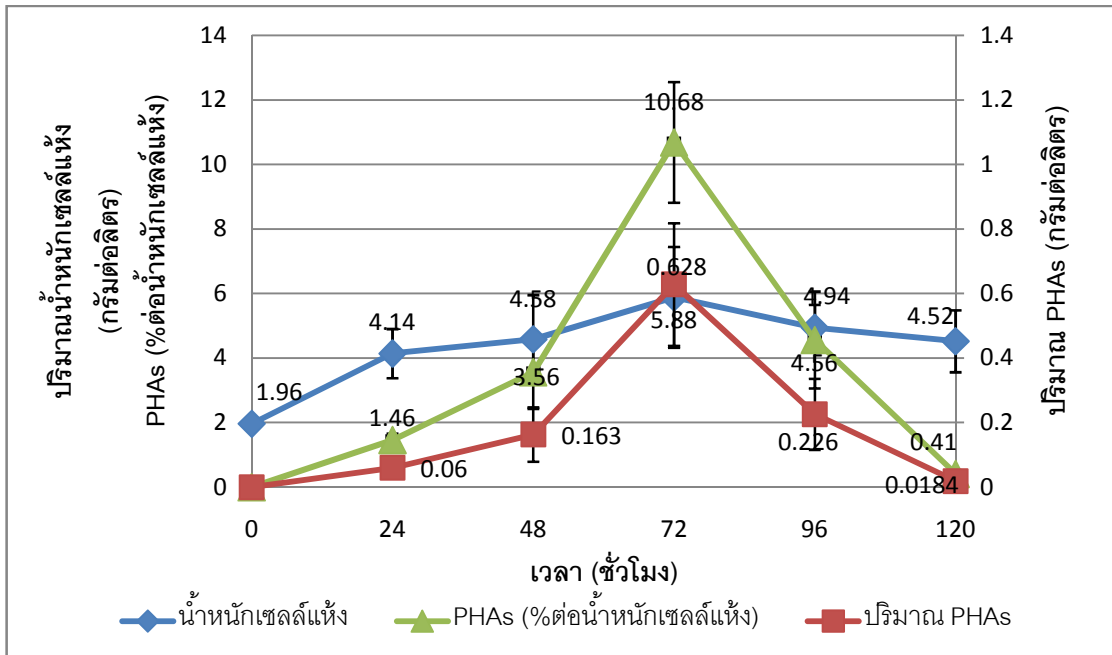
รูปที่ 4.24 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักที่ชั่วโมงต่างๆ ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร



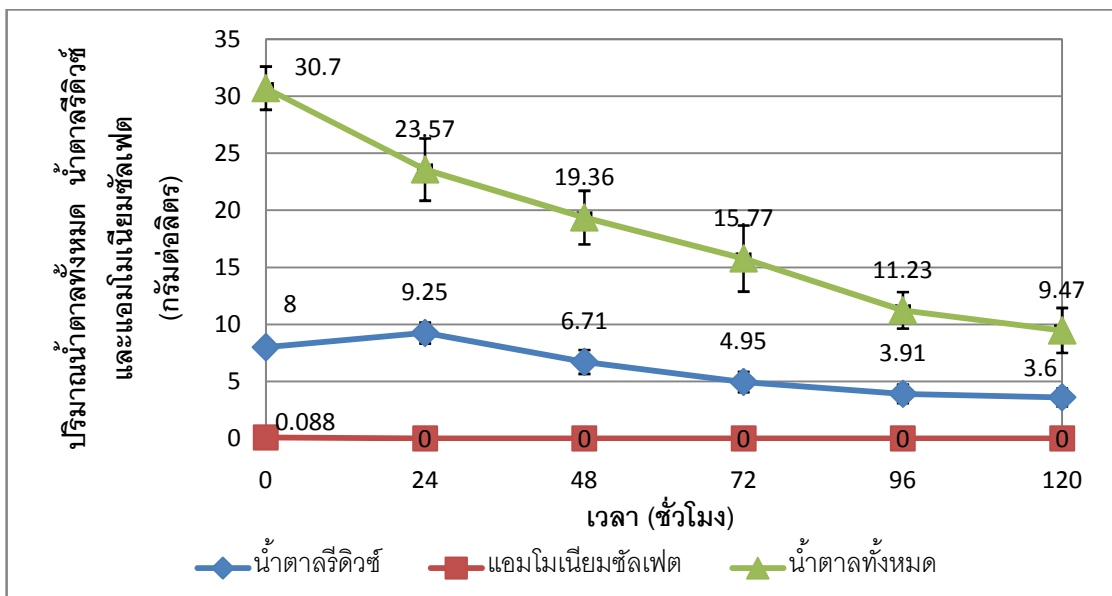
รูปที่ 4.25 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1.0 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.26 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักที่ชั่วโมงต่างๆ ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1.0 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.27 แสดงปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 2.0 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.28 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์และแอมโมเนียมซัลเฟตในน้ำหมักที่ชั่วโมงต่างๆ ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 2.0 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.10 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งสูงสุด ปริมาณ PHAs สูงสุดและปริมาณ PHAs สูงสุดของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลการปรับสภาพไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

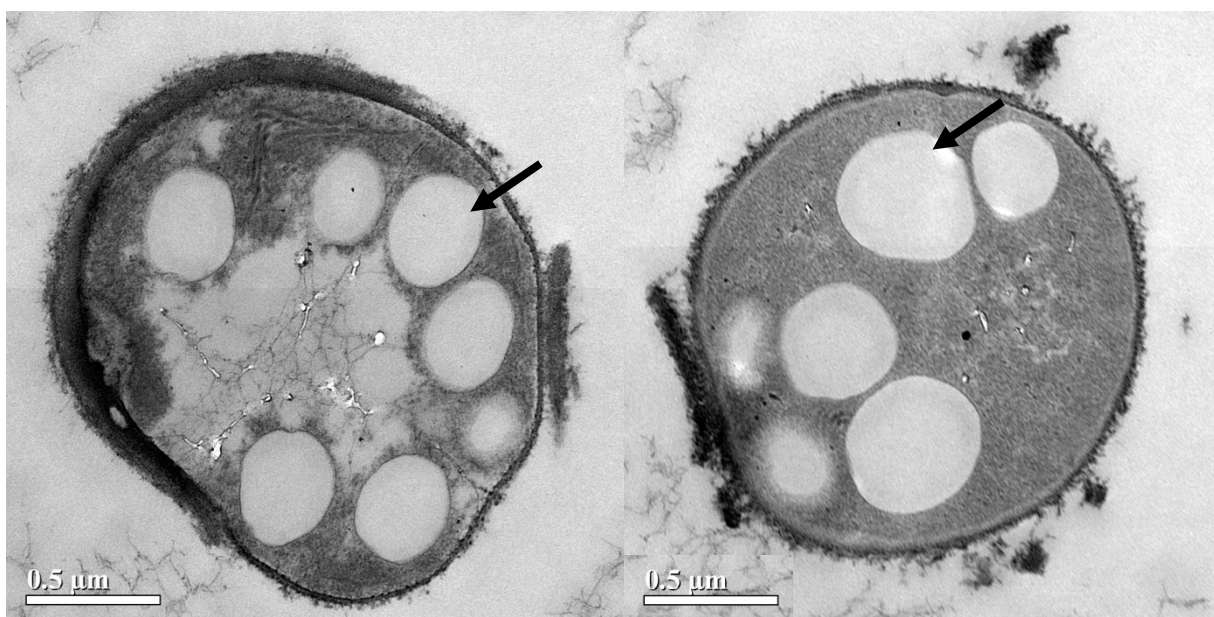
ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	PHAs (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ PHAs (%ของน้ำหนักรเซลล์แห้ง)
0.2	0.92 (96 h)	0.045 (96 h)	4.94 (96 h)
1.0	3.78 (96 h)	0.453 (96 h)	11.99 (96 h)
2.0	5.88 (72 h)	0.628 (72 h)	10.68 (72 h)

ตารางที่ 4.11 ปริมาณผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. MSC-5 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 120 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

ปริมาณ หัวเชื้อเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ชั่วโมงที่ 0			ชั่วโมงที่ 120		
	ปริมาณผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (กรัมต่อลิตร)		
	เฟอร์ฟิวรอล	5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอร์ฟิวรอล	กรดอะซิติค	เฟอร์ฟิวรอล	5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอร์ฟิวรอล	กรดอะซิติค
0.2	0.0037	0.0029	0.023	0.0035	0.0027	0.027
1.0				0.0024	0.0022	0.019
2.0				0.0020	0.0014	0.010

4.7 ศึกษาลักษณะแกรนูลภายในเซลล์แบคทีเรียโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron micrograph; TEM)

เพื่อศึกษาลักษณะของแกรนูลภายในเซลล์แบคทีเรียโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน จึงนำเซลล์ *Bacillus* sp. MSC-5 จากการทดลองที่ 4.5 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 96 ชั่วโมง มาเตรียมตัวอย่างและนำส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผลการวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน สามารถเห็นแกรนูลได้อย่างชัดเจนภายในเซลล์ *Bacillus* sp. MSC-5 ซึ่งมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น โดยในแต่ละเซลล์ประกอบด้วยแกรนูลประมาณ 4-7 แกรนูลต่อเซลล์ โดยแกรนูลที่พบมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 200-500 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4.29



รูปที่ 4.29 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของ *Bacillus* sp. MSC-5 จากภาพจะเห็นเซลล์มีลักษณะกลม (สี่เทาเข้ม) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-6 ไมโครเมตร และแกรนูลซึ่งอยู่ภายในเซลล์ มีลักษณะกลม และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 200-500 นาโนเมตร (สีขาว) ดังลูกศรชี้

4.8 การทดสอบสมบัติทางกายภาพ และเชิงกลของ PHAs

4.8.1 สกัดแยกพอลิเมอร์ตามวิธีของ Doi และคณะ (1995)

ในการพัฒนาพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์นั้น จำเป็นต้องศึกษาสมบัติต่างๆ ของพอลิเมอร์ เช่น สมบัติทางเคมี โครงสร้าง สมบัติทางกายภาพ และสมบัติเชิงกลของพอลิเมอร์เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ไปใช้ให้ตรงกับวัตถุประสงค์ หรือเพื่อทราบสมบัติเบื้องต้นของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้และนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาพอลิเมอร์ให้มีสมบัติที่ดีขึ้นกว่าเดิม เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มากพอสำหรับสกัด PHAs เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงกล การทดลองนี้จึงเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. MSC-5 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพใบจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 8 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 ในถังหมัก EYELA รุ่น EPC-1000 ขนาด 5 ลิตร โดยภาวะที่ใช้ในการผลิต คือ อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาทีควบคุมให้ความเป็นกรด เบส เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

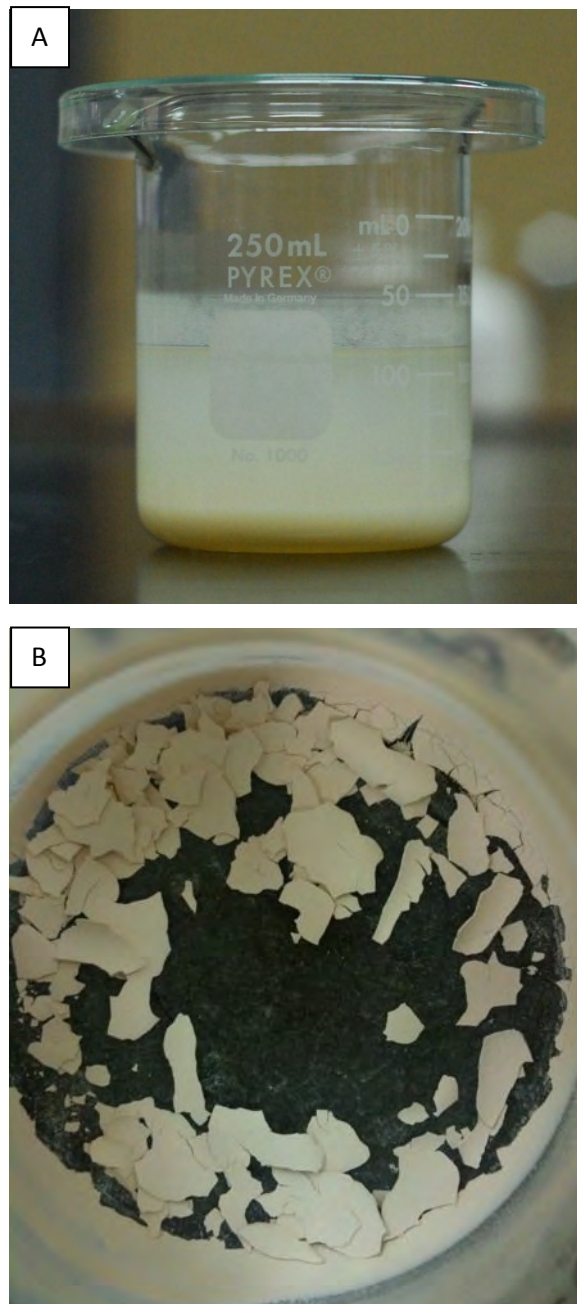
สุชาติา จันทร์ประทีป (2539) รายงานว่าการใช้คลอโรฟอร์มในการสกัด PHAs จากเซลล์จุลินทรีย์เป็นวิธีการสกัดวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการสกัดที่ดี ไม่ทำลายโครงสร้างของพอลิเมอร์เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดโดยใช้สารละลายไซเดียมไฮโปคลอไรด์ และมีขั้นตอนในการสกัดไม่ยุ่งยาก ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำการสกัดพอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มร้อน โดยนำเซลล์ *Bacillus* sp. MSC-5 ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลจากการปรับสภาพใบจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บรรจุลงในกระดาษกรอง Whatman หมายเลข 2 แล้วเย็บปิดให้สนิททุกด้าน นำไปสกัดพอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พอลิเมอร์จะละลายในคลอโรฟอร์มเมื่อระเหยคลอโรฟอร์มจะได้พอลิเมอร์ดังแสดงในรูปที่ 4.30



