

การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต
จากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยโดย *Azohydromonas lata*

นางสาวณิชารีย์ วิสุทธิแพทย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

OPTIMIZATION FOR POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION FROM SUGARCANE
INDUSTRY PRODUCTS BY *Azohydromonas lata*

Miss Nicharee Wisuthiphaet

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

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซี
ชีวพรีเวตจากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยโดย
Azohydromonas lata

โดย

นางสาวณิชาธิ์ วิสุทธิแพทย์

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน)

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

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.โสภณ สิริศรัทธา)

ณิชาธิ์ วิสุทธิแพทย์ : การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตจาก
ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยโดย

Azohydromonas lata (OPTIMIZATION FOR POLYHYDROXYBUTYRATE
PRODUCTION FROM SUGARCANE INDUSTRY PRODUCTS BY *Azohydromonas lata*)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป ภาธร, 177 หน้า.

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB) โดยแบคทีเรีย *Azohydromonas lata* เริ่มจากการทดลองในระดับขวดเขย่า เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและอัตราส่วน ระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N) ที่เหมาะสม โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็น น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายดิบ แปร ผันความเข้มข้นเป็น 20 – 40 กรัมต่อลิตร และแปรผัน C/N ในช่วง 5 20 50 100 200 และ ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน พบว่าที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 30 g/l C/N เท่ากับ 200 เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดโดย *A. lata* DSM 1122 ซิวสังเคราะห์ PHB ได้ 44% ของน้ำหนักเซลล์แห้งและให้ค่าประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด เท่ากับ 0.066 g-PHB/L/h จากนั้นทำการทดลองในระดับถังหมัก 5 ลิตร ปริมาตรรวม 3 ลิตร เริ่มแรกแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ โดยควบคุมความเข้มข้นของซูโครสเป็น 30 g/l C/N เท่ากับ 200 อัตราการให้อากาศ 1vvm อัตราเร็วการกวน 500 rpm ผลการทดลองพบว่า น้ำเชื่อมเหมาะที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนน้ำตาลทรายขาวได้ โดย ให้ค่าประสิทธิภาพการผลิต เท่ากับ 0.087 g-PHB/L/h จึงใช้น้ำเชื่อมเป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองขั้นต่อไป คือศึกษาผลของปริมาณออกซิเจน โดยควบคุมอัตราการกวนเท่ากับ 500 rpm และแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.25 0.5 และ 1.0 vvm จากผลการทดลองพบว่า อัตราการให้อากาศที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตสูงสุดคือ 0.5 vvm จากนั้นควบคุมอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm และแปรผันอัตราเร็วการกวนในช่วง 200 400 500 และ 600 รอบต่อนาที พบว่าค่าประสิทธิภาพการผลิตสูงสุด เมื่ออัตราเร็วการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที การผลิต PHB แบบเฟลด์แบบขยายได้ภาวะที่เหมาะสมพบว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตสูงกว่าการผลิตแบบแบช โดยได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 20.15 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB เท่ากับ 16.9 กรัม คิดเป็นสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 83.89% ในขณะที่การผลิตแบบแบชให้ปริมาณ PHB 9.08 กรัมต่อลิตร ซึ่ง PHB ที่ผลิตได้จาก *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตรมีอุณหภูมิหลอมเหลวเท่ากับ 178.5°C อุณหภูมิกลาสทรานซิชันเท่ากับ 10 °C ค่า Stress at Max.Load เท่ากับ 24.95 MPa ค่า Strain at Max.Load เท่ากับ 1.48 % และ Young's Modulus เท่ากับ 16191.9 Mpa

สาขาวิชา..... เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา..... 2555..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

5372247223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : POLYHYDROXYBUTYRATE / SUGARCANE / *Azohydromonas lata*

NICHAREE WISUTHIPHAET: OPTIMIZATION FOR POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION FROM SUGARCANE INDUSTRY PRODUCTS BY *Azohydromonas lata*
 ADVISOR : ASSOC. PROF. SUCHADA CHANPRATEEP NAPATHORN, Ph.D., 177 pp.

This research aimed to optimize PHB production from sugar cane industry products by *Azohydromonas lata*. The preliminary study was conducted in shake flask cultivation. Firstly, the comparison between refine sugar and raw sugar as a single carbon source were investigated. The amount of sugar was varied from 20, 30 and 40 g/l whereas the ratio of carbon to nitrogen (C/N) was varied from 5, 20, 50, 100, 200 and without nitrogen source. The results showed that *A. lata* DSM 1122, grown in 30 g/l of refine sugar and C/N was 200 (mol/mol), can accumulated PHB up to 44% of dry cell weight and the highest productivity (0.066 g-PHB/L/h) was obtained under this condition. Subsequently, in order to reduce the cost of production, several types of sugar cane products were also investigated; sugar cane juice, syrup, and molasses. The experiment was conducted in 5L bioreactor with 3L working volume. Firstly, aeration rate was set at 1 vvm and agitation speed was 500 rpm. The amount of total sucrose was given as 30 g/L and C/N was 200. Among various types of carbon source tested, maximum PHAs productivity was obtained with syrup (0.087 g-PHB/L/h). Therefore, syrup was chosen as the optimal carbon source. Secondly, the effect of oxygen concentration was investigated. The agitation rate was set at 500 rpm whereas the aeration rate was varied from 0.25, 0.5 and 1.0 vvm. The results showed that the aeration rate of 0.5 vvm gave the highest PHB productivity. Thirdly, the agitation rate was set at 0.5 vvm whereas the agitation speed was varied from 200, 400, 500 and 600 rpm. The result revealed that the most efficient agitation speed was 500 rpm. Finally, an intermittent fed-batch culture technique, conducted under the optimal condition, was performed. The results showed that, under fed-batch cultivation, the highest cell density was 20.15 g/l with 83.89 wt% resulting in higher amount of 16.9 g/l PHB than that of 9.08 g/l under batch culture technique. Characterization of PHB film produced by *A. lata* DSM 1123 in 5L bioreactor revealed that the melting temperature was 178.5°C, the glass transition temperature was 10°C, Stress at Maximum Load was 24.95 MPa, Strain at Maximum Load was 1.48 % and Young's Modulus was 16191.9 MPa.

Field of Study..... Biotechnology..... Student's Signature.....

Academic Year..... 2555..... Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่ง จากหลายๆท่าน ผู้วิจัยขอกราบ
ขอบพระคุณอย่างสูง สำหรับ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาติดา จันทร์ประทีป นภากาศ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทาง และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ รวมทั้งได้สละเวลาอันมีค่า
เพื่อให้คำปรึกษา และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน ประธานกรรมการสอบ อาจารย์ ดร.กิตติ
นันท์ โกมลภิส และ ดร.โสภณ สิริศรัทธา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์
และให้คำแนะนำต่างๆที่ล้นแล้วแต่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้

ขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนการศึกษาระดับ
บัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองในวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญ
พระชนมายุครบ 72 พรรษา และทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่สนับสนุน
เงินทุนสำหรับงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา และคณาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้
อีกทั้งให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาตลอดมา รวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา และเจ้าหน้าที่
ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่คอยให้ความช่วยเหลืออย่างดีในทุกๆด้าน

ขอขอบพระคุณ เพื่อนๆ ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในห้องวิจัย 449
ภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับคำแนะนำ ความช่วยเหลือ และกำลังใจที่มีให้เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัวสำหรับความรัก ความห่วงใย ความ
ช่วยเหลือทั้งด้านทุนทรัพย์ แรงกาย และเวลาอันมีค่า ทุกคนคือกำลังใจที่ดีที่สุดที่ช่วยให้ผู้วิจัยผ่านอุปสรรคต่างๆ
และทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ท
สัญลักษณ์ที่ใช้.....	พ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขั้นตอนการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 ปรัชญาหรือทฤษฎี.....	4
2.1 พลาสติก.....	4
2.2 แหล่งกำเนิดของพลาสติก.....	4
2.3 ประเภทของพลาสติก.....	5

บทที่	ช หน้า
2.4 ปัญหาสิ่งแวดล้อมเนื่องจากการใช้พลาสติก.....	6
2.5 พลาสติกย่อยสลายได้.....	6
2.6 ประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้.....	7
2.6.1 พลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradable plastic).....	7
2.6.2 พลาสติกชนิดย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative Degradation Plastic).....	8
2.6.3 พลาสติกย่อยสลายด้วยแสง (Photodegradable Plastic).....	8
2.6.4 พลาสติกย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolytic Degradable Plastic).....	9
2.7 พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates, PHAs).....	9
2.8 การค้นพบ PHAs.....	11
2.9 โครงสร้างของ PHAs.....	11
2.10 การจัดจำแนกชนิด PHAs.....	13
2.11 การชีวสังเคราะห์ PHAs.....	14
2.12 แบคทีเรียที่ชีวสังเคราะห์ PHAs.....	19
2.13 พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB).....	21
2.14 การชีวสังเคราะห์ PHB.....	23
2.15 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHB.....	24
2.16 อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยในประเทศไทย.....	28
2.17 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ.....	30
2.18 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลรีไฟน์.....	30
2.19 ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมอุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย.....	32

บทที่	หน้า
2.20 การย่อยสลาย PHB ในธรรมชาติ.....	33
2.21 การนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์.....	34
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	36
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	37
3.2 เคมีภัณฑ์.....	38
3.3 จุลินทรีย์.....	39
3.4 เก็บรักษาจุลินทรีย์สำหรับการทดลอง.....	39
3.5 แหล่งคาร์บอนที่ใช้.....	40
3.5.1 การเก็บตัวอย่างแหล่งคาร์บอน.....	40
3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC).....	40
3.6 สภาพที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับขวดเขย่า.....	40
3.6.1 การเตรียมกล้าเชื้อ.....	40
3.6.2 การผลิต PHB ในระดับขวดเขย่า.....	41
3.6.2.1 สภาพที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดยใช้ชูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	41
3.6.2.2 วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง.....	41
3.6.2.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชูโครสตามวิธีของ Dubois (1956).....	41
3.6.2.4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Bernfeld (1955).....	42
3.6.2.5 วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมตามวิธีของ Kamper (1974).....	42

บทที่	ญ หน้า
3.6.2.6 วิเคราะห์ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ตามวิธีของ Comeau และคณะ (1988).....	42
3.7 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับถังหมัก.....	43
3.8 สกัด PHB จากเซลล์แห้งและทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Doi (1995).....	44
3.9 ทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และเชิงกลของ PHB.....	44
3.9.1 ขึ้นรูป PHB เป็นแผ่นฟิล์มตามวิธีของ Yoshie (1995).....	44
3.9.2 วิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์.....	45
3.9.3 วิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature, TM) อุณหภูมิทรานซิชัน (Glass transition temperature, TG) ตามวิธีของ Chanprateep และคณะ (2003).....	45
3.9.4 วิเคราะห์คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม PHB ตามวิธีมาตรฐาน ASTM D882-91 (Annual Book of ASM Standard, V08.01) และ Chanprateep และ Kulprecha (2006).....	45
4 ผลการทดลอง.....	46
4.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับขวดเขย่า.....	46
4.1.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	46
4.2 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับถังหมัก.....	76
4.2.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB.....	76
4.2.2 อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิต PHB.....	89
4.2.3 อัตราการกวนที่เหมาะสมในการผลิต PHB.....	97
4.2.4 การผลิต PHB แบบเฟด-แบช.....	115
4.3 การสกัด PHB จากเซลล์แห้งและทำให้บริสุทธิ์.....	121
4.4 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและเชิงกลของ PHB.....	123

บทที่	หน้า
4.4.1 การขึ้นรูป PHB เป็นแผ่นฟิล์ม	123
4.4.2 วิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์	124
4.4.3 วิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature, T_M) และอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (Glass transition temperature, T_G)	127
4.4.4 วิเคราะห์คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม PHB	128
5. วิจารณ์ผลการทดลอง	129
รายการอ้างอิง	151
ภาคผนวก	167
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	168
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีเตรียมที่ใช้ในการทดลอง	170
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน	172
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	177

สารบัญญัตินำ

ตารางที่	หน้า
2.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHA.....	16
2.2 ตัวอย่างแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการผลิต PHAs ชนิดต่างๆ.....	20
2.3 คุณสมบัติทางกายภาพของ PHB เทียบกับคุณสมบัติทางกายภาพของ Polypropylene.....	22
2.4 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อราคา PHB.....	24
2.5 ตัวอย่างรายงานการผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ.....	26
2.6 การผลิต PHB จากน้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลกรวด น้ำตาลมะพร้าว น้ำตาลตะไคร้ โดย <i>R. eutropha</i> สายพันธุ์ A-04 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต 60 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	27
2.7 10 อันดับประเทศผู้ผลิตน้ำตาลสูงสุดในช่วงปี 2552 – 2553.....	29
4.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยจากโรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ.นครสวรรค์เดือนมกราคม 2553 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC).....	47
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยจากโรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ.นครสวรรค์เดือนสิงหาคม 2554 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC).....	48
4.3 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) และ เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลทรายขาว 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20.....	49
4.4 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) และ เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลทรายขาว 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200.....	51
4.5 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20.....	53

ตารางที่	หน้า
4.13 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลทรายดิบ 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20.....	69
4.14 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลทรายดิบ 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200.....	71
4.15 ค่าพารามิเตอร์ทางจลพลศาสตร์ของการผลิต PHB โดย <i>A. lata</i> DSM 1122 เมื่อใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันปริมาณน้ำตาลทราย 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแปรผัน C/N 20 และ 200.....	73
4.16 ค่าพารามิเตอร์ทางจลพลศาสตร์ของการผลิต PHB โดย <i>A. lata</i> DSM 1122 เมื่อใช้น้ำตาลทรายดิบเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันปริมาณน้ำตาลทราย 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแปรผัน C/N 20 และ 200.....	73
4.17 เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางจลพลศาสตร์ของการผลิต PHB โดย <i>A. lata</i> เมื่อใช้น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตรและแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เท่ากับ 5, 20, 50, 100, 200 และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	75
4.18 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 และ อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm.....	77
4.19 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) และ เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1 vvm.....	79
4.20 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1 vvm.....	81

ตารางที่	หน้า
4.21 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำอ้อยที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm.....	83
4.22 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm.....	85
4.23 ค่าพารามิเตอร์ทางจลพลศาสตร์ของการผลิต PHB โดย <i>A. lata</i> DSM 1123 เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย 5 ชนิดคือ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลดิบ น้ำเชื่อม น้ำอ้อย และ กากน้ำตาล ที่ปรับให้มีปริมาณน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 30 กรัม และให้อัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm.....	87
4.24 ราคาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาล และ ต้นทุนวัตถุดิบต่อหน่วย (บาทต่อกิโลกรัม) ในการผลิต PHB ในระดับถังหมักจากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาล 5 ชนิด.....	89
4.25 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.25 vvm.....	90
4.26 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm.....	92
4.27 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm.....	94
4.28 ค่าพารามิเตอร์ทางจลพลศาสตร์ของการผลิต PHB โดย <i>A. lata</i> DSM 1123 เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 อัตราการกวน 500 rpm และแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.25 0.5 และ 1.0 vvm.....	96

ตารางที่

หน้า

4.29	แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที.....	98
4.30	แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที.....	100
4.31	แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm.....	102
4.32	แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที.....	104
4.33	ค่าพารามิเตอร์ทางจลพลศาสตร์ของการผลิต PHB โดย <i>A. lata</i> DSM 1123 เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัม ให้อัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราการกวน เป็น 200 400 500 และ 600 rpm.....	106
4.34	แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm.....	111
4.35	แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วน C/N 200 อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราการกวน 5 รอบต่อนาที เติมน้ำเชื่อมที่มีน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 ทุก 24 ชั่วโมง.....	113

ตารางที่	หน้า	
4.36	แสดงน้ำหนักรเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) และ เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร แบบเฟดแบช ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm.....	116
4.37	แสดงน้ำหนักรเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) และ เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร แบบเฟดแบชที่มีน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm.....	118
4.38	ค่าจลนศาสตร์ของการผลิต PHB โดย <i>A. lata</i> DSM 1123 แบบเฟดแบช เปรียบเทียบกับแบบแบช เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครสเท่ากับ 30 กรัม และ น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร ให้อัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราเร็วการกวน 500 rpm.....	120
4.39	ตารางเคมีคัลลชีฟ (ppm) ¹³ C-NMR ของ PHB.....	127
4.40	แสดงอุณหภูมิหลอมเหลว (°C) เอนทัลปีของการหลอมเหลว (J/g) อุณหภูมิการเกิดผลึก (°C) และอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (°C) ของ PHB ที่ผลิตโดย <i>A. lata</i> DSM 1123 และ PHB มาตรฐาน.....	128
4.41	สมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม PHB ที่ผลิตโดย <i>A. lata</i> DSM 1123 เปรียบเทียบกับ PHB มาตรฐาน (Sigma- Aldrich).....	128
5.1	ราคาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาล และ ต้นทุนวัตถุดิบต่อหน่วย (บาทต่อกิโลกรัม) ในการผลิต PHB ในระดับถังหมักจากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาล 5 ชนิด.....	137
5.2	การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยจากโรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ.นครสวรรค์ เดือนมกราคม 2553 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC).....	138
5.3	การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยจากโรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ.นครสวรรค์ เดือนสิงหาคม 2554 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC).....	139
5.4	เปรียบเทียบการผลิต PHA ในระดับขวดเขย่า 100 มิลลิลิตร โดยจุลินทรีย์ และแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน.....	144
5.5	เปรียบเทียบการผลิต PHA ในระดับถังหมัก โดยจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอน และเทคนิคการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน.....	145

ตารางที่	หน้า
5.6 ตารางเคมีคัลซิฟ (ppm) ¹³ C-NMR ของ PHB จาก <i>A. lata</i> DSM 1123 จากงานวิจัยนี้เทียบกับ PHBsoy PHBs/m และ PHB มาตรฐาน.....	147
5.7 ตารางเคมีคัลซิฟ (ppm) ¹ H-NMR ของ PHB จาก <i>A. lata</i> DSM 1123 จากงานวิจัยนี้ และ PHBgly	148
5.8 สมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม PHB ที่ผลิตโดย <i>A. lata</i> DSM 1123 เปรียบเทียบกับ PHB มาตรฐาน (Sigma- Aldrich) โพลีโพรพิลีน (PP) โพลีเอทิลีนทาทาเรพทาเลท (PT) โพลีสไตรีน (PS) และ โพลีโพรพิลีนความหนาแน่นต่ำ (LDPE)	150

สารบัญญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน แสดงให้เห็นแกรนูลของ PHAs ภายในเซลล์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ..... 10
2.2	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHA 12
2.3	วิธีการสังเคราะห์ PHA ตัวเลขแสดงเอนไซม์ (หรือยีน) ที่เกี่ยวข้องในวิธีการสังเคราะห์... 15
2.4	กระบวนการเมแทบอลิซึมของการชีวสังเคราะห์ mcl-PHA 18
2.5	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHB 21
2.6	วิธีการสังเคราะห์ PHB 23
2.7	กระบวนการผลิตน้ำตาลอ้อย 31
2.8	วัฏจักรการย่อยสลายของ PHAs 34
4.1	(A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20 50
4.2	(A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 52
4.3	(A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20 54

รูปที่	หน้า
4.10 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200	68
4.11 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20	70
4.12 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200	72
4.13 ผลของ C/N ต่ออัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิต PHB โดย <i>A. lata</i> DSM1122 เมื่อใช้น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร และ C/N เท่ากับ 200	75
4.14 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 และ อัตราการกวน 500 รอบต่อ นาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm	78
4.15 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลดิบ 30 กรัมต่อ ลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 และ อัตราการกวน 500 รอบต่อ นาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm	80

4.22	(A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในการผลิตระดับถึงหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm.....	99
4.23	(A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในการผลิตระดับถึงหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm.....	101
4.24	(A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในการผลิตระดับถึงหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm.....	103
4.25	(A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในการผลิตระดับถึงหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm.....	105
4.26	แผนภูมิแบบ surface response แสดงผลของอัตราการกวน 200 400 500 และ 600 rpm และอัตราการให้อากาศ 1.0 0.5 0.25 vvm ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l).....	107
4.27	แผนภูมิแบบ surface response แสดงผลของอัตราการกวน 200 400 500 และ 600 rpm และอัตราการให้อากาศ 1.0 0.5 0.25 vvm ต่อน้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ (g/l).....	107
4.28	แผนภูมิแบบ surface response แสดงผลของอัตราการกวน 200 400 500 และ 600 rpm และอัตราการให้อากาศ 1.0 0.5 0.25 vvm ต่อปริมาณ PHB (g/l).....	108
4.29	แผนภูมิแบบ surface response แสดงผลของอัตราการกวน 200 400 500 และ 600 rpm และอัตราการให้อากาศ 1.0 0.5 0.25 vvm ต่อสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)...	108
4.30	แผนภูมิแบบ surface response แสดงผลของอัตราการกวน 200 400 500 และ 600 rpm และอัตราการให้อากาศ 1.0 0.5 0.25 vvm ต่อประสิทธิภาพการผลิต PHB.....	109

4.31	แผนภูมิแบบ surface response แสดงผลของอัตราการกวน 200 400 500 และ 600 rpm และอัตราการให้อากาศ 1.0 0.5 0.25 vvm ต่ออัตราการผลิต PHA จำเพาะ (g-PHA/g-CDW/h)	109
4.32	(A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในการผลิตระดับถึงหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm	112
4.33	(A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในการผลิตระดับถึงหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm	114
4.34	ปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคส และ ฟรุกโตสในน้ำหมัก เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในการผลิตระดับถึงหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นในน้ำเชื่อมที่มีซูโครสเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วน C/N 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm	115
4.35	(A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในการผลิตระดับถึงหมักแบบเฟดแบช ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm	117
4.36	(A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง <i>A. lata</i> DSM 1123 ในการผลิตระดับถึงหมักแบบเฟดแบช ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm	119

รูปที่	หน้า	
4.37	ลักษณะของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จาก <i>A. lata</i> DSM 1123 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHB ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200.....	122
4.38	ลักษณะของผงพอลิเมอร์ที่สกัดได้จากเซลล์แห้ง และทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนในเฮกเซนปริมาตร 4 เท่า	122
4.39	ลักษณะแผ่นฟิล์ม PHB.....	123
4.40	(a) สเปกตรัมของ PHB ที่ผลิตจาก <i>A. lata</i> DSM1123 จาก ¹ H-NMR ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 °C (b) สเปกตรัมของ P(3HB-co-12%4HB) ที่ผลิตจาก <i>Ralstonia eutropha</i> A04 จาก ¹ H-NMR ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 °C.....	125
4.41	(a) สเปกตรัมของ PHB ที่ผลิตจาก <i>A. lata</i> DSM1123 จาก ¹³ C -NMR ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 °C (b) สเปกตรัมของ PHB ที่จำหน่ายในท้องตลาด จาก ¹³ C -NMR.....	126

คำย่อและสัญลักษณ์ที่ใช้

สัญลักษณ์	ความหมาย
μ	อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, h^{-1})
γ	อัตราการใช้น้ำตาลจำเพาะ (specific consumption rate, g-sugar/g-CDW/h)
ρ	อัตราการผลิต PHA จำเพาะ (specific production rate, g-PHA/g-CDW/h)
$Y_{X/S}$	ค่าสัมประสิทธิ์การผลิตชีวมวลจากหนึ่งกรัมน้ำตาล (cell yield coefficient, g-CDW/g-sugar)
$Y_{P/S}$	ค่าสัมประสิทธิ์การผลิต PHA จากหนึ่งกรัมน้ำตาล (cell yield coefficient, g-PHA/g-sugar)
CDW	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)
HPLC	โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)
PHA	พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates)
PHB	พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate)
rpm	รอบต่อนาที (revolutions per minute)
vvm	หน่วยปริมาตรแก๊สต่อหน่วยปริมาตรของเหลวต่อนาที (volume per volume per minute, ml/l/min)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พลาสติกเป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์จากปิโตรเคมี มีความทนทาน น้ำหนักเบา หลากหลายชนิด และองค์ประกอบ จึงทำให้มีคุณสมบัติทางกายภาพที่หลากหลาย และมีราคาถูก ส่งผลให้พลาสติกเป็นวัสดุที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านบรรจุภัณฑ์ชนิดต่างๆ ซึ่งมีอายุการใช้งานค่อนข้างสั้น จึงเป็นสาเหตุทำให้ปริมาณขยะพลาสติกเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยมีรายงานว่าการผลิตพลาสติกในปี 2009 มีปริมาณกว่า 230 ล้านตันทั่วโลกและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง (European Commission: Plastic waste in the environment – Final Report, 2011) จากภาวะโลกร้อนที่อุบัติขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีระดับความรุนแรงสูงขึ้น จึงทำให้ทั่วโลกต่างตระหนักถึงความสำคัญในการมุ่งแก้ไขปัญหานี้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวัสดุชนิดอื่นขึ้นมาเพื่อทดแทนการใช้พลาสติก โดยมุ่งเน้นไปที่วัสดุที่มีคุณสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับพลาสติก และสามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติ ยกตัวอย่างเช่น พอลิเมอร์ที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์ เป็นต้น

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) เป็นพอลิเมอร์ที่ชีวสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ของแบคทีเรียกว่า 250 ชนิด ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Steinbüchel, 1992; Lenz และคณะ, 1992) โดย PHAs ถูกเก็บสะสมไว้ในรูปของแกรนูลในไซโตพลาสซึมภายในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองของเซลล์ โดยจุลินทรีย์จะชีวสังเคราะห์ PHA ภายใต้ภาวะที่ถูกจำกัดสารอาหารหรือปัจจัยบางอย่าง เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือ ออกซิเจน แต่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป (Medison and Huisman, 1999) PHAs เป็นพอลิเมอร์ในกลุ่มพอลิเอสเทอร์สายตรง มีมอนอเมอร์คือกรดไฮดรอกซีแอลคาโนอิก จำนวนคาร์บอน 3-14 อะตอม ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นแบบ อะลิฟาติก และอะโรมาติก (Doi และคณะ, 1992; De Smet และคณะ, 1983) โดยมีความหลากหลายของมอนอเมอร์มากกว่า 100 ชนิด อีกทั้งยังสามารถพอลิเมอร์ไรซ์เป็นได้ทั้ง สอโมพอลิเมอร์ และเฮเทอโรพอลิเมอร์ จึงทำให้ PHAs มีความหลากหลายและมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน (Reddy และคณะ, 2003)

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB) จัดเป็น PHAs ชนิดสอโมพอลิเมอร์ที่มีมอนอเมอร์คือกรดไฮดรอกซีบิวทริก PHB มีสมบัติไม่ละลายน้ำ และให้ออกซิเจนผ่านได้ดี (Lindsay, 1992; Holmes, 1985) นอกจากนี้ PHB ยังมีคุณสมบัติทางกายภาพที่คล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์อย่างเช่น พอลิโพรพิลีน และ พอลิเอทิลีน แต่เนื่องจาก PHB มีความเปราะสูง (Ojumu และคณะ, 2004) Savenkova และคณะ (1999) พบว่าการผสมพลาสติกไฮดรอกซี เช่น พอลิเอทิลีน ไกลคอล (Polyethylene glycol) และ

ออกซิโพรไพเลท กลีเซอรอล (Oxypropylated glycerol) กับ PHB สามารถปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของ PHB ให้มีความยืดหยุ่นมากขึ้น จึงยืนยันได้ว่า PHB สามารถพัฒนาเป็น PHB คอมโพสิต (composite) เพื่อประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้

ในการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรมมีต้นทุนที่ค่อนข้างสูง โดยสาเหตุหลักของต้นทุนคือแหล่งคาร์บอนที่ใช้ ดังนั้นหากใช้แหล่งคาร์บอนที่มีต้นทุนต่ำและหาได้ง่ายในท้องถิ่นก็จะเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิต PHB ได้ สำหรับในประเทศไทยนั้นเป็นประเทศที่ผลิตน้ำตาลอ้อยได้เป็นอันดับสี่ของโลก ทำให้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สามารถหาได้ง่ายและมีอยู่ตลอดฤดูกาลในประเทศไทย ดังนั้นการใช้ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการผลิตน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนจึงเป็นแนวทางที่จะช่วยลดต้นทุนการผลิต PHB และยังเป็นแนวทางในการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับอุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยได้อีกด้วย โดยในแต่ละกระบวนการผลิตน้ำตาลอ้อยนั้น จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน แต่มีองค์ประกอบหลักคือน้ำตาลซูโครส ซึ่งมีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ได้

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ *Azohydromonas lata* DSM 1122 และ DSM 1123 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ได้หลายชนิด รวมทั้งแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครส เช่น น้ำเชื่อมข้าวโพด กากน้ำตาลอ้อย และ กากน้ำตาลจากหัวบีท เป็นต้น และสามารถสะสม PHB ภายในเซลล์ได้ในปริมาณมาก โดยจาก United States Patent Number 4,957,861 (Lafferty และคณะ, 1990) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *A. lata* ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 25 กรัมต่อลิตร และมีค่าการละลายออกซิเจนในช่วง 25–35% ปรับค่าความเป็นกรดเบสที่ 7 ด้วย 10% NaOH โดยมีการเติมซูโครสและ แอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม พบว่าภายในเวลา 37 ชั่วโมงได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 48.1 กรัมต่อลิตรที่มี PHB สะสมอยู่ 70.2% คิดเป็นค่าสัมประสิทธิ์การผลิตชีวมวลจากหนึ่งกรัม น้ำตาล ($Y_{X/S}$, cell yield coefficient, g-CDW/g-sugar) เท่ากับ 0.45 นอกจากนี้ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียสามารถใช้ green syrup ที่มีปริมาณซูโครส 59% และ beet molasses ที่มีปริมาณซูโครส 44% เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการเจริญเติบโตและผลิต PHB ได้สูงถึง 74% Chen (1991) รายงานว่า *A. lata* เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้รวดเร็วในอาหารที่มีซูโครส สามารถสะสม PHB ได้สูงถึง 90% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและสามารถใช้ วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมในการผลิต PHB นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้ยังเคยถูกคัดเลือกให้ใช้ในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรมของบริษัท Chemie Linz ประเทศ Australia รายงานการผลิต PHB ในปริมาณ 1000 กิโลกรัมต่อสัปดาห์ในถังหมักขนาด 15 ลิตร โดยใช้ *A. lata* DSM 1124 (Harbak, 1992)

การผลิต PHB ในระดับถังหมักเป็นแนวทางที่สามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตได้ เนื่องจากผู้วิจัยสามารถควบคุมปัจจัยที่ส่งผลกับการชีวสังเคราะห์ PHB ได้แก่ ปริมาณออกซิเจน และ pH ให้อยู่ในภาวะที่เหมาะสมได้ โดยกระบวนการที่ใช้ในการผลิต PHB ได้แก่ การผลิตแบบแบช (batch) ซึ่งเป็นกระบวนการผลิตที่ไม่มีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิต โดยเซลล์จะเจริญจนกระทั่งองค์ประกอบของสารอาหาร

ที่จำเป็นหมดไป และการผลิตแบบเฟดแบช (fedbatch) เป็นการผลิตที่มีการเติมสารอาหาร 1 ครั้ง หรือมากกว่าลงในระบบในระหว่างการเพาะเลี้ยง แต่ไม่มีการนำผลผลิตที่ได้จากการผลิตออกจากระบบจนกว่าจะสิ้นสุดการหมัก ในระดับอุตสาหกรรมนิยมวิธีการผลิตแบบเฟดแบช เนื่องจากทำให้ผลผลิตหรือปริมาณเซลล์ที่ได้เพิ่มขึ้น

ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB จาก *A. lata* DSM 1122 และ DSM 1123 โดยเริ่มจากการผลิตในระดับขวดเขย่าเพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม จากนั้นขยายการผลิตสู่ระดับถังหมัก 5 ลิตรแบบแบช เพื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHB ของผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย และหาอัตราการให้อากาศ และอัตราการกวนที่เหมาะสม และทำการผลิตแบบเฟดแบชภายใต้ภาวะที่เหมาะสม เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาไปสู่การผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรมในประเทศไทยต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยโดย *Azohydromonas lata* DSM 1122 และ DSM 1123

1.3 ขั้นตอนการวิจัย

1. เก็บรักษาจุลินทรีย์ สำหรับใช้ในการทดลอง
2. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยชนิดต่างๆ
3. หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB จากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยในระดับขวดเขย่า
4. หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับถังหมักแบบแบช
5. ผลิต PHB จากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยในระดับถังหมักแบบเฟดแบช
6. สกัด PHB จากเซลล์แห้งและทำให้บริสุทธิ์
7. ทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และเชิงกลของ PHB

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาการผลิตระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 พลาสติก

สมาคมวิศวกรพลาสติก (SPE) และสมาคมอุตสาหกรรมพลาสติก (SPI) แห่งสหรัฐอเมริกาได้ให้คำจำกัดความของพลาสติกไว้ดังนี้ “พลาสติกคือวัสดุที่ประกอบด้วยสารหลายอย่างมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ลักษณะอ่อนตัวขณะทำการผลิต ซึ่งโดยมากใช้กรรมวิธีการผลิตด้วยความร้อนหรือแรงอัดหรือทั้งสองอย่าง” พลาสติกเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ออกซิเจน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และคลอรีน นำมาสังเคราะห์โดยกระบวนการทางเคมีที่เรียกว่า "พอลิเมอไรเซชัน" ในปัจจุบันนิยมใช้พลาสติกแทนวัสดุธรรมชาติ เนื่องจากพลาสติกมีคุณสมบัติเด่นคือ มีความทนทาน มีน้ำหนักเบา มีหลากหลายประเภท ซึ่งแต่ละประเภทมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันตามชนิดของมอนอเมอร์ เช่น พอลิเอทิลีน โพลีสไตรีน พอลิไวนิลคลอไรด์ และ พอลิยูรีเทน เป็นต้น พลาสติกมีคุณสมบัติที่หลากหลาย และเป็นวัสดุที่มีราคาถูก พลาสติกบางชนิดเมื่อเย็นจะแข็งตัว เมื่อถูกความร้อนจะอ่อนตัว ทำให้สามารถขึ้นรูปได้ตามต้องการ ส่งผลให้พลาสติกเป็นวัสดุที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านบรรจุภัณฑ์ชนิดต่างๆ (รววิทย์ จันทร์สุวรรณ, 2554)

2.2 แหล่งกำเนิดของพลาสติก

แหล่งกำเนิดของพลาสติก สามารถแบ่งออกเป็น 4 แหล่งดังต่อไปนี้ (รววิทย์ จันทร์สุวรรณ, 2554)

2.2.1 แหล่งผลิตผลทางเกษตร

เช่น เซลลูโลสไนเตรต (cellulose nitrate) เซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate) เซลลูโลสอะซิเตต บิวทิเรท (cellulose acetate butyrate) และเอทิลเซลลูโลส เคซีน (ethyl cellulose casein)

2.2.2 แหล่งน้ำมันและถ่านหิน

เป็นแหล่งที่ใช้ผลิตพลาสติกชนิดต่างๆ ได้มากที่สุด เช่น พอลิสไตรีน (polystyrene) ฟีนอล-ฟอร์มัลดีไฮด์ (phenol-formaldehyde) เมลามีน-ฟอร์มัลดีไฮด์ (melamine formaldehyde) พอลิเอทิลีน (polyethylene) ยูเรีย-ฟอร์มัลดีไฮด์ (urea-formaldehyde) ไนลอน (nylon) พอลิเอสเทอร์ (polyester) อะครีลิก (acrylic) และอีพอกซี (epoxy)

2.2.3 แหล่งน้ำมันและสินแร่

เช่น พอลิไวน์ลิวทิวราล (polyvinylbutyral) พอลิไวน์ลิวคาร์บาซอล (polyvinylcarbazole) พอลิไวน์ลิวอะซีเตท (polyvinylacetate) พอลิไวน์ลิวแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) ซิลิโคน (silicone) พอลิไวน์ลิวอะซีเตทคลอไรด์ (polyvinyl acetate chloride) และพอลิไวน์ลิวคลอไรด์ (polyvinyl chloride)

2.2.4 สินแร่ เช่น แคลเซียม (calcium) และอลูมิเนียมซิลิเกต (aluminium silicate)

2.3 ประเภทของพลาสติก (วรวิทย์ จันทร์สุวรรณ, 2554)

พลาสติกสามารถแบ่งออกตามลักษณะการยึดเกาะตัวของโครงสร้างโมเลกุลได้เป็น 2 ประเภท คือ เทอร์โมพลาสติก (Thermoplastics) และเทอร์โมเซตติง (Thermosetting)

2.3.1 เทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic)