รูปที่ 4.30 พอลิเมอร์ที่สกัดได้จากเซลล์ของ *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโอมัสจรีเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.8.2 การเตรียมแผ่นฟิล์มสำหรับทดสอบสมบัติทางกายภาพ และสมบัติเชิงกลตามวิธีของ Yoshie และคณะ (1995)

เนื่องจากพอลิเมอร์ที่ได้จากจมีสิ่งปนเปื้อน เช่น สีที่มาจากองค์ประกอบของอาหารปะปนอยู่ พอลิเมอร์ที่ได้จากข้อ 4.8.1 จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนในเฮกเซนปริมาตร 4 เท่า ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตะกอนพอลิเมอร์ที่ได้มาละลายซ้ำในคลอโรฟอร์มแล้วทำการตกตะกอนด้วยเฮกเซนซ้ำ 2-3 ครั้ง จนได้พอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นผงสีขาว ดังรูปที่ 4.31 จากนั้นละลายตะกอนพอลิเมอร์ที่ได้ด้วยคลอโรฟอร์มร้อน 80 องศาเซลเซียส เมื่อพอลิเมอร์ละลายเป็นเนื้อเดียวกันเทลงในพิมพ์ขนาดที่ต้องการ และระเหยคลอโรฟอร์มในตู้ดูดไอระเหยที่อุณหภูมิห้อง เมื่อคลอโรฟอร์มระเหยหมดจะได้แผ่นฟิล์ม PHAs ที่ต้องการ (รูปที่ 4.32) และนำแผ่นฟิล์ม PHAs ที่ได้ดังรูปที่ 4.33 ไปศึกษาลักษณะสมบัติทางกายภาพ เคมี และเชิงกลในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.31 การทำบริสุทธิ์โดยนำพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. MSC-5 มาตกตะกอนในเฮกเซน ภาพ (A) คือตะกอนพอลิเมอร์ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนในเฮกเซน (B) คือตะกอนพอลิเมอร์ที่ได้หลังจากระเหยเฮกเซนจนแห้ง



รูปที่ 4.32 ลักษณะของแผ่นฟิล์ม PHB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. MSC-5 หลังผ่านขั้นตอนการทำ
บริสุทธิ์แล้ว



รูปที่ 4.33 ลักษณะของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ PHB ที่ขึ้นรูปในแม่พิมพ์ขนาด กว้างxยาว เท่ากับ
5x10 เซนติเมตร

4.8.3 วิเคราะห์สมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มโดยเตรียมตัวอย่างตามวิธีมาตรฐาน ASTM D882-91 (Annual Book of ASTM Standard, V08.01) และ Chanprateep และ Kulpreecha (2006)

การพิจารณาเลือกวัสดุเพื่อนำมาใช้ในงานในลักษณะต่างๆ จำเป็นจะต้องทราบถึงสมบัติของวัสดุ เพื่อให้ได้วัสดุที่เหมาะสมกับสภาพงานนั้นๆ หนึ่งในสมบัติของวัสดุที่จะต้องพิจารณา คือ สมบัติเชิงกล (Mechanical Properties) ซึ่งเป็นสมบัติที่เกี่ยวกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของวัสดุเมื่อมีแรงจากภายนอกมากระทำต่อวัสดุ สมบัติเชิงกล ได้แก่ ความแข็งแรง (Strength), ความแข็ง (Hardness), ความสามารถในการยืดตัว (Elongation), ความยืดหยุ่น (Elasticity) และความเหนียว (Ductility) ความแกร่ง (Toughness) เป็นต้น ในงานวิศวกรรมสมบัติเชิงกลมีความสำคัญมากที่สุด เพราะเมื่อเราจะเลือกใช้วัสดุใดๆ ก็ตาม สมบัติเชิงกลของวัสดุนั้นคือสิ่งแรกที่จะนำมาพิจารณาเป็นสำคัญ

การทดสอบสมบัติเชิงกลของ PHB ที่ผลิตจากงานวิจัยนี้ เมื่อนำไปเตรียมเป็นแผ่นฟิล์ม พอลิเมอร์และทดสอบสมบัติเชิงกลด้วยเครื่อง Instron universal testing machine รุ่น Instron:4206 ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.9.5 (ASTM D882-91) เป็นการศึกษาพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงของพอลิเมอร์เมื่อใส่ความเค้น (stress) แล้วดึงให้พอลิเมอร์ยืดยาว (elongate) จนถึงจุดที่พอลิเมอร์ขาด โดยผลที่ได้จากการทดสอบได้แก่ ความเหนียว (Toughness, MPa) ระยะยืดของแผ่นฟิล์มเมื่อถูกดึงจนขาดซึ่งคำนวณในรูปเปอร์เซ็นต์ของระยะที่ยืดออกเทียบกับระยะเดิม (% Elongation at break) ค่าการต้านแรงดึงสูงสุดก่อนแผ่นฟิล์มขาด (Stress at max load หรือ Tensile strength, MPa) และค่าแรงต่อพื้นที่หน้าตัดของแผ่นฟิล์ม (Young's Modulus, MPa) ซึ่งเป็นดัชนีที่ใช้บ่งบอกถึงความต้านทานการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแผ่นฟิล์ม ผลการทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 4.12 พบว่าแผ่นฟิล์ม PHB ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. MSC-5 มีความเหนียว เท่ากับ 0.70 MPa สามารถถูกยืดได้ยาวกว่าระยะเดิมน้อยละ 2.9 ของความยาวเริ่มต้น ค่าการต้านแรงดึงสูงสุดก่อนขาด เท่ากับ 8 MPa และค่า Young's Modulus เท่ากับ 682 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ PHB จาก Sigma พบว่า PHB ที่ผลิตได้นี้มีค่า Young's Modulus ต่ำกว่า ส่งผลให้ความแข็งแรงและความเปราะลดลง จึงมีระยะยืดเพิ่มขึ้น แต่มีค่าการต้านแรงดึงสูงสุดก่อนขาดสูงกว่า

เมื่อเปรียบเทียบกับ PHB ที่ผลิตโดย *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 (Chanprateep และคณะ, 2010) พบว่ามีค่าการต้านแรงดึงสูงสุดก่อนแผ่นฟิล์มขาด และระยะยืดของแผ่นฟิล์มเมื่อถูกดึงจนขาดสูงกว่า แต่มีความเหนียว และค่าแรงต่อพื้นที่หน้าตัดของแผ่นฟิล์มต่ำกว่า และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับพลาสติกจากปิโตรเลียมพบว่ามีค่า Young's Modulus ของ PHB ที่ได้มีค่าสูงกว่าพลาสติกชนิด PS และ PVC โดยมีค่าความเหนียว ค่าการต้านแรงดึงสูงสุดก่อนขาด และระยะการยืดยาวใกล้เคียงกับ PS ซึ่งเป็นตัวแทนของพลาสติกชนิดที่มีความแข็งและเปราะ เมื่อเปรียบเทียบกับ PLA พบว่า PHB ที่ได้จากงานวิจัยนี้มีค่าการต้านแรงดึงสูงสุดก่อนแผ่นฟิล์มขาด ระยะยืดของแผ่นฟิล์มเมื่อถูกดึงจนขาด และค่าแรงต่อพื้นที่หน้าตัดของแผ่นฟิล์มต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม PLA (Ecopia) รายงานโดย Gross และ Kalra (2002) มีระยะยืดของแผ่นฟิล์มเมื่อถูกดึงจนขาดใกล้เคียงกับ PHB ที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้ ผลการทดสอบที่น่าจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่มีประโยชน์ในการศึกษาพอลิเมอร์ที่ได้จาก *Bacillus* sp. MSC-5 เพื่อให้สามารถปรับปรุงสมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพให้มีสมบัติที่ดีพอในการนำไปใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีตามวัตถุประสงค์ แต่เป็นการยากที่จะทำให้พอลิเมอร์ชีวภาพมีสมบัติทุกประการดีเทียบเท่าพลาสติกจากปิโตรเคมี เพราะพลาสติกจากปิโตรเคมีนั้นสังเคราะห์โดยปฏิกิริยาเคมีและสารเติมแต่ง รวมถึงการควบคุมปฏิกิริยาระหว่างกระบวนการผลิตเพื่อให้พลาสติกที่ได้มีสมบัติตรงตามความต้องการ ต่างจากพอลิเมอร์ชีวภาพซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากจุลินทรีย์ ซึ่งในกระบวนการชีวสังเคราะห์ภายในเซลล์ จุลินทรีย์นั้นไม่สามารถควบคุมให้จุลินทรีย์ผลิตพอลิเมอร์ให้มีสมบัติตามที่กำหนดได้ ดังนั้นจึงต้องนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ไปใช้เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาพอลิเมอร์ชีวภาพไปใช้ประโยชน์ได้จริง

ตารางที่ 4.12 สมบัติเชิงกลของ PHB ผลิตโดย *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโอมัสจุลินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับ PHB และพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิดอื่น

ชนิดของพอลิเมอร์	Toughness (MPa)	% Elongation at Break	Stress at Max.Load (MPa)	Young's Modulus (MPa)	อ้างอิง
PHB	0.70	2.9	8	682	การทดลองนี้
PHB (Sigma)	1.222	1.99	1.827	1068	Chanpreteep และคณะ, 2010
PHB (Biopol)	-	6	40	4000	Gross และ Kalra, 2002
PHB	1.544	1.93	1.926	1497	Chanpreteep และคณะ, 2010
PLA	-	8.91	65.78	1680	Yang และคณะ, 2008
PLA (Ecopia)	-	3	45	2800	Gross และ Kalra, 2002
HDPE	62	576	19	640	Chanpreteep และ Kulpreecha, 2006
PP	64	435	27	590	Chanpreteep และ Kulpreecha, 2006
LDPE	15	126	13	156	Chanpreteep และ Kulpreecha, 2006
PS	0.565	0.36	0.99	76.76	Chanpreteep และคณะ, 2010
PVC	2.59	1.59	12.05	388.14	Chanpreteep และคณะ, 2010
UV degradable	60	384	24	674	Chanpreteep และ Kulpreecha, 2006
Ecoflex	-	820	36	80	Gross และ Kalra, 2002

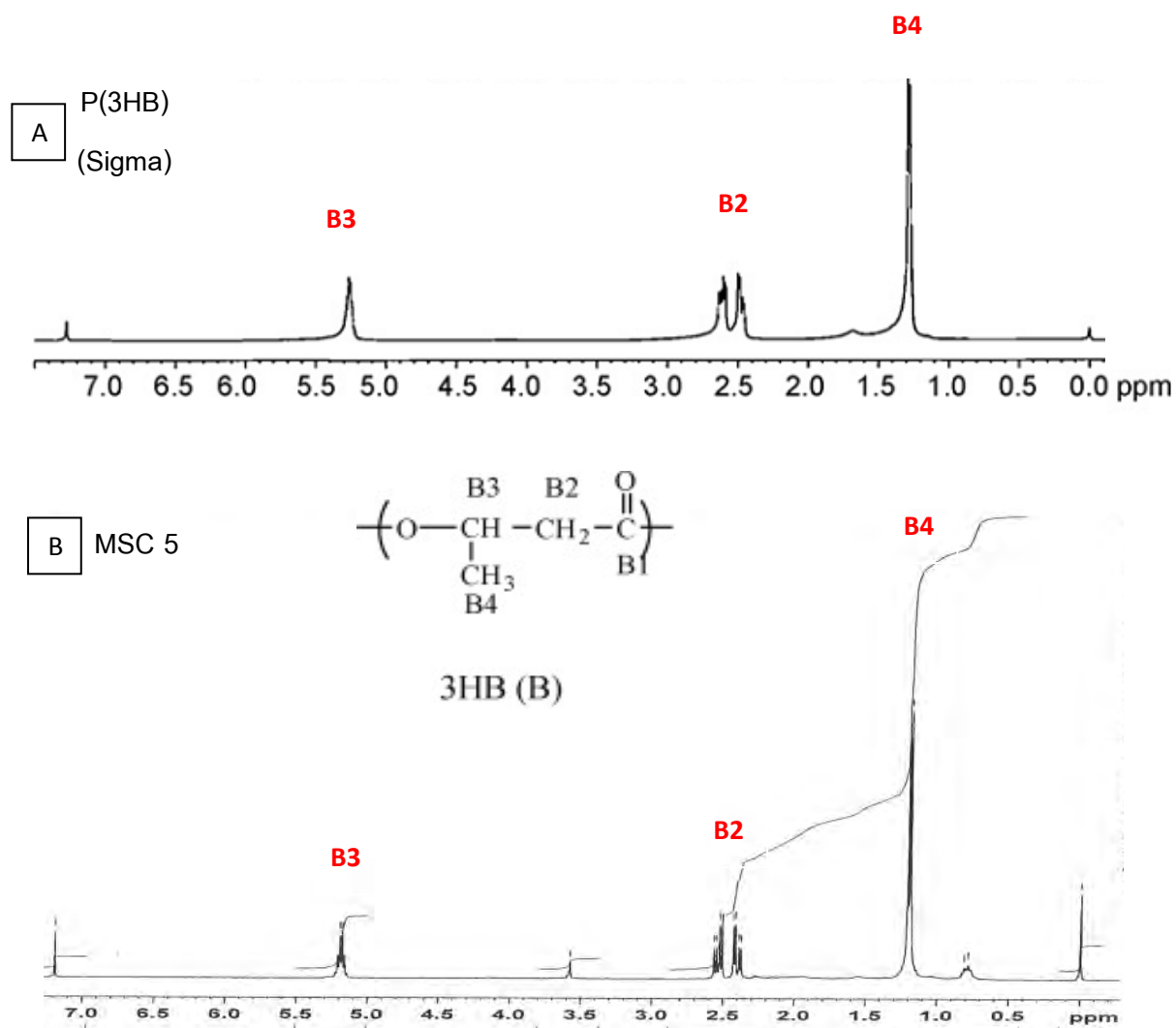
4.8.4 การศึกษาโครงสร้าง PHAs โดย $^1\text{H-NMR}$ และ $2\text{D-}^1\text{H-COSY}$ สเปกโทรสโกปี