คือพลาสติกประเภทค้ำรูป ที่รู้จักกันทั่วไปว่า พลาสติกอ่อน เป็นชนิดที่ถูกความร้อนแล้วจะหลอมตัวกลายเป็นของเหลวได้ พลาสติกชนิดนี้ มีโครงสร้างเป็นสายยาว ทำให้ทนต่อแรงดึงได้สูง เป็นพลาสติกที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก หลังจากนำไปหลอมทำเป็นผลิตภัณฑ์แล้ว โครงสร้างของพลาสติกประเภทนี้จะประกอบด้วยโมเลกุลเดี่ยวต่อกันเป็นสายยาว หรือแบบลูกโซ่ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของพลาสติกอาจเกิดได้ง่ายโดยการไหลเลื่อนระหว่างโมเลกุล ตัวอย่างเช่น พอลิธีน (Polythene) พอลิไวน์ลิวคลอไรด์ (polyvinyl chloride) พอลิสไตรีน (Polystyrene) พอลิโพรไพลีน (Polypropylene) และไนลอน (Nylon) เป็นต้น

2.3.2 เทอร์โมเซตติง (Thermosetting plastic)

คือพลาสติกประเภทค้ำรูป หรือที่รู้จักกันทั่วไปว่า พลาสติกแข็ง คือพลาสติกที่มีรูปทรงถาวรซึ่งผ่านกรรมวิธีการผลิตโดยใช้ความร้อน หรือแรงอัดขึ้นรูปแต่เมื่อเย็นตัวลงจะไม่สามารถทำให้อ่อนตัวโดยใช้ความร้อนหรือนำไปหลอมละลายขึ้นรูปใหม่ได้อีก โครงสร้างของพลาสติกแบบค้ำรูปจะมีการเกาะตัวของโมเลกุลเป็นแบบตาข่าย หรือร่างแห เวลาได้รับความร้อนจะไม่ยึดหรือหดตัวแต่จะเกิดพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ยึดระหว่างโมเลกุลขึ้น ฟีนอล-ฟอร์มัลดีไฮด์เรซิน (phenol-formaldehyde resin) ยูเรีย-ฟอร์มัลดีไฮด์เรซิน (urea-formaldehyde resin) และ เมลามีน-ฟอร์มัลดีไฮด์เรซิน (melamine-formaldehyde resin) เป็นต้น

2.4 ปัญหาสิ่งแวดล้อมเนื่องจากการใช้พลาสติก

เนื่องจากพลาสติกเป็นวัสดุที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านบรรจุภัณฑ์ชนิดต่างๆ เช่น บรรจุภัณฑ์อาหาร ซึ่งมีอายุการใช้งานค่อนข้างสั้น จึงเป็นสาเหตุทำให้ปริมาณขยะพลาสติกเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยมีรายงานว่าการผลิตพลาสติกในปี 2009 มีปริมาณกว่า 230 ล้านตันทั่วโลกและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง (European Commission: Plastic waste in the environment – Final Report, 2011) และเนื่องจากพลาสติกไม่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ จึงทำให้มีปริมาณขยะพลาสติกสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ กลายเป็นปัญหามลภาวะสิ่งแวดล้อม โดยในปี 2005 U.S. Environmental Protection Agency (EPA) ระบุว่า ประเทศสหรัฐอเมริกาทิ้งขยะพลาสติกกว่า 4.4 ล้านตันต่อปี มีเพียง 5.7% เท่านั้นที่ถูกนำมารีไซเคิล และส่วนที่เหลือก็เป็นขยะสะสมในสิ่งแวดล้อม บางส่วนปะปนในแหล่งน้ำ (Barry, 2009) นอกจากนี้ วัตถุประสงค์ในการผลิตพลาสติกคือน้ำมันปิโตรเคมี ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานมีค่าที่ใช้แล้วหมดไป ใช้เวลานานในการสร้างขึ้นมาทดแทนทำให้มีปริมาณลดลงเรื่อยๆ และอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกยังทำให้เกิดแก๊สเรือนกระจก ซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะโลกร้อนที่อุบัติขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีระดับความรุนแรงสูงขึ้นจึงทำให้ทั่วโลกต่างตระหนักถึงความสำคัญในการมุ่งแก้ไขปัญหานี้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวัสดุชนิดอื่นขึ้นมาเพื่อทดแทนการใช้พลาสติก โดยมุ่งเน้นไปที่วัสดุที่มีคุณสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับพลาสติก และสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติ

2.5 พลาสติกย่อยสลายได้

คือพลาสติกที่ถูกออกแบบมาเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีภายใต้สภาวะแวดล้อมที่กำหนดไว้เฉพาะ ซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียสมบัติบางประการ สามารถจัดการย่อยสลายได้โดยใช้วิธีการทดสอบมาตรฐานที่เหมาะสมสำหรับพลาสติกผลการทดสอบสามารถนำมาใช้ในการระบุชนิดและประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้ องค์กรในต่างประเทศหลายๆ องค์กรได้ดำเนินการจัดทำมาตรฐานวิธีการทดสอบและการรับรองการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ เช่น ISO (International Organization for Standardization) ASTM (American Society for testing and material) DIN (Deutsches Institut für Normung or German Institute for Standardization) JIS (Japan Industrial Standard) ORCA (Organic Reclamation and Composting Association, Belgium) และ ISR (Institute for Standard Research) ซึ่งกำหนดมาตรฐานสำหรับรับรองการย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradability) ในระดับนานาชาติในปัจจุบันนี้มีรายละเอียดที่ ใกล้เคียงกัน จะมีความแตกต่างกันเล็กน้อยในเรื่ององค์ประกอบ วิธีการทดสอบ และคุณสมบัติเพื่อผ่านการรับรองการย่อยสลายทางชีวภาพ อย่างไรก็ตาม

มาตรฐานเหล่านี้ ล้วนมีส่วนหลัก ที่คล้ายคลึงกัน อาทิ การ วัดความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradability) การวัดความสามารถ ในการแตกเป็นชิ้นเล็กๆ (Disintegration) ของวัสดุทดสอบในสภาวะหมักปุ๋ย (Compost) และการประเมินการย่อยสลายเบื้องต้น รวมถึงปริมาณ โลหะหนัก ตลอดจนการวิเคราะห์คุณภาพ และความเป็นพิษต่อระบบนิเวศน์ของปุ๋ยที่ได้จากการหมัก (Ecotoxicity of the compost)

การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพโดยทั่วไปมักใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 6 เดือน เช่น มาตรฐาน ASTM 5338 กำหนดไว้ว่าพลาสติกที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์เพียง 1 ชนิด จะต้องเกิดการย่อยสลายอย่างน้อย 60% โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารประกอบ โมเลกุลเล็ก เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ สารประกอบอินทรีย์ สารชีวมวล ภายใต้สภาวะการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์แบบใช้ออกซิเจนภายในเวลา 6 เดือน และสำหรับพอลิเมอร์ผสมต้องเกิดการย่อยสลาย 90% และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นสารปรับสภาพดินได้ และต้องไม่มีความเป็นพิษต่อพืชและสัตว์ จึงจะจัดชื่อว่าเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และสามารถกำจัดได้โดยกระบวนการหมักขยะอินทรีย์ เมื่อตัวอย่างได้ผ่านการทดสอบ ตามมาตรฐานและมีสมบัติเป็นไปตามที่มาตรฐานกำหนด จะได้รับอนุญาตให้ติดสัญลักษณ์ที่แสดงว่าเป็นผลิตภัณฑ์ ที่มีสมบัติย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เช่น OK compost ของประเทศเบลเยียม compostable DIN CERTCO ของประเทศเยอรมนี Compostable ของประเทศสหรัฐอเมริกา และ PBS GreenPla ของประเทศญี่ปุ่น (ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553)

2.6 ประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้

พลาสติกที่ย่อยสลายได้ สามารถจำแนกตามกลไกของการย่อยสลายได้ดังต่อไปนี้ (ชนาวดี ลีจากภัย, 2549)

2.6.1. พลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradable plastic)

คือพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในสิ่งแวดล้อม โดยจะถูกย่อยสลายเป็น ชีวมวล น้ำ แก๊สมีเทน และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการดำรงชีวิต และการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เช่น มันสำปะหลัง อ้อย และข้าวโพดเป็นต้น การย่อยสลายของพลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพจะเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะที่เหมาะสม คือมีแบคทีเรียและเอนไซม์ เช่น ในสภาวะถูกฝังกลบ ดังนั้น พลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพจะไม่เกิดการย่อยสลายไปในขณะที่ใช้งาน โดยในปัจจุบัน การใช้พลาสติก

ย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีแนวโน้มที่ดีขึ้นเรื่อยๆ และมีการใช้พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ยกตัวอย่าง เช่น พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid, PLA) ซึ่งเป็นพลาสติกที่ผลิตจากแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดผ่านกระบวนการทางชีวเคมีในการเปลี่ยนสภาพให้เป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และ พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) ซึ่งเป็นพลาสติกที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์จุลินทรีย์ นอกจากนี้พลาสติก 2 ชนิดนี้แล้ว ยังมีพลาสติกย่อยสลายได้อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นที่นิยมในตลาดเช่นกัน คือ พอลิบิวทิลีน อดิเพต-โค-ทาเรพทาเลต (Poly(butylene adipate-co-terephthalate) ที่ผลิตโดยบริษัท BASF ประเทศเยอรมนี เป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตจากวัตถุดิบปิโตรเคมี ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้เช่นเดียวกัน (Shiro, 2008)

2.6.2. พลาสติกชนิดย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative Degradation Plastic)

คือพลาสติกที่ย่อยสลายโดยปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนลงในโมเลกุลของพอลิเมอร์ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติ และไม่ต้องพึ่งพาลูซิโนส เป็นปฏิกิริยาที่มีออกซิเจนและความร้อน แสงยูวี หรือแรงทางกลเป็นปัจจัยสำคัญ โดยแสงและความร้อนจะทำให้ หมู่ ROOH แตกตัวกลายเป็นอนุมูลอิสระ RO และ OH ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยาต่อที่พันธะเคมีในสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลอย่างรวดเร็ว ในปัจจุบันด้วยเทคโนโลยีการผลิตที่ได้รับการวิจัยและพัฒนาขึ้น ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนได้เร็วขึ้นภายในเวลาที่กำหนด โดยการเติมสารเติมแต่งที่เป็นเกลือของโลหะทรานสิชัน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการแตกตัวของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระทำให้สายโซ่พอลิเมอร์เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลรวดเร็วยิ่งขึ้น

2.6.3. พลาสติกย่อยสลายด้วยแสง (Photodegradable Plastic)

คือพลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้เมื่อสัมผัสกับรังสียูวี โดยจะเกิดการสลายตัวของพันธะกลายเป็นอนุมูลอิสระซึ่งไม่เสถียร ซึ่งเข้าทำปฏิกิริยาทำลายพันธะเคมีระหว่างคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ทำให้เกิดการขาดของสายโซ่ ในกระบวนการผลิตพลาสติกย่อยสลายด้วยแสง จะมีการเติมสารเติมแต่งที่มีความไวต่อแสงลงในพลาสติกหรือสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ให้มีหมู่ฟังก์ชันหรือพันธะเคมีที่ไม่แข็งแรงแตกหักง่ายภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) เช่น หมู่คีโตนอยู่ในโครงสร้าง อย่างไรก็ตามพลาสติกชนิดนี้ จะไม่สามารถถูกย่อยสลายภายใต้สภาวะที่ปราศจากรังสี UV เช่น ในบ่อฝังกลบขยะ หรือสภาวะแวดล้อมอื่นที่มีมืด หรือแม้กระทั่งชิ้นพลาสติกที่มีการเคลือบด้วยหมึกที่หนาบบนพื้นผิว ประเทศฝรั่งเศสใช้พลาสติกประเภทนี้ ปลูกบนทุ่งนาเพื่อเก็บเกี่ยวความร้อนในดินและเร่งผลผลิต อายุใช้งานของพลาสติกจะ

อยู่ระหว่าง 1-3 ปี จากนั้นจะถูกย่อยสลายปนไปกับดิน แต่พลาสติกชนิดนี้ต้องใช้ในภูมิภาคที่มีแสงแดดสม่ำเสมอ เพื่อให้สลายตัวตามอัตราที่คาดการณ์ได้ (Brandl และคณะ, 1990)

2.6.4. พลาสติกย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolytic Degradable Plastic)

คือพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้ โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ของพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์ เช่น พอลิเอสเทอร์ พอลิเอโนไฮโดรลิก พอลิคาร์บอเนต และพอลิยูรีเทน ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถแบ่งได้เป็นสองประเภท ได้แก่

2.6.4.1. ประเภทที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalytic hydrolysis) ซึ่งแบ่งได้เป็นสองแบบ คือ

2.6.4.1.1 แบบที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจากภายนอกโมเลกุลของพอลิเมอร์ เร่งให้เกิดการย่อยสลาย (External catalytic degradation) ซึ่ง ตัวเร่งปฏิกิริยาจากภายนอกมี 2 ชนิด คือ ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็น เอนไซม์ต่างๆ เช่น Depolymerase Lipase และ Esterase เป็นต้น และตัวเร่งปฏิกิริยาที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น โลหะแอลคาไลน์ เบส และกรด ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมในธรรมชาติ

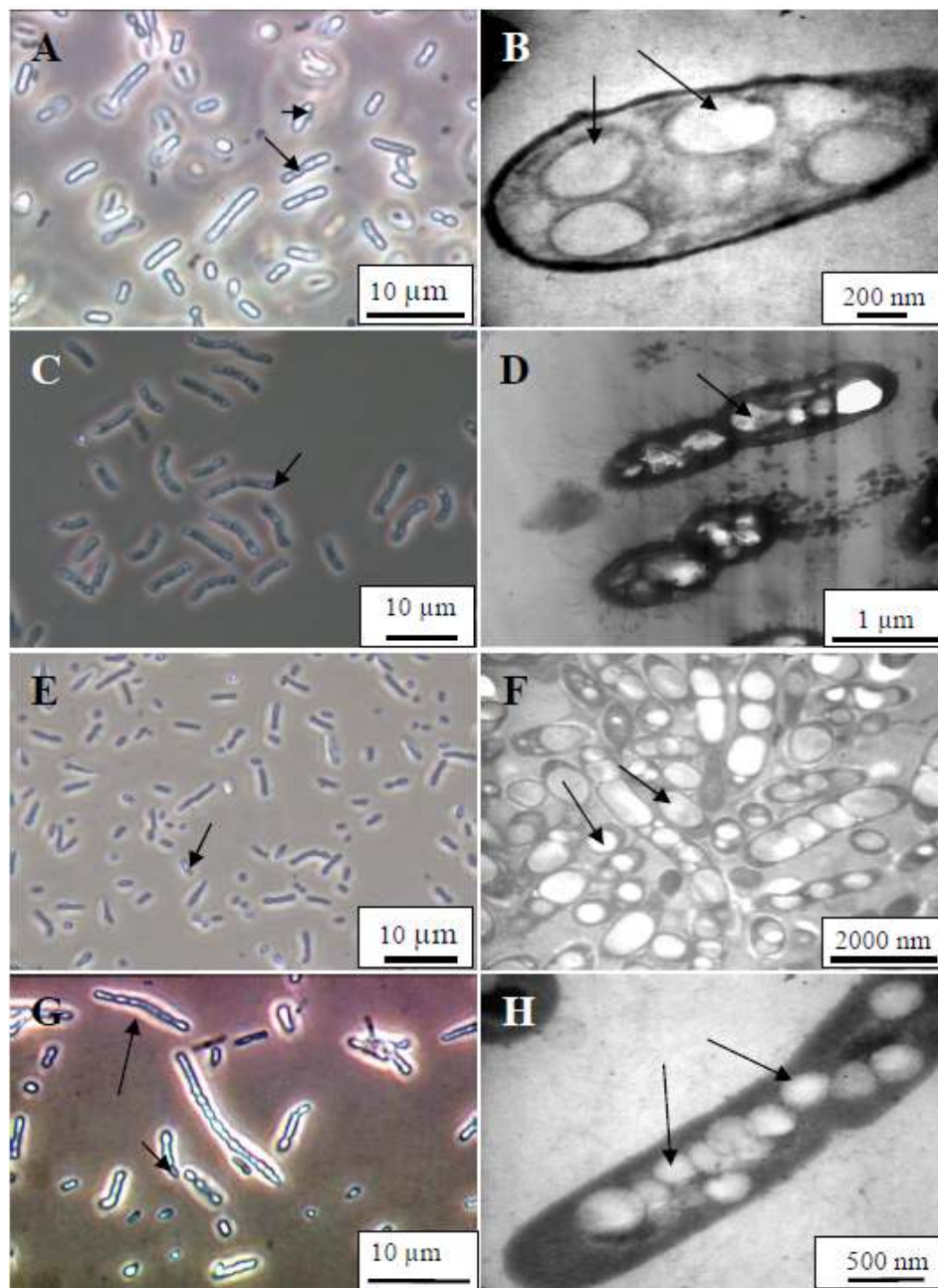
2.6.4.1.2 แบบที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์เองในการเร่งให้ เกิดการย่อยสลาย (Internal catalytic degradation) เป็นการใส่หมู่คาร์บอกซิลของหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์ บริเวณปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

2.6.4.2 ประเภทที่ไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (non-catalytic hydrolysis)

2.7 พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates, PHAs)

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) เป็นพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ และถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในสิ่งแวดล้อม (Steinbüchel, 1998) PHAs เป็นพอลิเมอร์ที่ชีวสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เรียกว่า 250 ชนิด ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Steinbüchel, 1992; Lenz et al., 1992) โดย PHAs ถูกเก็บสะสมไว้ในรูปของแกรนูลในไซโตพลาสซึมภายในเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองของเซลล์ ซึ่งปริมาณของแกรนูลจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะชีวสังเคราะห์ PHAs ภายใต้ภาวะที่ถูกจำกัดสารอาหารหรือปัจจัย

บางอย่าง เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือ ออกซิเจน แต่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป (Medison and Huisman, 1999)



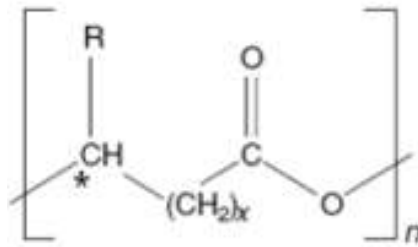
รูปที่ 2.1 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน แสดงให้เห็นแกรนูลของ PHAs ภายในเซลล์ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ *C. naccator* (A) *D. adidovorana* (B) *B. megaterium* MCI (C,D) ทรานส์ฟอร์มเม้นท์ *C. naccator* PHB⁻4 (pBBR1MCS-Csp2) (E,F) แกรนูลของ P(3HB-co-3HHx) และ P(3HB-co-3HV) ในเซลล์ของ *C. naccator* PHB⁻4/pBBREE32d13 (GH) (Medison and Huisman, 1999)

2.8 การค้นพบ PHAs

PHAs ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1888 โดย Beijerinck ซึ่งให้คำอธิบายว่า PHAs เป็นสารประกอบประเภทไขมันชนิดหนึ่ง (Chowdhury, 1963) Maurice Lamoigne (1925) นักจุลชีววิทยาชาวฝรั่งเศสได้ค้นพบแกรนูลภายในเซลล์ของ *Bacillus megaterrium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และพบว่าสารดังกล่าวเป็น ฮอมอพอลิเอสเทอร์ของกรดไฮดรอกซี คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) (Poly(3-hydroxybutyrate), PHB) จากนั้น Lamoigne และคณะ (1926) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ PHB และพบว่าสามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ และถูกสังเคราะห์ขึ้นได้โดยแบคทีเรียหลายชนิด Stanier และ Wilkinson (1959) รายงานว่าแกรนูลของ PHB ในเซลล์ของแบคทีเรีย ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสำรองสำหรับเซลล์และ PHB จะถูกสังเคราะห์ขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนสารอาหารบางชนิด หลังจากนั้นมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติของ PHAs ในหลายๆด้าน และพบว่า PHAs มีคุณสมบัติทางกายภาพที่หลากหลายขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ และชนิดของมอนอเมอร์ นอกจากนี้ Wallen และ Rohwedder (1974) ได้ค้นพบมอนอเมอร์ชนิด 3-ไฮดรอกซีเวอลาเรต (3-hydroxyvalerate, 3HV) และ 3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต (3-hydroxybutyrate, 3HB) ในแอคทิเวตเต็ด สลัดจ์ (activated sludge) โดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ในปี 1982 บริษัท Imperial Chemical Industries ในประเทศอังกฤษ เริ่มผลิต PHAs ในเชิงการค้า โดย PHAs ที่ผลิตได้เป็นพอลิเมอร์ชนิดโคพอลิเมอร์ ประกอบด้วยมอนอเมอร์สองชนิด คือ 3HV และ 3HB ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นโดยแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* มีชื่อทางการค้าว่า BIOPOL.

2.9 โครงสร้างของ PHAs

PHAs เป็นพอลิเมอร์ในกลุ่มพอลิเอสเทอร์สายตรง มีมอนอเมอร์คือกรดไฮดรอกซีแอลคาโนอิก จำนวนคาร์บอน 3-14 อะตอม ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นแบบ อะลิฟาติก และอะโรมาติก (Doi และคณะ, 1992; De Smet และคณะ, 1983) โดยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของมอนอเมอร์ตัวหนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซิลของมอนอเมอร์อีกตัวหนึ่ง ตรงตำแหน่งบิต้าคาร์บอนจะเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration แต่ละมอนอเมอร์จะเชื่อมต่อกันแบบหัวต่อหาง (head to tail configuration) เช่นเดียวกับ PP (Brandl และคณะ, 1990) แสดงในรูปที่ 2.2 PHAs มีความหลากหลายของมอนอเมอร์มากกว่า 100 ชนิด อีกทั้งยังสามารถพอลิเมอร์ไรซ์เป็นได้ทั้ง ฮอมอพอลิเมอร์ และเฮเทอโรพอลิเมอร์ จึงทำให้ PHA มีความหลากหลายและมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน (Reddy และคณะ, 2003)



*C แสดงตำแหน่งปีศาจคาร์บอน

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-ไฮดรอกซีวาลเอเรต)	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-ไฮดรอกซีอันเดคะโอเนต)	หรือ P(3HUD)
	R = โนทิล (C ₉ H ₁₉)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโดเดคะพิโอเนต)	หรือ P(3HDD)
n = 2	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ (4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	หรือ P(4HB)
n = 3	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ (5-ไฮดรอกซีวาลเอเรต)	หรือ P(3HV)

รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHA (ดัดแปลงจาก Brauneegg และคณะ, 2004)

2.10 การจัดจำแนกชนิด PHAs

2.10.1 การจัดจำแนกชนิดตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยมอนอเมอร์ (Lee และคณะ, 1996a; Yim และคณะ, 1996; Hazenberg และ Witholt, 1997; Song และคณะ, 2008)

2.10.1.1 PHAs ความยาวสายสั้น (Short-chain-length PHAs, SCL) คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยมอนอเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 3-5 อะตอม

2.10.1.2 PHAs ความยาวสายปานกลาง (Medium-chain-length PHAs, MCL) คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยมอนอเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 6-14 อะตอม

2.10.1.3 PHAs ความยาวสายยาว (Long-chain-length PHAs, LCL) คือพอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยมอนอเมอร์ ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมมากกว่า 14 อะตอม

2.10.2 การจัดจำแนกชนิดโดยแบ่งตามชนิดของมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์แบ่งเป็น 2 ประเภทดังนี้ (Luengo และคณะ, 2003)

2.10.2.1 สอมอพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน ตัวอย่างเช่น พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-3-hydroxybutyrate) และ พอลิ-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxyvalerate) เป็นต้น

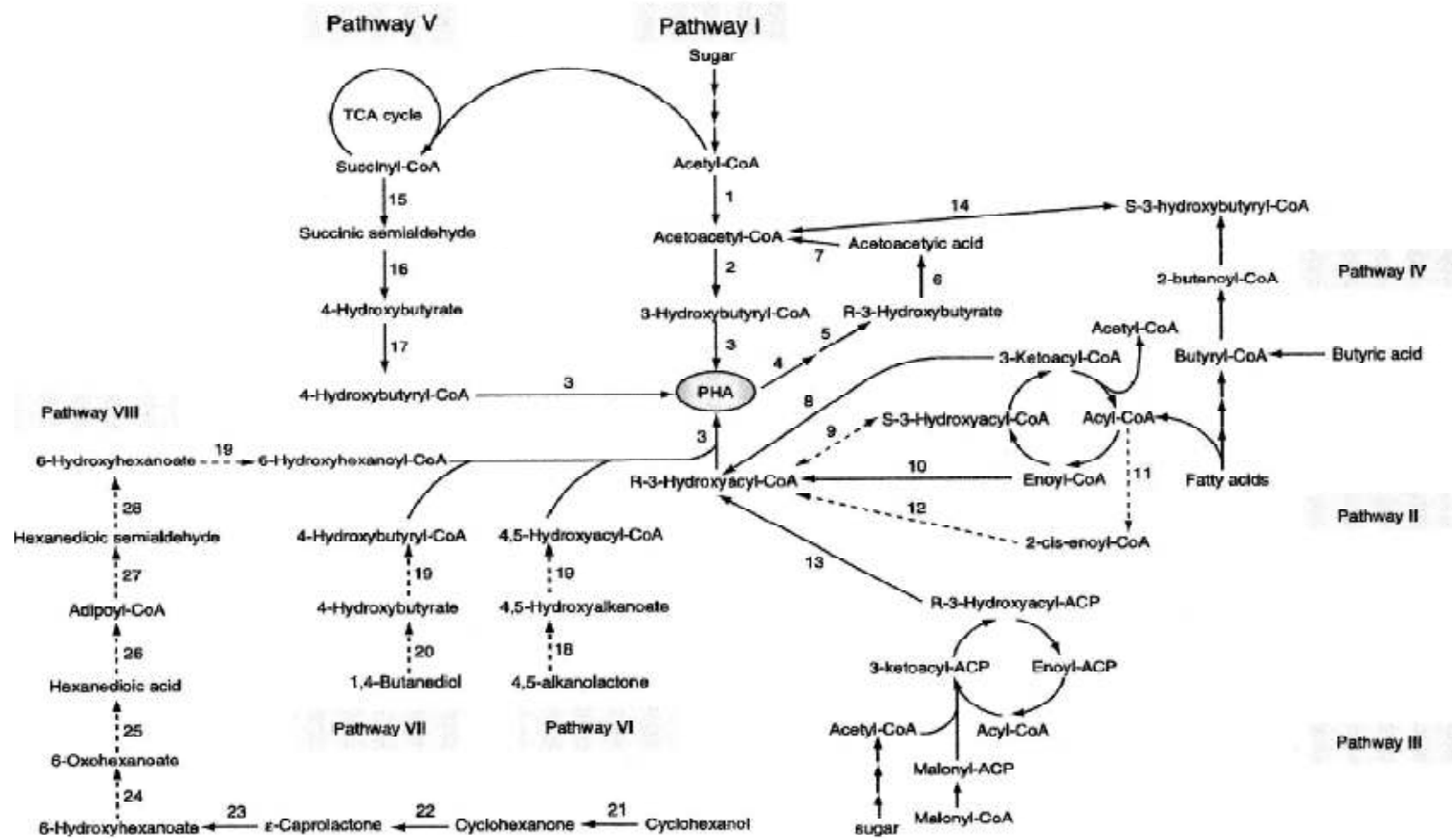
2.10.2.2 เฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนของมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบดังนี้

2.10.2.2.1 โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [polyhydroxy(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate); PHBV] เป็นต้น

2.10.2.2.2 เทอริพอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate); P(3HB-co-3HV-co-4HB)] (Chanprateep และ Kulpreecha, 2006)

2.11 การชีวสังเคราะห์ PHAs

มีรายงานการศึกษาวิถีการชีวสังเคราะห์ PHAs จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ จำนวนมาก (Anderson และ Dawes, 1990; Doi, 1990; Brunegg, 1998; Reddy และคณะ, 2003) พบว่าอะเซทิลโคเอ (acetyl-CoA) เป็นส่วนประกอบสำคัญที่จะทำให้เกิด 3-ไฮดรอกซีแอลคานอยล์โคเอ (3-hydroxyalkanoyl-CoA) ที่มีความยาวต่างกันขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นและเอนไซม์ที่จำเพาะในการสังเคราะห์ PHAs นอกจากนี้ 3-ไฮดรอกซีแอลคานอยล์โคเอ สามารถเกิดจากกระบวนการเบต้าออกซิเดชัน (β -oxidation) ของกรดไขมันได้เช่นกัน จากตารางที่ 2.1 มีเอนไซม์หลายตัวที่แสดงรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHA ทั้งทางตรงและทางอ้อม วิถีการชีวสังเคราะห์ PHA สรุปได้เป็น 8 วิถี แสดงในรูปที่ 2.3 (วิถีการชีวสังเคราะห์ PHA จากน้ำตาลคือวิถีที่ 1) และตารางที่ 2.1



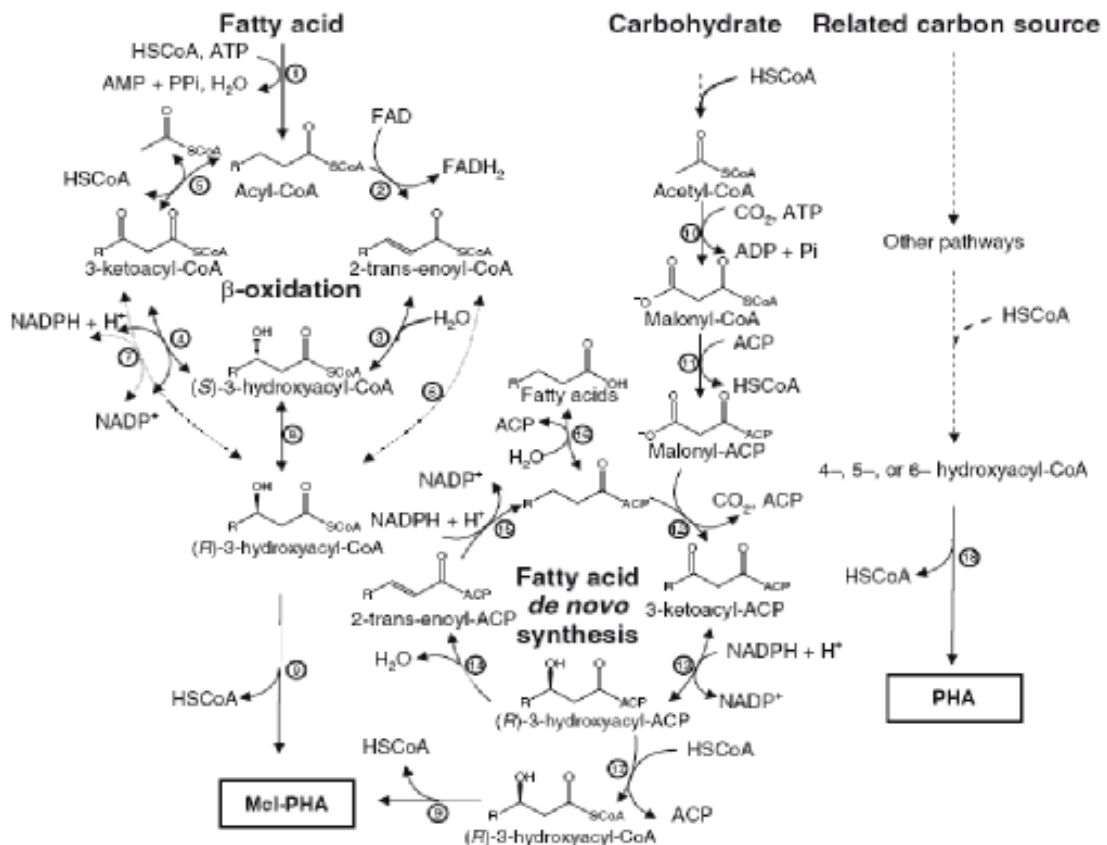
รูปที่ 2.3 วิธีการสังเคราะห์ PHAs ตัวเลขแสดงเอนไซม์ (หรือยีน) ที่เกี่ยวข้องในวิธีการสังเคราะห์แสดงในตารางที่ 2.1 (Chen, 2010b)

ตารางที่ 2.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHA (Chen, 2010b)

ตัวเลข	วิถีการสังเคราะห์	ตัวย่อ	เอนไซม์	สายพันธุ์	อ้างอิง
1	Pathway I	PhaA	β -Ketothiolase	<i>Ralstonia eutropha</i>	Sudesh และคณะ (2000)
2		PhaB	NADPH dependent acetoacetyl-CoA reductase		
3		PhaC	PHA synthase		
4	Associated way	PhaZ	PHA depolymerase	<i>Aeromonas hydrophila</i> 4AK4	Sudesh และคณะ (2000)
5			Dimer hydrolase	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 1317	
6			(R)-3-Hydroxybutyrate dehydrogenase	<i>R. eutropha</i>	
7	Pathway II		Acetoacetyl-CoA synthetase	<i>P. oleovorans</i>	Sudesh และคณะ (2000)
8		FabG	3-Ketoacyl-CoA reductase	<i>P. putida</i> KT2442,	
9			Epimerase	<i>A. hydrophila</i> 4AK4,	Mittendorf และคณะ (1998)
10		PhaJ	(R)-Enoyl-CoA hydratase/enoyl-CoA hydratase I	<i>P. aeruginosa</i>	
11			Acyl-CoA oxidase, putative		
12	Pathway III		Enoyl-CoA hydratase I, putative		
13		PhaG	3-Hydroxyacyl-ACP-CoA transferase	<i>P. mendocina</i> ,	Sudesh และคณะ(2000), Zheng และคณะ (2005), Taguchi และคณะ (1999)
	FabD	transacylase	recombinant <i>Escherichia coli</i>		

ตารางที่ 2.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHA (Chen, 2010b) (ต่อ)

ตัวเลข	วิถีการสังเคราะห์	ตัวย่อ	เอนไซม์	สายพันธุ์	อ้างอิง
14	Pathway IV		NADH-dependent acetoacetyl-CoA reductase	<i>Rhizobium</i> (Cicer) sp. CC 1192	Chohan และ Copeland (1998)
15		SucD	Succinic semialdehyde dehydrogenase	<i>Clostridium kluyveri</i>	Valentin และ Dennis (1997)
16		4hbD	4-Hydroxybutyrate dehydrogenase		Valentin และ Steinbüchel
17	Pathway V	OrfZ	4-Hydroxybutyrate-CoA:CoA transferase	Mutants and recombinant of	(1995)
18			Lactonase, putative	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Xie และ Chen (2008)
19	Pathway VI		Hydroxyacyl-CoA synthase, putative	<i>A. hydrophila</i> 4AK4	
20			Alcohol dehydrogenase, putative		Brzostowicz และคณะ (2002)
21	Pathway VII	ChnA	Cyclohexanol dehydrogenase	<i>Acinetobacter</i> sp. SE19, <i>Brevibacterium</i>	
22	Pathway VIII	ChnB	Cyclohexanone monooxygenases	<i>epidermidis</i> HCU	
23		ChnC	Caprolactone hydrolase		
24		ChnD	6-Hydroxyhexanoate dehydrogenase		
25		ChnE	6-Oxohexanoate dehydrogenase		
26			Semialdehyde dehydrogenase, putative		
27			6-Hydroxyhexanoate dehydrogenase, putative		
28			Hydroxyacyl-CoA synthase, putative		



รูปที่ 2.4 กระบวนการเมแทบอลิซึมของการชีวสังเคราะห์ mcl-PHA 1) acyl-CoA synthetase, 2) acyl-CoA dehydrogenase, 3) enoyl-CoA hydratase, 4) NAD-dependent (S)-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, 5) 3-ketoacyl-CoA thiolase, 6) (R)-specific enoyl-CoA hydratase, 7) NADPH-dependent 3-ketoacyl-CoA reductase, 8) 3-hydroxyacyl-CoA epimerase, 9) mcl-PHA polymerase, 10) acetyl-CoA carboxylase, 11) malonyl-CoA-acyl carrier protein (ACP) transacylase, 12) 3-keto-ACP synthase, 13) 3-keto-ACP reductase, 14) 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase, 15) enoyl-ACP reductase, 16) acyl-ACP thiolase, 17) (R)-3-hydroxyacyl-ACP-CoA transacylase, 18) mcl-PHA polymerase (Zinn, 2010)