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีและองค์ประกอบโมโนเมอร์ของ PHAs ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพใบจามจุรี เป็นแหล่งคาร์บอนไป โดยนำ PHAs ที่ทำบริสุทธิ์แล้วไปส่งวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ spectra ด้วยฟูเรียร์ ทรานส์ฟอร์มมิกเวฟแอมเพดิกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามวิธีในข้อ 3.3.10.3 ได้ผลการทดลอง $^1\text{H-NMR}$ ดังแสดงในรูปที่ 4.34 และ $2\text{D-}^1\text{H-COSY}$ ดังแสดงในรูปที่ 4.35

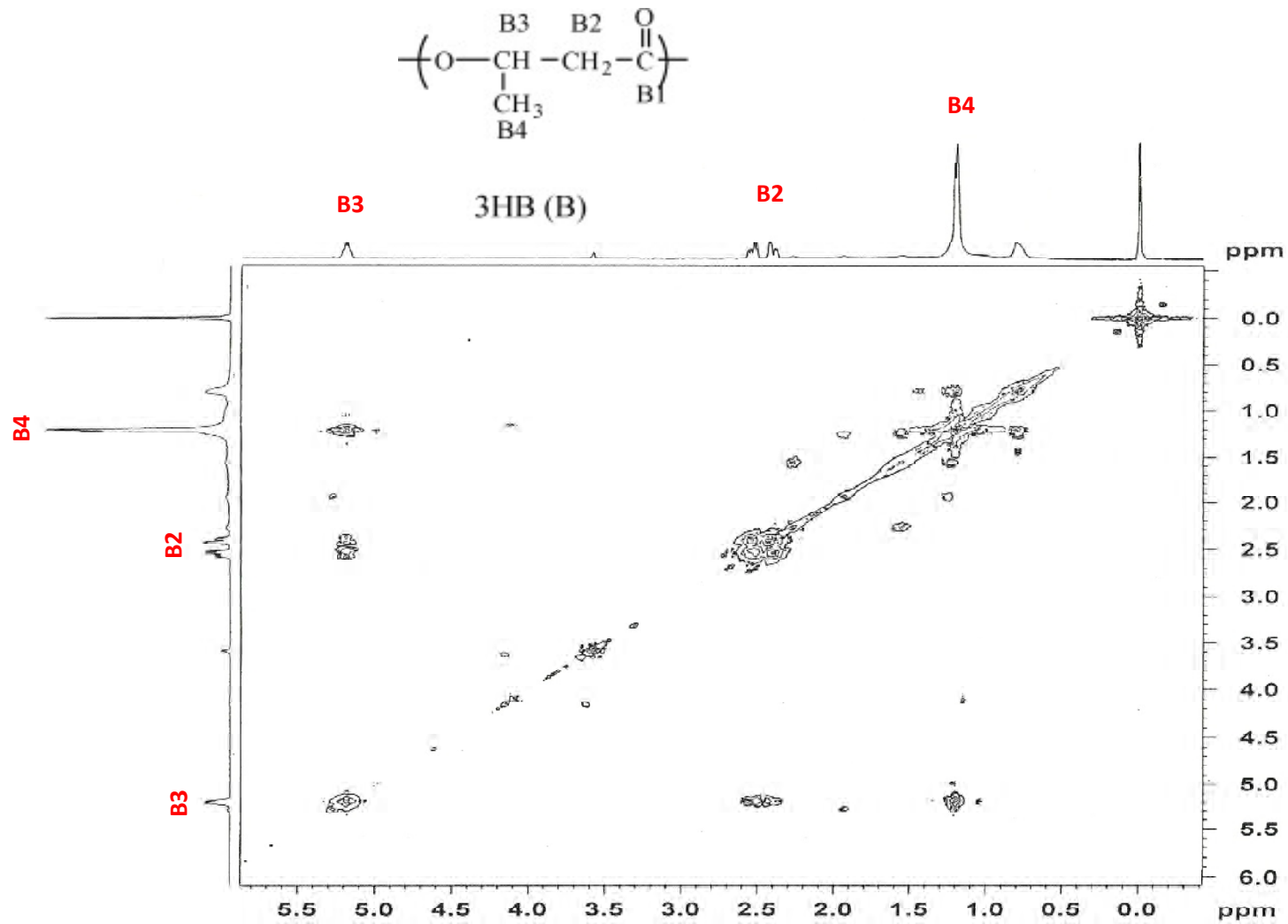
จากผลการวิเคราะห์พบว่าโครมาโทแกรมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. MSC-5 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมสารมาตรฐาน PHB (Sigma) ในการทดลองของ Shrivastav และคณะ (2010) พบว่าพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. MSC-5 เป็นฮอโมพอลิเมอร์ชนิด PHB โดยพบ 3 สัญญาณที่ชัดเจนในโครมาโทแกรมในช่วง $\delta = 1.0 - 5.3$ ซึ่งเป็นสัญญาณของ anomeric proton โดยให้ชื่อตำแหน่งเป็น B2 B3 และ B4 ที่บ่งชี้ว่าเป็น PHB โดยที่ตำแหน่ง $\delta = 5.30$ ppm เป็นสัญญาณของโปรตอนจากหมู่ asymmetric carbon (-HC=CH-) ในตำแหน่ง B3 สัญญาณที่ตำแหน่ง $\delta = 2.50$ ppm เป็นสัญญาณของโปรตอนจากหมู่เอทิล (-CH₂-) ในตำแหน่ง B2 และสัญญาณที่ตำแหน่ง $\delta = 1.20$ ppm เป็นสัญญาณที่หนาแน่นของโปรตอนจากหมู่เมทิล (-CH₃) ในตำแหน่ง B4 และที่ตำแหน่ง $\delta = 7.235$ ppm แสดงสัญญาณที่หนาแน่นของโปรตรอนจาก CDCl₃ ซึ่งเป็นตัวทำละลาย PHAs ที่ใช้ในการวิเคราะห์ นอกจากสัญญาณที่กล่าวมายังพบสัญญาณที่ตำแหน่งอื่นๆ ได้แก่ ที่ตำแหน่ง $\delta = 0.00$ 0.80 และ 3.60 ppm ซึ่งไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสัญญาณที่เกิดจากโปรตอนที่เป็นโมโนเมอร์ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานก่อนหน้านี้ ในโครงสร้างของ PHAs หรือเป็นโปรตอนของสารปนเปื้อนอื่นๆ ที่ปนอยู่กับ PHAs ที่ผลิตได้ ดังนั้นจึงต้องนำพอลิเมอร์ไปทดสอบ $2\text{D-}^1\text{H-NMR}$ เพื่อเป็นการยืนยันโครงสร้างของพอลิเมอร์ และสัญญาณโปรตอนดังกล่าว โดยผลการทดสอบ $2\text{D-}^1\text{H-NMR}$ ของพอลิเมอร์ที่ได้จาก *Bacillus* sp. MSC-5 แสดงไว้ในรูปที่ 4.35

จากผลการวิเคราะห์ $2\text{D-}^1\text{H-NMR}$ ของพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. MSC-5 พบว่าสัญญาณที่ตำแหน่ง B3 มีการเชื่อมต่อกับตำแหน่ง B2 และ B4 โดยทั้งหมดนี้เป็นการยืนยันว่า

ตำแหน่ง B3 หรือหมู่ asymmetric carbon (=CH-) มีการเชื่อมต่อกับหมู่เอทิล (-CH₂) ในตำแหน่ง B4 ดังรูปที่ 4.34 จากการวิเคราะห์ด้วย 2D-¹H-COSY สามารถสรุปได้ว่าสัญญาณโปรตรอนในช่วง $\delta = 0.8$ และ 3.7 ในรูปที่ 4.35 (A) เป็นสัญญาณโปรตรอนของสารปนเปื้อนที่ปะปนมากับพอลิเมอร์ของ PHB โดยทราบได้จาก 2D-¹H-COSY (รูปที่ 4.28) เพราะตำแหน่งในช่วงนี้ไม่ได้สัมพันธ์กับตำแหน่งโปรตรอนใดๆ ของ PHB ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า *Bacillus* sp. MSC-5 ผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต ชนิดฮอมอพอลิเมอร์ PHB เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพใบจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.34 โครมาโทแกรมของ PHAs ที่ได้จาก *Bacillus* sp. MSC-5 (B) และสารมาตรฐาน PHB (Sigma) (A) (Shrivastav และคณะ, 2010) จากโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$) ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.35 โครมาโทแกรมของ PHAs ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. MSC-5 จาก 2D-¹H-NMR (Two dimension-¹H-correlation spectroscopy) ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

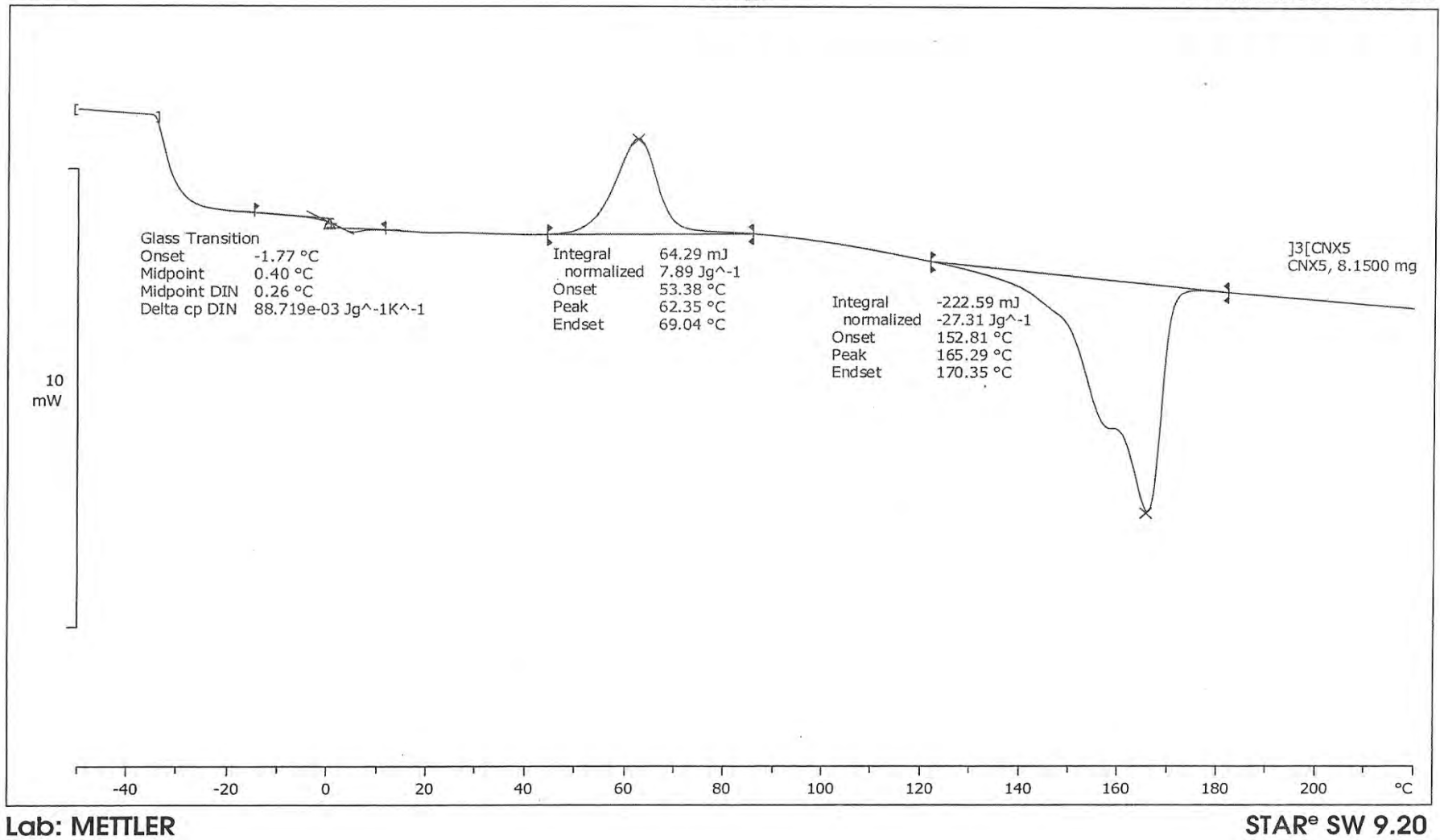
4.8.5 การวิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature, T_M) อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (Glass transition temperature, T_G) อุณหภูมิของการตกผลึก (Crystallization temperature, T_C) และความร้อนแฝงของการหลอมเหลว (Heat of fusion, ΔH_{fus}) ตามวิธีของ Chanprateep และคณะ (2003)