2.12 แบคทีเรียที่ชีวสังเคราะห์ PHAs

แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHAs มีกว่า 250 สายพันธุ์ ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งจะสังเคราะห์ PHAs ขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้สภาวะที่ถูกจำกัดสารอาหารบางชนิด แต่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป โดย PHAs ที่สังเคราะห์ขึ้นจะถูกเก็บสะสมไว้ในไซโทพลาซึม ภายในเซลล์ในรูปของแกรนูล ซึ่งปริมาณ PHAs จะมีค่ามากหรือน้อยนั้น ส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์ของแบคทีเรียและแหล่งคาร์บอนที่ใช้ แม้แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้จะมีหลากหลายสายพันธุ์ แต่มีแบคทีเรียไม่กี่สายพันธุ์เท่านั้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ PHAs ในระดับอุตสาหกรรม ยกตัวอย่างเช่น *Alcaligenes latus* ซึ่งได้รับการจัดจำแนกใหม่เป็น *Azohydromonas lata* (Xie และ Yokota, 2005) , *B. Megaterium* , *C. necator* และ *P. oleovorans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย เช่น น้ำมันพืช หรือแม้กระทั่งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้ต่างชนิดกัน โดยอาจเป็นได้ทั้ง มอนอเมอร์หรือฮอโมพอลิเมอร์ ขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ แสดงดังตารางที่ 2.2 ยกตัวอย่างเช่น *A. eutrophus* เป็นแบคทีเรียที่ผลิต PHB ซึ่งเจริญได้ดีเมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาล และเอทานอล และจะสามารถผลิต PHAs ชนิด P3HB-co-HV ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ได้ เมื่อมี โพรพิโอเนต (propionate) หรือ วาเลอเรต (valerate) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Byrom, 1987; Holmes, 1985)

Azohydromonas lata เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนสั้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.2-2.4 ไมโครเมตร และยาว 1.6-2.4 ไมโครเมตร *A. lata* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดในการผลิต PHB รวมทั้งแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครส เช่น น้ำเชื่อมข้าวโพด กากน้ำตาล อ้อย และ กากน้ำตาลจากหัวบีท เป็นต้น และสามารถสะสม PHB ภายในเซลล์ได้ในปริมาณมาก โดยจาก United States Patent Number 4,957,861 (Lafferty et al., 1990) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *A. lata* ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 25 กรัมต่อลิตร และมีค่าการละลายออกซิเจนในช่วง 25-35% ปรับค่าความเป็นกรดเบสที่ 7 ด้วย 10% NaOH โดยมีการเติมซูโครสและแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม พบว่าภายในเวลา 37 ชั่วโมงได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 48.1 กรัมต่อลิตรที่มี PHB สะสมอยู่ 70.2% คิดเป็นค่าสัมประสิทธิ์ปริมาณผลิตชีวมวล (yield coefficient $Y_{X/S}$, g of cell dry weight/ g of sucrose consumed) เท่ากับ 0.45 นอกจากนี้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แบคทีเรียสามารถใช้ green syrup ที่มีปริมาณซูโครส 59% และ beet molasses ที่มีปริมาณซูโครส 44% เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตและผลิต PHB ได้สูงถึง 74% Chen (1991) รายงานว่า *A. lata* เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้รวดเร็วในอาหารที่มีซูโครส กลูโคส และ โมลาส สามารถสะสม PHB ได้สูงถึง 90% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและสามารถใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมในการผลิต PHB นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้ยังเคยถูกรับเลือกให้ใช้ในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรมของ

บริษัท Chemie Linz ประเทศ Austria รายงานการผลิต PHB ในปริมาณ 1000 กิโลกรัมต่อสัปดาห์ในถังหมัก ขนาด 15 m³ โดยใช้ *A. lata* DSM 1124 (Harbak, 1992)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการผลิต PHAs ชนิดต่างๆ (Braunegg และคณะ, 2002)

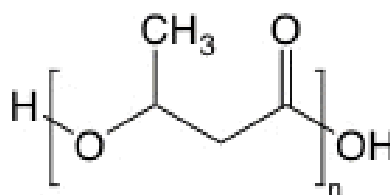
แบคทีเรีย	ชนิดของ PHAs	แหล่งคาร์บอน	อ้างอิง
<i>Ralstonia eutropha</i>	PHB, PHBV P3HB-co-4HB P3HB-co-3HV-co-5HV P3HB-co-4HB-co-3HV P3HB-co-3WHB-co-4HV P4HB		Stageman, 1984 Saito และคณะ, 1993 Doi และคณะ, 1987 Kunioka และคณะ, 1988 Valentin และคณะ, 1992 Nakamura และคณะ, 1992
<i>Alcaligenes latus</i>	PHB PHBV P3HB-co-3propionate P3HB-co-4HB		Hiramitsu และคณะ, 1993 Hiramitsu และคณะ, 1993 Palleroni และคณะ, 1987 Chen และคณะ, 1991
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P3HB-co-3HV		Nakamura และคณะ, 1992
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Copolymer 3HB +3HV+3H4-pentenoate	4-Pentanoic acid or pentanoic acid Sodium valerate	Ulmer และคณะ, 1994
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Poly3HV homopolymer	1,4-Butanediol	Steinbüchel และคณะ, 1993

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการผลิต PHAs ชนิดต่างๆ (Braunegg และคณะ, 2002) (ต่อ)

แบคทีเรีย	ชนิดของ PHAs	แหล่งคาร์บอน	อ้างอิง
<i>Delftia acidovorans</i>	P(3HB-co-4HB)	Methanol + 3-	Fuchtenbusch และคณะ
<i>Methylobacterium</i>	copolymer	hydroxypropinoate	, 1996
<i>Comomonas testosterone</i>	P(3HB-co-4HB) copolymer		Kang และคณะ 1993
<i>Sphaerotilus natans</i>	P3HB-co-Hcaproate P3HB-co-Hcaproate- co-Hoctanoate P3HB-co-3HV	Glucose+sodium propionate	Caballero และคณะ, 1995 Takeda และคณะ, 1995

2.13 พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB)

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต), [Poly-(3-hydroxybutyrate), PHB], จัดเป็น PHA ชนิดฮอโมพอลิเมอร์สายตรง ที่มีมอนอเมอร์คือกรดไฮดรอกซีบิวทีริก มีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 สูตร โครงสร้างทางเคมีของ PHB (Byrom และคณะ, 1993)

PHB เป็นเทอร์โมพลาสติก ที่มีคุณสมบัติทางกายภาพที่คล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์อย่างเช่น พอลิโพรพิลีน ดังแสดงใน ตารางที่ 2.3 PHB มีปริมาณผลึกในโครงสร้างสูง (ร้อยละ 60 - 80) จึงทำให้พอลิเมอร์มีความต้านทานต่อตัวทำละลายต่างๆ ดีมาก และมีความต้านทานต่อไขมันและน้ำมันปานกลางถึงดี PHB มีความหนาแน่น 1.23 - 1.25 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร PHB ที่มีความหนาแน่นต่ำจะมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน ส่วน PHB ที่มีความหนาแน่นสูงจะสามารถตกผลึกได้ (Philip และคณะ, 2007) มีจุดหลอมเหลวที่แปรผันระหว่าง

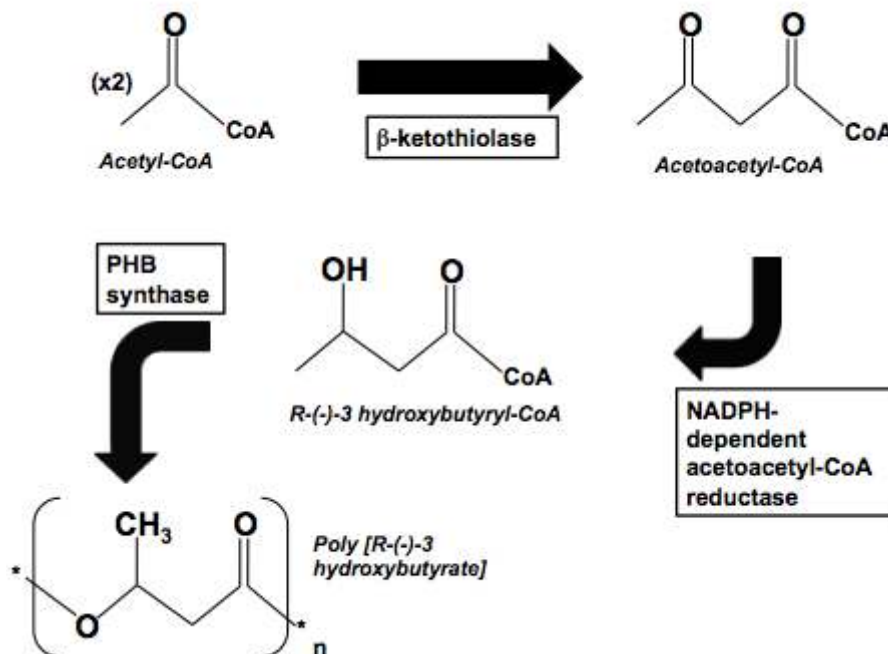
171 - 182 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีความต้านทานต่อรังสีUVได้ดี แต่ไม่ทนต่อสารละลาย เนื่องจาก PHB มีการแพร่ผ่านของก๊าซออกซิเจนต่ำ จึงสามารถนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ไวต่อออกซิเจนได้ดี อย่างไรก็ตาม PHB ก็มีข้อจำกัดในการนำไปใช้งานคือ PHB มีลักษณะที่ค่อนข้างแข็งและเปราะ (Ojumu et al., 2004) ดังนั้น Savenkova และคณะ (1999) จึงทำการศึกษาเกี่ยวกับการปรับปรุงคุณสมบัติของ PHB และพบว่า การผสมพลาสติกไซเซอรอล เช่น พอลิเอทิลีน ไกลคอล (Polyethylene glycol) และ ออกซีโพรไพเลท กลีเซอรอล (Oxypropylated glycerol) กับ PHB สามารถปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของ PHB ให้มีความยืดหยุ่นมากขึ้น จึงยืนยันได้ว่า PHB สามารถพัฒนาเป็น PHB คอมโพสิต (composite) เพื่อประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้ ซึ่งเป็นแนวทางในการหลีกเลี่ยงปัญหาสิ่งแวดล้อมที่มีสาเหตุมาจากขยะพลาสติก เนื่องจาก PHB ถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติ

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางกายภาพของ PHB เทียบกับคุณสมบัติทางกายภาพของ Polypropylene (Jogdand, 2004)

สมบัติทางกายภาพ	PHB	Polypropylene (PP)
อุณหภูมิหลอมเหลว (°C)	171-182	171-186
อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (°C)	5-10	-15
ระดับความเป็นผลึก (%)	65-80	65-70
ความหนาแน่น (g·cm ⁻³)	1.23-1.25	0.905-0.94
น้ำหนักโมเลกุล (10 ⁻⁵)	1-8	2.2-7
การกระจายของน้ำหนักโมเลกุล	2.2-3	5-12
โมดูลัสของการโค้งงอ (GPa)	3.5-4	1.7
ความทนต่อแรงดึง (MPa)	40	39
การยืดที่จุดขาด (%)	6-8	400
การต้านทานรังสีUV	ดี	ไม่ดี
ความทนต่อสารละลาย	ไม่ดี	ดี
การซึมผ่านของออกซิเจน (cm ³ m ⁻² atm ⁻¹ d ⁻¹)	45	1700
การถูกย่อยสลายในธรรมชาติ	ดี	-

2.14 การชีวสังเคราะห์ PHB

ในวิถีการชีวสังเคราะห์ PHB มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง 3 ชนิดด้วยกัน คือ เอนไซม์บีต้าคีโตไทโอเลส (β -ketothiolase) เอนไซม์อะซีทิลโคเอ รีดักเทส (Acetyl-CoA reductase) และเอนไซม์ PHB พอลิเมอร์เรส (PHB polymerase) โดยการทำงานของเอนไซม์ทั้งสามชนิดจะถูกควบคุมโดย *pha* CBA cluster (Reddy และคณะ, 2003) การชีวสังเคราะห์ PHB ภายในเซลล์ เป็นการบวนการเมทาบอลิซึม เริ่มจากสารตั้งต้นคือ อะซีทิล โคเอ (Acetyl CoA) 2 โมเลกุลรวมตัวกัน โดยมีเอนไซม์บีต้าคีโตไทโอเลสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้เป็น อะซีโอะอะซีทิลโคเอ (Acetoacetyl CoA) ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ไปเป็น 3-ไฮดรอกซีบิวทิลโคเอ (3-hydroxybutyryl CoA) โดยการเร่งปฏิกิริยาจากเอนไซม์อะซีทิลโคเอ รีดักเทส ซึ่งต่อมากจะถูกพอลิเมอร์ไรซ์เป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB พอลิเมอร์เรส (Anderson และ Dawes, 1990; Doi, 1999; Braunegg, 1998) ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 วิถีการสังเคราะห์ PHB (Reemer, 2009)

ในภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ คาร์โบไฮเดรตจะถูกคะตาบอลิซ์โดยวิถี Entner-Doudoroff ได้เป็นไพรูเวท (Pyruvate) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน (Hydrogenation) เปลี่ยนเป็นอะซีทิลโคเอ และเข้าสู่วิถี TCA ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ATP FADH₂ NADH และ NADPH ซึ่งเป็นพลังงานและสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน

ปริมาณอะซีทิลโคเอที่จะเข้าสู่ วิถี TCA ขึ้นกับปริมาณแร่ธาตุบางชนิด เช่น ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัส โดยในภาวะที่ขาดแคลนแร่ธาตุ จะส่งผลทำให้ไม่เกิดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้ NADH และ NADPH เพิ่มปริมาณมากขึ้น และไปยับยั้งเอนไซม์ซิเตรทซินเทส (Citrate synthase) และ เอนไซม์ ไอโซ

ซีเตรท ดีไฮโดรจีเนส (Isocitrate dehydrogenase) ทำให้อะซีทิลโคเอเข้าสู่วิถี TCA น้อยลง และเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB มากขึ้น (Doi, 1990; Brauneegg และคณะ, 1998)

2.15 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHB

คาร์บอนนับเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการสร้างเซลล์และพลังงาน ในการผลิต PHB คาร์บอนจึงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการพิจารณาให้เหมาะสม Yamane (1992) รายงานว่า แหล่งคาร์บอนนับเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ต้นทุนในการผลิต PHB ก่อนข้าวสูง โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHB นั้นมีมากมายหลายชนิด การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต้องคำนึงถึงความสามารถของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต และผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ผลิต PHB ได้มี 4 ประเภท ได้แก่ (Lee 1996, fernandez และคณะ 2005)

1. คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาล เช่น กลูโคส ซูโครส และฟรุกโตส
2. อัลเคน (alkane) ได้แก่ สารประกอบแอลเคน ที่มีคาร์บอน 3 – 10 อะตอม เช่น น้ำมันพืชชนิดต่างๆ
3. แอลกอฮอล์ เช่น กลีเซอรอล และ เอทานอล
4. กรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 3 อะตอมขึ้นไป

ประสิทธิภาพในการผลิต PHB ของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆมีผลต่อต้นทุนการผลิต PHB ด้วย เช่นเดียวกัน ตารางที่ 2.4 แสดงราคาของแหล่งคาร์บอนและผลผลิต PHB ตามทฤษฎี (Theoretical yield) ซึ่งส่งผลต่อราคา PHB

ตารางที่ 2.4 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อราคา PHB (Lee, 1996)

แหล่งคาร์บอน	ราคาโดยประมาณ (Approximate price, USD/kg)	ผลผลิต PHB (gPHB/gSubstrate)	ราคาแหล่งคาร์บอน (Substrate cost, USD/kgPHB)
กลูโคส	0.493	0.038	1.3
ซูโครส	0.290	0.40	0.72
เมทานอล	0.180	0.43	0.42
กรดแอซติก	0.595	0.38	1.56
เอทานอล	0.502	0.50	1.00
กากน้ำตาลอ้อย	0.220	0.42	0.52
หางนมจากการผลิตชีส	0.071	0.33	0.22
ไฮโดรไลเสทของ เฮมิเซลลูโลส	0.069	0.20	0.34

ทุกวันนี้ นักวิจัยหันมาสนใจเทคโนโลยีในการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก และสามารถผลิตได้เองภายในประเทศมาเป็นวัตถุดิบดังแสดงในตารางที่ 2.5 เพื่อลดต้นทุนการผลิต ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง โดยมุ่งเน้นไปที่ผลิตผลจากการเกษตรหรือของเสียจากอุตสาหกรรมการเกษตรที่หาได้ง่ายตลอดปี และมีมากในท้องถิ่น เช่น น้ำตาลที่ผลิตจากอ้อย ข้าวโพด แป้ง (Lee และคณะ, 1999; Shahhosseini, 2004; Tian และคณะ, 2009) หรือของเสียที่ได้จากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น กากน้ำตาลอ้อย หางนมซึ่งเป็นของเสียจากโรงงานผลิตชีส และ น้ำมันพืชที่เหลือจากการทอด เป็นต้น ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นวัตถุดิบที่มีราคาต่ำ และหาได้ง่าย จึงเหมาะสมในการนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB (Lee, 1996; Choi และ Lee, 1996; Verlinden และคณะ, 2011) ดังรายงานของ Choi และ Lee (1999) ที่ศึกษาการผลิต PHB จาก ริกอมบีแนนท์ *E. Coli* พบว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสซึ่งราคา 0.5 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ต้นทุนการผลิต PHB จะเท่ากับ 4.91 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม แต่เมื่อใช้ไฮโดรไลเสทของแป้งข้าวโพด ที่มีราคา 0.22 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัมเป็นแหล่งคาร์บอน ต้นทุนการผลิต PHB ลดลงเป็น 3.72 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม

อย่างไรก็ตาม แบบที่เรียส่วนใหญ่แม้สามารถใช้ผลิตผลทางการเกษตร หรือของเสียเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ได้ แต่อัตราการผลิต PHB และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ มักจะต่ำกว่า การผลิต PHB โดยใช้แหล่งคาร์บอนบริสุทธิ์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต โดยการหาภาวะที่เหมาะสม ซึ่งทำได้โดยศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิต PHB

สำหรับประเทศไทยนั้น นับเป็นประเทศที่ผลิตน้ำตาลอ้อยได้เป็นอันดับสี่ของโลก ทำให้ผลิตภัณฑ์ต่างๆที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สามารถหาได้ง่ายและมีอยู่ตลอดฤดูกาลในประเทศไทย ดังนั้นการใช้ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการผลิตน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนจึงเป็นแนวทางที่จะช่วยลดต้นทุนการผลิต PHB และยังเป็นแนวทางในการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับอุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยได้อีกด้วย โดยในแต่ละกระบวนการผลิตน้ำตาลอ้อยนั้น จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน แต่มีองค์ประกอบหลักคือน้ำตาลซูโครส ซึ่งมีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ได้

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างรายงานการผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์จุลินทรีย์	PHAs โมโนเมอร์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	PHAs (g/L)	ปริมาณ PHAs (wt %)	อ้างอิง
Hydrolyzed corn oil	<i>Pseudomonas putida</i>	mcl-PHAs	103	28	27.2	Shang และคณะ, 2008 Koller และคณะ, 2008
Whey	<i>P. hydrogenovora</i>	PHB	5	1.27	30	Albuquerque และคณะ, 2007
Sugar cane molasses	Mixed bacteria	PHBV				Solaiman และคณะ, 2006
Soy molasses	<i>P. corrugate</i>	P(HDD-HO-HTDE)	3.6		5-17	Chen และคณะ, 2006
Enzymatic extruded starch	<i>Haloferax mediterranei</i>	PHBV	39.4	20	50.8	Goff และคณะ, 2007
Petrochemical plastic waste	<i>P. putida</i> CA-3		1.14	0.84	43	Bengtsson และคณะ, 2008
Paper mill wastewater	Activated sludge	PHBV				Yu และคณะ, 2008
Bagasse hydrolysates	<i>Ralstonia eutropha</i>	PHB	11.1±0.4	94	48.2	Haas และคณะ, 2008
Waste tomato starch	<i>R. eutropha</i> NCIMB 11599	PHB	179		56.5±0.5	Singh และ Mallick, 2009
Wheat bran	<i>P. aeruginosa</i> MTCC 7925	P(3HB-co-3HV-co-3HHD-co-3HOD)	0.168		12.5	

Chanprateep และคณะ (2010) รายงานการผลิต PHB จากน้ำตาลทรายโดย *Ralsonia eutropha* สายพันธุ์ 04 ในระดับขวดเขย่า แหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบในการทดลองนี้คือ น้ำตาล ทรายขาว น้ำตาล ทรายแดง น้ำตาลกรวด น้ำตาลมะพร้าว น้ำตาลตะไคร้ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ ภายในประเทศเนื่องจากประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกน้ำตาลทรายรายใหญ่ของโลก ทั้งนี้เพื่อลด การใช้แหล่งคาร์บอนที่ต้องนำเข้า จากต่างประเทศเพื่อให้เป็นการพัฒนาที่ยั่งยืน จากรายงานก่อนหน้านี้นี้พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด สำหรับ *R. eutropha* สายพันธุ์ 04 คือ ฟรักโตส

การทดลองนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นในระดับขวดเขย่าเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับปรุง กระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจากน้ำตาลธรรมชาติที่ผลิตในประเทศไทย โดยเลี้ยง จุลินทรีย์ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตรที่มีอาหารเพื่อการผลิตปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผลการศึกษาแสดง ในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 การผลิต PHB จากน้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลกรวด น้ำตาลมะพร้าว น้ำตาลตะ ไคร้ โดย *R.eutropha* สายพันธุ์ A-04 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต 60 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศา เซลเซียส (Chanprateep และคณะ, 2010)

น้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัมต่อลิตร)	จำนวนการเติม ครั้ง	ชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	PHB (% w/w)
น้ำตาลทรายขาว				
20 g/l	0.1	1 ครั้ง	2.9	21
4 g/l	0.02	5 ครั้ง	4.5	40
น้ำตาลทรายแดง				
20 g/l	0.1	1 ครั้ง	3.1	17
น้ำตาลกรวด				
20 g/l	0.1	1 ครั้ง	2.9	5
น้ำตาลตะไคร้				
20 g/l	0.1	1 ครั้ง	3.4	9
น้ำตาลมะพร้าว				
20 g/l	0.1	1 ครั้ง	3.6	7

ผลวิจัยสรุปว่าเมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 สามารถใช้น้ำตาลที่นำมาใช้ทดสอบได้แต่มีการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตที่ต่ำ ผลการทดลองโดยสรุปคือน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวโดยใช้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 2.9 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตที่ผลิตได้สูงสุด 21% (โดยน้ำหนัก) จากการวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟี พบว่าพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตที่ผลิตได้คือ PHB ในการทดลองต่อมาเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำตาลทรายขาวเป็น 4 กรัมต่อลิตรโดยแบ่งเติมทุก 12 ชั่วโมง (รวม 5 ครั้ง เท่ากับปริมาณน้ำตาลทรายรวม 20 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองในเบื้องต้นพบว่าสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตได้ดีขึ้นเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.5 กรัมต่อลิตรได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นเป็น 40% จึงสรุปในเบื้องต้นว่า *R. eutropha* สายพันธุ์ A-04 เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพที่ดีในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตได้องค์ประกอบของโมโนเมอร์ที่หลากหลายชนิดดังที่ผู้วิจัยได้เคยรายงานก่อนหน้านี้ สำหรับความเป็นไปได้ในการใช้น้ำตาลทรายที่ผลิตในประเทศไทยเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ยังคงต้องศึกษาปัจจัยเสริม อื่นๆให้มีการผลิตที่ดีขึ้นเนื่องจากภาวะและองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ทดสอบในเบื้องต้นนี้เป็นสูตรที่ปรับปรุงให้เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจากฟรักโตส

2.16 อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยในประเทศไทย

ในปัจจุบัน อ้อยถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เพราะมีการปลูกอ้อยในจังหวัดต่างๆ มากกว่า 40 จังหวัด ประมาณ 6 ล้านไร่ทั่วประเทศ ผลผลิตอ้อยต่อปีประมาณ 45-70 ล้านตัน ผลิตน้ำตาลได้ 5-7 ล้านตัน เป็นน้ำตาลที่บริโภคภายในประเทศ 2 ล้านตันที่เหลือส่งออกขายในต่างประเทศ มีมูลค่ารวมมากกว่า 50,000 ล้านบาทต่อปี โดยมีโรงงานน้ำตาล 46 โรงงาน กำลังการผลิตรวมทั้งสิ้น 623,390 ตันต่อวัน ตั้งกระจายอยู่ใน 24 จังหวัด ดังนี้

- ภาคเหนือ มี 9 โรงงาน ในเขตจังหวัดดังนี้ ลำปาง อุดรดิตถ์ กำแพงเพชร พิจิตร โลก เพชรบูรณ์ นครสวรรค์
- ภาคกลาง มี 18 โรงงานในเขตจังหวัดดังนี้ สิงห์บุรี ลพบุรี สระบุรี อุทัยธานี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์
- ภาคตะวันออก (ภาคกลาง) มี 5 โรงงาน ในเขตจังหวัด ดังนี้ ชลบุรี สระแก้ว
- ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มี 14 โรงงาน ในเขตจังหวัดดังนี้ นครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น อุรธานี กาฬสินธุ์ มุกดาหาร บุรีรัมย์ สุรินทร์

โดยเฉลี่ยในการหีบอ้อย 1 ตันจะได้ส่วนประกอบหลักต่างๆดังนี้

น้ำตาล	105-110 กิโลกรัม
น้ำ	500-510 กิโลกรัม
กากอ้อย (ความชื้นร้อยละ 50-52)	270-290 กิโลกรัม
กากตะกอนหม้อกรอง (ความชื้นร้อยละ 70-72)	28-40 กิโลกรัม
กากน้ำตาล	50-60 กิโลกรัม

น้ำตาลที่ได้จากกระบวนการผลิตถือว่าเป็นผลิตภัณฑ์หลักของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล ส่วนที่เหลือนั้นสามารถนำไปใช้ ภายในโรงงานน้ำตาล หรือนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้ อีก เรียกว่า ผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by-products) ตัวอย่างของการนำไปใช้ประโยชน์อื่นๆ ได้แก่ กากอ้อย (bagasse) ใช้เป็น เชื้อเพลิงในการผลิตไอน้ำที่นำไปใช้ผลิตไฟฟ้า ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารสัตว์ และผลิตเยื่อกระดาษ ส่วนกากน้ำตาล (molasses) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่สำคัญ เนื่องจาก กากน้ำตาล สามารถนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้อีกมากมาย เช่น เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol หรือ ethanol) ผงชูรส (monosodium glutamate) ใช้เป็นอาหารสัตว์ และอาหารมนุษย์ เป็นต้น (กลุ่มน้ำตาล มิตรผล, 2006)

สำหรับสถานการณ์อุตสาหกรรมอ้อยในประเทศไทย ในปี 2552-2553 ประเทศไทยมีกำลังการผลิตอ้อยมากเป็นอันดับที่ 4 ของโลก ดังตารางที่ 2.7 โดยผลิตน้ำตาลอ้อยได้กว่า 7.6 ล้านตัน และในปี 2554 – ปัจจุบัน การผลิตน้ำตาลในไทยก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

(<http://ecosugar2012.wordpress.com>)

ตารางที่ 2.7 10 อันดับประเทศผู้ผลิตน้ำตาลสูงสุดในช่วงปี 2552 – 2553 (Sugar Nutrition UK, 2012)

อันดับ	ประเทศ	น้ำตาล (ล้านตัน)	ชนิด
1	บราซิล	36,500,000	อ้อย
2	อินเดีย	24,700,000	อ้อย
3	จีน	11,300,000	อ้อย
4	ไทย	7,600,000	อ้อย
5	เม็กซิโก	4,950,000	อ้อย
6	ฝรั่งเศส, ออสเตรเลีย	4,700,000	บีท, อ้อย
7	เยอรมัน	4,575,000	บีท
8	สหรัฐอเมริกา	4,151,000	บีท
9	รัสเซีย	3,570,000	บีท
10	ตุรกี	2,700,000	บีท

2.17 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ

2.17.1 กระบวนการสกัดน้ำอ้อย (Juice Extraction): ทำการสกัดน้ำอ้อยโดยผ่านอ้อยเข้าไปในชุดลูกหีบ (4-5 ชุด) และกากอ้อยที่ผ่านการสกัดน้ำอ้อยจากลูกหีบชุดสุดท้าย จะถูกนำไปเป็นเชื้อเพลิงเผาไหม้ภายในเตาหม้อไอน้ำ เพื่อผลิตไอน้ำมาใช้ในกระบวนการผลิต และน้ำตาลทราย

2.17.2 การทำความสะอาด หรือทำให้ใส่น้ำอ้อย (Juice Purification): น้ำอ้อยที่สกัดได้ทั้งหมดจะเข้าสู่กระบวนการทำให้ใส เนื่องจากน้ำอ้อยมีสิ่งสกปรกต่าง ๆ จึงต้องแยกเอาส่วนเหล่านี้่ออกโดยผ่านวิธีทางกล เช่น ผ่านเครื่องกรองต่าง ๆ และวิธีทางเคมี เช่น โดยให้ความร้อน และผสมปูนขาว

2.17.3 การต้ม (Evaporation): น้ำอ้อยที่ผ่านการทำให้ใสแล้วจะถูกนำเข้าสู่ชุดหม้อต้ม (Multiple Evaporator) เพื่อระเหยเอาน้ำออก(ประมาณ 70 %) โดยน้ำอ้อยชั้นที่ออกมาจากหม้อต้มลูกสุดท้าย เรียกว่า น้ำเชื่อม (Syrup)

2.17.4 การเคี้ยว (Crystallization): น้ำเชื่อมที่ได้จากการต้มจะถูกนำเข้าสู่หม้อเคี้ยวระบบสุญญากาศ (Vacuum Pan) เพื่อระเหยน้ำออกจนน้ำเชื่อมถึงจุดอิ่มตัว ที่จุดนี้ผลึกน้ำตาลจะเกิดขึ้นมา โดยที่ผลึกน้ำตาล และกากน้ำตาลที่ได้จากการเคี้ยวนี้รวมเรียกว่า เมสสิควิท (Messecuite)

2.17.5 การปั่นแยกผลึกน้ำตาล (Centrifugaling): เมสสิควิทที่ได้จากการเคี้ยวจะถูกนำไปปั่นแยกผลึกน้ำตาลออกจาก กากน้ำตาล โดยใช้เครื่องปั่น (Centrifugals) ผลึกน้ำตาลที่ได้นี้จะเป็นน้ำตาลดิบ

2.18 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายขาว

น้ำตาลทรายดิบถูกนำไปละลายน้ำ แล้วถูกผ่านเข้า 5 ขั้นตอนการผลิต ดังนี้ (บริษัทไทยชูการ์ มิลเลอร์ จำกัด)

2.18.1 การปั่นละลาย (Affinated Centrifugaling): นำน้ำตาลดิบมาผสมกับน้ำร้อน หรือน้ำเหลือจากการปั่นละลาย (Green Molasses) น้ำตาลดิบที่ผสมนี้เรียกว่า แมกม่า (Magma) และแมกม่านี้จะถูกนำไปปั่นละลายเพื่อล้างคราบน้ำเหลือง หรือกากน้ำตาลออก

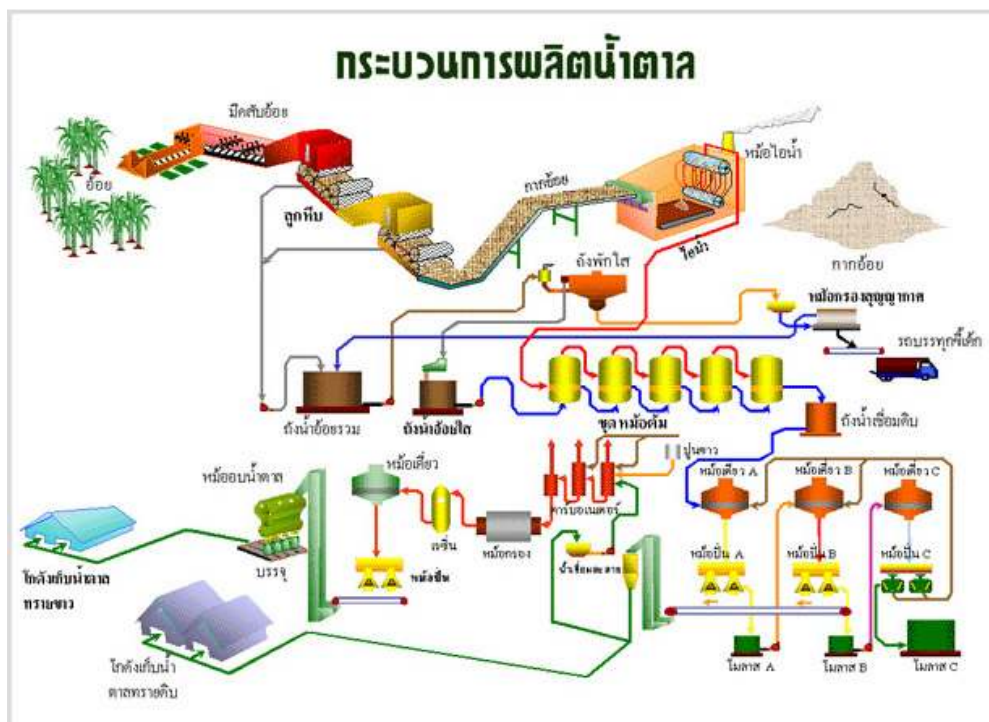
2.18.2 การทำความสะอาด และฟอกสี (Clarification) : น้ำเชื่อมที่ได้จากหม้อปั่นละลาย (Affinated Syrup) จะถูกนำไปละลายอีกครั้งเพื่อละลายผลึกน้ำตาลบางส่วนที่ยังละลายไม่หมดจากการปั่น และผ่านตะแกรงกรองเข้าผสมกับปูนขาว เข้าฟอกสีโดยผ่านเข้าไปในหม้อฟอก (ปัจจุบันนิยมใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวฟอก) จากนั้นจะผ่านเข้าสู่การกรองโดยหม้อกรองแบบใช้แรงดัน (Pressure

Filter) เพื่อแยกตะกอนออก และน้ำเชื่อมที่ได้จะผ่านไปฟอกเป็นครั้งสุดท้ายโดยกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุ (Ion Exchange Resin) จะได้น้ำเชื่อมรีไฟน์ (Fine Liquor)

2.18.3 การเคี้ยว (Crystallization): น้ำเชื่อมรีไฟน์ที่ได้จะถูกนำเข้าหม้อเคี้ยวระบบสุญญากาศ (Vacuum Pan) เพื่อระเหยน้ำออกจนน้ำเชื่อมถึงจุดอิ่มตัว

2.18.4 การปั่นแยกผลึกน้ำตาล (Centrifuging): เมลลิกวิทที่ได้จากการเคี้ยวจะถูกนำไปปั่นแยกผลึกน้ำตาลออกจากกากน้ำตาล โดยใช้เครื่องปั่น (Centrifugals) ผลึกน้ำตาลที่ได้นี้จะเป็น น้ำตาลรีไฟน์ และน้ำตาลทรายขาว

2.18.5 การอบ (Drying): ผลึกน้ำตาลรีไฟน์ และน้ำตาลทรายขาวที่ได้จากการปั่นก็จะเข้าหม้ออบ (Dryer) เพื่อไล่ความชื้นออก แล้วบรรจุกระสอบเพื่อจำหน่าย



รูปที่ 2.7 กระบวนการผลิตน้ำตาลอ้อย (ที่มา: บริษัทไทยชูการ์ มิลเลอร์ จำกัด)

2.19 ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย (อัศวิน ปีพ.ศ. 2539)

2.19.1 น้ำอ้อย

คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหีบอ้อย โดยนำคั้นอ้อยสดที่เกษตรกรเก็บเกี่ยวได้ ไล่ไปในชุดลูกหีบ หรือ Crusher ซึ่งจะคั้นส่วนน้ำออกมา องค์ประกอบหลักของน้ำอ้อยคือ น้ำ 69-75% ซูโครส 8-16% น้ำตาลรีดิคิง 0.5-2.0%

2.19.2 น้ำเชื่อม

คือน้ำอ้อยที่ผ่านการทำใสและถูกนำเข้าสู่ชุดหม้อต้ม (Multiple Evaporator) เพื่อระเหยเอาน้ำออกประมาณ 70 % โดยน้ำอ้อยขั้นที่ออกมาจากหม้อต้มเรียกว่า น้ำเชื่อมดิบ มีความเข้มข้น 60 - 65 บริกส์ น้ำเชื่อมดิบที่ได้จากการต้มจะถูกนำเข้าสู่หม้อเคี้ยวระบบสุญญากาศ (Vacuum Pan) เพื่อระเหยน้ำออกจนน้ำเชื่อมถึงจุดอิ่มตัว ที่จุดนี้ผลึกน้ำตาลจะเกิดขึ้นมา

2.19.3 น้ำกากน้ำตาล

คือของเสียที่ได้จากกระบวนการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกผลึกน้ำตาล (centrifuge) มีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืด สีน้ำตาลเข้ม โดย ส่วนประกอบของกากน้ำตาลแตกต่างกันไปตามโรงงาน อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบโดยประมาณ คิดเป็นร้อยละตามน้ำหนัก ของกากน้ำตาล มีดังนี้ คือ น้ำ 17-25% น้ำตาลซูโครส 30-40% น้ำตาลกลูโคส 4-9% และน้ำตาลฟรุกโทส 5-12 % นอกจากนั้นก็มีส่วนประกอบคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ สารประกอบไนโตรเจน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ อีกเป็นจำนวนมาก ดังนั้นกากน้ำตาลจึงใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางกว่าผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยชนิดอื่นๆ เช่น ใช้ทำปุ๋ย ใช้เลี้ยงสัตว์ ใช้ผลิตแอลกอฮอล์ ใช้ในอุตสาหกรรมยีสต์ ใช้ทำผงชูรส และใช้ทำกรดน้ำส้ม เป็นต้น (ที่มา: <http://kanchanapisek.or.th>)

2.19.4 น้ำตาลทรายดิบ

คือ ผลึกน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการผลิตขั้นต้น โดยกระบวนการเคี้ยวและตกผลึกน้ำตาล โดยมีค่าสีสูงกว่า 1,000 ICUMSA น้ำตาลทรายดิบจะต้องผ่านกระบวนการรีไฟน์ (Refine) หรือทำให้บริสุทธิ์ให้เป็นน้ำตาลทรายขาวหรือน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ ก่อนจึงจะสามารถนำไปบริโภคได้

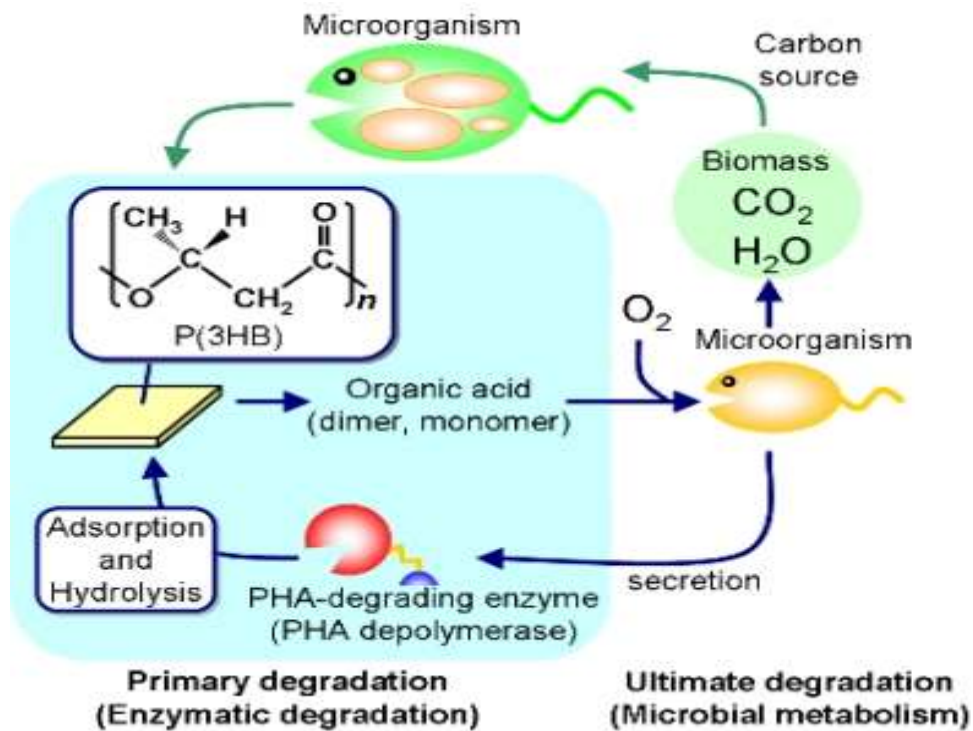
น้ำตาลทรายดิบจะเป็นเกล็ดใสหรือน้ำตาลอ่อน หรือน้ำตาลเข้ม เกล็ดน้ำตาลจะจับเกาะติดกันไม่ร่วนเหมือนน้ำตาลทรายขาว น้ำตาลดิบยังมีความชื้นอยู่สูงมาก เนื่องจากไม่ได้ผ่านหม้ออบ มีกลิ่นหอมกว่าน้ำตาลทรายขาว เมื่อผ่านขั้นตอนทำน้ำตาลทรายมาทุกขั้นตอนยกเว้นขั้นตอนที่ทำน้ำอ้อยให้มีสีจางลง และขั้นตอนที่ทำน้ำเชื่อมซึ่งยังมีสีคล้ำให้จางลงจนมองดูใสขึ้นเท่านั้น ยังไม่ผ่านขั้นตอนผ่านก๊าซกำมะถันเสียครั้งหนึ่งก่อน และตอนต้มเคี่ยวน้ำอ้อยเป็นน้ำเชื่อมแล้วก็นำไปผ่านก๊าซกำมะถันอีกครั้งหนึ่ง รวมเป็นสองครั้ง

2.19.5 น้ำตาลทรายขาว

คือ ผลึกน้ำตาลที่ได้จากการนำเอาน้ำตาลทรายดิบมาผ่านกระบวนการรีไฟน์ เพื่อสกัดเอาสิ่งเจือปนในน้ำตาลทรายดิบออก น้ำตาลทรายขาวมีค่าสีไม่เกิน 100 ICUMSA มีค่าโพลาไรเซชันไม่น้อยกว่าร้อยละ 99.70 น้ำตาลประเภทนี้โดยทั่วไปเป็นน้ำตาลทรายที่ประชาชนนิยมใช้เป็นวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องการความบริสุทธิ์ปานกลาง เช่น เครื่องดื่มชูกำลัง นมข้นหวาน และนมเปรี้ยว เป็นต้น ส่วนน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ และน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์พิเศษ คือ น้ำตาลทรายที่ได้จากการนำเอาน้ำตาลทรายดิบมาผ่านกระบวนการรีไฟน์เช่นเดียวกับน้ำตาลทรายขาว แต่จะมีความบริสุทธิ์มากกว่า โดยมีลักษณะเป็นเม็ดสีขาวใส น้ำตาลขาวบริสุทธิ์มีค่าสี 20-45 ICUMSA มีลักษณะเด่น คือ มีความบริสุทธิ์สูง ส่วนใหญ่ใช้เป็นวัตถุดิบใน อุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องดื่มต่างๆ

2.20 การย่อยสลาย PHAs ในธรรมชาติ

คุณสมบัติสำคัญที่ทำให้ PHAs ได้รับความสนใจจากนักวิจัย และอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ คือคุณสมบัติที่สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติ โดยไม่ก่อให้เกิดสารพิษจึงเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Anderson และ Daews, 1990; Brandl และคณะ, 1990) PHAs ถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมหลายสายพันธุ์ เช่น *Aspergillus* *Streptomyces* *Actinomyces* และ *Pseudomon* ซึ่งปล่อยเอนไซม์ประเภท ดีพอลิเมอร์เรส (depolymerases) หรือ เอสเทอร์เรส (esterase) มาเพื่อย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของสายพอลิเมอร์ด้วยปฏิกิริยา ไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ได้เป็นมอนอเมอร์ซึ่งจะถูกนำเข้าสู่เซลล์และเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึม ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำหรับพืชในการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ด้วยแสงต่อไป ซึ่งพืชเหล่านี้เป็นวัตถุดิบในการผลิต PHAs ได้ (Reddy และคณะ, 2003) โดยอัตราในการย่อยสลายของ PHB ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับ ความชื้น สารอาหาร อุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างของสิ่งแวดล้อม พื้นที่ผิวสัมผัสของพอลิเมอร์ (Byrom, 1993)



รูปที่ 2.8 วัฏจักรการย่อยสลายของ PHAs (Keiji, 2009)

2.21 การนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์

PHA ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมผลิตเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้และ/หรือสามารถผสมเข้ากับพลาสติกเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านอื่นๆ อีกมากมาย (Lee, 1996a) ดังแสดงในรูปที่ 10 PHB ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 100-200 หน่วย ซึ่งพบว่ามีองค์ประกอบคล้ายกับผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต Reusch และคณะ (1992) ได้พบองค์ประกอบที่คล้ายกับ PHB จำนวนมากในพลาสมาของเลือดมนุษย์ (blood plasma) ดังนั้นมีความน่าจะเป็นไปได้สูงที่จะนำ PHB ไปใช้กับเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยไม่เป็นพิษกับสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ด้วยคุณสมบัติที่ PHA มีสมบัติการเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) จึงมีศักยภาพในการใช้เป็นวัสดุปลูกถ่ายที่มีสมบัติการเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดกลไกการต่อต้านระหว่างวัสดุปลูกถ่ายและเซลล์เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติเด่นของ PHA ที่นำไปสู่ในการประดิษฐ์วัสดุทางการแพทย์ ตัวอย่างความเป็นไปได้ที่จะนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ

- บรรจุภัณฑ์ทางอุตสาหกรรม เช่น ฟิล์มห่อหุ้มวัสดุ กระเป๋าล้างและถุงบรรจุภัณฑ์ บรรจุภัณฑ์ที่ใช้ใน ยารักษาโรค ยาฆ่าแมลง ยากำจัดวัชพืช หรือปุ๋ย (Brandl และคณะ, 1990)
- ผลิตภัณฑ์ที่ออกแบบมาให้ใช้แล้วทิ้ง เช่น ใบบิด โคน เครื่องใช้ในบ้านบางชนิด ผ้าอ้อม หรือ ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ดูแลทำความสะอาดสำหรับผู้หญิง (Lee, 1995)
- อุตสาหกรรมเคมี เป็นวัตถุดิบในการผลิตองค์ประกอบไครรัล (chiral compound) (Chen และ Wu, 2005)
- วัสดุที่ใช้ทางการแพทย์ เช่น วัสดุตกแต่งบาดแผล เข็มที่ใช้ในการเย็บแผล ผ้าก๊อชหรือสำลีที่ใช้ ในการทำความสะอาดบาดแผล (Lee, 1995)
- วัสดุค้ำจุนและช่วยการผสมผสานกระดูกในทางการแพทย์ออร์โธพีดิกส์ กระตุ้นการเจริญของกระดูก และสมานกระดูก (Brandl และคณะ, 1990)
- ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารเพื่อสุขภาพ (Chen, 2009)
- อุตสาหกรรมทอผ้า โดย PHA สามารถนำไปผ่านกระบวนการผลิตเป็นไฟเบอร์ที่ใช้ใน อุตสาหกรรมสิ่งทอเช่นเดียวกับไนลอน (Chen, 2009)
- อุตสาหกรรมยา เฉพาะ PHB ที่มีโครงสร้างเป็น R-configuration มีคุณสมบัติรักษาโรคอัลไซเมอร์ และโรคพาร์กินสัน (Alzheimer's และ Parkinson's diseases) (Kashiwaya และคณะ, 2000) โรคข้อกระดูกอักเสบ (Massieu และคณะ, 2003) ช่วยปรับปรุงและฟื้นฟูความจำ (Zou และคณะ, 2009)
- ใช้ในการทำบริสุทธิ์โปรตีน (Protein purification) โดยให้แกรนูลของ PHA จับกับ phasin proteins (PHA granule binding protein phasin; PhaP) ทำให้ recombinant proteins บริสุทธิ์ (Wang และคณะ, 2008)

ในปัจจุบันประเทศที่มีเทคโนโลยีด้านพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพจะเป็นผู้นำในการกำหนดทิศทางการใช้สินค้าจากพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และพัฒนารูปแบบไปสู่กฎหมายหรือแผนปฏิบัติการระหว่างประเทศที่ทำให้เกิดอำนาจต่อรองด้านธุรกิจการค้าในเวทีโลกเราจึงเห็นได้ว่าความตื่นตัวด้านพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพทั้งด้านนโยบาย การวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรม และการ

สร้างผลิตภัณฑ์เพื่อเร่งรัดให้เกิดการทดแทนพลาสติกทั่วไปนั้นเป็นไปได้อย่างรวดเร็วและมีขั้นตอนที่มีทิศทางอย่างชัดเจน เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นหนึ่งในประเทศผู้นำด้านวิชาการและเทคโนโลยี พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยประสบความสำเร็จในการผลิตเม็ดพลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม เช่น บริษัท NatureWorks LLC ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดแลคติกและ PLA โดยมีชื่อทางการค้าว่า Ingeo™ ในขณะที่บริษัท Telles ประเทศสหรัฐอเมริกาสามารถผลิต PHAs โดยมีชื่อทางการค้าว่า Mirel™ ในปี 2009 มีการผลิต PHAs 50,000 ตัน โดยกำหนดราคาขายในราคาโลกกรัมละ €1.50 (Chanprateep, 2010)

บริษัท ZENECA Bio-Products หรือบริษัท Imperial Chemical Industries (ICI plc) เป็นบริษัทแรกที่ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Cupriavidus nator* (โดยชื่อเดิมคือ *Ralstonia eutropha* หรือ *Alcaligenes eutrophus*) (Vandamme และ Coenye, 2004; Vanechoutte และคณะ, 2004) ในการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) และ PHB มีชื่อทางการค้าว่า BIOPOL ในปี 1990 มีการผลิต 1,000 ตันต่อปีและมีการตั้งเป้าหมายไว้ว่าในปี 2008 มีการผลิตถึง 50,000 ตันต่อปี (Verlinden และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังมีหลายบริษัทที่ผลิต PHB เช่น Mitsubishi Gas Chemical Company Inc. ประเทศญี่ปุ่น มีชื่อทางการค้าว่า Biogreen® PHB Industrial Company ประเทศบราซิล มีชื่อทางการค้าว่า Biocycle® Biomer Inc. ประเทศเยอรมนี มีชื่อทางการค้าว่า Biomer® บริษัทที่ผลิต P(3HB-co-3HV) เช่น บริษัท Tianan Biologic, Ningbo ประเทศจีน มีชื่อทางการค้าว่า Enmat® เป็นต้น ปัจจุบันมีหลายประเทศที่รณรงค์และออกกฎหมายเกี่ยวกับการใช้ถุงพลาสติก เช่น ในประเทศไอร์แลนด์ สกอตแลนด์ เดนมาร์ก และสวีเดนมีการจัดเก็บภาษีการใช้ถุงพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ ในประเทศบังคลาเทศมีการต่อต้านการใช้ถุงพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้เริ่มต้นเมื่อเดือนมกราคม ปี 2002 ในประเทศอิตาลีมีการเก็บเงินเพิ่ม €0.10–0.20 เมื่อซื้อของโดยใส่ถุงพลาสติกเมื่อปี 2009 เป็นต้น (Chanprateep, 2010)

ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB จาก *A. lata* โดยใช้ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีรายงานว่า เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลซูโครสเป็น แหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการผลิต PHB เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมในประเทศไทยต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ถังหมักขนาด 5 ลิตรและชุดควบคุมถังหมัก รุ่น EPC-1000 ของบริษัท EYELA, Japan
2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker) รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R ของบริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920, รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I ของบริษัท Beckman Coulter, Germany
4. เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
5. เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น AG 204 และรุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic, USA และรุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer ของบริษัท PerkinElmer, Inc., USA
7. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
8. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus, Japan
9. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow ISSCO รุ่น BV-124 ของบริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clear รุ่น V3-4 ของบริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S ของบริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
10. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
11. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko Ltd., Japan รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama Co., Ltd., Japan
12. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น SevenEasy ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
13. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น INE 500 ของบริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB14 และรุ่น W760 ของบริษัท Memmert, Germany
15. เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น 3400C ของบริษัท Varian, USA

16. แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด CP-wax ขนาด 30 m×0.25 mm ID× 0.25 µm Df ของบริษัท
17. ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane) ขนาด 0.45 µm ของบริษัท Sartorius, Germany
18. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ 2 ของบริษัท Whatman International Ltd., England

3.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany
2. กรดเบนโซอิก ($C_7H_6O_2$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
3. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
4. กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) ของบริษัท Merck, Germany
5. คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) ของบริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Ireland
6. คอปเปอร์ไดคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
7. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
8. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
9. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
10. โซเดียมซิเตรท ($C_6H_5Na_3O_7$) ของบริษัท Merck, Germany
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
12. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
13. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
14. ทริปโตส (tryptose) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
15. เปปโตน (peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
16. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Merck, Germany
17. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
18. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
19. แอมโมเนียมไอออนทรีซิเตรต (Fe-III NH_4 citrate (17% of Fe)) ของบริษัท Merck, Germany
20. เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck, German
21. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
22. แมงกานีสไดคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) ของบริษัท Merck, Germany
23. ฐันผง (agar) ของบริษัท บิกเบน โปรดัคตอรา เดอ ออการ์ เอส.เอ., Chile
24. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Springer, France

25. เอทานอล (C₂H₅OH) ของบริษัท Merck, Germany
26. แอมโมเนียมซัลเฟต (NH₄)₂SO₄ ของบริษัท Merck, Germany
27. เฮกเซน (C₆H₁₄) ของบริษัท Merck, Germany
28. ก๊าซไนโตรเจน (N₂) ของบริษัท PRAXAIR, Thailand
29. น้ำตาลทรายขาว จากโรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ.นครสวรรค์
30. น้ำตาลดิบ จากโรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ.นครสวรรค์
31. น้ำเชื่อม จากโรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ.นครสวรรค์
32. น้ำอ้อย จากโรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ.นครสวรรค์
33. กากน้ำตาล จากโรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ.นครสวรรค์

3.3 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยคือ *Azohydromonas lata* DSM 1122 (ชื่อเดิมคือ *Alcaligenes latus* IAM 12599T) และ *Azohydromonas lata* DSM 1123 (ชื่อเดิมคือ *Alcaligenes latus* IAM 12665) (Palleroni and Palleroni 1978; Xie and Yokota 2005)

3.4 เก็บรักษาจุลินทรีย์สำหรับการทดลอง

3.4.1 เก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

ใช้รูปเชื้อเชื้อเชื้อ 1 โคลนเดี่ยวแล้วลาก (streak) บนอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) เลียงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน โดยจะต้องถ่ายลงอาหารแข็งใหม่ทุก 1 เดือน

3.4.2 เก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) (ภาคผนวก ก) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปราศจากเชื้อสองครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ที่ปราศจากเชื้อ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับปริมาณกลีเซอรอลให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.8-1.0

(จำนวน 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นบรรจุลงในหลอดเยือกแข็ง (cryotube) ที่ปลอดเชื้อ แล้วเก็บที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เก็บได้เป็นเวลา 6 เดือน

3.5 แหล่งคาร์บอนที่ใช้

3.5.1 การเก็บตัวอย่างแหล่งคาร์บอน

ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย ได้แก่ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายดิบ น้ำอ้อยสด น้ำเชื่อม และ โมลาส ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย โดยได้รับ ตัวอย่างในช่วงหีบน้ำตาลทรายของเดือนมกราคม 2553 และ เดือนสิงหาคม 2554 จากโรงงานน้ำตาล เกษตรไทย จ.นครสวรรค์ นำตัวอย่างของเหลวไปนึ่งฆ่าเชื้อในสภาวะมาตรฐานและเก็บรักษาโดยการแช่ เยือกแข็ง -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยด้วยเทคนิคโครมาโท กราฟของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

กรองน้ำส่วนใสผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของ น้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC ของ Varian รุ่น Prostar โดยใช้ RI Dectector และคอลัมน์คาร์โบไฮเดรต (Previal-CHO) ของ Varian ขนาด 4.6×250 mm ตั้งอุณหภูมิสารละลายตัวพา 30 องศาเซลเซียส ตั้ง อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายอะซิโตน ไตรคลอโรเอทิลีน 73 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ เป็น สารละลายตัวพา และใช้อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่าง ไปเทียบหาปริมาณของสารจากกราฟมาตรฐาน ของน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลซูโครส ตามลำดับ (ภาคผนวก ก)

3.6 สภาพที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับขวดเขย่า

3.6.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายเชื้อที่เก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร สำหรับเตรียมกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาดปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้าง

ตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปราศจากเชื้อสองครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในขั้นตอนนี้ต่อไป

3.6.2 การผลิต PHB ในระดับขวดเขย่า

3.6.2.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดยใช้ชูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตปริมาณ 100 มิลลิลิตร (Lafferty และคณะ, 1990) ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายดิบ น้ำอ้อย น้ำเชื่อม และกากน้ำตาล เริ่มจากหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด โดยแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มีเฉพาะชูโครสเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ น้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายดิบเป็น 20 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 20 และ 200 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์ ปริมาณน้ำตาลชูโครส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอมโมเนียม และปริมาณ PHB ตามข้อ 3.6.2.2 3.6.2.3 3.6.2.4 3.6.2.5 และ 3.6.2.6 ตามลำดับ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำแบบไม่เป็นอิสระต่อกัน จากนั้นแปรผันอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็น 5 20 50 100 200 และไม่เติมไนโตรเจน โดยใช้ความเข้มข้นของชูโครสที่เหมาะสมที่สุด

3.6.2.2 วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสขนาด 0.45 ไมโครเมตร ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาใส่ในเดซิเคเตอร์จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นกรองน้ำหมักปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาใส่ในเดซิเคเตอร์จนน้ำหนักคงที่ คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร วิเคราะห์ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง

3.6.2.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชูโครสตามวิธีของ Dubois (1956)

ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตร และกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที เขย่าผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณ

ปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำหมักในหน่วยกรัมต่อลิตรจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) วิเคราะห์ 3 ซ้ำ ต่อตัวอย่าง

3.6.2.4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Bernfeld (1955)

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติม สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางลูกแก้ว บนปากหลอดเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กำหนดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักในหน่วยกรัมต่อลิตรจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) วิเคราะห์ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง

3.6.2.5 วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมตามวิธีของ Kamper (1974)

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2 โมลต่อลิตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอทิลีน ไดอะมีนเตตราอะซิติกแอซิด (Ethelene diamine tetraacetic acid, EDTA) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมฟีนอล ไนโตรพัสไซดรีเอเจนท์ 2 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรด์รีเอเจนท์ 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น ปลอดภัย 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปอุ่นในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 636 นาโนเมตร กำหนดหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในหน่วย กรัมต่อลิตรจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) วิเคราะห์ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง

3.6.2.6 วิเคราะห์ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ตามวิธีของ Comeau และคณะ (1988)

ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อสองครั้ง แล้วนำตะกอนเซลล์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม กรดเบนโซอิก 3 กรัมต่อลิตรที่ละลายอยู่ใน 3% กรดซัลฟูริกในเมทานอล 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที โดยทุกๆ 30 นาทีต้องนำมาเขย่า เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลา นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมเป็นเวลา 3

นาที่ ทิ้งให้แยกชั้น ใช้พาสเจอร์ปีเปตต์ดูดชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของคลอโรฟอร์มเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณ PHB ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีโดยใช้ภาวะการวิเคราะห์และการคำนวณตามวิธีของ Chanprateep และคณะ (2003; 2006) ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปิลลารีคอลัมน์ชนิด CP-wax ขนาด 30m × 25mm IDx 25 µm Df
อุณหภูมิของอินเจกเตอร์ (injector)	: 250 องศาเซลเซียส (ไอโซเทอร์มอล)
อุณหภูมิของคอลัมน์	: 140 องศาเซลเซียส (ไอโซเทอร์มอล)
อุณหภูมิของดีเทกเตอร์ชนิด Flame ionization detector	: 50 องศาเซลเซียส (ไอโซเทอร์มอล)
อัตราส่วนการสพลิต (Split ratio)	: 50 ต่อ 1
แก๊สตัวพา (carrier gas)	: O ₂ อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที : N ₂ อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที : H ₂ อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรฉีด	: 1 ไมโครลิตร

วิเคราะห์ชนิดของมอนอเมอร์ โดยการเปรียบเทียบเวลาที่คงอยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่คงอยู่ในคอลัมน์ของสารมาตรฐาน และคำนวณปริมาณมอนอเมอร์ของ PHA ในหน่วย กรัมต่อลิตร (ที่มีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน (ภาคผนวก ค)

3.7 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับถังหมัก

การผลิต PHB ในระดับถังหมัก ใช้ถังหมัก EYELA รุ่น MBF-500ME ปริมาตร 5 ลิตร โดยปริมาตรการผลิตเท่ากับ 3 ลิตร เริ่มจาก เตรียมกล้าเชื้อตามข้อ 3.6.1 ถ่ายลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต ปริมาตร 3 ลิตร โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 3.6 ทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน เป็นน้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายดิบ น้ำอ้อย น้ำเชื่อม และกากน้ำตาล โดยกำหนดความเข้มข้นของ ซูโครสในแหล่งคาร์บอนและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.6.2 โดยทดลอง

ผลิตแบบแบตช์ (batch) และศึกษาผลของปริมาณออกซิเจน โดยแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.25vvm 0.5vvm และ 0.1vvm จากนั้นทำการแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 200 400 500 และ 600 รอบต่อนาที จากนั้นทดลองผลิตแบบเฟดแบตช์ (fed batch) ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ควบคุมอุณหภูมิตลอดการผลิตที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH ให้เท่ากับ 7 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 40 มิลลิลิตรทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์ ปริมาณน้ำตาลซูโครส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอมโมเนียม และปริมาณและองค์ประกอบของ PHB ตามข้อ 3.6.2.2 3.6.2.3 3.6.2.4 3.6.2.5 และ 3.6.2.6 ตามลำดับ

3.8 สกัด PHB จากเซลล์แห้งและทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Doi (1995)

ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อสองครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบรรจุเซลล์แห้งในถุงกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 สกัด PHB ด้วยคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เทคลอโรฟอร์มใส่ภาชนะแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในตู้ระเหยสารเคมี เพื่อให้คลอโรฟอร์มระเหยไปให้หมด จะได้แผ่นฟิล์มของ PHB นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการละลายในคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาตกตะกอนในเฮกเซนปริมาตร 4 เท่า ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเกี่ยว PHB ที่ได้ซึ่งจะมีลักษณะเป็นพาวเดอร์สีขาวนำไปเก็บในเดซิเคเตอร์ จนกว่าจะวิเคราะห์ต่อไป

3.9 ทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และเชิงกลของ PHB

3.9.1 ขึ้นรูป PHB เป็นแผ่นฟิล์มตามวิธีของ Yoshie (1995)

ละลาย PHB ในคลอโรฟอร์มให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เทสารละลายลงบนแม่พิมพ์ขนาด กว้าง 8 เซนติเมตร ยาว 18 เซนติเมตร ที่มีพื้นผิวเรียบและอยู่ในแนวระดับเดียวกัน ทิ้งให้คลอโรฟอร์มระเหยที่อุณหภูมิห้องในตู้ดูดควัน จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทิ้งให้แผ่นฟิล์มตกผลึกที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วแกะแผ่นฟิล์มออกจากแม่พิมพ์ นำแผ่นฟิล์มที่ได้ส่งวิเคราะห์ตามข้อ 3.9.2 และ 3.9.3 ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และวิเคราะห์ตามข้อ 3.9.4 ที่วิทยาลัยปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.9.2 วิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

นำผง PHB ที่ได้จากข้อ 5 มาละลายใน CDCl_3 , วิเคราะห์โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$) และคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ($^{13}\text{C-NMR}$) spectra ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometer) ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.9.3 วิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature, T_M) อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (Glass transition temperature, T_G) ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimeter ตามวิธีของ Chanprateep และคณะ (2003)

ชั่งพอลิเมอร์ให้มีน้ำหนักประมาณขึ้นละ 5-10 มิลลิกรัม ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียม (aluminum crucible) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimeter ยี่ห้อ Netzch รุ่น 204 F1 Phoenix ภายใต้สถานะในโตรเจน เริ่มจากเพิ่มอุณหภูมิจาก 30 องศาเซลเซียส จนถึง 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ลดอุณหภูมิ จาก 180 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียสอย่างรวดเร็ว จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจาก -80 องศาเซลเซียส ถึง 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยมีสารมาตรฐานเปรียบเทียบ คือ Al_2O_3

3.9.4. วิเคราะห์คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม PHB ด้วยเครื่อง Universal testing machine ตามวิธีมาตรฐาน ASTM D882-91 (Annual Book of ASM Standard, V08.01) และ Chanprateep และ Kulprecha (2006)

เตรียมแผ่นฟิล์มให้มีความหนาไม่เกิน 0.025 มิลลิเมตร กว้าง 50 มิลลิเมตร ยาว 150 มิลลิเมตร เป็นระยะทดสอบ 100 มิลลิเมตร ที่เหลือด้านละ 25 มิลลิเมตร เป็นระยะยึดของเขี้ยวจับสำหรับเครื่อง Universal testing machine ของ Lloyd รุ่น LRX ตั้งด้วยอัตรา 10 มิลลิเมตรต่อนาทีจนแผ่นฟิล์มขาด ทำการทดสอบ 5 ซ้ำ ต่อ 1 ตัวอย่าง บันทึกค่า Load at Max.Load (N) Displacement at Max.Load (mm.) Stress at Max.Load (Mpa) %Strain at Max.Load (%) Toughness (MPa) และ Modulus (MPa)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับขวดเขย่า

การชีวสังเคราะห์ PHB จากแบคทีเรีย จำเป็นต้องควบคุมภาวะการผลิตให้เหมาะสมเพื่อให้ประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญและการผลิต PHB ของแบคทีเรีย ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน หรือฟอสฟอรัส อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน อุณหภูมิ pH และความเข้มข้นของออกซิเจน เป็นต้น

โดยก่อนหน้านี้มีงานวิจัยของ Palleroni และ Palleroni (1978) ซึ่งรายงานว่าค่า pH ที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Alcaligenes latus* (ปัจจุบันคือ *Azohydromonas lata*) คือ 6.0 – 7.5 นอกจากนี้ Grothe และคณะ (1999) ศึกษาผลของ pH เริ่มต้น ต่อการผลิต PHB ของ *A. latus* เมื่อแหล่งคาร์บอนคือซูโครส พบว่า pH เริ่มต้นที่ 6.5 – 7.0 ให้ปริมาณการผลิต PHB สูงสุด และพบว่าการลดลงของ pH ในระหว่างการเพาะเลี้ยงไม่ส่งผลต่อการชีวสังเคราะห์ PHB แต่อย่างใด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงกำหนด pH เริ่มต้น ในการเพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าเท่ากับ 7.0

สำหรับอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง *A. lata* เพื่อการผลิต PHB Grothe และคณะ (1999) รายงานว่า อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญและการสังเคราะห์ PHB ของ *A. latus* โดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 25 – 37 องศาเซลเซียสไม่ส่งผลต่อการผลิต PHB อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น การทดลองนี้จึงควบคุมอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส

4.1.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

การผลิต PHB จากแบคทีเรียในระดับอุตสาหกรรม มักใช้แหล่งคาร์บอนที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นซึ่งมีราคาถูกและมีตลอดทั้งปี ยกตัวอย่างเช่น น้ำตาลอ้อย น้ำตาลจากหัวบีท กากน้ำตาล รวมถึง น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (Wang และคณะ 2006)

Grothe และคณะ (1999) รายงานว่า *Azohydromonas lata* DSM 1122 DSM 1123 และ DSM1124 เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิต PHB ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสะสม PHB ภายในเซลล์ได้สูงถึง 80% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้ มีรายงานการ

ใช้แบคทีเรียชนิดต่างๆในการผลิต PHB โดยใช้แหล่งคาร์บอนหลายชนิด เช่น ผลิต PHAs โมเลกุลใหญ่ จากกากถั่วเหลือง โดย *Pseudomonas corrugata* (Solaiman และคณะ 2006) ผลิต PHB จากน้ำเชื่อม ข้าวโพด โดย recombinant *Escherichia coli* (Nikel และคณะ 2006) และ ผลิต PHB จากหางนม โดย *Pseudomonas hydrogenovora* (Koller และคณะ 2008) เป็นต้น ดังนั้นเพื่อเป็นแนวทางการลดต้นทุนการผลิต PHB และเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยในประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงศึกษาเปรียบเทียบการใช้ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย 5 ชนิดคือ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายดิบ น้ำเชื่อม น้ำอ้อย และกากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ในระดับขวดเย้าและระดับถังหมัก

เนื่องจาก น้ำเชื่อม น้ำอ้อย และ กากน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในงานวิจัยนี้ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ แต่เป็นผลิตภัณฑ์จากสายกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย จึงมีน้ำตาลหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ ดังนั้น จึงต้องวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดในน้ำเชื่อม น้ำอ้อย และ กากน้ำตาลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลดังกล่าว แสดงดังตารางที่ 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยจากโรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ.นครสวรรค์ เดือนมกราคม 2553 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		
	ซูโครส	ฟรุคโตส	กลูโคส
น้ำตาลอ้อย			
กากน้ำตาล	844.75	228.22	276.52
น้ำเชื่อม	812.16	38.10	45.54
น้ำอ้อย	577.49	52.46	29.83

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยจากโรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ.นครสวรรค์ เดือนสิงหาคม 2554 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำตาลอ้อย	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		
	ซูโครส	ฟรุคโตส	กลูโคส
กากน้ำตาล	534.54	133.24	189.26
น้ำเชื่อม	917.86	28.342	139.69
น้ำอ้อย	347.85	11.854	130.59

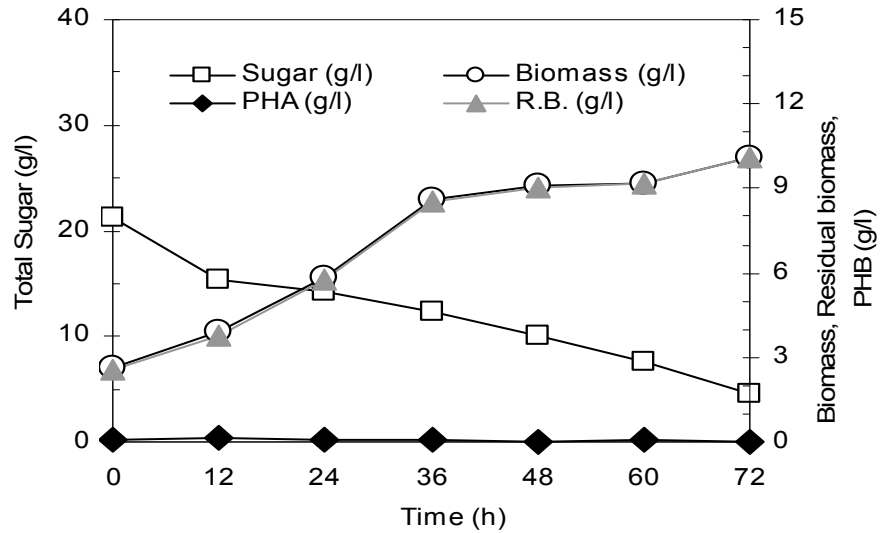
งานวิจัยในเบื้องต้นนี้ ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม ต่อการเจริญและการผลิต PHB ของ *A. lata* DSM 1122 ในระดับขวดเข่าตามวิธีข้อ 3.6.2.1 โดยแปรผันปริมาณน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายดิบเท่ากับ 20 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เท่ากับ 20 และ 200 โดยเลี้ยงในภาวะที่อุณหภูมิ 30 °C อัตราการเข่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณน้ำตาล และ ปริมาณ PHB ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี ผลการทดลองมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.3 – 4.14 และรูปที่ 4.1 – 4.12

ผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้น้ำตาลทรายขาว 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับอัตราส่วน C/N 200 *A. lata* DSM 1122 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุด 5.25 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 72 คิดเป็น 44.27 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมาคือ ใช้น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับอัตราส่วน C/N 200 ผลิต PHB ได้สูงสุด 4.02 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 72 คิดเป็น 44.17 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมาคือ ใช้น้ำตาลทรายดิบ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ C/N 200 ผลิต PHB ได้สูงสุด 3.20 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 72 คิดเป็น 38.72% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 13.2 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 72 เมื่อใช้น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับอัตราส่วน C/N 20 รองลงมาคือใช้น้ำตาลทรายดิบ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับอัตราส่วน C/N 20 ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 11.17 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 72

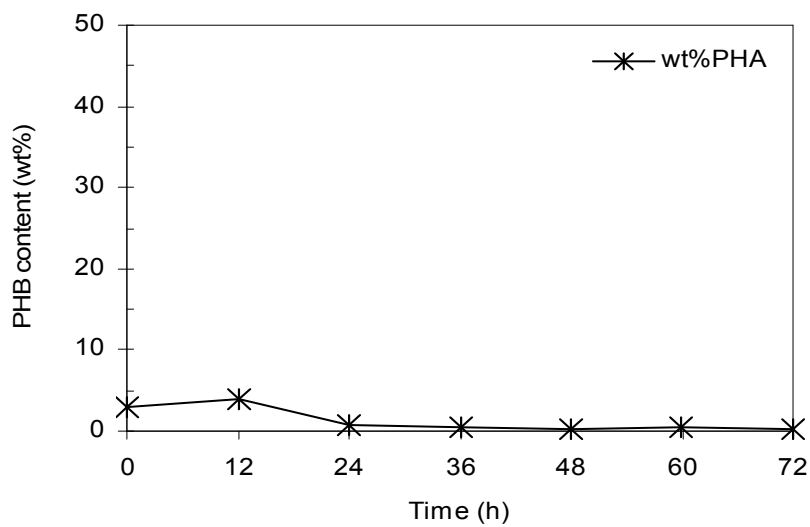
ตารางที่ 4.3 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) และ เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายขาว 20 กรัมต่อลิตร และ C/N 20				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	2.60	2.53	21.31	0.07	2.84
12	3.90	3.75	15.39	0.15	3.94
24	5.80	5.76	14.17	0.04	0.77
36	8.57	8.52	12.31	0.05	0.55
48	9.07	9.04	10.11	0.03	0.33
60	9.20	9.16	7.50	0.04	0.40
72	10.10	10.07	4.6	0.03	0.26