อุณหภูมิหลอมเหลว อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน อุณหภูมิของการตกผลึก และความร้อนแฝงของการหลอมเหลวของพอลิเมอร์เป็นข้อมูลเชิงความร้อนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการนำไปพัฒนาสมบัติและความสามารถในการขึ้นรูปรวมถึงการนำไปใช้ประโยชน์ โดยปกติเมื่อพอลิเมอร์มีอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน พอลิเมอร์จะมีลักษณะแข็งและเปราะคล้ายแก้ว เมื่อได้รับความร้อนสูงกว่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน พอลิเมอร์จะมีลักษณะยืดหยุ่นคล้ายยาง จนกระทั่งอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิหลอมเหลวจึงเปลี่ยนสถานะเป็นของเหลว

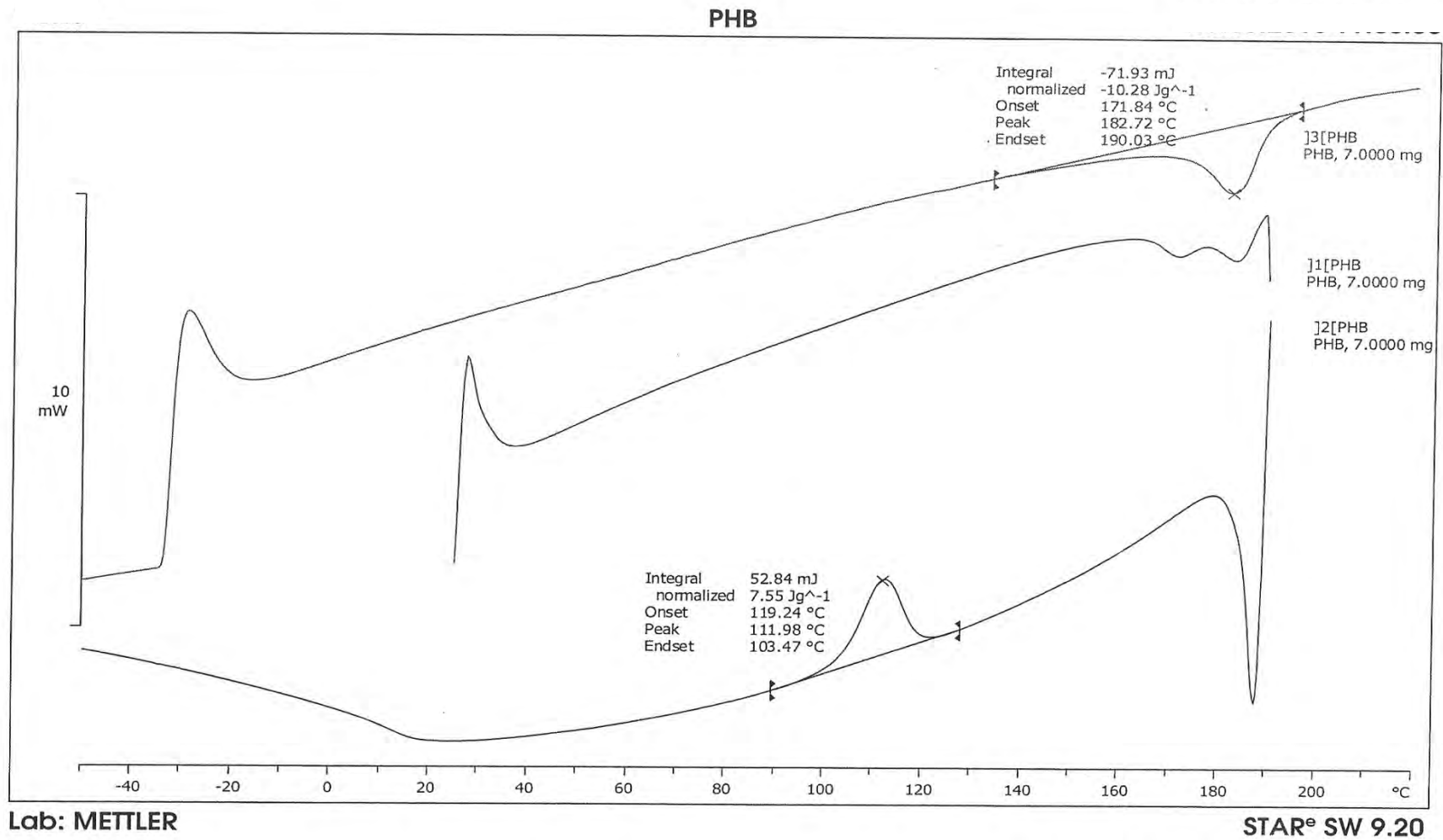
อุณหภูมิหลอมเหลว อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน อุณหภูมิของการตกผลึก และความร้อนแฝงของการหลอมเหลวของพอลิเมอร์สามารถหาได้โดยใช้เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential Scanning Calorimeter; DSC) โดยส่งทดสอบที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งใช้ PHAs ที่ทำบริสุทธิ์และ PHB (Sigma) น้ำหนัก 10 มิลลิกรัมใส่ในถ้วยอะลูมิเนียม (aluminium crucible) ปริมาตร 25 ไมโครลิตรวิเคราะห์ภายใต้ภาวะไนโตรเจน โดยวิเคราะห์หาค่า T_M และ ΔH_{fus} โดยเพิ่มอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียส ถึง 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจาก 180 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียสแล้ววิเคราะห์หาค่า T_G โดยเพิ่มอุณหภูมิจาก -80 องศาเซลเซียสถึง 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายใต้ภาวะไนโตรเจนโดยมีสารมาตรฐานเปรียบเทียบคือ Al_2O_3 ผลที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงไว้ในตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.36-4.37 จากผลการศึกษามิติทางกายภาพของพอลิเมอร์ที่ได้จาก *Bacillus* sp. MSC-5 เปรียบเทียบกับ PHB (Sigma) และ PHB จากผู้วิจัยกลุ่มอื่น พบว่า PHB ที่ผลิตได้มีค่า T_M T_G T_C ใกล้เคียงกับ PHB ที่ได้จากผู้วิจัยกลุ่มต่างๆ PHB (Sigma) รวมถึง PLA และ PP

ตารางที่ 4.13 ค่า T_M T_G T_C และ ΔH_{fus} ของพอลิเมอร์ซึ่งผลิตโดย *Bacillus* sp. MSC-5 เปรียบเทียบกับ PHB ที่รายงานก่อนหน้านี้จากคณะวิจัยต่างๆ

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	T_G (°C)	T_C (°C)	T_M (°C)	ΔH_{fus} (J/g)	อ้างอิง
Recombinant <i>E.coli</i>	หางนม	7.0	63.40	155.2	-	Koller และคณะ, 2005
	กลีเซอรอล	7.0	64.50	133.7	-	
<i>C. necator</i> A-04	ฟรักโทส	2.4	116.3	178.2	98.01	Chanpreteep และคณะ, 2010
<i>Spirulina</i> <i>subsalsa</i>	CO ₂	4.5	-	-	-	Shrivastav และคณะ, 2010
<i>Pseudomonas</i> <i>hydrogenovora</i>	หางนม	5.5	-	169.3	-	Koller และคณะ, 2008
<i>B. cereus</i>	กลูโคส	-1.45 - 2.72	54.10	160 - 170	-	Valappil และคณะ, 2010
<i>Bacillus</i> sp. MSC-5	ไบจามจุรี	0.26	62.35	165.29	27.31	ในการทดลองนี้
PHB (Sigma)		8	112	182	10.28	ในการทดลองนี้
PHB		5 - 10	-	171 - 182	-	Doi, 1990
PHB		1	-	180	-	Martin และ Williams, 2003
PLA		65	-	175	-	Martin และ Williams, 2003
PP		-10	-	176		Akaraonye และ คณะ, 2010



รูปที่ 4.36 โคโรมาโทแกรมของพอลิเมอร์ PHB จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ MSC-5 ซึ่งทำการวิเคราะห์หาอุณหภูมิหลอมเหลว อุณหภูมิกลาสทรานซัน อุณหภูมิของการตกผลึก และความร้อนแฝงของการหลอมเหลว ด้วยเครื่อง DSC ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.37 โคโรมาโทแกรมของพอลิเมอร์ PHB (Sigma) ซึ่งทำการวิเคราะห์หาอุณหภูมิหลอมเหลว อุณหภูมิกลาสทรานซิชันอุณหภูมิของการตกผลึก และความร้อนแฝงของการหลอมเหลว ด้วยเครื่อง DSC ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8.6 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วยวิธีของ Abate และคณะ (1995)

ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (Number average molecular weight ; M_n) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (Weight average molecular weight ; M_w) และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (Polydispersity index; PDI) ด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC) โดยใช้คอลัมน์ Water styragel HT 6E และมีคลอโรฟอร์มเป็นตัวพาที่อัตราการชะ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานพอลิสไตรีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 456 ถึง 190,000 Da ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.14

จากผลการวิเคราะห์พบว่า PHB ที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้มี $M_w = 9.9 \times 10^4$ Da $M_n = 3.7 \times 10^4$ Da และมีค่า PDI = 2.62 ซึ่งพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลที่ค่อนข้างต่ำและขนาดโมเลกุลของสายพอลิเมอร์มีขนาดต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอาจมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดจากการปรับสภาพและย่อยลิกโนเซลลูโลสซึ่งอาจเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อยู่ด้วยจึงทำให้ *Bacillus* sp. MSC-5 สร้างและสะสมพอลิเมอร์สายสั้นๆ และได้พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำ

ตารางที่ 4.14 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (M_w) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (M_n) และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (PDI) ของพอลิเมอร์ PHB จาก *Bacillus* sp. MSC-5

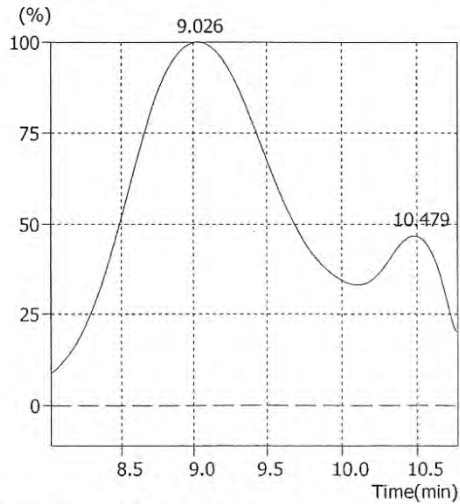
M_w (Da)	M_n (Da)	PDI
9.9×10^4	3.7×10^4	2.62

 GPC Report Version 1.02

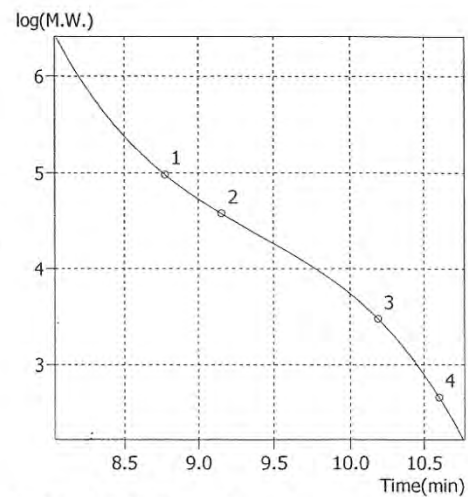
*** Title ***

Date/Time : 10/07/15 18:18:17
 Method File : MOB_THF.GMT
 Data File : CNX5.D01

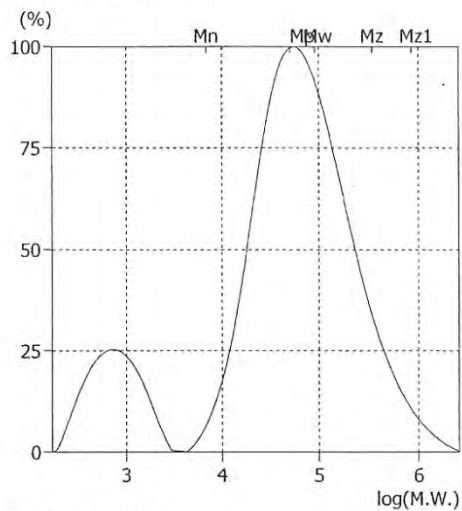
** Chromatogram **



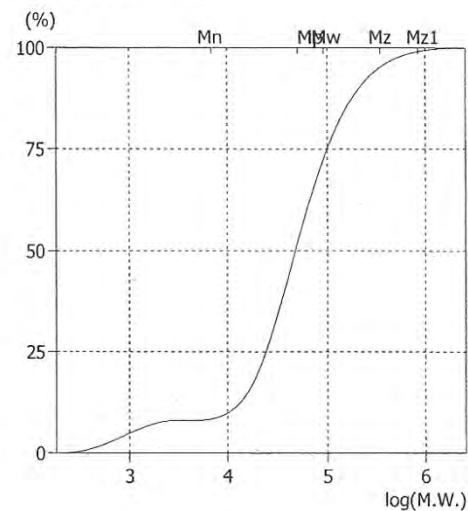
** Calibration Curve **



** Differential M.W. Curve **



** Integral M.W. Curve **



รูปที่ 4.38 โครมาโทแกรมของพอลิเมอร์ PHB จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ MSC-5 ซึ่งทำการวิเคราะห์หาโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (M_w) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (M_n) และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (PDI) ของพอลิเมอร์ ด้วยเครื่อง GPC ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