(A)



(B)

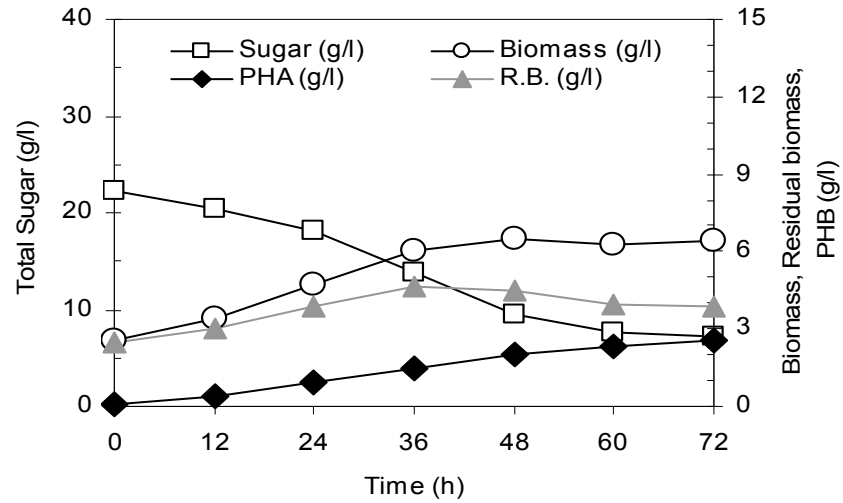


รูปที่ 4.1 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิว ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20

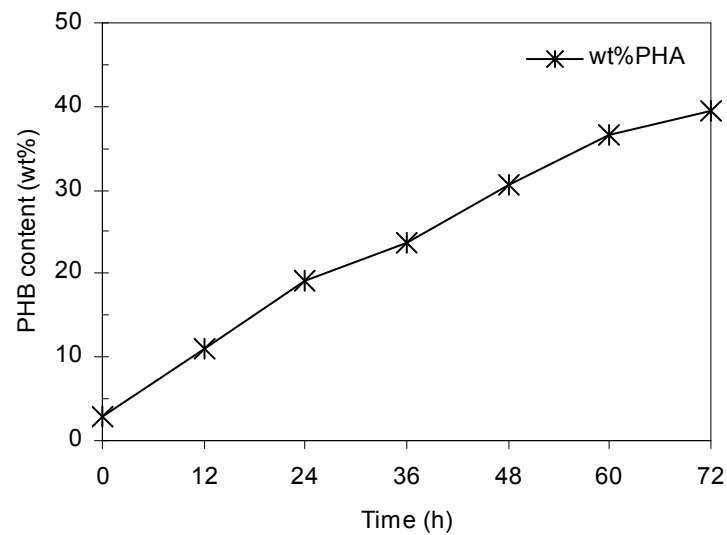
ตารางที่ 4.4 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) และ เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหาร เพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่ง ไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายขาว 20 กรัมต่อลิตร และ C/N 200				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	2.53	2.46	22.34	0.07	2.92
12	3.40	3.03	20.41	0.37	11.01
24	4.73	3.83	18.14	0.90	19.06
36	6.07	4.62	13.87	1.44	23.79
48	6.50	4.51	9.44	1.99	30.59
60	6.27	3.97	7.64	2.29	36.60
72	6.40	3.87	7.31	2.53	39.47

(A)



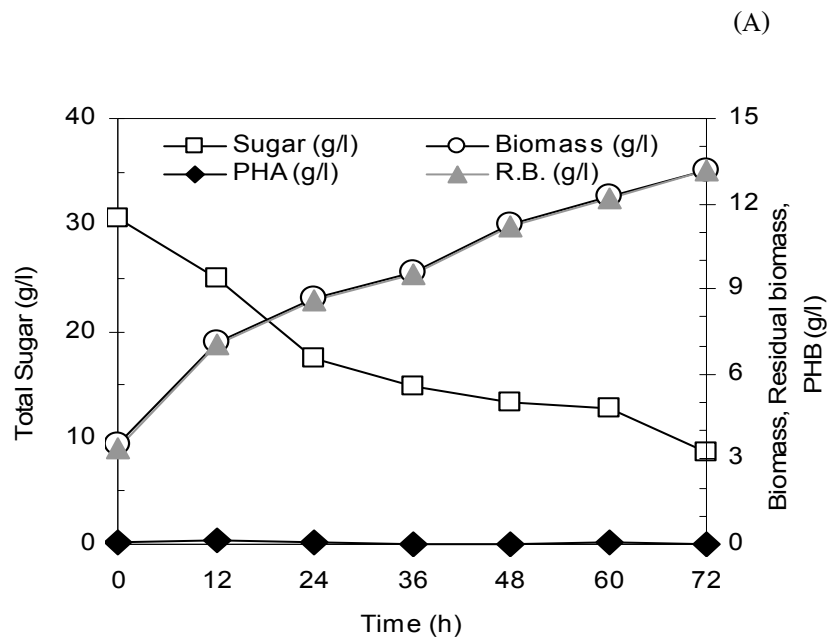
(B)



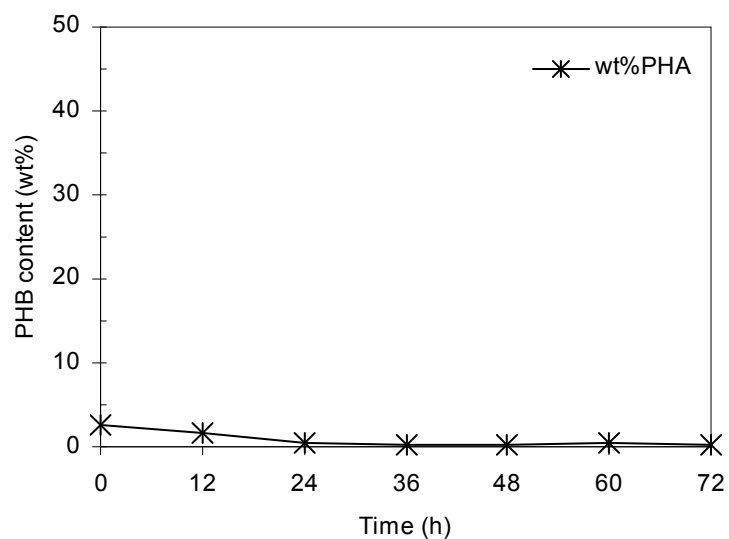
รูปที่ 4.2 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200

ตารางที่ 4.5 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร และ C/N 20				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	3.50	3.41	30.61	0.09	2.53
12	7.13	7.01	25.06	0.13	1.76
24	8.63	8.60	17.40	0.04	0.43
36	9.57	9.53	14.76	0.03	0.34
48	11.23	11.21	13.42	0.02	0.19
60	12.23	12.19	12.82	0.05	0.37
72	13.20	13.17	8.70	0.03	0.26



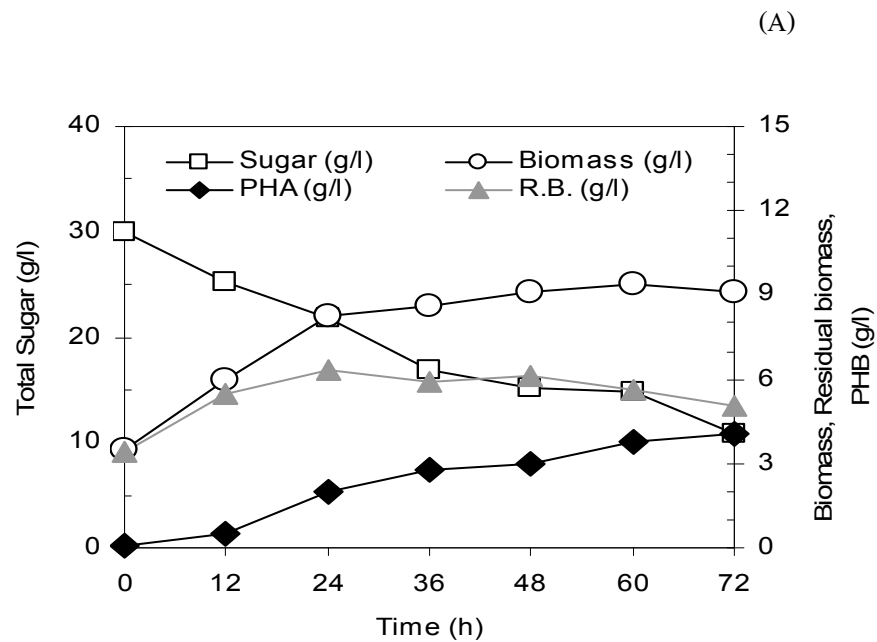
(B)



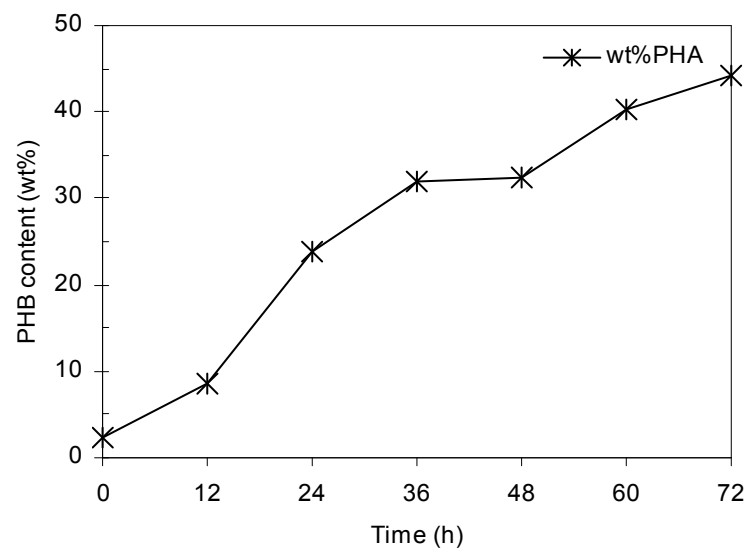
รูปที่ 4.3 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20

ตารางที่ 4.6 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร และ C/N 200				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	3.47	3.39	30.01	0.08	2.30
12	5.97	5.46	25.25	0.51	8.53
24	8.27	6.29	21.83	1.97	23.87
36	8.63	5.88	16.88	2.75	31.91
48	9.10	6.15	15.17	2.95	32.46
60	9.40	5.60	14.77	3.80	40.39
72	9.10	5.08	10.82	4.02	44.17



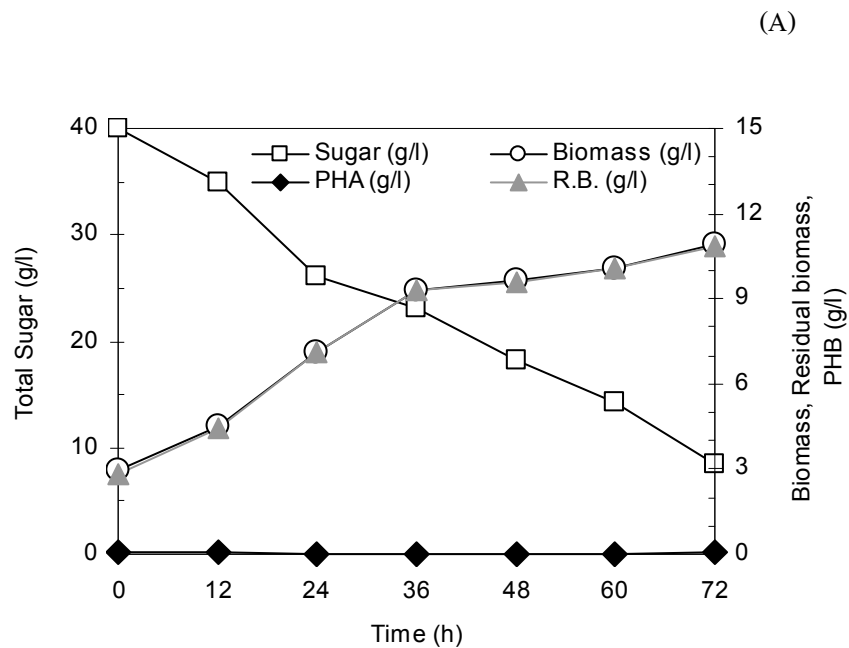
(B)



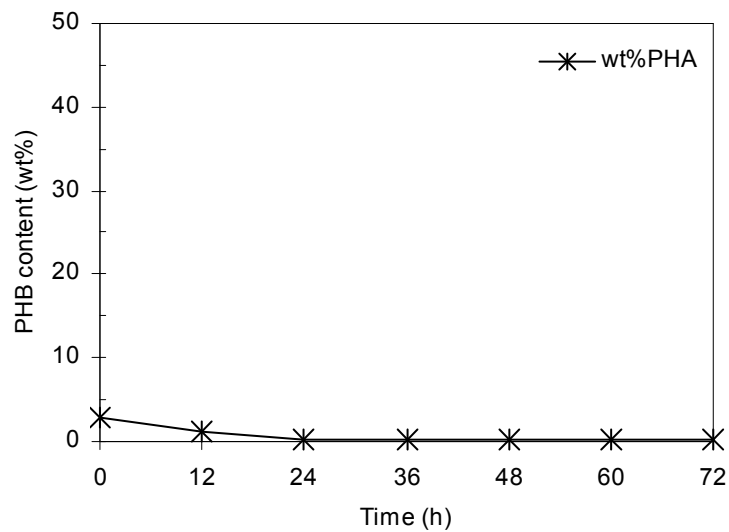
รูปที่ 4.4 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิว ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200

ตารางที่ 4.7 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายขาว 40 กรัมต่อลิตร และ C/N 20				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	2.93	2.85	40.02	0.08	2.82
12	4.50	4.45	34.84	0.05	1.16
24	7.13	7.12	26.08	0.02	0.24
36	9.31	9.30	23.03	0.02	0.17
48	9.63	9.61	18.27	0.02	0.26
60	10.10	10.07	14.22	0.03	0.28
72	10.90	10.86	8.39	0.04	0.35



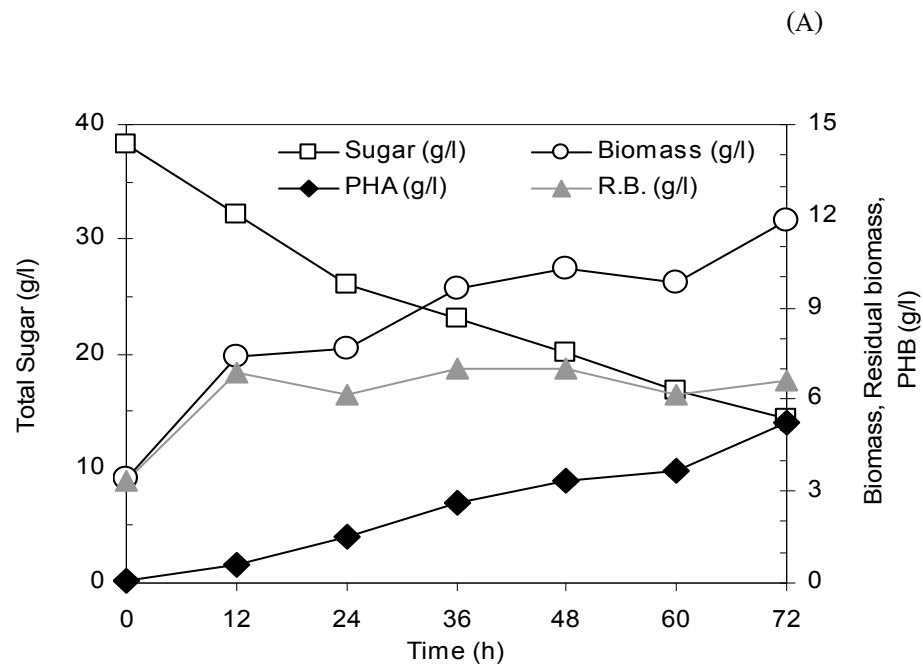
(B)



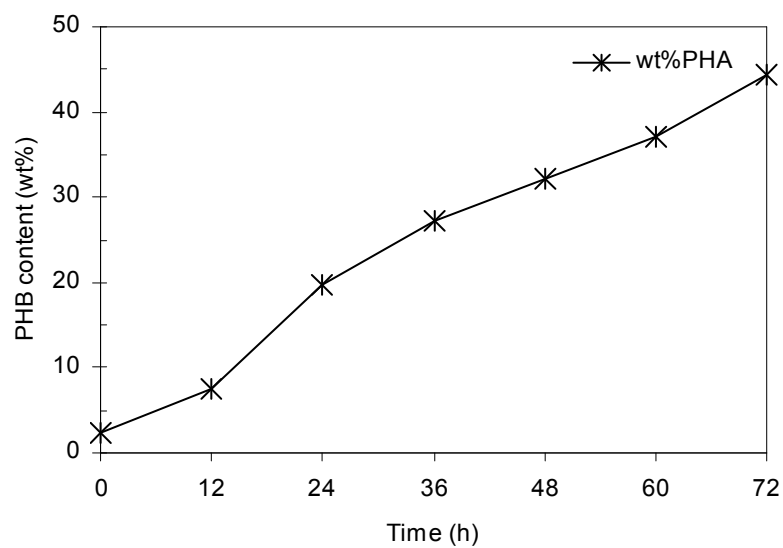
รูปที่ 4.5 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20

ตารางที่ 4.8 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายขาว 40 กรัมต่อลิตร และ C/N 200				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	3.43	3.35	38.24	0.08	2.42
12	7.43	6.87	32.22	0.56	7.56
24	7.65	6.14	25.95	1.52	19.83
36	9.66	7.04	23.12	2.62	27.16
48	10.3	6.99	20.06	3.31	32.17
60	9.80	6.16	16.83	3.64	37.10
72	11.87	6.61	14.31	5.25	44.27



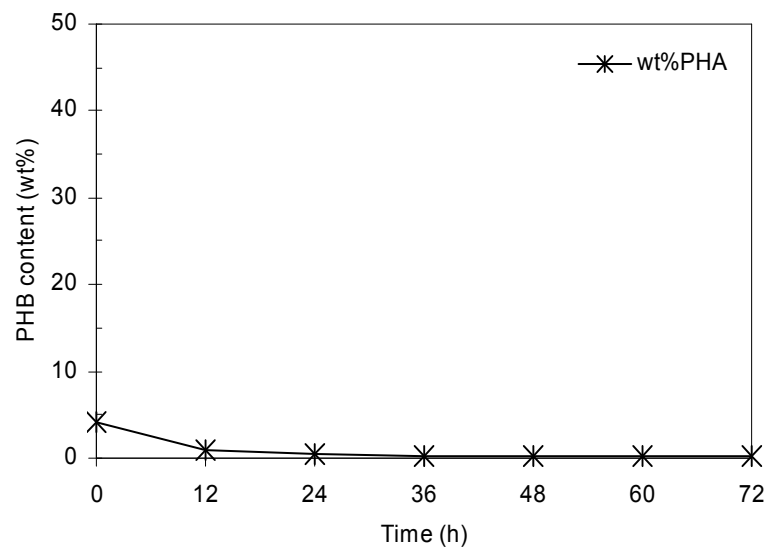
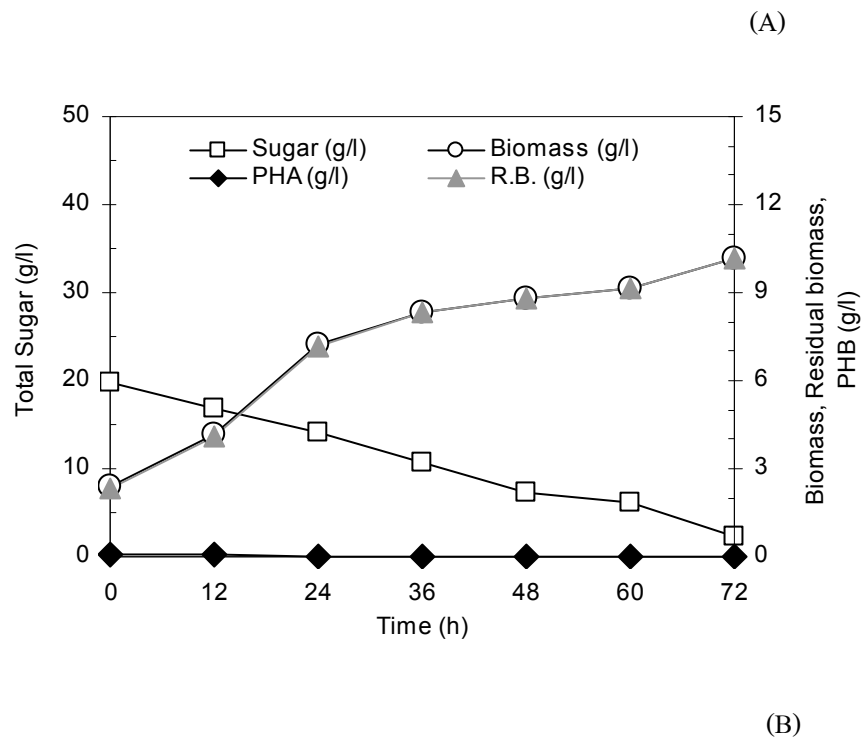
(B)



รูปที่ 4.6 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200

ตารางที่ 4.9 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายดิบ 20 กรัมต่อลิตร และ C/N 20				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	2.40	2.30	19.8	0.10	4.12
12	4.13	4.09	16.71	0.04	0.98
24	7.20	7.17	14.20	0.03	0.39
36	8.33	8.31	10.63	0.02	0.30
48	8.80	8.78	7.21	0.02	0.19
60	9.17	9.14	6.20	0.03	0.29
72	10.17	10.15	2.31	0.02	0.19

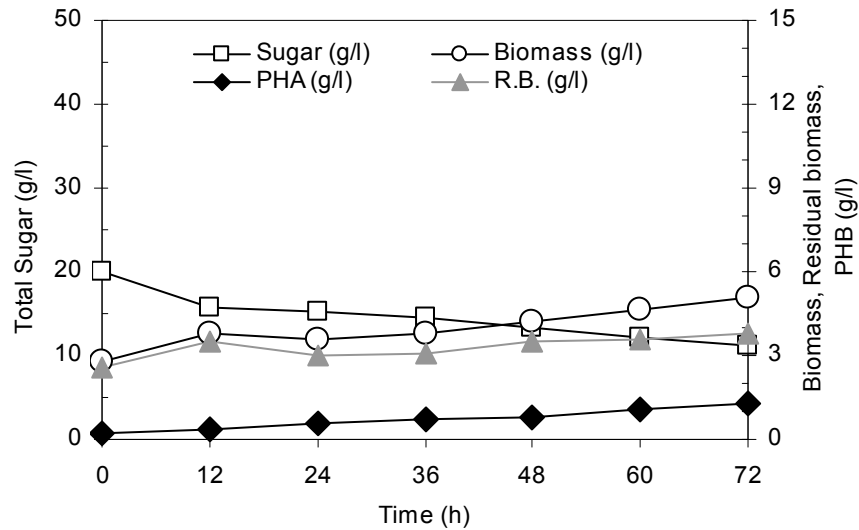


รูปที่ 4.7 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิว ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20

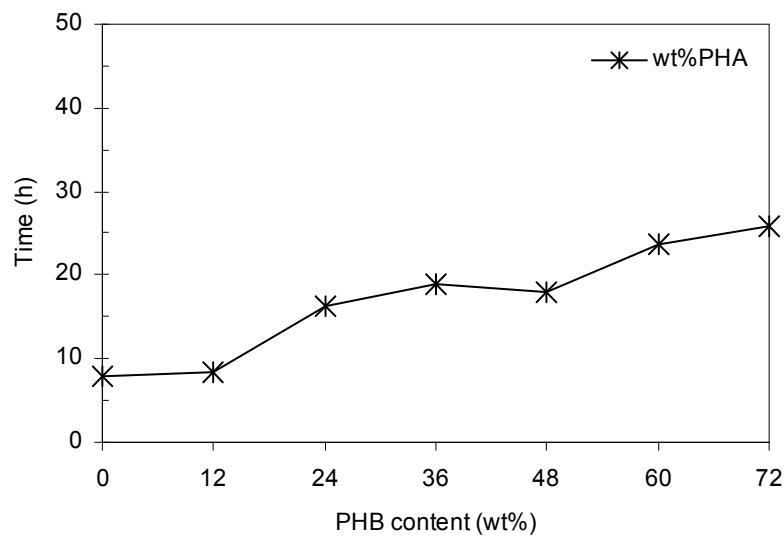
ตารางที่ 4.10 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายดิบ 20 กรัมต่อลิตร และ C/N 200				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	2.77	2.55	19.89	0.22	7.80
12	3.81	3.49	15.83	0.32	8.44
24	3.60	3.01	15.17	0.58	16.21
36	3.76	3.05	14.50	0.71	18.99
48	4.23	3.46	13.37	0.76	18.02
60	4.64	3.54	12.24	1.10	23.68
72	5.06	3.75	11.10	1.30	25.77

(A)



(B)

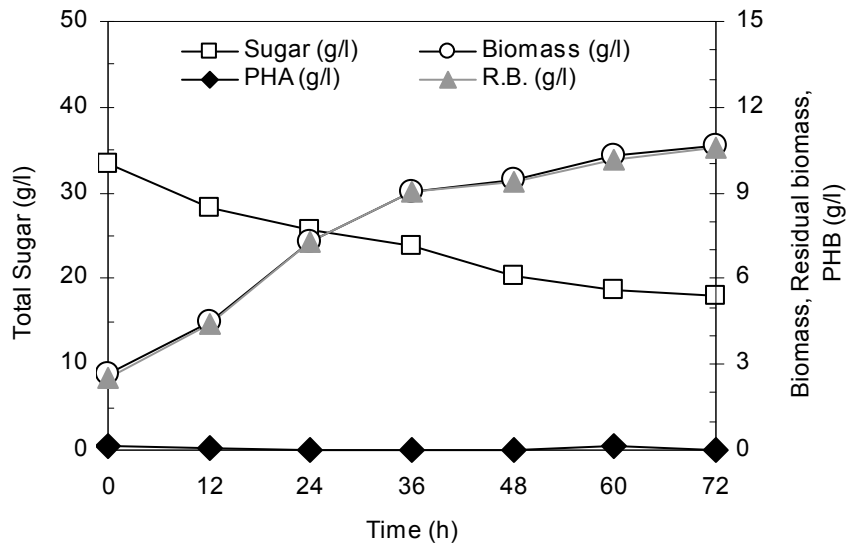


รูปที่ 4.8 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200

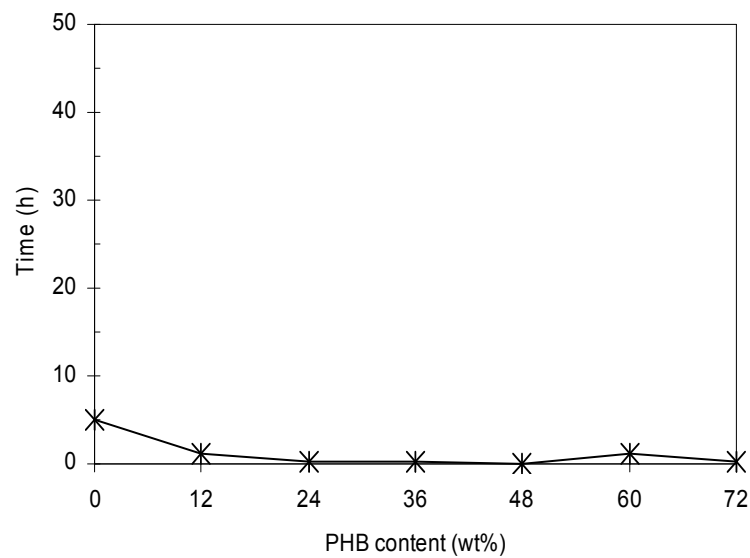
ตารางที่ 4.11 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายดิบ 30 กรัมต่อลิตร และ C/N 20				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	2.67	2.53	33.32	0.13	4.96
12	4.46	4.41	28.20	0.05	1.06
24	7.30	7.28	25.66	0.02	0.26
36	9.07	9.04	23.92	0.02	0.27
48	9.43	9.43	20.32	0.01	0.07
60	10.29	10.17	18.63	0.12	1.15
72	10.63	10.61	18.00	0.02	0.19

(A)



(B)

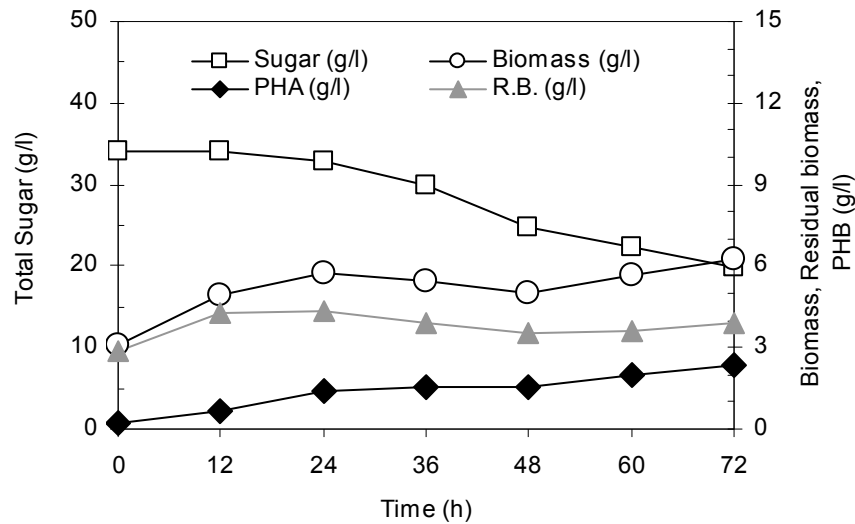


รูปที่ 4.9 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิว ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20

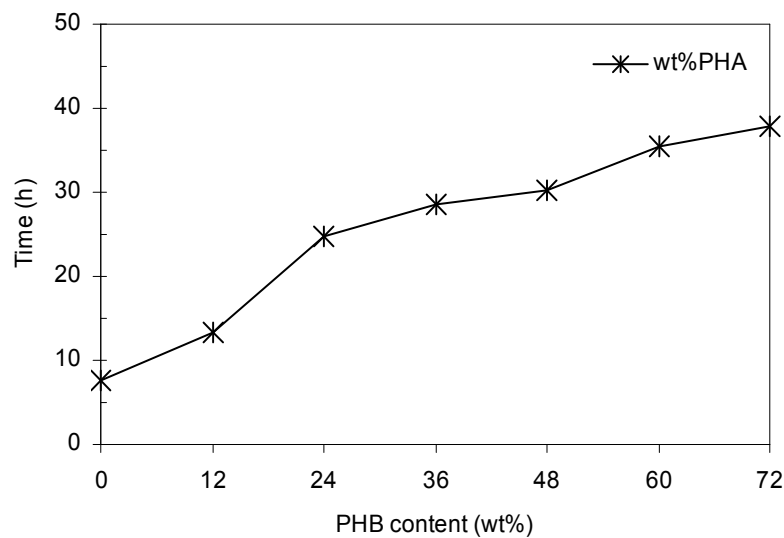
ตารางที่ 4.12 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายดิบ 30 กรัมต่อลิตร และ C/N 200				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	3.10	2.86	33.98	0.24	7.67
12	4.90	4.25	33.95	0.65	13.33
24	5.73	4.31	32.81	1.43	24.87
36	5.43	3.87	30.00	1.56	28.68
48	5.03	3.51	24.75	1.52	30.18
60	5.65	3.64	22.34	2.01	35.58
72	6.27	3.90	19.93	2.37	37.80

(A)



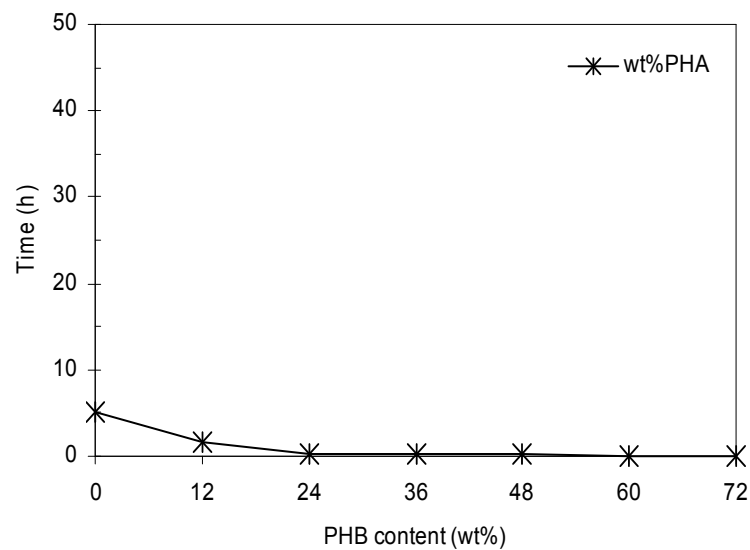
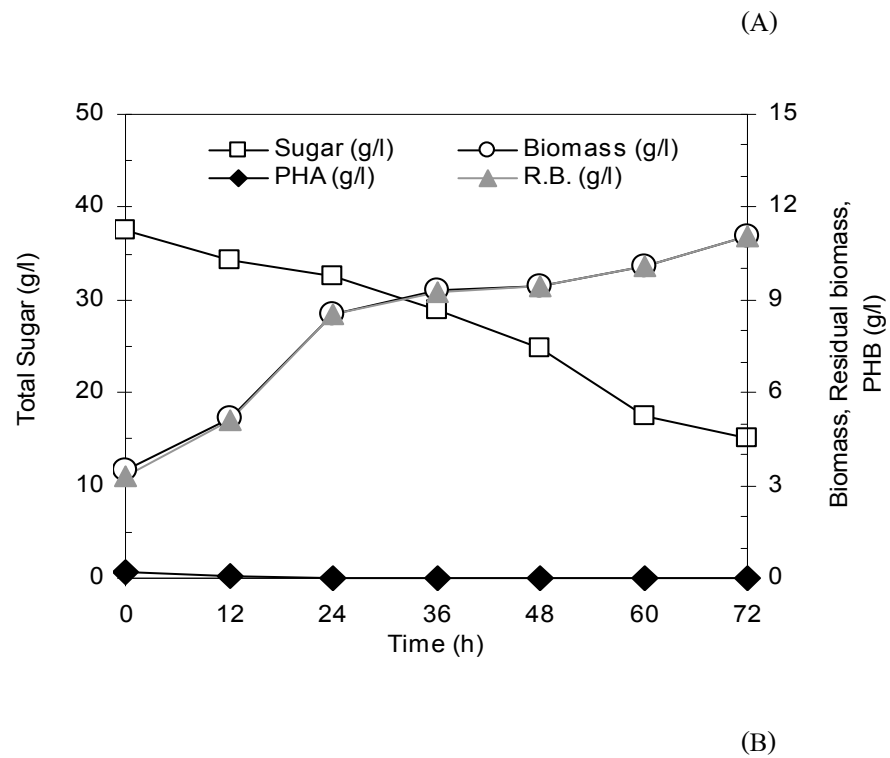
(B)



รูปที่ 4.10 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิว ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 30 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200

ตารางที่ 4.13 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายดิบ 40 กรัมต่อลิตร และ C/N 20				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	3.49	3.31	38.58	0.18	5.07
12	5.20	5.16	34.3	0.08	1.62
24	8.57	8.55	30.06	0.02	0.21
36	9.30	9.28	26.82	0.02	0.24
48	9.47	9.45	24.88	0.01	0.15
60	10.11	10.10	17.54	0.01	0.10
72	11.07	11.06	15.14	0.01	0.10