PHAs เป็นพอลิเอสเทอร์ที่สร้างและสะสมในรูปของแกรนูลภายในเซลล์จุลินทรีย์บางชนิด ซึ่งมีสมบัติเฉพาะตัวคือมีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติกสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติสามารถนำมาใช้ทดแทนพลาสติกจากแหล่งปิโตรเลียมที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน แต่ปัญหาสำคัญในการผลิต PHAs คือ ต้นทุนการผลิตจากแหล่งคาร์บอนที่สูงถึงกว่าร้อยละ 50 ของราคาต้นทุนรวมทำให้ PHAs ยังไม่เป็นที่นิยมมากนักเมื่อเทียบกับพลาสติกจากแหล่งฟอสซิล (Ataei และคณะ, 2008) เพื่อแก้ไขปัญหาด้านต้นทุนการผลิต PHAs ที่มีราคาสูง งานวิจัยนี้จึงมุ่งหาแหล่งคาร์บอนอื่นที่มีราคาถูกหาง่ายและไม่ใช้แหล่งอาหารของมนุษย์เช่น วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสโดยศึกษาศักยภาพในการนำไปจากจรี (*Samanea saman* Jacq. Merr.) มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHAs เพื่อเป็นการทดลองต้นแบบในการนำแหล่งลิกโนเซลลูโลสมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยทำการเก็บใบจากจรีภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยตั้งแต่เดือนตุลาคม ปีพ.ศ. 2552 ถึงเดือนมกราคม ปีพ.ศ. 2553 สำหรับใช้ในการทดลอง

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของใบจากจรีแห่งพบว่าใบจากจรีมีเซลลูโลสปริมาณสูง (40.3%) และมีลิกนินในปริมาณสูงด้วยเช่นกัน (25.8%) โดยลิกนินซึ่งมีหน้าที่ช่วยให้โครงสร้างของพืชมีความแข็งแรงจะขัดขวางกระบวนการปรับสภาพด้วยกรดทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลลดลง อีกทั้งลิกนินยังเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (van Wyk, 2001) ดังนั้นจึงต้องกำจัดลิกนินออกก่อนนำไปปรับสภาพด้วยกรด ในงานวิจัยนี้เลือกใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในการกำจัดลิกนิน เนื่องจากแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์สามารถสกัด ลิกนินออกจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้ (Laopaiboon และคณะ, 2010) และใช้กรดฟอสฟอริกในการย่อยใบจากจรี เนื่องจากกรดฟอสฟอริกมีข้อดี เช่น เป็นกรดที่ทำปฏิกิริยาไม่รุนแรงผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้น

ระหว่างการปรับสภาพต่ำและตะกอนเกลือที่ได้หลังการปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถใช้เป็นแหล่งของโซเดียมและฟอสเฟตให้แก่จุลินทรีย์ได้ โดยไม่ต้องกำจัดออกเหมือนเกลือของกรดซัลฟูริก และไฮโดรคลอริก (Lenihan และคณะ, 2010)

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพไบโจามจุรีโดยการแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการปรับสภาพไบโจามจุรีก่อนนำไปย่อยด้วยกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร พบว่าแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์มีผลในการกำจัดลิกนินที่มีอยู่ในไบโจามจุรี กล่าวคือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะเพิ่มขึ้นและแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตรมีความเหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพไบโจามจุรีโดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 2.33 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 1.86 เท่าของชุดควบคุม (ไม่มีแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์มากกว่าร้อยละ 8 โดยปริมาตรปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้กลับลดลงเช่นเดียวกับรายงานของ Laopaiboon และคณะ (2010) ที่ใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในการกำจัดลิกนินออกจากขาน้อยพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ลิกนินจะถูกกำจัดออกมากขึ้น โดยที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรมีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพมากกว่าชุดควบคุมถึง 8.5 เท่าแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 10 โดยปริมาตรประสิทธิภาพจะลดลงด้วยเช่นกัน

การแปรผันความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกที่ใช้โดยเมื่อใช้กรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตรได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 2.41 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็น 8.31 เท่าของชุดควบคุม (ไม่มีกรดฟอสฟอริก) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกมากกว่าร้อยละ 2.5 โดยปริมาตรปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้กลับลดลง เช่นเดียวกับรายงานของ Lenihan และคณะ (2010) ที่ใช้กรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 2.5 - 10 ในการปรับสภาพขาน้อยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกปริมาณน้ำตาลที่ได้จะเพิ่มขึ้นและได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดที่ความเข้มข้นของกรดร้อยละ 7.5 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกมากกว่าร้อยละ 7.5

น้ำตาลที่ได้มีปริมาณลดลงทั้งนี้เนื่องจากปริมาณกรดที่มากเกินไปจะไปทำปฏิกิริยากับน้ำตาลที่ถูกย่อยออกมากลายเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง ทำให้ปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ลดลง

จากการศึกษาผลของขนาดอนุภาคและปริมาณไบจามจุรีพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณไบจามจุรี ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะเพิ่มขึ้น โดยเมื่อใช้ไบจามจุรีที่มีขนาดอนุภาคขนาด <20 เมช จะได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 3.95 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ไบจามจุรีขนาดอนุภาค <20 เมช ปริมาณ 10 กรัม หรือคิดเป็น 1.22 เท่าของชุดควบคุม (ไบจามจุรีขนาดอนุภาค <20 เมช ปริมาณ 3 กรัม) และเมื่อใช้ไบจามจุรีที่มีขนาดอนุภาคขนาด 20-40 เมช จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 8.85 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ไบจามจุรีขนาดอนุภาค 20-40 เมช ปริมาณ 10 กรัม หรือคิดเป็น 3.82 เท่าของ ชุดควบคุม (ไบจามจุรีขนาดอนุภาค 20-40 เมช ปริมาณ 3 กรัม) แต่ทั้งนี้หากเพิ่มปริมาณมากกว่า ร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณน้ำตาลที่ได้จะเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณสารละลายน้ำตาลที่ได้จะ ลดลงเนื่องจากกากไบจามจุรีที่เหลืออยู่จะดูดซับสารละลายน้ำตาลเอาไว้ เมื่อกรองด้วยกระดาษ กรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วจะได้สารละลายน้ำตาลไม่มาก ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ปริมาณของไบ จามจุรี 10 กรัมและผลของขนาดไบจามจุรีมีผลต่อน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้สูงสุด โดยใช้ไบจามจุรีขนาด 20-40 เมชให้น้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าไบจามจุรีขนาดเล็กกว่า 20 เมช 2.24 เท่าเมื่อปรับสภาพที่ ภาวะเดียวกันจากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพไบจามจุรีด้วยแอมโมเนียไฮดรอกไซด์และกรดฟอสฟอริกพบว่าภาวะที่เหมาะสมคือแอมโมเนียไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตรกรดฟอสฟอริกร้อยละ 2.5 โดยปริมาตรใช้ไบจามจุรีที่มีขนาดอนุภาค 20-40 เมช และ ปริมาณไบจามจุรี 10 กรัม ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 8.85 กรัมต่อลิตร จึงเลือกภาวะนี้ในการปรับสภาพไบ จามจุรีเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

เมื่อนำสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบจามจุรีจากภาวะที่ เหมาะสมมาวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการปรับสภาพ ได้แก่ เฟอรัฟิวรัล (Furfural) 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัฟิวรัล (5-Hydroxymethylfurfural) วานิลลิน (Vanillin) และ กรดอะซิติก (Acetic acid) โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง(High Performance Liquid Chromatography; HPLC) พบว่าในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับ

สภาพไบโจามจุรีมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเกิดขึ้น โดยพบ เพอร์ฟิวรอล 0.0037 กรัมต่อลิตร 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรอล 0.0029 กรัมต่อลิตร และกรดอะซิติก 0.023 กรัมต่อลิตร แต่ไม่พบวานิลินในสารละลายน้ำตาล สารยับยั้งเหล่านี้มักพบเมื่อทำการย่อยลิกโนเซลลูโลสด้วยกรด โดยปริมาณที่พบขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณกรดที่ใช้ เช่น Yu และ Stalh (2008) ได้ใช้กรดซัลฟูริกในการปรับสภาพและย่อยชานอ้อย ที่อุณหภูมิ 100 - 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 - 300 นาที ซึ่งในสารละลายน้ำตาลที่ได้พบเพอร์ฟิวรอล 0.11 - 1.0 กรัมต่อลิตร 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรอล 0.054 - 0.19 กรัมต่อลิตร และกรดอะซิติก 2.35 - 2.80 กรัมต่อลิตร แต่ไม่พบวานิลินเช่นกัน และในการทดลองของ Silva และคณะ (2004) ได้ใช้แคลเซียมออกไซด์ร่วมกับกรดฟอสฟอริกในการปรับสภาพและย่อยชานอ้อย และเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเช่นกัน โดยพบเพอร์ฟิวรอล 0.245 กรัมต่อลิตร 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรอล 0.103 กรัมต่อลิตร และกรดอะซิติก 0.145 กรัมต่อลิตร แต่ไม่พบวานิลินเช่นกัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นหลังการปรับสภาพและการย่อยไบโจามจุรีในการทดลองนี้มีปริมาณน้อยกว่าการทดลองข้างต้นที่กล่าวมาอยู่ค่อนข้างมาก จึงไม่จำเป็นที่จะต้องเพิ่มขึ้นขั้นตอนการกำจัดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงดังกล่าว เพื่อลดกระบวนการที่เกี่ยวข้องและลดต้นทุนที่ใช้ตั้งวัตถุดิบประสงค์ที่ตั้งไว้

จากการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสะสม PHAs โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนจากดินแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ MSC-5 ที่มีความสามารถในการผลิต PHAs โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทราบจากการนำเซลล์ไปย้อมแกรนูลดด้วยสีย้อม Sudan Black B ซึ่งพบแกรนูลภายในเซลล์ โดยแกรนูลจะติดสีดำของ Sudan Black B เนื่องจากบริเวณผิวของแกรนูลมีไขมันเป็นองค์ประกอบจึงติดสีย้อมของ Sudan Black B และเซลล์แบคทีเรียจะติดสีแดงของ Safranin O อีกทั้งเมื่อพิจารณาปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีการผลิต PHAs และแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-5 มีการผลิต PHAs ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 และ *Cupriavidus necator* A-04 เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและการย่อยไบโจามจุรี โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-5 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 0.74 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96

และ PHAs สูงสุด 0.035 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 และ *C. necator* A-04 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง สูงสุด 0.47 กรัมต่อลิตร และ PHAs สูงสุด 0.027 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ผู้วิจัยจึงเลือก แบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-5 มาใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-5 ทางอนุกรมวิธาน โดยศึกษาลักษณะ ทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางสรีรวิทยาหรือการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าโคโคนี้มีขนาดใหญ่ มีลักษณะกลม สีขาวครีม ขอบเรียบ และมีลักษณะด้าน และจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีลักษณะรูปร่างแท่งสั้น ติดสีแกรมบวก และสร้างสปอร์ และจากการศึกษาลักษณะของแกรนูลภายในเซลล์แบคทีเรียโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน โดยนำเซลล์ *Bacillus* sp. MSC-5 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการ ปรับสภาพใบจามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าสามารถเห็นแกรนูลได้อย่าง ชัดเจนภายในเซลล์ *Bacillus* sp. MSC-5 ซึ่งมีรูปร่างเป็นกลม โดยในแต่ละเซลล์ประกอบด้วย แกรนูลประมาณ 4-7 แกรนูลต่อเซลล์ โดยแกรนูลที่พบมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 200-500 นาโนเมตร รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-5 จัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-2 มีความคล้ายกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ LAMA 262 เท่ากับ 98.97 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียสายพันธุ์ MSC-5 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ LAMA 262 เท่ากับ 98.57 เปอร์เซ็นต์และนำลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ไปเสนอใน Genbank เพื่อให้ได้ accession numbers จึงให้ แบคทีเรียสายพันธุ์ MSC 2 และ MSC 5 ชื่อว่า *Bacillus* sp. MSC-2 (GU227612) และ *Bacillus* sp. MSC-5 (GU227615) ตามลำดับ

การศึกษากการผลิต PHAs จาก *Bacillus* sp. MSC-5 ในระดับขวดเขย่า จากขั้นตอนการ คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs โดยมีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพใบจามจุรี

เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Bacillus* sp. MSC-5 สามารถเจริญและสะสม PHAs ได้ในปริมาณน้อย โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 0.74 กรัมต่อลิตร และ PHAs ปริมาณสูงสุด 0.11 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 3 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งอาจเกิดจากผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการปรับสภาพไปยับยั้งการเจริญและการผลิต PHAs ดังนั้นในการทดลองนี้จึงหาภาวะการผลิตที่ลดผลกระทบของผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการปรับสภาพและการย่อยที่มีอยู่ในสารละลายน้ำตาลต่อการเจริญและการสร้างและสะสม PHAs ของ *Bacillus* sp. MSC-5 แบ่งออกเป็น 2 แนววิธี โดยวิธีแรกทำการเจือจางอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยอาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอัตราส่วนต่างๆ กัน จากผลการทดลองพบว่า การเจือจางสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโຈามจุรีด้วยสารละลายน้ำตาลกลูโคสในอาหารเพื่อการผลิตมีผลต่อการเจริญเติบโต และการผลิต PHAs ของ *Bacillus* sp. MSC-5 โดยเมื่อในอาหารมีสารละลายน้ำตาลจะส่งผลให้การผลิต PHAs ที่สูงที่สุดใช้เวลาเพิ่มขึ้นอีก 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับชุดควบคุมและเมื่อทำการเจือจางสารละลายน้ำตาลเพิ่มขึ้น *Bacillus* sp. MSC-5 จะมีปริมาณเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และร้อยละของ PHAs ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นโดยที่อัตราการเจือจาง 20:80 จะได้ปริมาณ PHAs ร้อยละ 29.1 ของน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าชุดควบคุม