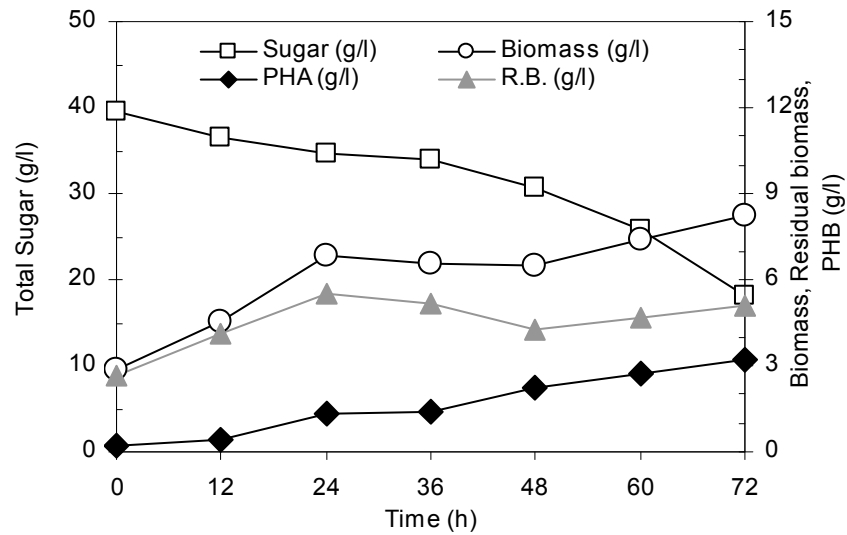


รูปที่ 4.11 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 20

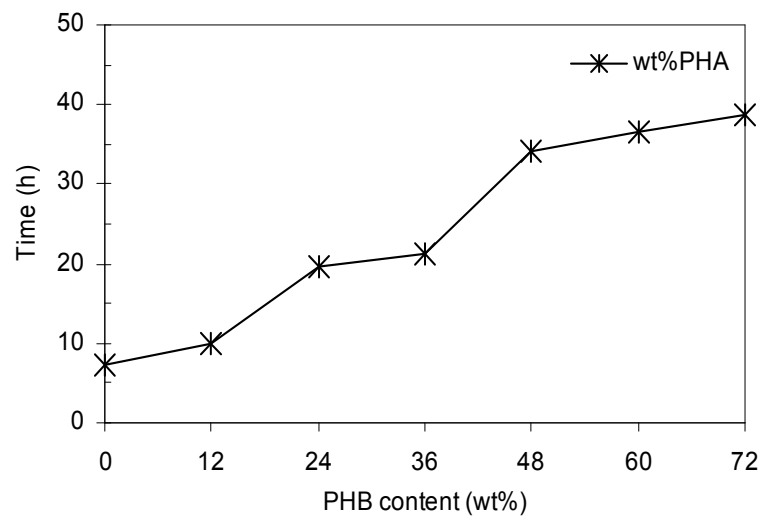
ตารางที่ 4.14 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายดิบ 40 กรัมต่อลิตร และ C/N 200				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	2.83	2.63	39.62	0.21	7.31
12	4.53	4.08	36.60	0.45	9.93
24	6.87	5.53	34.54	1.34	19.51
36	6.53	5.15	34.06	1.39	21.25
48	6.50	4.28	30.64	2.22	34.15
60	7.38	4.68	25.87	2.70	36.56
72	8.27	5.06	18.10	3.20	38.72

(A)



(B)



รูปที่ 4.12 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายดิบที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1122 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 40 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200

ลำดับต่อมานำข้อมูลในตารางที่ 4.3 – 4.14 เพื่อคำนวณค่าจลนศาสตร์และนำเสนอข้อมูลใน ตารางที่ 4.15 และ 4.16 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.15 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของการผลิต PHB โดย *A. lata* DSM 1122 เมื่อใช้น้ำตาลทรายขาวเป็น แหล่งคาร์บอน โดยแปรผันปริมาณน้ำตาลทราย 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแปรผัน C/N 20 และ 200

น้ำตาล ทรายขาว (g/l)	C/N	พารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์					
		μ (h ⁻¹)	Productivity (g/l/h)	ρ (g-PHA/g- CDW/h)	γ (g-sugar/g- CDW/h)	$Y_{P/S}$ (g-PHA/g- sugar)	$Y_{X/S}$ (g-CDW/g- sugar)
20	20	0.023	0.0004	0	0.04	0	0.49
	200	0.009	0.0400	0.0096	0.06	0.16	0.13
30	20	0.029	0.0005	0	0.04	0	0.50
	200	0.015	0.0660	0.0100	0.05	0.21	0.22
40	20	0.025	0.0005	0	0.06	0	0.30
	200	0.018	0.0630	0.0100	0.06	0.18	0.22

ตารางที่ 4.16 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของการผลิต PHB โดย *A. lata* DSM 1122 เมื่อใช้น้ำตาลทรายดิบเป็น แหล่งคาร์บอน โดยแปรผันปริมาณน้ำตาลทราย 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแปรผัน C/N 20 และ 200

น้ำตาล ทรายดิบ (g/l)	C/N	พารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์					
		μ (h ⁻¹)	Productivity (g/l/h)	ρ (g-PHA/g- CDW/h)	γ (g-sugar/g- CDW/h)	$Y_{P/S}$ (g-PHA/g- sugar)	$Y_{X/S}$ (g-CDW/g- sugar)
20	20	0.020	0.0003	0	0.04	0	0.52
	200	0.001	0.0200	0.0051	0.04	0.12	0.13
30	20	0.027	0.0003	0	0.033	0	0.56
	200	0.010	0.0300	0.0087	0.05	0.17	0.17
40	20	0.028	0.0001	0	0.04	0	0.44
	200	0.014	0.0400	0.0095	0.01	0.17	0.18

ผลสรุปค่าจลนศาสตร์ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ , specific growth rate, h^{-1}) อัตราการใช้ น้ำตาลจำเพาะ (γ , specific consumption rate, g-sugar/g-CDW/h) อัตราการผลิต PHA จำเพาะ (ρ , specific production rate, g-PHA/g-CDW/h) ค่าสัมประสิทธิ์การผลิตชีวมวลจากหนึ่งกรัม น้ำตาล ($Y_{X/S}$, cell yield coefficient, g-CDW/g-sugar) ค่าสัมประสิทธิ์การผลิต PHA จากหนึ่งกรัม น้ำตาล ($Y_{P/S}$, cell yield coefficient, g-PHA/g-sugar) และประสิทธิภาพการผลิต (productivity, g-PHA/h) ดังในตารางที่ 4.15 และ 4.16 แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ อัตราส่วน C/N 20 *A. lata* DSM 1122 มี μ สูงสุดเท่ากับ 0.028 ต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง แต่ภาวะที่ให้ค่าประสิทธิภาพการผลิตสูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.66 g-PHA/h และค่า ρ สูงสุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.010 g-PHA/g-CDW/h คือ ภาวะที่แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วน C/N 200 ในขณะเดียวกัน เมื่อใช้น้ำตาลทรายขาว 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ อัตราส่วน C/N 20 พบว่า *A. lata* DSM 1122 มี γ สูงสุดเท่ากับ 0.06 g-sugar/g-CDW/h

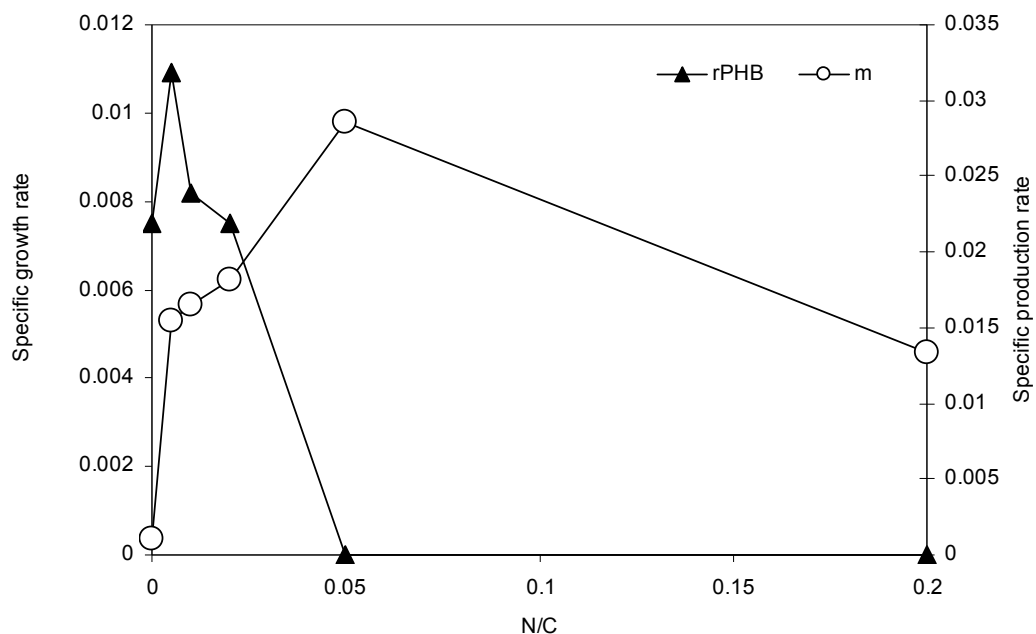
ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB ของ *A. lata* DSM 1122 คือ 30 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลมอโนแซคคาไรด์เพียงชนิดเดียวคือ ซูโครส ดังนั้นในการทดลองในขั้นต่อไป จึงใช้ภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ในการศึกษาในข้อ 3.7 จึงปรับใช้น้ำอ้อย น้ำเชื่อม และกากน้ำตาล ให้มีน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยไม่คำนึงถึงปริมาณน้ำตาล กลูโคส และฟรุคโตส ที่เป็นแหล่งคาร์บอนผสม

จากนั้นลำดับต่อมา ผู้วิจัยแปรผันอัตราส่วน C/N อีกครั้งอย่างละเอียดเป็น 20 50 100 200 และ ไม่มีไนโตรเจน โดยเลือกใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษานี้ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นมีค่าเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ตามผลการทดลองข้างต้น

ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาล และ ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสม ต่อการเจริญและการผลิต PHB ของแบคทีเรียในระดับขวดเขย่าตามข้อ 3.6.3.1 โดยใช้น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร และแปรผัน C/N เท่ากับ 5 20 50 100 200 และไม่มีเติมแหล่งไนโตรเจน โดยเลี้ยงในภาวะที่อุณหภูมิ 30 °C อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณน้ำตาล และปริมาณ PHB ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี ผลการทดลองมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.13

ตารางที่ 4.17 เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางจลศาสตร์ของการผลิต PHB โดย *A. lata* เมื่อใช้น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตรและแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เท่ากับ 5, 20, 50, 100, 200 และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

C/N	ค่าพารามิเตอร์ทางจลศาสตร์				
	μ (h ⁻¹)	ρ (g-PHA/g- CDW/h)	γ (g-sugar/g-CDW/h)	$Y_{P/S}$ (g-PHA/g-sugar)	$Y_{X/S}$ (g-CDW/g-sugar)
5	0.013	0	0.03	0	0.32
20	0.029	0	0.04	0	0.50
50	0.018	0.0075	0.03	0.01	0.38
100	0.016	0.0082	0.04	0.10	0.29
200	0.015	0.0109	0.05	0.21	0.22
No N	0.001	0.0075	0.04	0.11	0.19



รูปที่ 4.13 ผลของ C/N ต่อ μ และ ρ โดย *A. lata* DSM 1122 เมื่อใช้น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร และ C/N เท่ากับ 200 (หมายเหตุ: ในภาพแสดงเป็นอัตราส่วน N/C เพื่อให้สามารถแสดงผลของอัตราส่วน C/N ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนได้)

จากตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.13 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับอัตราส่วน C/N 200 เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต PHB โดยให้ ρ สูงสุดเท่ากับ 0.0109 g-PHA/g-CDW/h และ $Y_{P/S}$ สูงสุด คือ 0.2106 g-PHA/g-sugar ดังนั้น อัตราส่วน C/N ที่เหมาะสมในการผลิต PHB คือ 200

ผลการศึกษาเมื่อพิจารณาพร้อมกับ ผลการทดลองของ ชนารัตน์ สุทธะนันท์ (2554) ที่ศึกษาการผลิต PHB เมื่อใช้น้ำอ้อยป็นแหล่งคาร์บอนในระดับขวดเขย่า โดยทำการเปรียบเทียบ *A. lata* 3 สายพันธุ์ คือ DSM 1122 DSM 1123 และ DSM 1124 พบว่า *A.lata* DSM 1123 และ *A. lata* DSM 1124 มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ PHB สูงกว่า *A. lata* DSM 1122 โดย *A. lata* DSM 1123 มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ PHB สูงสุด เมื่อความเข้มข้นของซูโครสในน้ำอ้อยเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 ได้สัดส่วน PHB เท่ากับ 44.1 % ปริมาณ PHB เท่ากับ 3.528 กรัมต่อลิตร และ น้ำหนักเซลล์ 8.00 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 72

ในการทดลองในระดับถังหมัก ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ *A. lata* DSM 1123 เพื่อศึกษาการผลิต PHB เปรียบเทียบระหว่างน้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายดิบ น้ำเชื่อม น้ำอ้อย และกากน้ำตาล โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร C/N เท่ากับ 200 สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

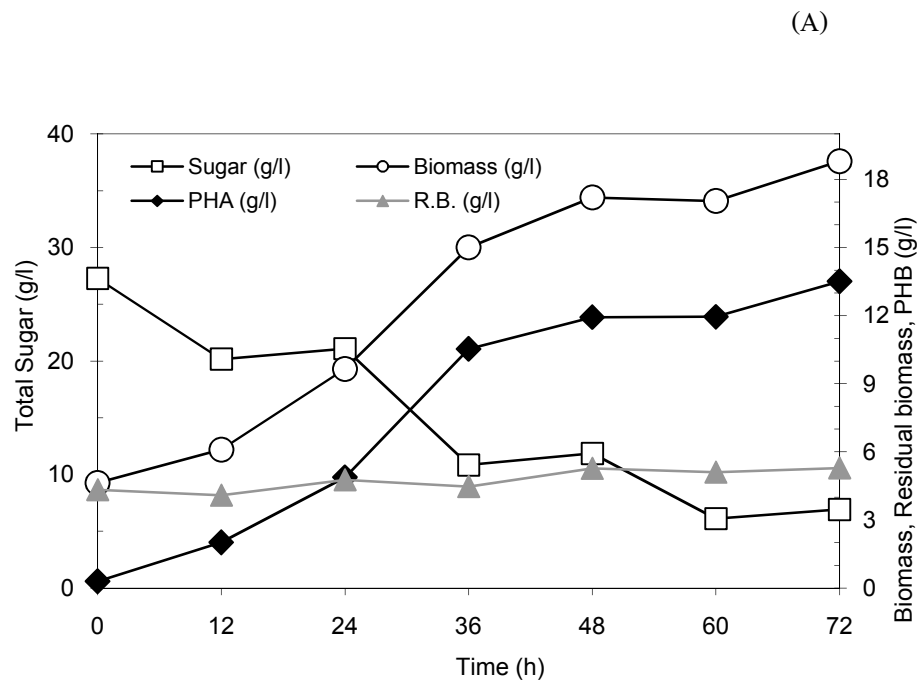
4.2 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับถังหมัก

4.2.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB

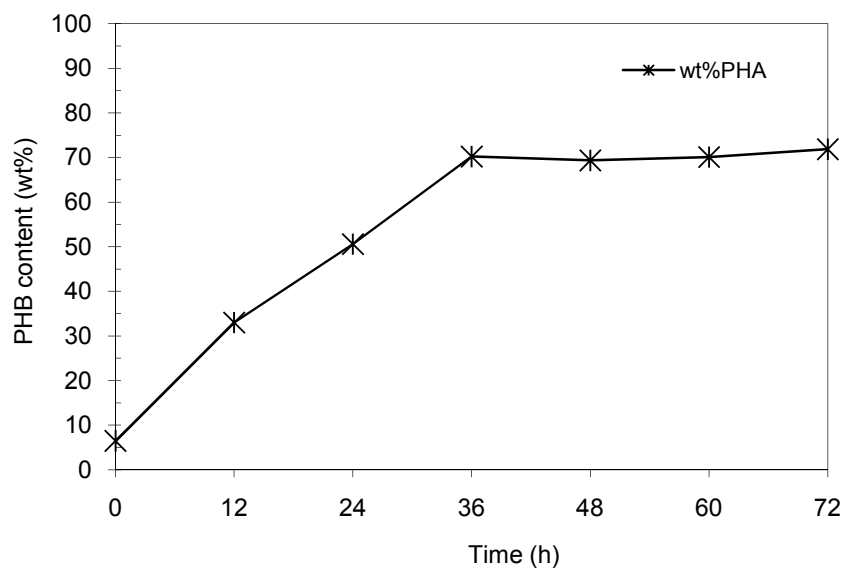
งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาภาวะแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับถังหมัก โดยเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนได้แก่ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลดิบ น้ำเชื่อม น้ำอ้อย และ กากน้ำตาล ภาวะที่ใช้คือกำหนดให้แหล่งคาร์บอนที่ใช้มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร C/N เท่ากับ 200 โดยเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในภาวะที่อุณหภูมิ 30 °C ควบคุม pH 7 อัตราการให้อากาศ 1 vvm และควบคุมอัตราการกวนให้เท่ากับ 500 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณน้ำตาล และปริมาณ PHB ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี ตามวิธีข้อ 3.6.2.2 - 3.6.2.6 ผลการทดลองมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.18-4.22 และรูปที่ 4.14-1.18

ตารางที่ 4.18 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	4.63	4.33	27.27	0.30	6.45
12	6.10	4.09	20.17	2.01	32.98
24	9.65	4.77	21.09	4.88	50.58
36	15.00	4.47	10.84	10.53	70.21
48	17.20	5.27	11.86	11.93	69.36
60	17.05	5.10	6.11	11.95	70.08
72	18.80	5.29	6.92	13.51	71.87



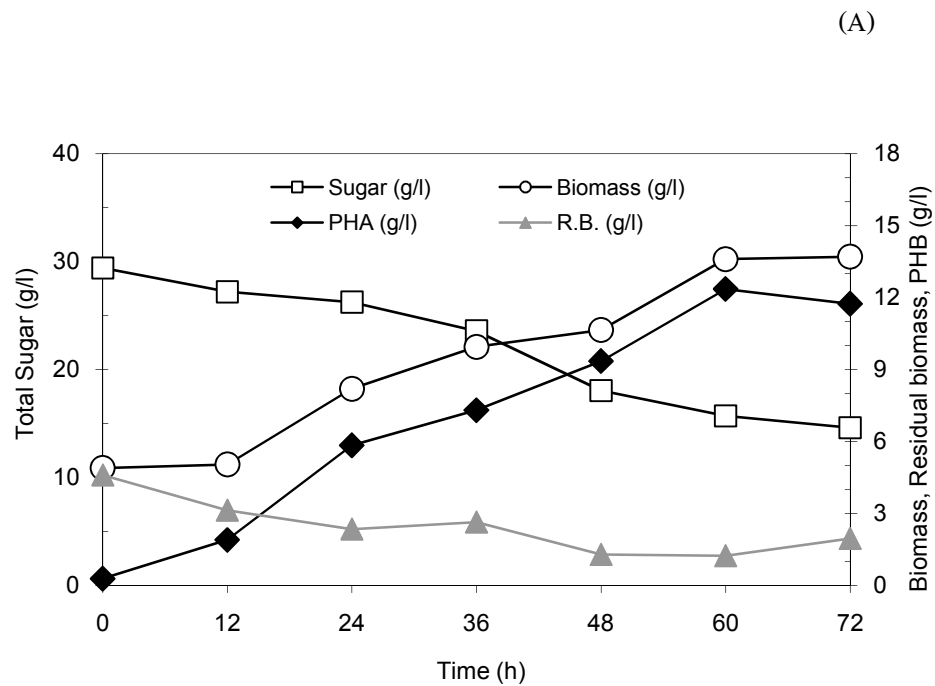
(B)



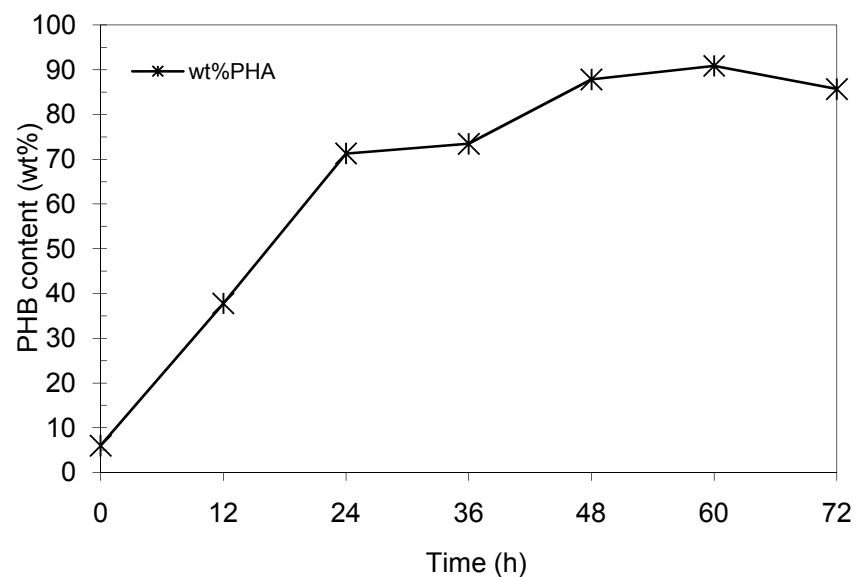
รูปที่ 4.14 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm

ตารางที่ 4.19 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) และ เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบ 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายดิบ 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)
0	4.90	4.61	29.41	0.29	6.00
12	5.05	3.14	27.20	1.91	37.79
24	8.20	2.35	26.25	5.845	71.30
36	9.95	2.64	23.58	7.31	73.46
48	10.65	1.30	18.05	9.35	87.83
60	13.60	1.24	15.71	12.36	90.86
72	13.70	1.96	14.62	11.74	85.70



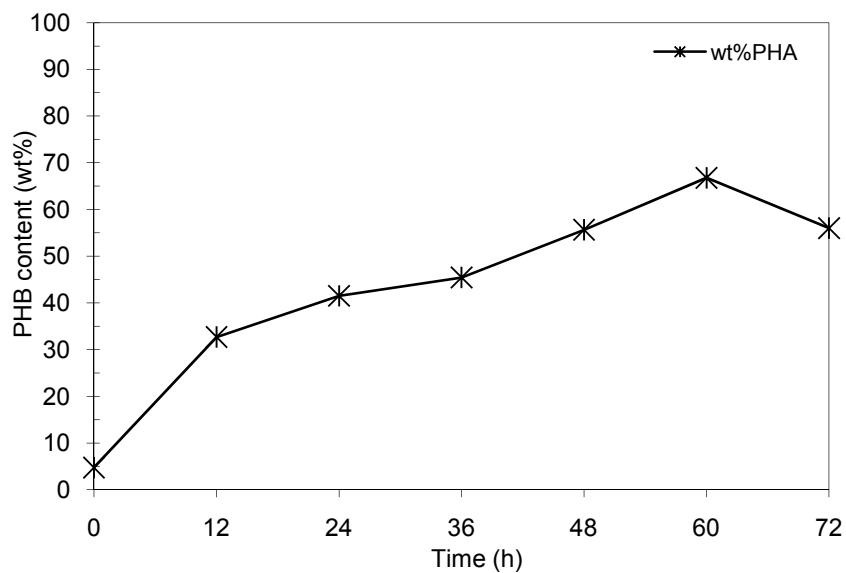
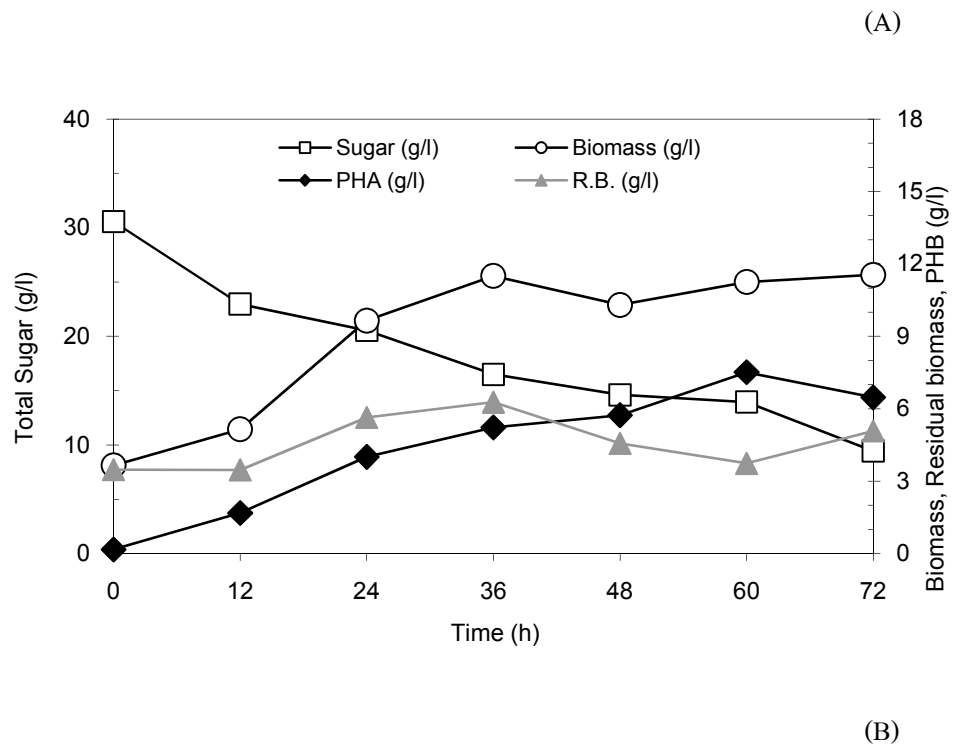
(B)



รูปที่ 4.15 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลดิบ 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm

ตารางที่ 4.20 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1 vvm

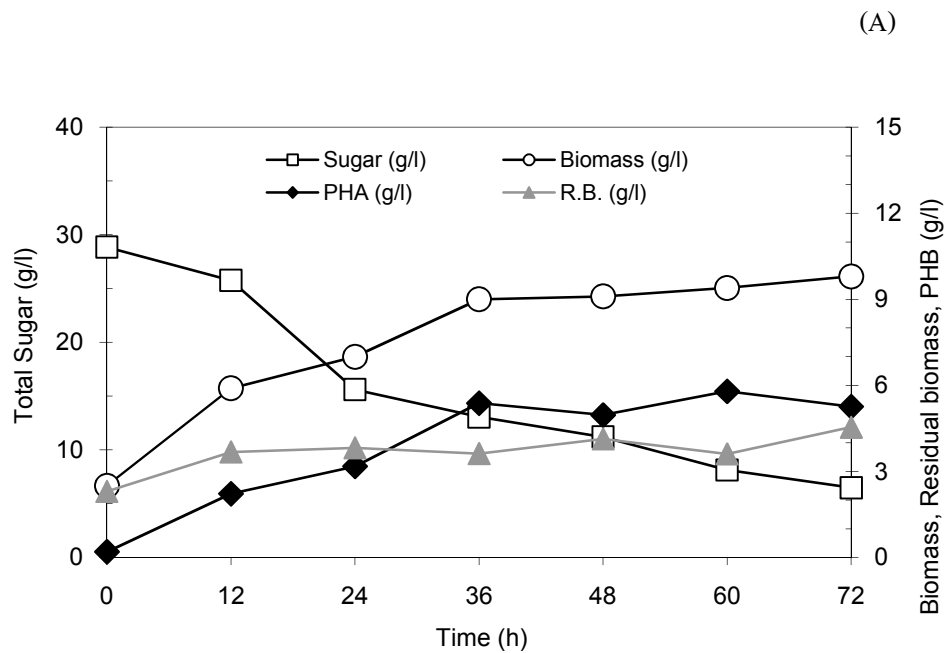
เวลา (ชั่วโมง)	ซูโครสในน้ำเชื่อม 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์ แห้ง (%wt)
0	3.65	3.48	30.56	0.17	4.74
12	5.15	3.47	22.97	1.68	32.68
24	9.65	5.64	20.54	4.01	41.51
36	11.50	6.28	16.50	5.22	45.43
48	10.30	4.57	14.61	5.73	55.64
60	11.25	3.74	13.95	7.51	66.70
72	11.55	5.08	9.45	6.47	56.01



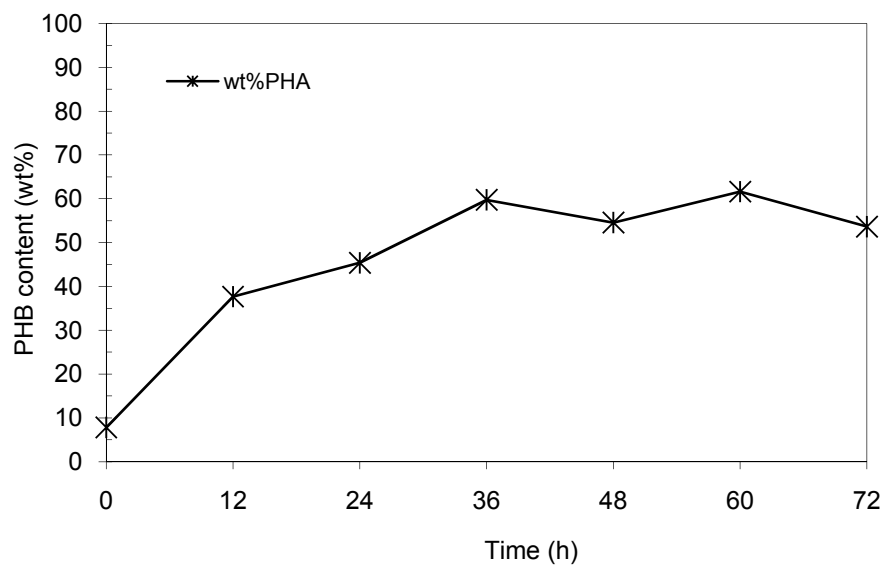
รูปที่ 4.16 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm

ตารางที่ 4.21 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำอ้อยที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ซูโครสในน้ำอ้อย 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์ แห้ง (%wt)
0	2.50	2.30	28.86	0.19	7.81
12	5.90	3.68	25.76	2.22	37.66
24	7.07	3.82	15.61	3.18	45.40
36	9.05	3.62	13.07	5.38	59.76
48	9.13	4.13	11.21	4.96	54.57
60	9.45	3.61	8.14	5.79	61.63
72	9.80	4.54	6.49	5.26	53.66



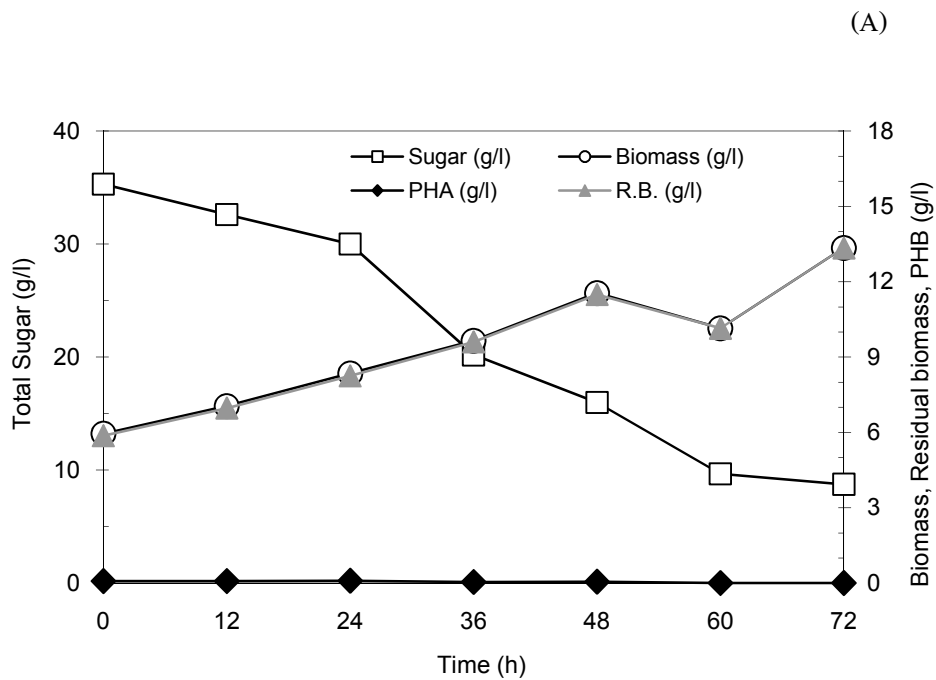
(B)



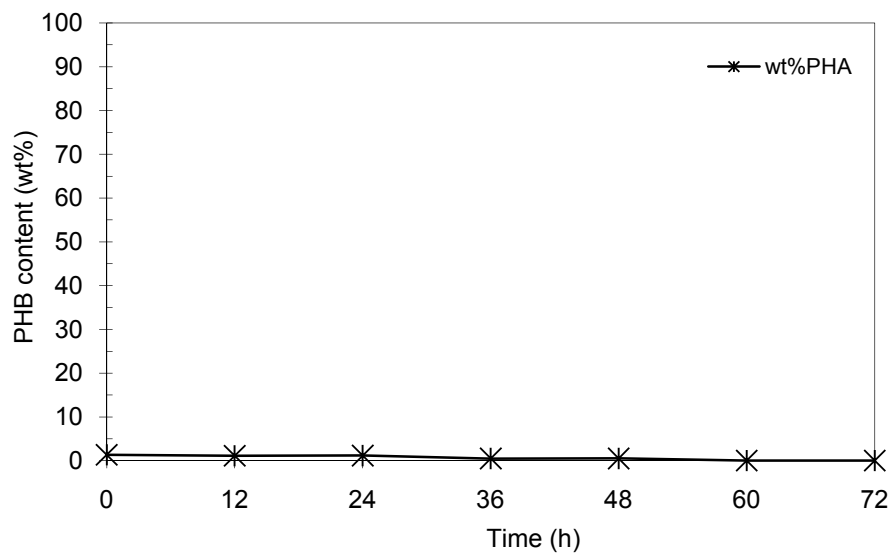
รูปที่ 4.17 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำอ้อย 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm

ตารางที่ 4.22 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาลที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ซูโครสในกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm				
	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	PHB (กรัมต่อลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์ แห้ง (%wt)
0	5.95	5.87	35.31	0.08	1.33
12	7.05	6.97	32.62	0.08	1.13
24	8.35	8.25	30.01	0.01	1.17
36	9.65	9.60	20.2	0.05	0.49
48	11.55	11.49	15.99	0.06	0.53
60	10.15	10.15	9.67	0.00	0.03
72	13.35	13.35	8.75	0.00	0.03



(B)



รูปที่ 4.18 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิว ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm

ผลการทดลองในตารางที่ 4.18 – 4.22 แสดงว่าการผลิต PHB โดย *A.lata* DSM1123 ในระดับถังหมัก โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของซูโครสในแหล่งคาร์บอนทุกชนิดเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 ความเร็วการกวนเท่ากับ 500 rpm และอัตราการให้อากาศ 1vvm เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว ให้น้ำหนักเซลล์สูงสุดคือ 18.80 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHB สูงสุด 13.51 กรัมต่อลิตร สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 71.87 % ที่ชั่วโมงที่ 72 ในขณะที่เดียวกันเมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบให้ค่าสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 90.86 % ปริมาณ PHB เท่ากับ 12.357 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 60 และน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 13.70 ที่ชั่วโมงที่ 72 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมให้น้ำหนักเซลล์ 11.55 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 72 และปริมาณ PHB สูงสุด 7.51 กรัมต่อลิตร สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 66.7 % ที่ชั่วโมงที่ 60 ส่วนน้ำอ้อยให้น้ำหนักเซลล์ 9.8 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 5.793 สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 61.63 % ที่ชั่วโมงที่ 60 และเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาล พบว่าให้น้ำหนักเซลล์สูงสุดเท่ากับ 13.35 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณ PHB 0.00 กรัมต่อลิตร สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.03 % ที่ชั่วโมงที่ 72

ลำดับต่อมา นำข้อมูลในตารางที่ 4.18 – 4.22 เพื่อคำนวณค่าจลนศาสตร์และนำเสนอข้อมูลในตารางที่ 4.23

ตารางที่ 4.23 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของการผลิต PHB โดย *A. lata* DSM 1123 เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย 5 ชนิดคือ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลดิบ น้ำเชื่อม น้ำอ้อย และกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร และให้อัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm

ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย	พารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์					
	μ (h ⁻¹)	Productivity (g/l/h)	ρ (g-PHA/g- CDW/h)	γ (g-sugar/g- CDW/h)	$Y_{P/S}$ (g-PHA/g- sugar)	$Y_{X/S}$ (g-CDW/g- sugar)
น้ำตาลทรายขาว	0.028	0.184	0.044	0.07	0.62	0.04
น้ำตาลดิบ	0.016	0.159	0.056	0.08	0.48	0.13
น้ำเชื่อม	0.006	0.087	0.023	0.07	0.34	0.03
น้ำอ้อย	0.002	0.070	0.025	0.09	0.26	0.02
กากน้ำตาล	0.017	0	0	0.04	0.01	0.32