เมื่อพิจารณาผลที่ได้ข้างต้นพบว่าในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนจะส่งผลให้การเจริญและการสะสม PHAs เกิดช้าขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมแม้จะทำการเจือจางแล้วก็ตาม ซึ่งแสดงว่าผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่มีอยู่ สารละลายน้ำตาลมีผลกระทบต่อ การเจริญและกระบวนการสะสม PHAs จากรายงานของ Yu และ Stahl (2008) ได้ทำการทดลองโดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกเพื่อผลิต PHAs จาก *Ralstonia eutropha* (ถูกจัดจำแนกใหม่เป็น *Cupriavidus necator*) จากการทดลองพบว่า *R. eutropha* มีการเจริญต่ำในอาหารที่มีสารละลายน้ำตาลโดยไม่พบการเจริญของเซลล์ ภายหลังเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและไม่มี การสะสม PHAs เกิดขึ้นซึ่งเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ PHAs ถูกยับยั้งเพื่อเป็นการสงวนพลังงาน (ATP) และการที่จุลินทรีย์เจริญในอาหารที่มีสับเสตรหลายชนิด สับเสตรบางชนิดเช่น กรดอะซิติกและฟีนอลจะไปยับยั้ง

การใช้น้ำตาลของเซลล์ทำให้ปริมาณน้ำตาลยังคงอยู่ในอาหารและไม่ถูกนำไปใช้เพื่อเป็นการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นแนวทางที่สองที่ใช้ คือ การแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ระหว่าง 0.2 - 2.0 กรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs จะเพิ่มขึ้นด้วย โดยปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 2.0 กรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 5.88 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHAs สูงสุด 0.628 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 72 ซึ่งเร็วกว่าการใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 0.2 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ถึง 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นสามารถทำให้เซลล์แบคทีเรียทนต่อความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่มีอยู่ในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยไบโຈามจุรีได้ และเมื่อทำการหาปริมาณผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เหลืออยู่ในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าเพอร์ฟิวรอล 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟิวรอล และกรดอะซิติกมีปริมาณลดลง ซึ่งอาจเกิดจาก *Bacillus* sp. MSC-5 สามารถใช้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเหล่านี้ในการเจริญได้ด้วย ทั้งนี้การแก้ปัญหาผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากกระบวนการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสนั้นสามารถทำได้โดยวิธีอื่นๆ เช่นการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทนทานหรือใช้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากกระบวนการปรับสภาพได้ (Yu และ Stahl, 2008) หรืออาจใช้วิธีการเติมสารอื่นๆ ที่ช่วยเสริมการเจริญเช่นสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เพื่อช่วยเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ (Van-Thouc และคณะ, 2008)

เมื่อวิเคราะห์การลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมด และแอมโมเนียมซัลเฟตพบว่า ในการทดลองการเลี้ยงอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยอาหารเพื่อการผลิตที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอัตราส่วนต่างๆเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลง จาก 8 กรัมต่อลิตร เหลือ 2.68 และ 2.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อมีการเพิ่มสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยไบโຈามจุรีพบว่าสารละลายน้ำตาลจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นแต่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลง ทั้งนี้เกิดจากผลิตภัณฑ์ข้างเคียงในสารละลายน้ำตาลส่งผลยับยั้งการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ (Palmqvist และ Hahn-Hägerdal,

2000) ทำให้ *Bacillus* sp. MSC-5 ต้องไปใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น เช่น โอลิโกแซคคาไรด์ โดย *Bacillus* sp. MSC-5 จะย่อยโอลิโกแซคคาไรด์เหล่านั้นได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น พบว่าทุกชุดการทดลองจะไม่พบแอมโมเนียมซัลเฟตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง และสำหรับในการทดลองการแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยไบโຈຈຸຣີเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 0.2 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลง แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร พบว่าทั้งปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลง โดยน่าจะเกิดจากปริมาณหัวเชื้อ 0.1 กรัมต่อลิตรนั้นมีปริมาณน้อย จึงไวต่อการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ข้างเคียงซึ่งยับยั้งการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ (Palmqvist และ Hahn-Hägerdal, 2000) ทำให้ *Bacillus* sp. MSC-5 ใช้โอลิโกแซคคาไรด์ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จึงเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นจนสามารถทนต่อผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่มีอยู่ในสารละลายน้ำตาลแล้ว จะพบว่า *Bacillus* sp. MSC-5 สามารถใช้ได้ทั้งน้ำตาลรีดิวซ์และคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆ สังเกตได้จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ลดลง สำหรับปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในทุกชุดการทดลองพบว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจะหมดไปตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลอง และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก ได้แก่ เฟอร์ฟิวรอล 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล และกรดอะซิติก พบว่าผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเหล่านี้มีปริมาณลดลง ซึ่งอัตราการลดลงสอดคล้องกับปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้น จึงสรุปได้ว่า *Bacillus* sp. MSC-5 สามารถใช้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเหล่านี้ได้อีกด้วยเช่นเดียวกับรายงานของ Wierckx และคณะ (2009) ที่ได้ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยฟางข้าวสาลีในการผลิต PHAs โดยใช้ *C. basilensis* HMF14 ซึ่งพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองปริมาณน้ำตาลมีค่าเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณผลิตภัณฑ์ข้างเคียง ได้แก่ เฟอร์ฟิวรอล 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟิวรอล กรดฟอมิก และกรดอะซิติกมีปริมาณลดลง

เพื่อให้ได้ปริมาณ PHAs ในปริมาณที่มากเพียงพอต่อการนำมาศึกษาสมบัติพื้นฐานของพอลิเมอร์ จึงนำภาวะที่เหมาะสม คือ เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีสารละลายน้ำตาลที่ได้จาก

การปรับสภาพไบโຈามจุรีเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 8 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 2.0 กรัมต่อลิตร มาขยายส่วนการผลิตในถังหมัก EYELA รุ่น EPC-1000 ขนาด 5 ลิตร โดยภาวะที่ใช้ในการผลิตคือ อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาทีควบคุมให้ pH เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงจากนั้นเก็บเซลล์ที่ได้ และนำมาสกัด PHAs โดยใช้คลอโรฟอร์มร่อน (สุชาติ จันทรประทีป, 2539) นำ PHAs ที่ได้จาก *Bacillus* sp. MSC-5 ไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยตกตะกอนในเฮกเซนแล้วนำมาขึ้นรูปเพื่อนำไปศึกษาสมบัติทางเคมีและทางกายภาพจากการศึกษาโครงสร้างของ PHAs ที่ได้โดยวิธี ^1H NMR เมื่อนำโครมาโทแกรมที่ได้ไปเทียบกับโครมาโทแกรมของ PHB (sigma) พบว่า PHAs จาก *Bacillus* sp. MSC-5 มีสัญญาณโปรตรอนที่ชัดเจนและตรงกับตำแหน่งโปรตรอนในโครมาโทแกรมของ PHB แต่ทั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้เนื่องจากพบสัญญาณโปรตรอนอื่นๆ ด้วย ดังนั้นเพื่อยืนยันให้แน่ชัด ผู้วิจัยจึงวิเคราะห์ PHAs จาก *Bacillus* sp. MSC-5 ด้วยวิธี 2D- ^1H -NMR (COSY) ผลที่ได้พบว่าสัญญาณโปรตรอนที่ตำแหน่งอื่นๆ ที่ต่างไปจากสัญญาณโปรตรอนของ PHB ไม่สัมพันธ์กับตำแหน่งใดๆ ของ PHAs แสดงว่าสัญญาณโปรตรอนดังกล่าวเป็นสัญญาณโปรตรอนจากสารปนเปื้อนที่ไม่ใช่องค์ประกอบของ PHAs ที่ผลิตได้ จึงสามารถสรุปได้ว่า PHAs ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. MSC-5 เป็น PHB

จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพของแผ่นฟิล์ม PHB โดยใช้เครื่องดีฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential Scanning Calorimeter; DSC) พบว่า PHB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. MSC-5 มีลักษณะอ่อนนิ่มที่อุณหภูมิห้องเนื่องจากค่า T_g ที่ต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง (0.26 องศาเซลเซียส) และเมื่อเปรียบเทียบกับ PHB ทางการค้า (Sigma-Aldrich) พบว่า PHB ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. MSC-5 มีค่า T_M T_G T_C ใกล้เคียงกับ PHB ที่ได้จากผู้วิจัยกลุ่มต่างๆ และ PHB ทางการค้า (Sigma-Aldrich) และเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกชนิดอื่นพบว่า PHB ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. MSC-5 ค่า T_M T_G T_C ใกล้เคียงกับพลาสติกชนิด PLA และ PP

ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของ PHB ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. MSC-5 มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (M_w) เท่ากับ 9.9×10^4 น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (M_n) เท่ากับ 3.7×10^4 และมีค่าการกระจายของขนาดโมเลกุลพอลิเมอร์ (PDI) เท่ากับ 2.62 ซึ่งพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลที่ค่อนข้างต่ำทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์ข้างเคียงซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และชีวสังเคราะห์ PHAs อยู่ด้วยทำให้ *Bacillus* sp. MSC-5 สร้างและสะสมพอลิเมอร์สายสั้นๆ และด้วยน้ำหนักโมเลกุลที่ค่อนข้างต่ำของ PHB ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. MSC-5 จึงส่งผลให้ T_g มีค่าลดลง

ผลการวิเคราะห์สมบัติเชิงกลของ PHB ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. MSC-5 โดยเตรียมตัวอย่างตามวิธีมาตรฐาน ASTM D882-91และนำไปทดสอบสมบัติเชิงกล ได้แก่ ความเหนียว (Toughness, MPa) ระยะเวลาของแผ่นฟิล์มเมื่อถูกดึงจนขาดซึ่งคำนวณในรูปเปอร์เซ็นต์ของระยะที่ยืดออกเทียบกับระยะเดิม (% Elongation at break) ค่าการต้านแรงดึงสูงสุดก่อนแผ่นฟิล์มขาด (Stress at max load หรือ Tensile strength, MPa) และค่าแรงต่อพื้นที่หน้าตัดของแผ่นฟิล์ม (Young's Modulus, MPa) ด้วยเครื่อง Instron testing machine ผลการทดลองที่ได้พบว่าแผ่นฟิล์ม PHB ที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. MSC-5 มีความเหนียว เท่ากับ 0.70 MPa สามารถถูกยืดได้ยาวกว่าระยะเดิมน้อยละ 2.9 ของความยาวเริ่มต้น ค่าการต้านแรงดึงสูงสุดก่อนขาด เท่ากับ 8 MPa และค่า Young's Modulus เท่ากับ 682 เมื่อเปรียบเทียบกับสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม PHB จากงานวิจัยต่างๆ พบว่ามีสมบัติเชิงกลที่คล้ายคลึงกัน แต่ PHB ที่ผลิตจากงานวิจัยนี้มีค่า Young's Modulus ต่ำกว่างานวิจัยอื่นๆ ซึ่งการที่ PHB มีค่า Young's Modulus ที่ต่ำนี้ส่งผลให้ความแข็งและความเปราะลดลง จึงทำให้มีระยะยืดเพิ่มขึ้น แต่มีค่าการต้านแรงดึงสูงสุดก่อนขาดลดลง และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับพลาสติกจากปิโตรเลียมพบว่ามีค่า Young's Modulus ของ PHB ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับพลาสติกชนิด PS โดยมีค่าความเหนียว ค่าการต้านแรงดึงสูงสุดก่อนขาด และระยะการยืดยาวมากกว่า PS ดังนั้นหากต้องการนำ PHB ที่ผลิตได้ไปใช้ทดแทนพลาสติกชนิดอื่นๆ นั้น จำเป็นต้องปรับปรุงสมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพให้มีสมบัติที่ดีพอโดยนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ไปใช้เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการนำพอลิเมอร์ชีวภาพไปใช้ประโยชน์ต่อไป

งานวิจัยนี้สามารถใช้ลิกโนเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHAs โดยใช้ไบโຈามຈຸรีเป็นการทดลองต้นแบบด้วยการปรับสภาพด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกสามารถคัดแยกเชื้อ *Bacillus* sp. MSC-5 ที่สามารถเจริญและสะสม PHAs โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพไบโຈามຈຸรีเป็นแหล่งคาร์บอนและสามารถลดผลกระทบที่เกิดจากผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดจากกระบวนการปรับสภาพซึ่งยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* sp. MSC-5 โดยการเจือจางสารละลายน้ำตาล และการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นและ PHAs ที่ผลิตได้เป็นชนิด PHB ที่มีสมบัติเชิงกล และสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับ PHB ในงานวิจัยต่างๆ รวมไปถึง PHB ทางการค้า และ PS อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นเพียงการทดลองต้นแบบที่ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำวัสดุลิกโนเซลลูโลสมาใช้ในการผลิต PHAs โดยมีจุดประสงค์เพื่อลดต้นทุนในการผลิตที่เกิดจากแหล่งคาร์บอน โดยการทดลองใช้แหล่งลิกโนเซลลูโลสที่ไม่มีมูลค่าใดๆ และไม่ใช่อาหารของมนุษย์ มาพัฒนาวิธีการผลิตและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHAs ให้ได้เป็นแนวทางการศึกษาต่อในอนาคต ซึ่งหากจะนำไปใช้จริงจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกมากเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับสภาพและย่อยลิกโนเซลลูโลสชนิดต่างๆ เพื่อให้ได้น้ำตาลสูงสุดและเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงน้อยที่สุด และการปรับปรุงความทนทานต่อผลิตภัณฑ์ข้างเคียงชนิดต่างๆ ของจุลินทรีย์ และการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต รวมถึงการปรับปรุงคุณภาพ PHAs ที่ผลิตได้ให้มีสมบัติตามต้องการ

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

มาลินี ชัยศุภกิจสินธ์. 2546. เคมีพอลิเมอร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 สุชาดา จันทร์ประทีป. 2539. การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซี วาเลอเรต-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Abate, R., Ballistreri, A., Montaudo, G., Giuffrida, M. and Impallomeni, G. 1995. Separation and structural characterization of cyclic and open chain oligomers produced in the partial pyrolysis of microbial poly(hydroxybutyrates). Macromolecules 28 : 7911-7916.
- Akaraonye, K., Keshavarz, T. and Roy, I. 2010. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 85 : 732-743.
- Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R. and Reis, M.A.M. 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. Journal of Biotechnology 130 : 411-421.
- Ataei, S.A., Vasheghani-Farahani, E. and Shojaosadati, S.A. 2008. Isolation of PHA-producing bacteria from date syrup waste. Macromolecular Symposia 269 : 11-16.