เมื่อพิจารณาค่าทางจลนพลศาสตร์ เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาวพบว่า ประสิทธิภาพในการผลิตมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.184 g-PHB/l/h ρ เท่ากับ 0.044 g-PHB/g-CDW/h $Y_{P/S}$ สูงสุดเท่ากับ 0.62 g-PHB/g-sugar และค่า μ สูงสุดเท่ากับ 0.028 h⁻¹ เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายดิบพบว่า ประสิทธิภาพในการผลิตมีค่าเท่ากับ 0.159 g-PHB/l/h ให้ค่า ρ สูงสุดเท่ากับ 0.056 g-PHB/g-CDW/h $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.48 g-PHB/g-sugar และค่า μ เท่ากับ 0.016 h⁻¹ สำหรับแหล่งคาร์บอนผสมอย่าง น้ำเชื่อม น้ำอ้อย และกากน้ำตาล พบว่า เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมค่า μ เท่ากับ 0.006 h⁻¹ ประสิทธิภาพในการผลิต PHB เท่ากับ 0.087 g-PHB/l/h ρ เท่ากับ 0.023 g-PHB/g-CDW/h และ $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.34 g-PHB/g-sugar เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำอ้อย ค่า μ เท่ากับ 0.002 h⁻¹ ประสิทธิภาพในการผลิต PHB เท่ากับ 0.070 g-PHB/l/h ρ เท่ากับ 0.025 g-PHB/g-CDW/h และ $Y_{P/S}$ สูงสุดเท่ากับ 0.26 g-PHB/g-sugar และ เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาล ค่า μ มีค่าเท่ากับ 0.017 h⁻¹ แต่ไม่สามารถผลิต PHB ได้ ประสิทธิภาพในการผลิต PHB จึงมีค่าเท่ากับ 0 g-PHB/l/h ρ เท่ากับ 0 g-PHB/g-CDW/h และ $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.01 g-PHB/g-sugar

จากผลการทดลอง ดังกล่าวแสดงว่า *A. lata* DSM 1123 สามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณมาก เมื่อแหล่งคาร์บอนคือน้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลดิบ ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเป็นหลัก สำหรับน้ำเชื่อม และน้ำอ้อยซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ทดแทนการใช้น้ำตาลทรายขาวได้ แม้ศักยภาพในการผลิต PHB จะต่ำกว่าน้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลดิบ แต่น้ำเชื่อมและน้ำอ้อยก็เป็นตัวเลือกที่น่าสนใจสำหรับการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากน้ำเชื่อม และน้ำอ้อยเป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาลอ้อยที่มีราคาต่ำกว่าน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลดิบ และเมื่อพิจารณาในแง่ความเหมาะสมทางด้านเศรษฐศาสตร์ ดังแสดงในตารางที่ 4.24 และประสิทธิภาพในการผลิต PHB พบว่าการใช้น้ำเชื่อมเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นแนวทางที่สามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรมได้

ตารางที่ 4.24 ราคาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาล และ ต้นทุนวัตถุดิบต่อหน่วย (บาทต่อกิโลกรัม) ในการผลิต PHB ในระดับถึงหมักจากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาล 5 ชนิด

ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาล	ปริมาณวัตถุดิบ (กรัมต่อลิตร)	% Yield	ปริมาณวัตถุดิบที่ต้องใช้ในการผลิต PHB 1 กิโลกรัม (กิโลกรัม) (1)	ราคาวัตถุดิบ* (บาท/กิโลกรัม) (2)	ต้นทุนวัตถุดิบ (บาท/กิโลกรัม PHA) (1) x (2)
น้ำตาลทรายขาว	30.00	45.03	2.22	20.00	44.40
น้ำตาลทรายดิบ	30.00	39.13	2.56	17.00	43.52
น้ำเชื่อม	32.68	19.76	5.05	5.16	26.06
น้ำอ้อย	86.24	6.09	16.40	1.71	28.04
กากน้ำตาล	56.12	0.01	18706.67	3.00	56120.00

(ที่มา: รายงานโครงการผลิตพลาสติกชีวภาพ PLA และ PHB ในอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล)

หมายเหตุ * ราคาวัตถุดิบ เดือนสิงหาคม 2012

4.2.2 อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิต PHB

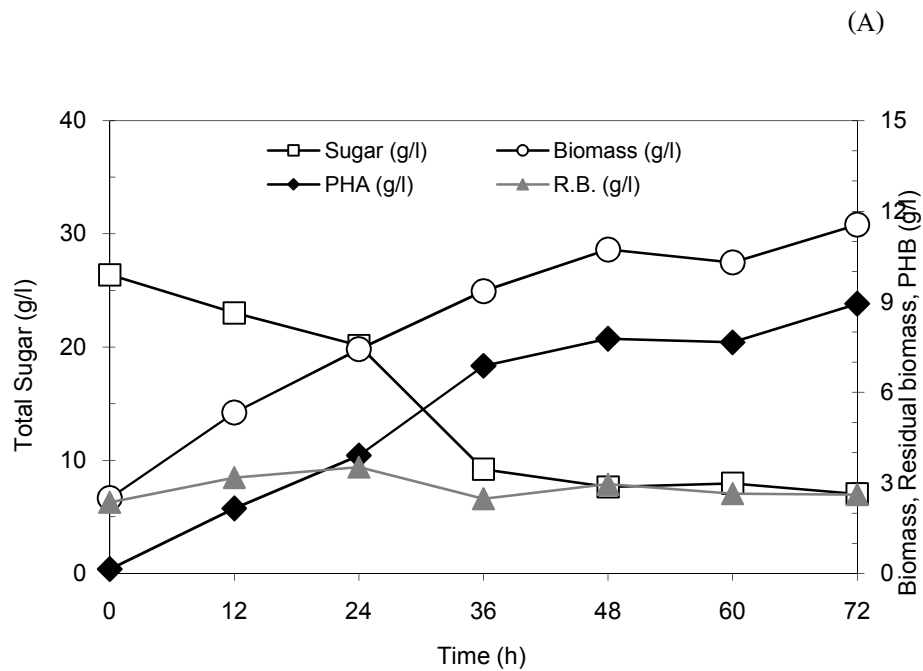
งานวิจัยนี้ใช้ *A. lata* DSM 1123 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแอโรบิกในการผลิต PHB ดังนั้นออกซิเจนจึงนับเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตรวมทั้งการชีวสังเคราะห์ PHB ซึ่งในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ระบบการให้อากาศนับเป็นสาเหตุใหญ่ของต้นทุนการผลิตที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นการหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมจึงเป็นแนวทางที่สามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

Penloglou และคณะ (2012) รายงานว่าออกซิเจนเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและสังเคราะห์ PHB ของ *Alcaligenes latus* (ปัจจุบันคือ *Azohydromonas lata*) และศึกษาการแปรผันค่าการละลายของออกซิเจนในการเพาะเลี้ยง *A. latus* เป็น 5% 15% 20% 25 % และ 30% โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อปริมาณออกซิเจนมากขึ้น ส่งผลให้การเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น โดยเมื่อปริมาณออกซิเจนเท่ากับ 30% ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุดเท่ากับ 2.05 กรัมต่อลิตร และ เมื่อปริมาณออกซิเจนเท่ากับ 20% สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 47%

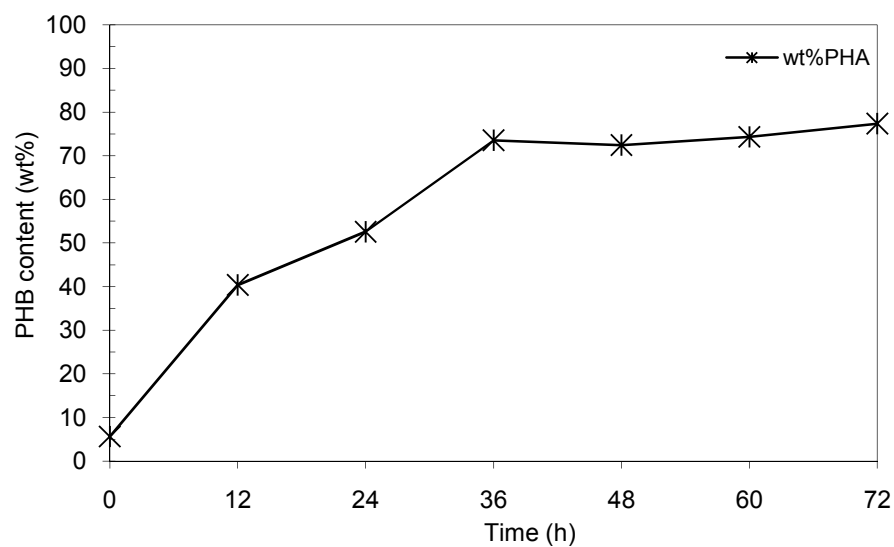
หลังจากได้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับถังหมักคือน้ำเชื่อม ขั้นตอนต่อไปเป็นการศึกษาปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมในการผลิต PHB งานวิจัยนี้ศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับถังหมัก 5 ลิตรโดยแปรผันอัตราการให้อากาศ เป็น 0.25 0.5 และ 1 vvm ภาวะการเพาะเลี้ยงคือ ใช้น้ำเชื่อมเป็นแหล่งคาร์บอน ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 7 และอัตราการกวนเท่ากับ 500 rpm เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณน้ำตาล และปริมาณ PHB ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟ ผลการทดลองมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 14.25 - 14.27 และรูปที่ 4.19 - 4.21

ตารางที่ 4.25 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.25 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ซูโครสในน้ำเชื่อม 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.25 vvm					
	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	(NH ₄) ₂ SO ₄ ที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	PHB (กรัมต่อ ลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนัก เซลล์แห้ง (%wt)
0	2.50	2.36	26.38	67.43	0.14	5.65
12	5.33	3.18	23.01	0	2.15	40.37
24	7.43	3.52	20.13	0	3.91	52.59
36	9.35	2.47	9.210	0	6.88	73.54
48	10.73	2.96	7.64	0	7.77	72.44
60	10.30	2.64	7.96	0	7.66	74.33
72	11.55	2.61	7.03	0	8.93	77.36



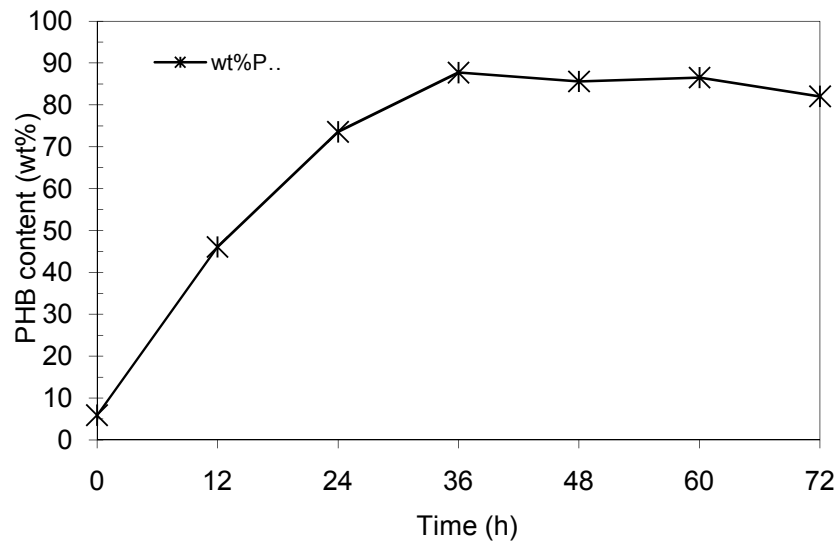
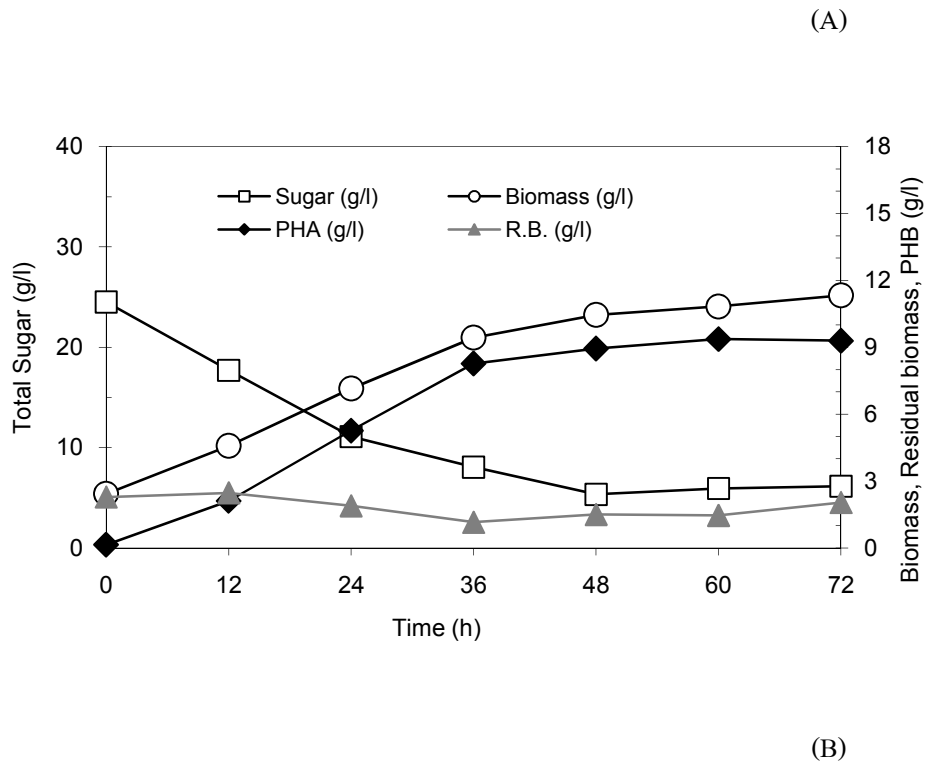
(B)



รูปที่ 4.19 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 0.25 vv

ตารางที่ 4.26 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

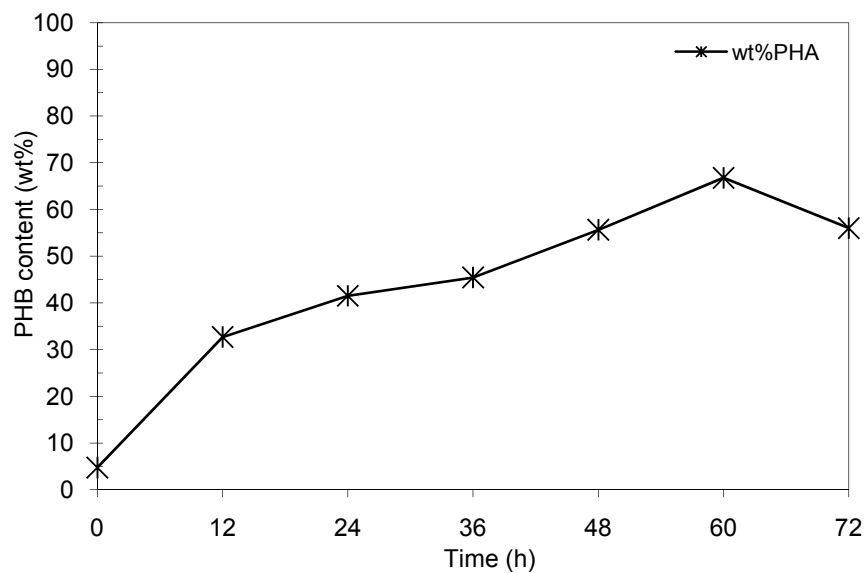
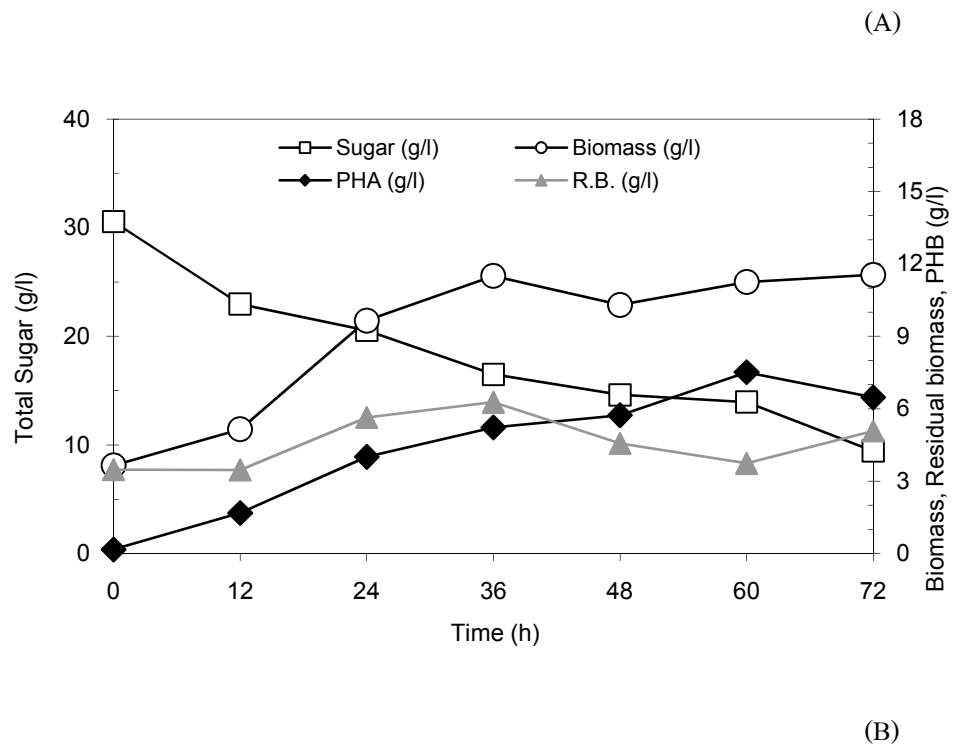
เวลา (ชั่วโมง)	ซูโครสในน้ำเชื่อม 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm					
	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	(NH ₄) ₂ SO ₄ ที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	PHB (กรัมต่อ ลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนัก เซลล์แห้ง (%wt)
0	2.43	2.29	24.50	66.09	0.14	5.89
12	4.58	2.47	17.70	0	2.11	46.07
24	7.15	1.89	11.10	0	5.26	73.57
36	9.43	1.16	8.06	0	8.27	87.72
48	10.45	1.51	5.34	0	8.94	85.60
60	10.83	1.46	5.93	0	9.37	86.51
72	11.33	2.04	6.15	0	9.29	82.03



รูปที่ 4.20 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

ตารางที่ 4.27 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ซูโครสในน้ำเชื่อม 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm					
	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	(NH ₄) ₂ SO ₄ ที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	PHB (กรัมต่อ ลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนัก เซลล์แห้ง (%wt)
0	3.65	3.48	30.56	66.67	0.17	4.74
12	5.15	3.47	22.97	0	1.68	32.68
24	9.65	5.64	20.54	0	4.01	41.51
36	11.50	6.28	16.50	0	5.22	45.43
48	10.30	4.57	14.61	0	5.73	55.64
60	11.25	3.74	13.95	0	7.51	66.70
72	11.55	5.08	9.45	0	6.47	56.01



รูปที่ 4.21 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm

จากข้อมูลในตารางที่ 4.25 – 4.27 และและรูปที่ 4.19 – 4.21 แปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.25 0.5 และ 1.0 vvm โดยกำหนดอัตราเร็วในการกวนคงที่เท่ากับ 500 rpm พบว่าอัตราการให้อากาศ 0.25 และ 1.0 vvm ให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ชั่วโมงที่ 72 มีค่า 11.55 กรัมต่อลิตร และใกล้เคียงกับอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm คือ 11.33 กรัมต่อลิตร โดยอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ให้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 9.36 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 60 ตามด้วยอัตราการให้อากาศ 0.25 และ 1.0 vvm ซึ่งให้การผลิต PHB เท่ากับ 8.935 กรัมต่อลิตร และ 7.512 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

ลำดับต่อมานำข้อมูลในตารางที่ 4.25 – 4.27 เพื่อคำนวณค่าจลนศาสตร์และนำเสนอข้อมูลในตารางที่ 4.28

ตารางที่ 4.28 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของการผลิต PHB โดย *A. lata* DSM 1123 เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 อัตราเร็วการกวน 500 rpm และแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.25 0.5 และ 1.0 vvm

อัตราการให้อากาศ (vvm)	พารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์					
	μ (h ⁻¹)	Productivity (g/l/h)	ρ (g-PHA/g-CDW/h)	γ (g-sugar/g-CDW/h)	$Y_{P/S}$ (g-PHA/g-sugar)	$Y_{X/S}$ (g-CDW/g-sugar)
0.25	0.003	0.187	0.0472	0.11	0.42	0.02
0.5	0.002	0.226	0.0491	0.08	0.58	0.02
1.0	0.006	0.087	0.0230	0.07	0.34	0.03

เมื่อพิจารณาค่าทางพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ตามตารางที่ 4.28 พบว่า เมื่ออัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm μ ของ *A. lata* DSM 1123 สูงสุดเท่ากับ 0.0060 h⁻¹ ตามด้วย อัตราการให้อากาศ 0.25 vvm และ 0.5 vvm ซึ่งให้ μ เท่ากับ 0.0031 h⁻¹ และ 0.0015 h⁻¹ตามลำดับ และ อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ให้ค่าประสิทธิภาพในการผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 0.226 g/l/h ρ สูงสุดเท่ากับ 0.0491 g-PHA/g-CDW/h และ $Y_{P/S}$ สูงสุดเท่ากับ 0.58 g-PHA/g-sugar

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เหลือที่ชั่วโมงที่ 72 พบว่า เมื่ออัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.25 vvm ปริมาณน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 7.03 กรัมต่อลิตร และ γ สูงสุดเท่ากับ 0.1099 g-sugar/g-CDW/h เมื่ออัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 vvm ปริมาณน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 6.15 กรัมต่อลิตร และ γ เท่ากับ 0.0824 g-sugar/g-CDW/h และเมื่ออัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.1 vvm ปริมาณน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 9.45 กรัมต่อลิตร และ γ เท่ากับ 0.0669 g-sugar/g-CDW/h สำหรับปริมาณแหล่งไนโตรเจน คือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พบว่าหมดในระยะเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงในทุกอัตราการให้อากาศ

จากผลการทดลองดังกล่าว สรุปได้ว่าอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดย *A. lata* DSM 1123 ดังนั้น ในการทดลองขั้นตอนต่อไปจึงกำหนดอัตราการให้อากาศคงที่เท่ากับ 0.5 vvm และแปรผันอัตราการกวน

4.2.3 อัตราการกวนที่เหมาะสมในการผลิต PHB

การกวนทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์ผสมเข้ากันเป็นหนึ่งเดียวทั้งระบบ และทำให้เกิดการสัมผัสอย่างทั่วถึงระหว่างเซลล์ ออกซิเจน และอาหาร ทำให้อากาศในระบบกระจายตัวเป็นฟองขนาดเล็ก ทำให้เซลล์สามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามการกวนเป็นระบบที่อาศัยพลังงานกล ซึ่งหมายถึงพลังงานไฟฟ้าที่ต้องสูญเสียไป และการกวนที่มากเกินไป ยังก่อให้เกิดความเครียดจากแรงเฉือน (Shear stress) ทำให้เกิดอันตรายแก่เซลล์ ดังนั้นการศึกษามวลของอัตราการกวนต่อประสิทธิภาพการผลิต PHB ในระดับถังหมัก จึงมีประโยชน์ในการพัฒนาระบบไปสู่การผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม

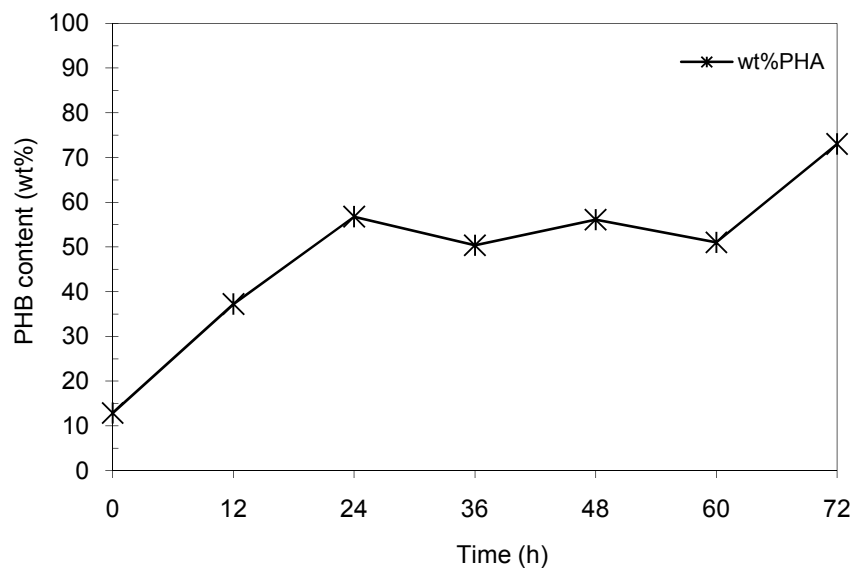
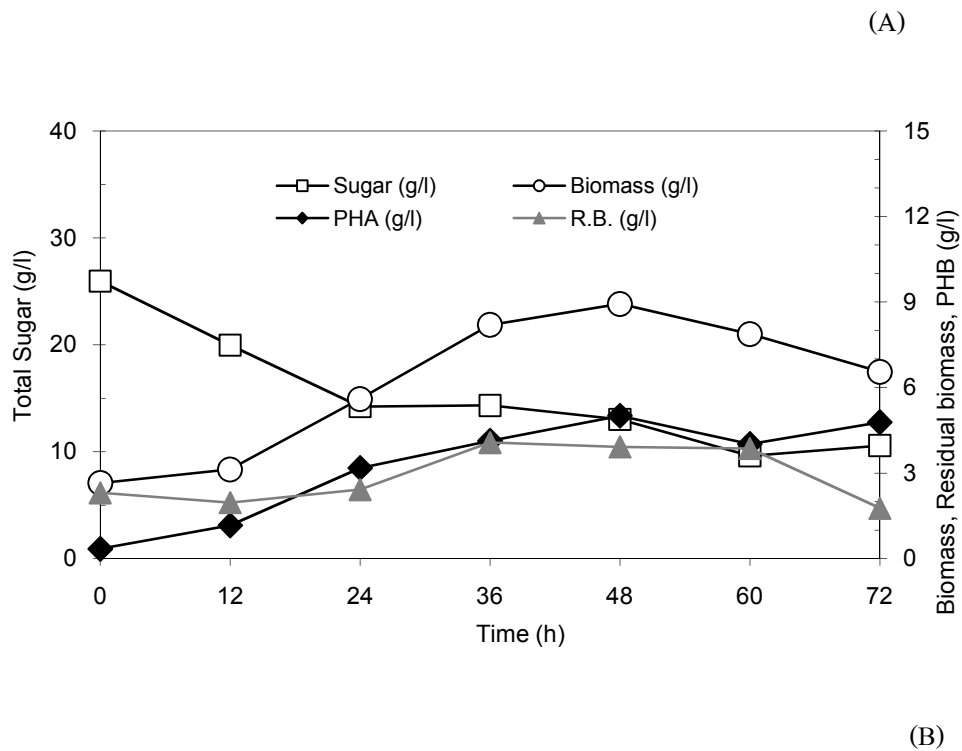
Ching และคณะ(2012) ศึกษาผลของอัตราการกวนต่อการผลิตโคพอลิเมอร์ PHA ชนิดโคพอลิเมอร์ของ *Delftia acidovorans* โดยแปรผันอัตราการกวนเป็น 50 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่าเมื่ออัตราการกวนเพิ่มขึ้นจาก 50 -150 รอบต่อนาที ส่งผลให้ปริมาณ PHA ที่สังเคราะห์ได้ มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นจาก 17% เป็น 31% แต่เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณ PHA ที่สังเคราะห์ได้คงที่อยู่ที่ 31% และพบว่าอัตราการกวนไม่มีผลต่อการส่งเสริมเจริญของ *D. acidovorans* แต่อย่างใด

การทดลองในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษามวลของอัตราการกวนที่ส่งผลต่อการผลิต PHB ทำการทดลองโดยแปรผันอัตราการกวนเป็น 200 400 500 และ 600 rpm โดยกำหนดอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5vvm แหล่งคาร์บอนที่ใช้คือน้ำเชื่อมซึ่งกำหนดให้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 โดยเลี้ยงในภาวะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความคุม

pH 7 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณน้ำตาล และปริมาณ PHB ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี ผลการทดลองมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 14.29 - 14.32 และรูปที่ 4.22 – 4.25

ตารางที่ 4.29 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิว ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถึงหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ซูโครสในน้ำเชื่อม 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm					
	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิว (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	(NH ₄) ₂ SO ₄ ที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	PHB (กรัมต่อ ลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนัก เซลล์แห้ง (%wt)
0	2.65	2.31	25.95	65.81	0.34	12.86
12	3.13	1.96	19.97	0	1.16	37.23
24	5.60	2.42	14.22	0	3.18	56.76
36	8.20	4.07	14.33	0	4.13	50.37
48	8.93	3.92	13.02	0	5.01	56.11
60	7.88	3.86	9.60	0	4.02	51.03
72	6.55	1.77	10.57	0	4.78	73.03

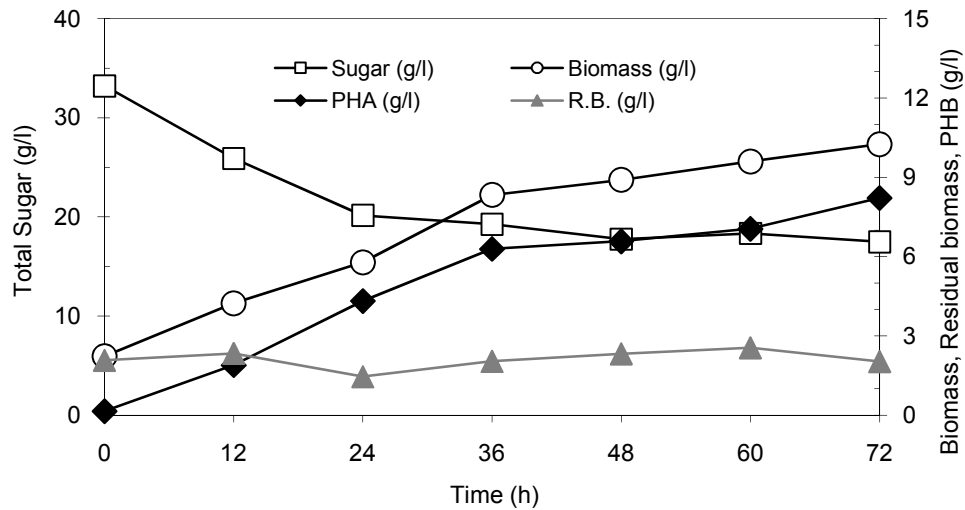


รูปที่ 4.22 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

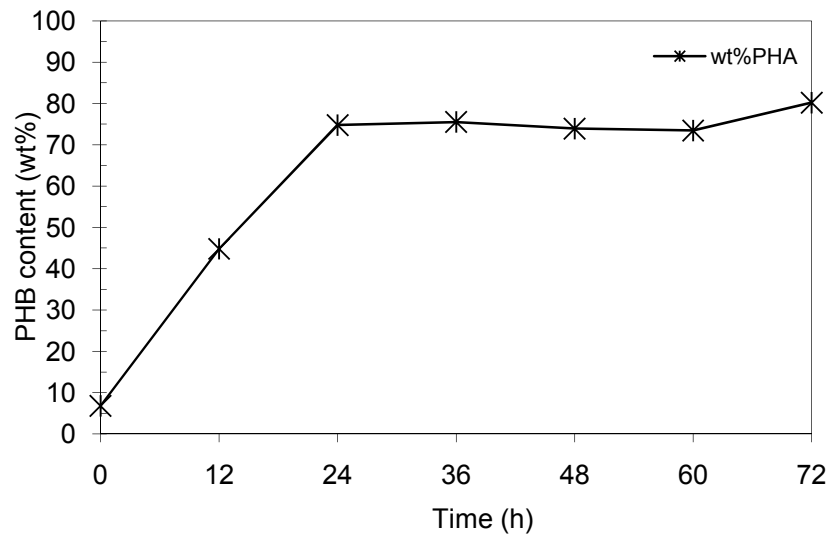
ตารางที่ 4.30 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถึงหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ซูโครสในน้ำเชื่อม 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm					
	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	(NH ₄) ₂ SO ₄ ที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	PHB (กรัมต่อ ลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนัก เซลล์แห้ง (%wt)
0	2.23	2.08	33.22	69.62	0.15	6.81
12	4.23	2.34	25.89	10.12	1.89	44.79
24	5.78	1.46	20.16	0	4.32	74.78
36	8.33	2.04	19.26	0	6.29	75.53
48	8.90	2.32	17.76	0	6.58	73.93
60	9.60	2.55	18.34	0	7.05	73.46
72	10.25	2.03	17.49	0	8.22	80.20

(A)



(B)

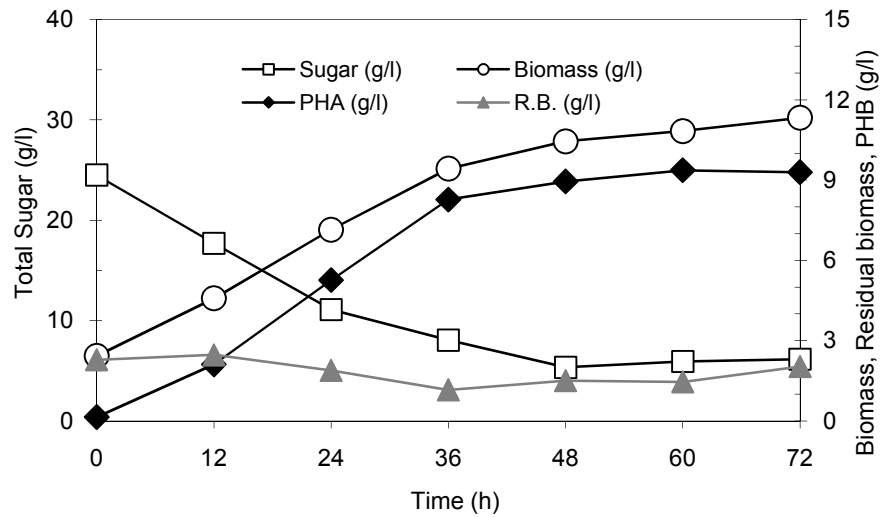


รูปที่ 4.23 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

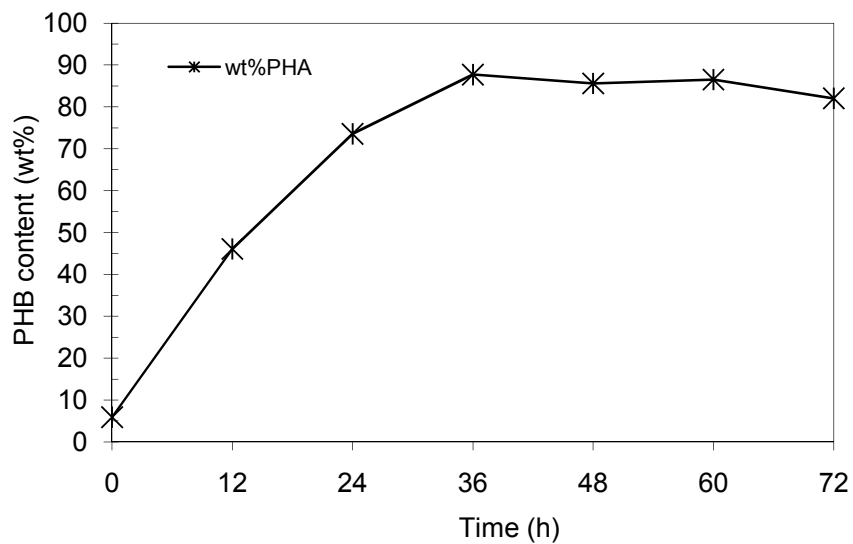
ตารางที่ 4.31 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ซูโครสในน้ำเชื่อม 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm					
	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	(NH ₄) ₂ SO ₄ ที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	PHB (กรัมต่อ ลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนัก เซลล์แห้ง (%wt)
0	2.43	2.29	24.50	61.22	0.14	5.89
12	4.58	2.47	17.70	0	2.11	46.07
24	7.15	1.89	11.10	0	5.26	73.57
36	9.43	1.16	8.06	0	8.27	87.72
48	10.45	1.51	5.34	0	8.94	85.60
60	10.83	1.46	5.93	0	9.37	86.51
72	11.33	2.04	6.15	0	9.29	82.03

(A)