- Atkins, T.W. and Peacock, S.J. 1996. In vitro biodegradation of poly(β -hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres exposed to Hanks' buffer, newborn calf serum, pancreatin and synthetic gastric juice. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 7 : 1075-1084.
- Bengtsson, S. Pisco, A.R. Reis, M.A.M. and Lemos, P.C. 2010. Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. Journal of Biotechnology 145 : 253-263.
- Bhubalan, K. et al. 2008. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. Polymer Degradation and Stability 93 : 17-23.
- Boatman, E. S. 1964. Observations on the fine structure of spheroplasts of *Rhodospirillum rubrum*. The Rockefeller University Press 20 : 297-311.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. 1974. Bergey's manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. United States of America : Waverly press.
- Chanprateep, S., et al. 2003. Nonisothermal crystallization kinetics of biodegradable random poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and block one. Journal of Chemical Engineering of Japan 36 : 639-646.
- Chanprateep, S. and Kulpreecha, S. 2006. Production and characterization of biodegradable terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. A-04. Journal of Bioscience and Bioengineering 101 : 51-56.
- Chanprateep, et al. 2008. Characterization of new isolated *Ralstonia eutropha* strain A-04 and kinetic study of biodegradable copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 35 : 1205-1215.

- Chanprateep, S., Buasri, K., Muangwong, A. and Utiswannakul, P. 2010. Biosynthesis and biocompatibility of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). Polymer Degradation and Stability 95: 2003-2012.
- Chanprateep, S. 2010. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal of Bioscience and Bioengineering 110 : 621-632.
- Chen, G.Q. and Wu, Q. 2005. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Biomaterials 26 : 6565-6578.
- Chia, K., Ooia, T., Saika, A., Tsuge, T. and Sudesh, K. 2010. Biosynthesis and characterization of novel polyhydroxyalkanoate polymers with high elastic property by *Cupriavidus necator* PHB⁻ 4 transformant. Polymer Degradation and Stability 95 : 2226-2232.
- Comeau, Y., Hall, K.J. and Oldham, W.K. 1988. Determination of poly-3-hydroxybutyrate and poly-3-hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography. Applied and Environmental Microbiology 54 (9) : 2325-2327.
- de Koning, G. J. M. and Maxwell, I. A. 1993. Biosynthesis of poly-(R)-3-hydroxyalkanoate: An emulsion polymerization. Journal of Polymers and the Environment 1 : 223-226.
- Doi, Y. 1990. Microbial Polyesters. New York: VCH.
- Doi, Y., et al. 1992. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiology Letters 103 : 103-108.
- Doi, Y., Kitamura, S. and Abe, H. 1995. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). Macromolecules 28 (14) : 4822-4828.
- Du Bois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28 : 350-356.

- Duvernoy, O., Malm, T., Ramström, J. and Bowald, S. 1995. A biodegradable patch used as a pericardial substitute after cardiac surgery: 6- and 24-Month Evaluation with CT. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 43 : 271-274.
- Elevitch, C.R. and Staples, G.W. 2006. Traditional Trees of Pacific Islands: Their Culture, Environment, and Use. Holualoa, USA: Permanent Agriculture Resources.
- Gámeza, S., González-Cabriales, J.J., Ramírez J.A., Garroteb, G. and Vázquez, M. 2006. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. Journal of Food Engineering. 7 : 78-88.
- Gilmore, D.F., Fuller R.C. and Lenz, R. 1990. Degradable Materials: Perspectives, Issues and Opportunities. Boca Raton, FL : CRC Press.
- Griebel, R., Smith, Z. and Merrick, J. M. 1968. Metabolism of poly(β -hydroxybutyrate). I. purification, composition, and properties of native poly(β -hydroxybutyrate) granules from *Bacillus megaterium*. Biochemistry 7 : 3676-3681.
- Griebela, R. J. and Merrick, J. M. 1971. Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate: effect of mild alkaline extraction on native poly- β -hydroxybutyrate granules. Journal of Bacteriology 108 : 782-789.
- Gross, R.A. and Kalra, B. 2002. Biodegradable polymers for the environment. Science 297 : 803-807.
- Haas, R., Jin, B. and Zepf, F.T. 2008. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 72 : 253-256.
- Hänggi, U.I. 1995. Requirements of bacterial polyesters as future substitutes for conventional plastic for consumer goods. FEMS Microbiology Reviews 16 : 213-220.
- Hendriks, A.T.W.M. and Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology 100 : 10-18.
- Ibrahim, M.H.A. and Steinbüchel, A. 2010. *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. Journal of Applied Microbiology 108 : 214-225.

- Jendrossek, D. and Handrick, R. 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. Annual Review of Microbiology 56 : 403-432.
- Kempers, A.J. 1974. Determination of sub-micro quantities of ammonium and nitrates in soils with phenol, sodiumnitroprusside and hypochlorite. Geoderma 12 : 201-206.
- Khanna, S. and Srivastava, A.K. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Process Biochemistry 40 : 607-619.
- Khardenavis, A., Kumar, M.S., Mudliar, S.N. and Chakrabarti, T. 2007. Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly β -hydroxybutyrate. Bioresource Technology 98 : 3579-3584.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. Journal of Molecular Evolution 16 : 111-120.
- Koisor, E., Bragansa, R.M. and Fowler, P. 2006. Lightweight Compostable Packaging: Literature Review. UK : The Waste & Resources Action Programme.
- Koller, M., et al. 2005. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. Biomacromolecules 6 : 561-565.
- Koller, M., et al. 2008. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. Bioresource Technology 99 : 4854-63.
- Koller, M., Atlic, A., Dias, M., Reiterer, A. and Braunegg, G. 2010. Microbial PHA production from waste raw materials. In Chen, G.Q. (ed.), Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications, pp. 85-119. Austria : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Koller, M., et al. 2010. Sustainable embedding of the bioplastic poly-(3-hydroxybutyrate) into the sugarcane industry: principles of a future-oriented technology in Brazil. In Polymers - Opportunities and Risks II. pp. 81-96. Austria : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Kumar, T., Singh, M., Purohit, H.J. and Kalia, V.C. 2009. Potential of *Bacillus* sp. to produce polyhydroxybutyrate from biowaste. Journal of Applied Microbiology 106 : 2017-2023.
- Laopaiboonr, P., Thania, A., Leelavatcharamasc, V. and Laopaiboon, L. 2010. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. Bioresource Technology 101 : 1036-1043.
- Lee, S.Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnology and Bioengineering 49 : 1-14.
- Lenihan, P., et al. 2010. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. Chemical Engineering Journal 156 : 395-403.
- Li, R., Zhang, H. and Qi, Q. 2007. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. Bioresource Technology 98 : 2313-2320.
- Luengo, J.M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, E.R. 2003. Bioplastics from microorganisms. Current Opinion in Microbiology 6 : 251-260.
- Lundgren, D. G., Pfister, R. M. and Merrick, J. M. 1964. Structure of Poly- β -hydroxybutyric Acid Granules. Journal of General Microbiology 34 : 441-446.
- Luzier, W.D. 1992. Materials derived from biomass/biodegradable materials. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89 : 839-842.
- Madison, L.L. and Huisman, G.W. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63 : 21-53.
- Majid, M.I.A., et al. 1999. Production of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Erwinia* sp. USMI-20. International Journal of Biological Macromolecules 25 : 95-104.
- Martin, D.P. and Williams, S.F. 2003. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. Biochemical Engineering Journal 16 : 97-105.

- Mayer, F. and Hoppert, M. 1997. Determination of the thickness of the boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies, and implications for models describing the molecular architecture of this layer. Journal of Basic Microbiology 37 : 45-52.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31 : 426-428.
- Mothes, G., Schnorpfeil, C. and Ackermann, J.U. 2007. Production of PHB from Crude Glycerol. Engineering in Life Sciences 7 : 475-479.
- Müller, H.M. and Seebach, D. 1993. Poly(hydroxyalkanoates): A fifth class of physiologically important organic biopolymers?. Angewandte Chemie International Edition in English 32 : 477-502.
- Munoz, L.E.A. and Riley, M.R. 2008. Utilization of cellulosic waste from tequila bagasse and production of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics by *Saccharophagus degradans*. Biotechnology and Bioengineering 100 : 882-888.
- Omar, S., Rayes, A., Eqaab, A., Voß I. and Steinbüchel A. 2001. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. Biotechnology Letters 23 : 1119-1123.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology 74 : 25-33.
- Peacock, A.J. and Calhoun, A.R. 2006. Polymer chemistry: properties and applications. Minich, Germany : Carl Hanser Verlag.
- Philip, S., Keshavarz, T. and Roy, I. 2007. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 82 : 233-247.
- Pötter, M. and Steinbüchel, A. 2006. Biogenesis and Structure of Polyhydroxyalkanoate Granules. Microbiology Monographs 2006 : 109-136.
- Prasad, S., Singh, A. and Joshia, H.C. 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. Resources, Conservation and Recycling 50 : 1-39.

- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, and Kalia, V.C. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresource Technology 87 : 137-146.
- Rehm, B.H.A. 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nature Reviews Microbiology 8 : 578-592.
- Romero, I., Moya, M., Sánchez, S., Ruiz, E., Castro, E. and Bravo, V. 2007. Ethanol fermentation of phosphoric acid hydrolysates from olive tree pruning. Industrial Crops and Products 25 : 160-168.
- Saxena, R.C., Adhikari, D.K. and Goyal, H.B. 2009. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 13 : 167-178.
- Sevastianov, V.I., Perova, N.V., Shishatskaya, E.I., Kalacheva, G.S. and Volova, T.G. 2003. Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. Journal of Biomaterials Science 14 : 1029-1042.
- Shrivastav, A., Mishra, S.K. and Mishra, S. 2010. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. International Journal of Biological Macromolecules 46 : 255-260.
- Silva, L.F., et al. 2004. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 31 : 245-254.
- Steinbüchel, A. and Schlegel, H.G. 1991. Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. Molecular Microbiology 5 : 535-542.
- Steinbüchel, A. and Valentin, H.E. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. FEMS Microbiology Letters 128 : 219-228.
- Sudesh, K. and Iwata, T. 2008. Sustainability of biobased and biodegradable plastics. Clean 36 : 433-442.
- TAPPI-Technical Association of Pulp and Paper Industry. 1988. Test method for determination of alpha-beta and gamma-cellulose in pulp. TAPPI 203 om-88.

- Yang, S.I., Wu, Z.H., Yang, W. and Yang, M.B. 2008. Thermal and mechanical properties of chemical crosslinked polylactide (PLA). Polymer Testing 27 : 957-963.
- Yoshie, N., Azuma, Y., Sakurai, M. and Inoue, Y. 1995. Crystallization and compatibility of poly(vinyl alcohol)/poly(3-hydroxybutyrate) blends: Influence of blend composition and tacticity of poly(vinyl alcohol). Journal of Applied Polymer Science 56 : 17-24.
- Yu, J. and Stahl, H. 2008. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. Bioresource Technology 99 : 8042-8048.
- Valappil, S.P., Boccaccini, A.R., Bucke, C. and Roy, I. 2007. Polyhydroxyalkanoates in gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. Antonie van Leeuwenhoek 91 : 1-17.
- Van-Thouc, D., Quillaguamán, J., Mamo, G. and Mattiasson, B. 2008. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. Journal of Applied Microbiology 104 : 420-428.
- van Wyk, J.P.H. 2001. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. Trends in Biotechnology 19 : 172-177.
- Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D. and Radecka, I. 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal of Applied Microbiology 102 : 1437-1449.
- Wierckx, N., Koopman, F., Bandounas, L., De Winde, J.H. and Ruijsenaars, H.J. 2010. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. Microbial Biotechnology 3 : 336-343.
- William, S.F. and Martin, D.P. 2003. Biopolymer. Wiley-VCH: Weinheim, Germany.
- Williams, S.F. and Peoples, O.P. 1996. Biodegradable plastics from plants. Chemtech 26 : 38-44.
- Williamson, D. H. and Wilkinson, J. F. 1958. The Isolation and Estimation of the Poly- β -hydroxy-butyrates Inclusions of *Bacillus* Species. Journal of General Microbiology 19 : 198-209.

Zhang, H., Obias, V., Gonyer, K. and Dennis D. 1994. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. Applied and Environmental Microbiology 60 : 1198-1025.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรอุดม (rich medium)

อาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract)	5	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต (NH ₄) ₂ SO ₄	5	กรัม
ทริปโตส (tryptose)	10	กรัม

ละลายสาร 4 ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ด้วยสารละลายไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตรอุดม (rich medium agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรอุดมและละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรเพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเพื่อการผลิต (Production medium)

อาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต (ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน)

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.4	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	5.8	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.12	กรัม
โซเดียมซิเตรต	5	กรัม
สารละลาย trace element	1	มิลลิลิตร

สารละลาย trace element ใน 1M HCl 1 ลิตรประกอบด้วย

คอปเปอร์ไดคลอไรด์ไดไฮเดรตไฮเดรต	0.17	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	2.78	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	1.67	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.29	กรัม
แมงกานีสไดคลอไรด์เตตระไฮเดรต	1.98	กรัม

แยกสารละลายเกลือ, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต และ trace element เพื่อละลาย
แล้วนำมารวมกัน ปรับ pH โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ หนึ่งหม่าเชื้อแบบ
มาตรฐาน

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. วิธีเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

ละลาย 1.0 กรัมของกรดไดไนโตรซาลิไซลิกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมนิเตรตซีมไซเดียมคาร์เตรต 30.0 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นเก็บในขวดสีชา

2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

สารละลายนิเตรตซีมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เตรียมโดยละลายนิเตรตซีมคลอไรด์ 150 กรัมในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

สารละลายไนโตรพัสซายด์ เตรียมโดยละลายฟีนอล 7 กรัมและโซเดียมไนโตรพัสซายด์ 34 มิลลิกรัมในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายบัพเฟอร์ไฮโปคลอไรต์ เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.480 กรัมในน้ำปลอดประจุปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมนิเตรตซีมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.98 กรัม และเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (5-5.25 %) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 11.4-12.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย EDTA เตรียมโดยละลายเกลือของ EDTA ไดโซเดียม (EDTA disodium salt) 6 กรัมในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลาย 3 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟูริกในเมทานอล 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิก 2 กรัมต่อลิตรเป็นสารมาตรฐานภายใน

เตรียมโดยใช้ขวดคูแวนฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร เต็มเมทานอลเกรด AR ปริมาตร 485 มิลลิลิตร ลงไปช้าๆ จะเกิดความร้อนและเกิดควัน จึงควรทำที่ตู้ดูดไอระเหยปิดฝา เขย่าผสมให้เข้ากัน ซึ่งกรดเบนโซอิก 1 กรัม ละลายในสารละลายดังกล่าว เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เขียนระบุที่ข้างขวดว่าเป็น 2 กรัมต่อลิตร กรดเบนโซอิกและเมทานอลที่มี 3 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริก

4. Sudan Black B

เตรียมโดยละลาย Sudan Black B 0.3 กรัม ใน 70 เปอร์เซ็นต์ v/v เอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บไว้ในขวดสีชา

5. Nystatin

เตรียมโดยละลาย Nystatin 40 มิลลิกรัมใน DMSO 1 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ในภาชนะที่ไม่โดนแสง เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

6. กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยนำกลีเซอรอล 87 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 11.5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 88.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

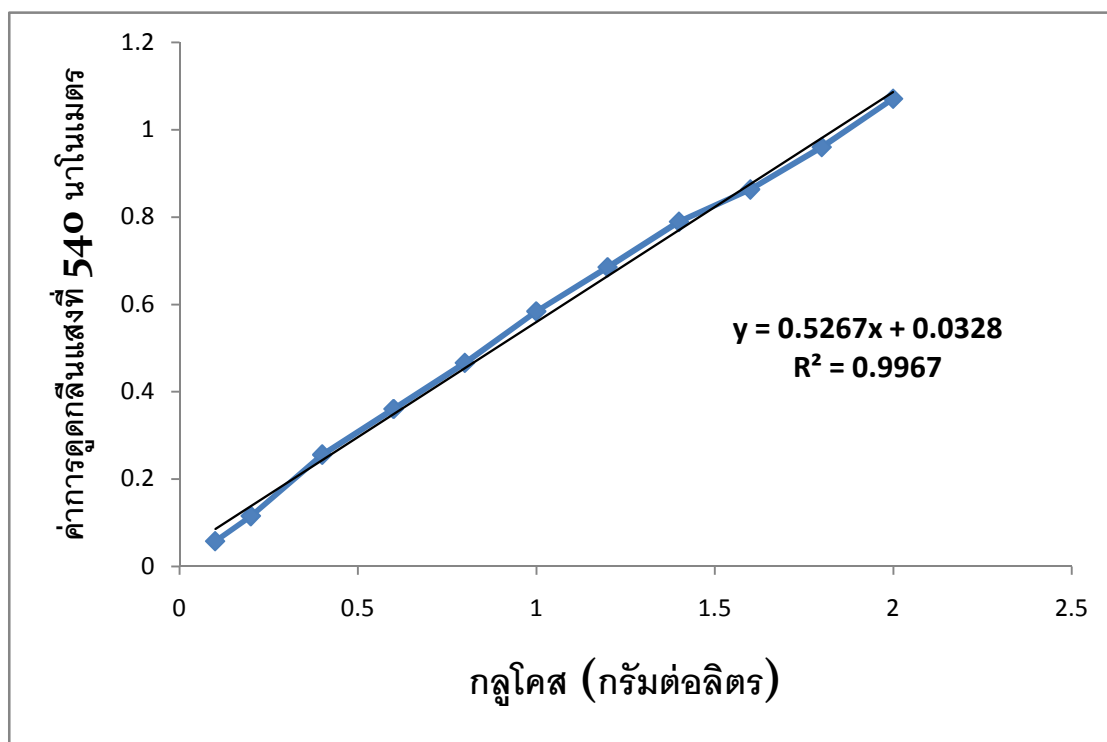
7. สารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl)

เตรียมโดยละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

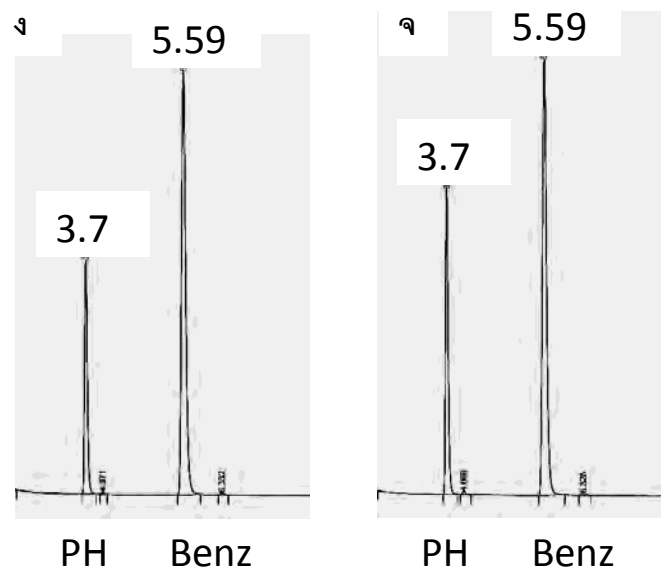
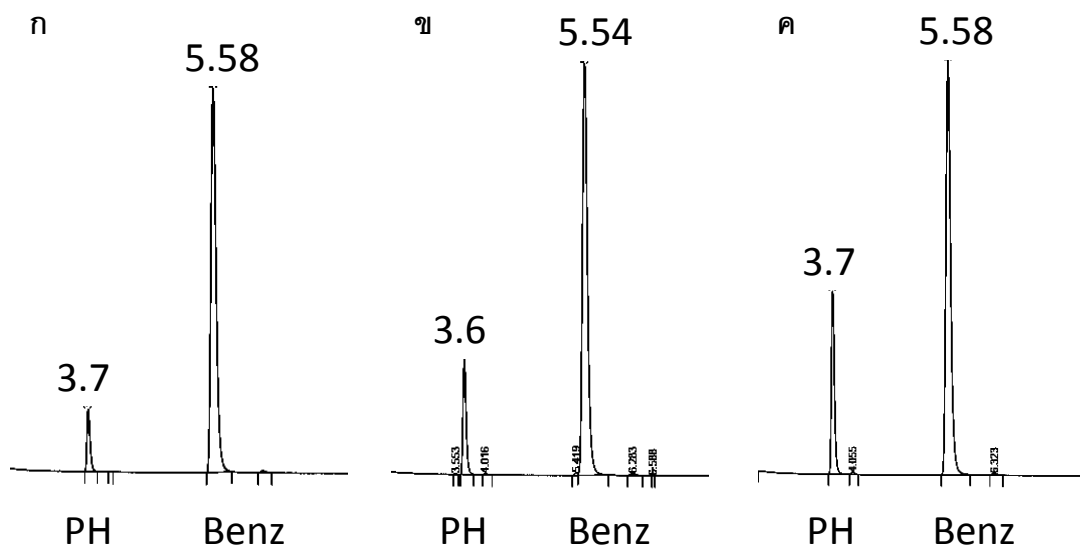
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DNSA



กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-2 กรัมต่อลิตร

2. โคโรมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB



รูปโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB ปริมาณ 1 2 3 4 5 กรัมต่อลิตร แสดงดังรูป ก ข ค ง จ ตามลำดับ

ภาคผนวก ง
ลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ MSC-2 (HQ694774)

```

1 atgttttttt tacgctcagg atgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgagcg
61 aactgattag aagcttgctt ctatgacggt agcggcggac gggtgagtaa cacgtgggca
121 acctgcctgt aagactggga taacttcggg aaaccgaagc taataccgga taggatcttc
181 tccttcatgg gagatgattg aaagatgggt tcggctatca cttacagatg ggcccgcggt
241 gcattagcta gttggtgagg taacggctca ccaaggcaac gatgcatagc cgacctgaga
301 gggtgatcgg ccacactggg actgagacac ggcccagact cctaccgggag gcagcagtag
361 ggaatcttcc gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg atgaaggctt
421 tcgggtcgta aaactctggt gttaggggaag aacaagtaca agagtaactg cttgtacctt
481 gacggtaact aaccagaaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccggc taatacgtag
541 gtggcaagcg ttatccggaa ttattgggcg taaagcgcgc gcagggcgtt tcttaagctt
601 gatgtgaaaag cccacggctc aaccgtggag ggtcattgga aactggggaa cttgagtgca
661 gaagagaaaa gcggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatgtg gaggaacacc
721 agtggcgaa ggcgcttttt ggtctgtaac tgacgctgag gcgcgaaagc gtggggagca
781 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgcataag tgttagaggg
841 tttccgccct ttagtgctgc agctaacgca ttaagcactc cgctggggga gtacggctcg
901 aagactgaaa ctcaaagga ttgacggggg ccgcacaagc cgtgggagca tgtggtttaa
961 ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacaact ctagagatag
1021 agcgttcccc ttcgggggac agagtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgctg
1081 tgagatggtt ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg atcttagttg ccagcattta
1141 gttgggcaact ctaaggtgac tgccgggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgacgtcaaa
1201 tcatcatgcc ccttatgacc tgggctacac acgtgctaca atggatggta caaagggctg
1261 caagaccgcg aggtcaagcc aatccataa aaccattctc agttcggatt gtaggctgca
1321 actcgcctac atgaagctgg aatcgtagtt aatcgcggat cagcatgcgc gggttgaata
1381 cgttcccggg ccttgctacac accgcccgtc acaccacgag agtttgtaac acccgaagtc
1441 ggtggagta

```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ MSC-5 HQ678105

```

1 gtcaggatg aacgctggcg gctgctcctaa tacatgcaag tcgagcgaac tgattagaag
61 cttgcttcta tgacgttagc ggcggacggg tgagtaacac gtgggcaacc tgctgtaag
121 actgggataa cttcgggaaa ccgaagctaa taccggatag gatcttctcc ttcattgggag
181 atgattgaaa gatggtttct gctatcactt acagatgggc ccgcggtgca ttagctagtt
241 ggtgaggtaa cggctcacca aggcaacgat gcatagccga cctgagaggg tgatcggcca
301 cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atcttccgca
361 atggacgaaa gtctgacgga gcaacgccgc gtgagtgatg aaggctttcg ggtogtaaaa
421 ctctgttggt agggagaaga aagtacaaga gtaactgctt gtacctgac ggtacctaac
481 cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgtta
541 tccggaatta ttgggcgtaa agcgcgcgca ggcggtttct taagtctgat gtgaaagccc
601 acggctcaac cgtggagggt cattggaaac tggggaaact gagtgcagaa gasaaaagcg
661 gaattccacg tgtagcggtg aaatgcgtag agatgtggag gaacaccagt ggcgaaggcg
721 gctttttggt ctgtaactga cgctgagggc cgaaagcgtg gggagcaaac aggtatgat
781 accctggtag tccaacggc aaacgatgag tgctaagttg tagagggttt ccgcccttta
841 gtgctgcagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta cggctgcaag actgaaactc
901 aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc
961 gaaaaacctt accaggctct gacatcctct gacaactcta gagatagagc gttccccttc
1021 ggggggacac agtgacagggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tctgtcgtg agatggtggg
1081 ttaagtcccc caacgagcgc aacccttgat cttagttgcc agcatttagt tgggcactcc
1141 aaggtgactg ccggtgacaa atcggaggaa ggtgggggat acgtcaaact atcatgcccc
1201 ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat gggtggtaca aagggctgca agaccgcaag
1261 gtcaagccaa tcccataaaa ccattctcag ttcggattgt aggctgcaac tcgcctacat
1321 gaagctggaa tcg

```

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายจักรารุช ไม้ทิพย์ เกิดวันที่ 30 มีนาคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2550 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 ที่อยู่ปัจจุบัน 49/125 ซอยนวมินทร์ 157 ถนนนวมินทร์ เขตบึงกุ่ม กรุงเทพฯ 10230

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับชาติ “TSB 2010 : International Conference on Biotechnology for Healthy Living” ระหว่างวันที่ 20-22 ตุลาคม 2553 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตตรัง ในหัวข้อเรื่อง “Production of Polyhydroxyalkanoates from Cellulose Hydrolysates”