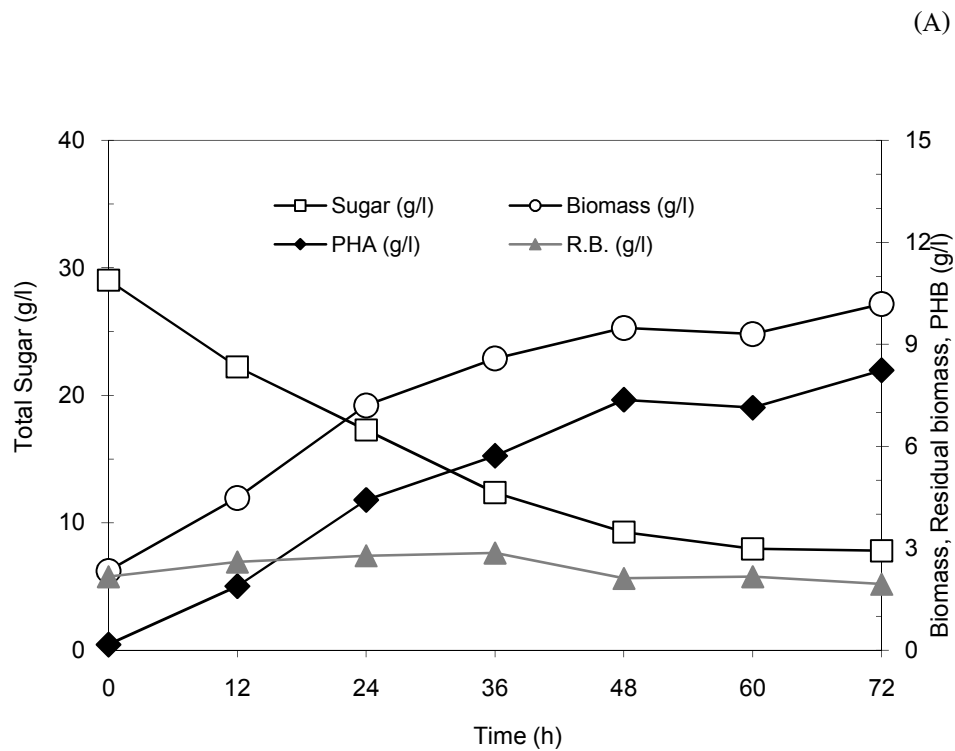
(B)



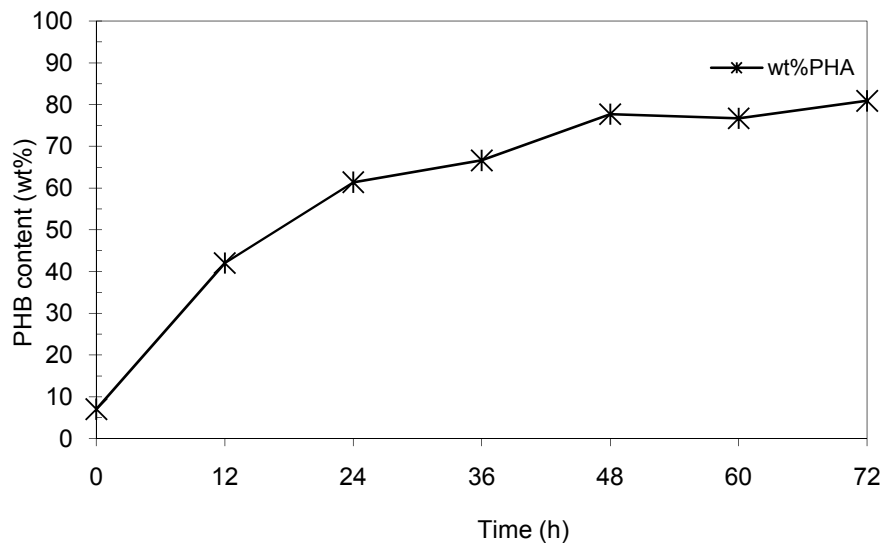
รูปที่ 4.24 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

ตารางที่ 4.32 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถึงหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	ซูโครสในน้ำเชื่อม 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm					
	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	(NH ₄) ₂ SO ₄ ที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	PHB (กรัมต่อ ลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนัก เซลล์แห้ง (%wt)
0	2.33	2.17	29.033	70.48	0.16	7.03
12	4.48	2.60	22.220	9.02	1.88	42.03
24	7.20	2.78	17.279	0	4.42	61.38
36	8.58	2.86	12.363	0	5.72	66.63
48	9.48	2.11	9.268	0	7.37	77.70
60	9.30	2.17	7.946	0	7.13	76.71
72	10.18	1.95	7.796	0	8.23	80.88



(B)



รูปที่ 4.25 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิว ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

จากผลการทดลอง ดังตารางที่ 4.28– 4.31 แสดงให้เห็นว่าเมื่ออัตราการกวนเท่ากับ 200 rpm ได้น้ำหนักเซลล์ เพียง 6.55 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าเมื่อใช้อัตราการกวนเป็น 400 – 600 rpm อย่างชัดเจน โดยได้ปริมาณ PHB สูงสุด 5.011 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 48 ได้สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 73.03 % ที่ชั่วโมงที่ 72 เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 400 rpm ได้น้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 10.25 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณ PHB 8.220 กรัมต่อลิตร คิดเป็นสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 80.02 % ที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งผลค่อนข้างใกล้เคียงกับอัตราการกวน 500 rpm ที่ได้น้ำหนักเซลล์เพิ่มเป็น 11.33 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB สูงสุด 9.369 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 60 สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 87.72 % ที่ชั่วโมงที่ 36 และเมื่ออัตราการกวนเท่ากับ 600 rpm ได้น้ำหนักเซลล์ 10.18 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB สูงสุด 8.234 กรัมต่อลิตร คิดเป็นสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 80.88 % ที่ชั่วโมงที่ 72

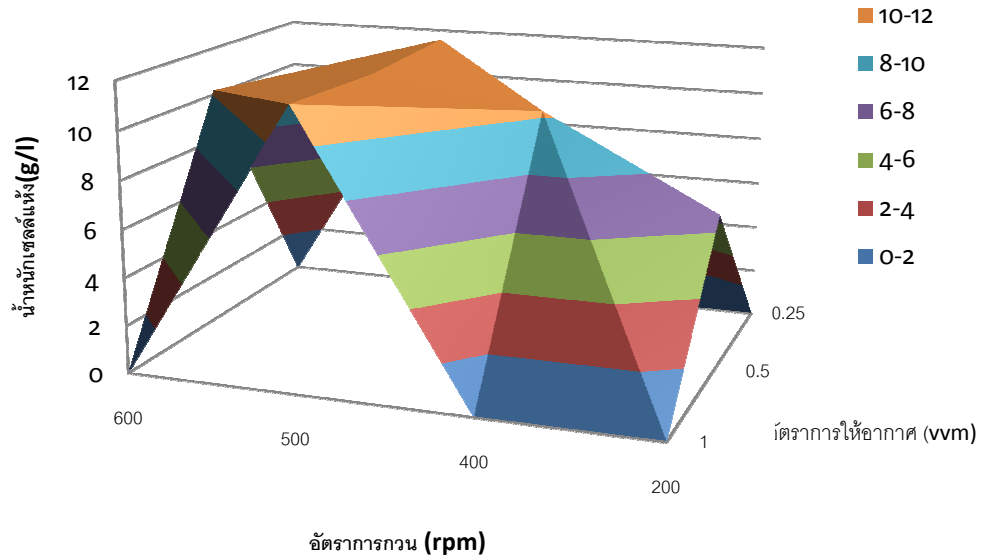
ลำดับต่อมานำข้อมูลในตารางที่ 4.28– 4.32 เพื่อคำนวณค่าจลนศาสตร์และนำเสนอข้อมูลในตารางที่ 4.33

ตารางที่ 4.33 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของการผลิต PHB โดย *A. lata* DSM 1123 เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัม ให้อัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราการกวน เป็น 200 400 500 และ 600 rpm

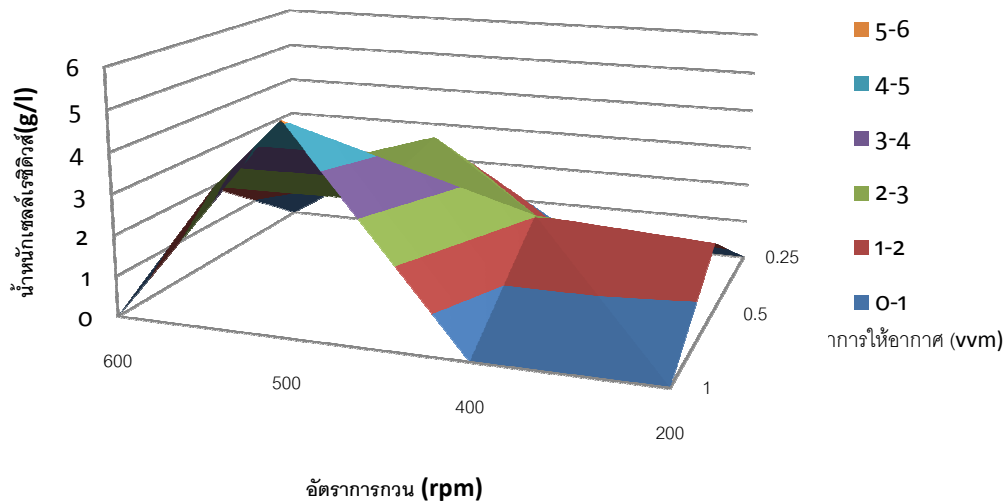
อัตราการกวน (rpm)	พารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์					
	μ (h ⁻¹)	Productivity (g/l/h)	ρ (g-PHA/g- CDW/h)	γ (g-sugar/g- CDW/h)	$Y_{P/S}$ (g-PHA/g- sugar)	$Y_{X/S}$ (g-CDW/g- sugar)
200	0.0003	0.118	0.0249	0.09	0.28	0.06
400	0.0006	0.112	0.0602	0.13	0.43	0.002
500	0.0015	0.226	0.0491	0.08	0.58	0.02
600	0.0007	0.184	0.0510	0.14	0.35	0.01

เมื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ตามตารางที่ 4.33 พบว่า เมื่ออัตราการกวนเท่ากับ 500 rpm *A. lata* DSM 1123 มี μ สูงสุดเท่ากับ 0.0015 h⁻¹ ประสิทธิภาพการผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 0.226 g/l/h และ $Y_{P/S}$ มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.5842 g-PHA/g-sugar แต่ที่อัตราการกวน 400 rpm ให้ ρ สูงสุดเท่ากับ

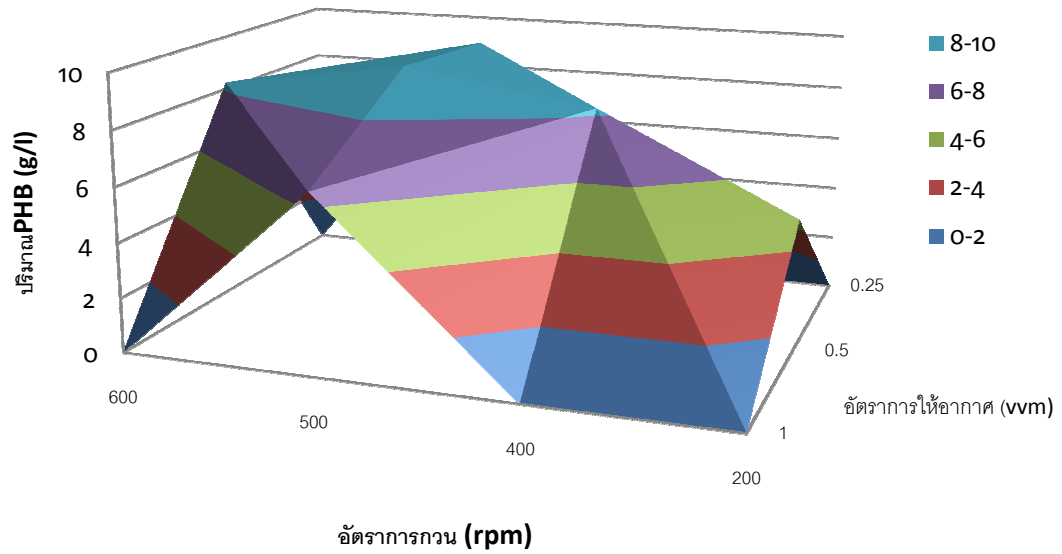
0.0602 g-PHA/g-CDW/h ลำดับต่อมานำข้อมูลจากตารางที่ 4.28- 4.33 ไปสร้างแผนภูมิแบบ surface response ดังรูปที่ 4.26 – 4.29 เพื่อพิจารณาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB



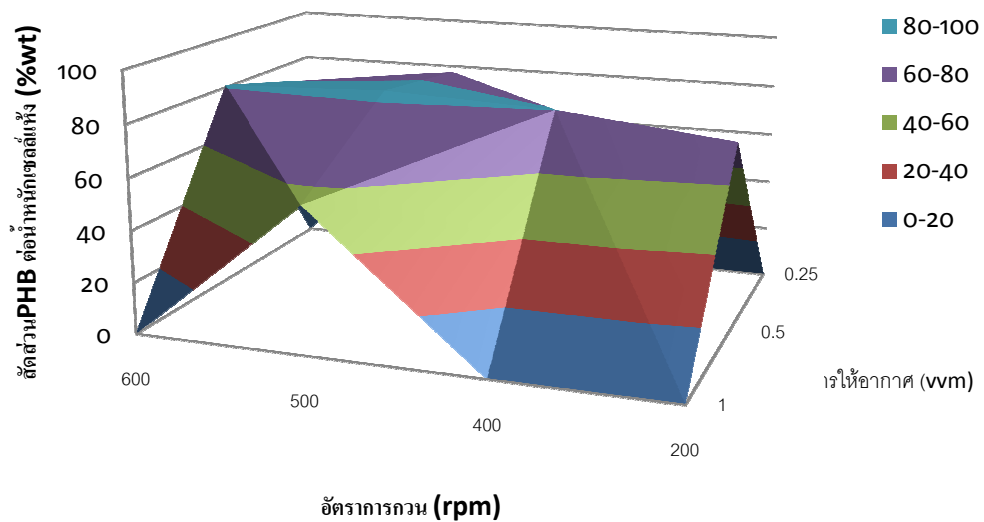
รูปที่ 4.26 แผนภูมิแบบ surface response แสดงผลของอัตราการกวน 200 400 500 และ 600 rpm และ อัตราการใช้อากาศ 1.0 0.5 0.25 vvm ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)



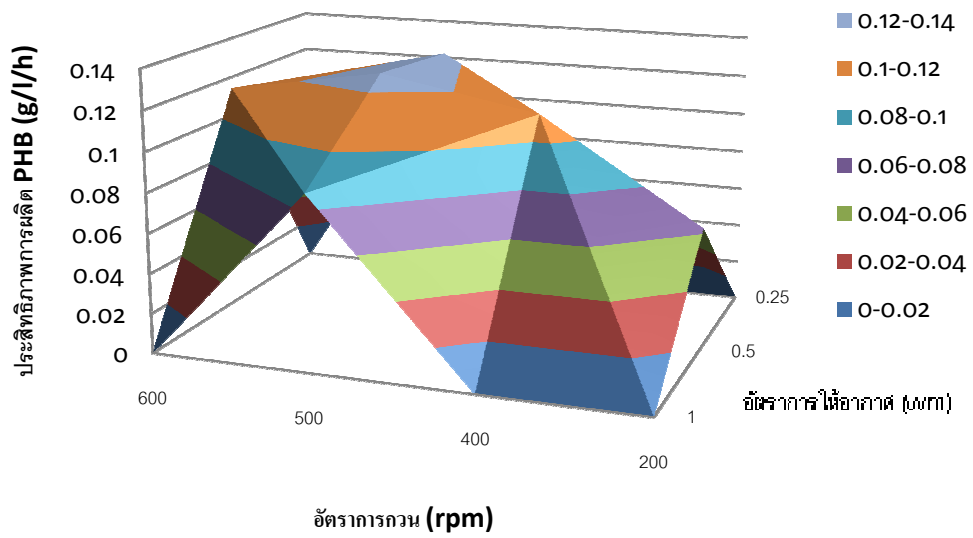
รูปที่ 4.27 แผนภูมิแบบ surface response แสดงผลของอัตราการกวน 200 400 500 และ 600 rpm และ อัตราการใช้อากาศ 1.0 0.5 0.25 vvm ต่อ น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ (g/l)



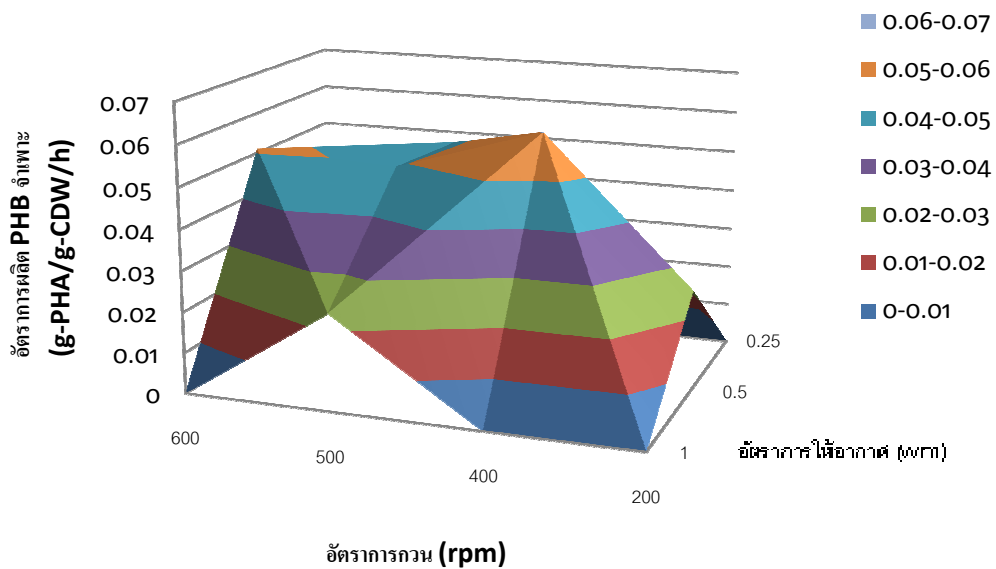
รูปที่ 4.28 แผนภูมิแบบ surface response แสดงผลของอัตราความเร็ว 200 400 500 และ 600 rpm และ อัตราการให้อากาศ 1.0 0.5 0.25 vvm ต่อปริมาณ PHB (g/l)



รูปที่ 4.29 แผนภูมิแบบ surface response แสดงผลของอัตราความเร็ว 200 400 500 และ 600 rpm และ อัตราการให้อากาศ 1.0 0.5 0.25 vvm ต่อสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt)



รูปที่ 4.30 แผนภูมิแบบ surface response แสดงผลของอัตราการกวน 200 400 500 และ 600 rpm และอัตราการให้อากาศ 1.0 0.5 0.25 vvm ต่อประสิทธิภาพการผลิต PHB



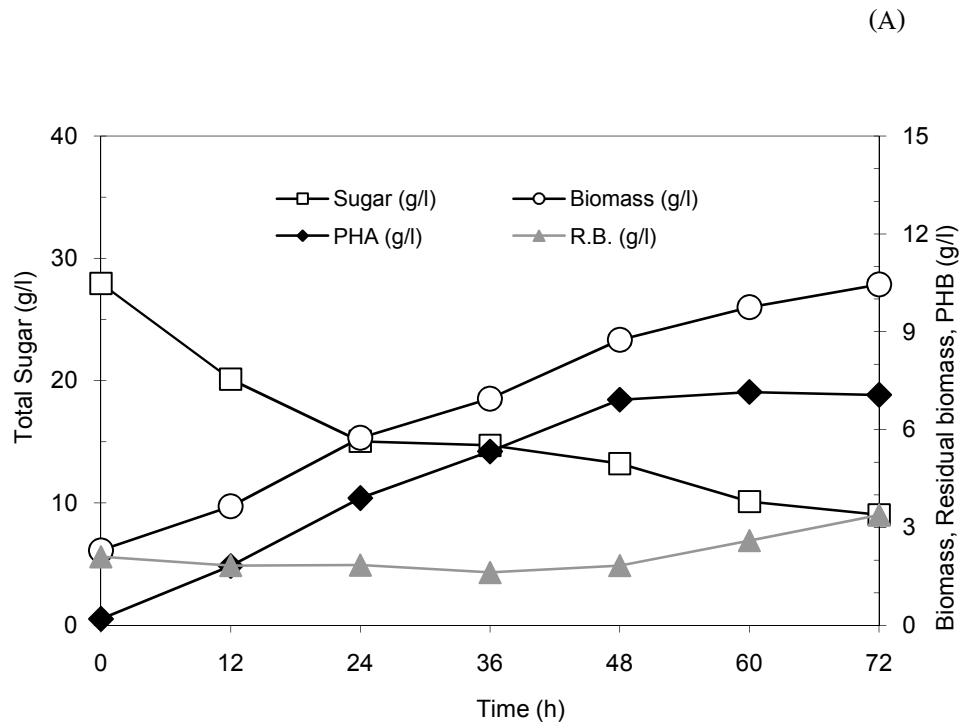
รูปที่ 4.31 แผนภูมิแบบ surface response แสดงผลของอัตราการกวน 200 400 500 และ 600 rpm และอัตราการให้อากาศ 1.0 0.5 0.25 vvm ต่อ ρ (g-PHA/g-CDW/h)

จากภาพที่ 4.26 – 4.29 ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเมื่ออัตราการกวนเท่ากับ 200 rpm ส่งผลให้ μ และประสิทธิภาพในการผลิต PHB ก่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับ อัตราการกวนที่สูงกว่า และพบว่า อัตราการกวนที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตที่น่าพอใจคือ 500 rpm แสดงให้เห็นว่า *A. lata* DSM 1123 ต้องการอากาศสำหรับการเจริญและการผลิต PHB ดังนั้น อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนที่เหมาะสมจึงเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการผลิต PHB

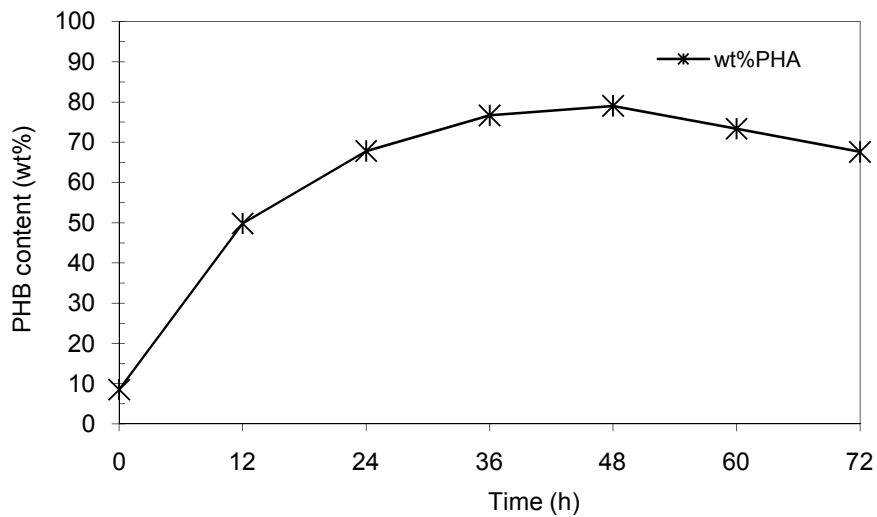
จากผลการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดย *A. lata* DSM 1123 เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า แหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพในการผลิต PHB สูงสุด คือ น้ำตาลทรายขาวเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับอัตราส่วน C/N 200 และแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในด้านความคุ้มทุนคือ น้ำเชื่อมที่มีซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับอัตราส่วน C/N 200 โดยภาวะการผลิตที่เหมาะสมคือ อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm และอัตราเร็วการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) แสดงดังตารางที่ 4.34 - 4.35 รูปที่ 4.32 - 4.33

ตารางที่ 4.34 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถึงหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm					
	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	(NH ₄) ₂ SO ₄ ที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	PHB (กรัมต่อ ลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนัก เซลล์แห้ง (%wt)
0	2.30	2.10	27.95	79.43	0.20	8.52
12	3.65	1.83	20.12	0	1.82	49.82
24	5.75	1.85	15.04	0	3.90	67.83
36	6.95	1.62	14.71	0	5.33	76.68
48	8.75	1.83	13.22	0	6.92	79.04
60	9.75	2.60	10.12	0	7.15	73.36
72	10.45	3.38	9.04	0	7.07	67.61



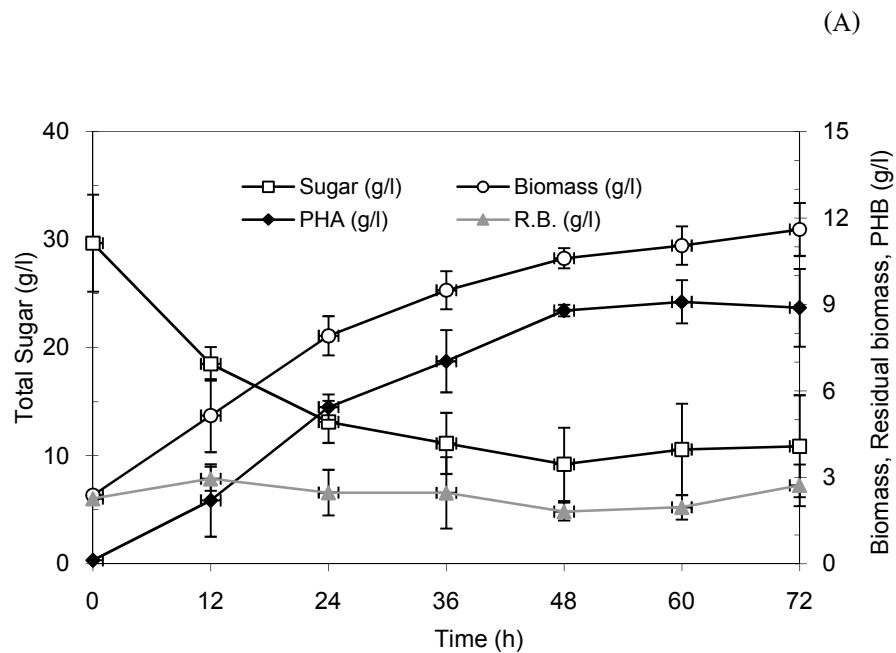
(B)



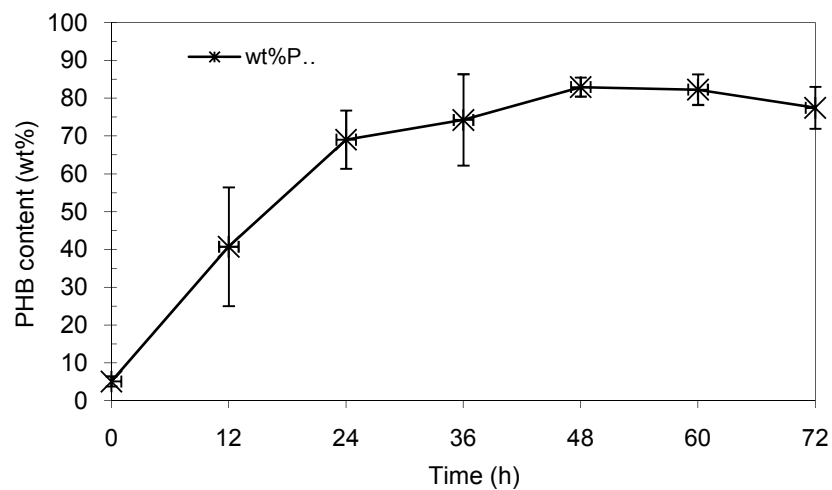
รูปที่ 4.32 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

ตารางที่ 4.35 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถึงหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วน C/N 200 อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราการกวน 5 รอบต่อนาที เติมน้ำเชื่อมที่มีน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 ทุก 24 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ซูโครสในน้ำเชื่อม 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm					
	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	(NH ₄) ₂ SO ₄ ที่เหลือ (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	PHB (กรัมต่อ ลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนัก เซลล์แห้ง (%wt)
0	2.38±0.05	2.26 ±0.04	29.66±4.49	65.15±0.32	0.12±0.03	5.07±1.33
12	5.14±1.27	2.95±0.42	18.49±1.55	5.09±1.19	2.19±1.26	40.70±15.72
24	7.91±0.68	2.47±0.79	13.13±1.95	0	5.43±0.44	69.01±7.71
36	9.49±7.02	2.46±1.24	11.14±2.83	0	7.03±1.08	74.25±12.09
48	10.60±3.30	1.81±0.31	9.20±3.39	0	8.79±0.20	82.94±2.52
60	11.04±6.12	1.96±0.43	10.57±4.23	0	9.09±0.75	82.26±4.05
72	11.60±7.93	2.72±0.72	10.87±4.72	0	8.88±1.35	77.45±5.53

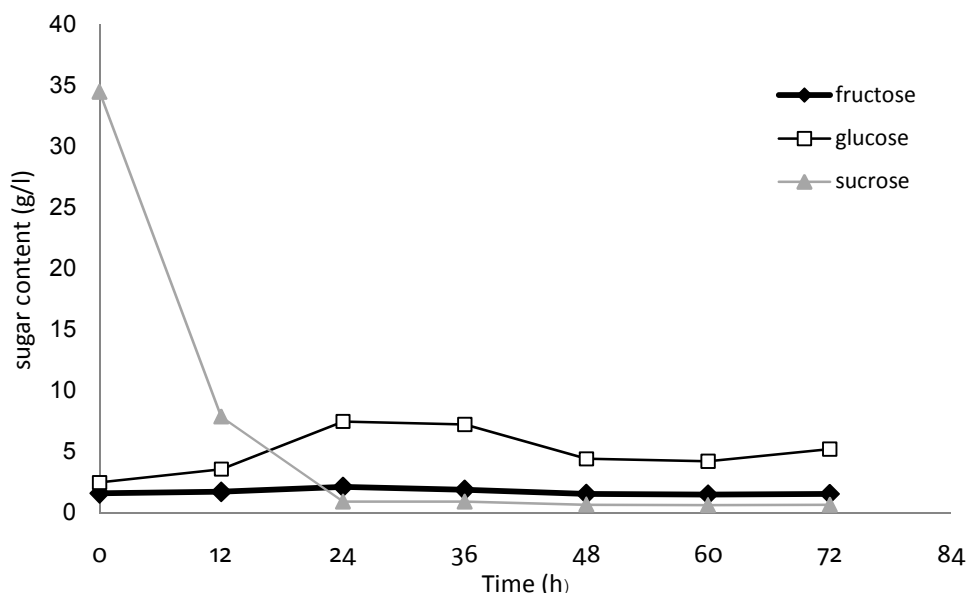


(B)



รูปที่ 4.33 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคส และ ฟรุกโตสในน้ำหมัก จากการผลิต PHB เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ด้วยเทคนิค HPLC ผลการวิเคราะห์ แสดงดังรูปที่ 4.34



รูปที่ 4.34 ปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคส และ ฟรุกโตสในน้ำหมัก เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นในน้ำเชื่อมที่มีซูโครสเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วน C/N 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

จากรูปที่ 4.34 พบว่า ปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำหมัก หดลงอย่างรวดเร็ว ภายใน 24 ชั่วโมงจึงได้ทดลองผลิต PHB ในระดับถังหมักแบบเฟดแบช เพื่อศึกษาแนวโน้มการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต PHB

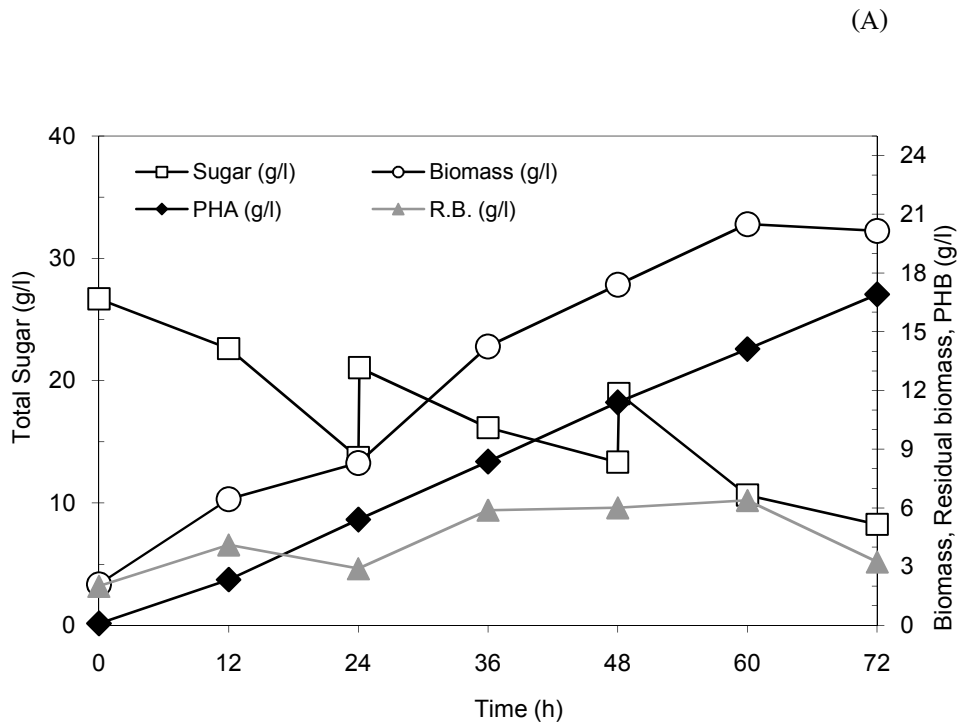
4.2.4 การผลิต PHB จาก *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมักแบบเฟดแบช

Grothe (2000) ศึกษาการผลิต PHB โดย *A. lata* ในระดับถังหมัก แบบเฟดแบช และรายงานว่าการผลิตแบบเฟดแบชช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต PHB ได้ ดังนั้นจากผลการทดลองข้อ 4.2.3 การผลิต PHB โดย *A. lata* DSM 1123 แบบแบช จึงได้นำไปสู่การผลิตแบบเฟดแบช โดยเริ่มการผลิตด้วยน้ำเชื่อมที่มีปริมาณซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 จากนั้นเติมน้ำเชื่อมที่มีน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร และไนโตรเจนเท่ากับอัตราส่วน C/N 200 ที่ชั่วโมงที่ 24 และชั่วโมงที่ 48 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 7 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการผลิต

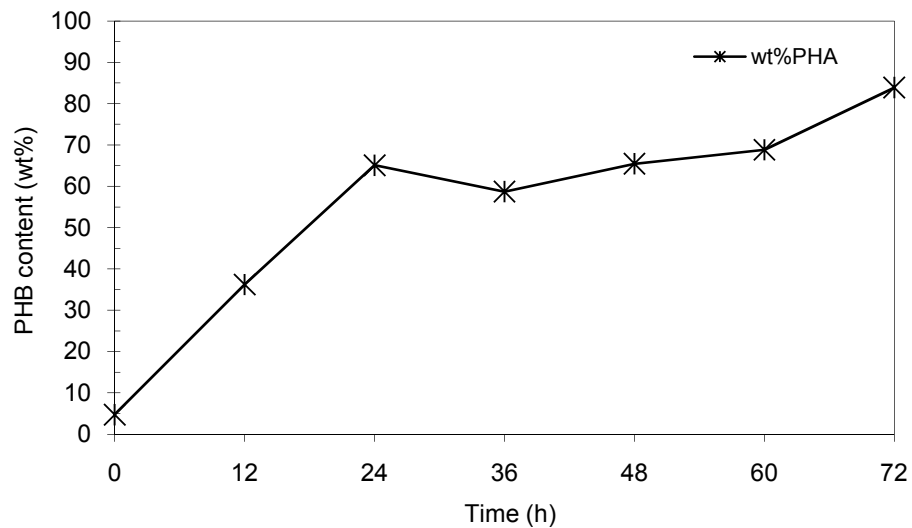
PHB แบบเฟดแบชเมื่อนำน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะเดียวกัน เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณน้ำตาล และ ปริมาณ PHB ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี ตามวิธีการทดลองข้อ 3.6.2.6 ผลการทดลองมีรายละเอียดดังแสดง ในตารางที่ 4.36 – 4.37 และรูปที่ 4.35 – 4.36

ตารางที่ 4.36 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) และ เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร แบบเฟดแบช ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราส่วน คาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	ซูโครสในน้ำเชื่อม 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 ผลิตแบบเฟดแบช อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm							
	ซูโครส ใน น้ำเชื่อม ที่เติม (กรัมต่อ ลิตร)	น้ำหนัก เซลล์ แห้ง (กรัมต่อ ลิตร)	น้ำหนัก เซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อ ลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	น้ำตาล หลังเติม (กรัมต่อ ลิตร)	(NH ₄) ₂ SO ₄ ที่เหลือ (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	PHB (กรัม ต่อ ลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนัก เซลล์ แห้ง (%wt)
0	30	2.10	2.00	26.69	-	61.89	0.10	4.74
12	-	6.45	4.11	22.62	-	0	2.34	36.23
24	10	8.30	2.90	13.71	21.06	43.51	5.40	65.09
36	-	14.25	5.89	16.16	-	0	8.36	58.70
48	10	17.40	6.01	13.34	18.95	32.7	11.39	65.44
60	-	20.50	6.39	10.65	-	0	14.11	68.84
72	-	20.15	3.25	8.26	-	0	16.90	83.89



(B)

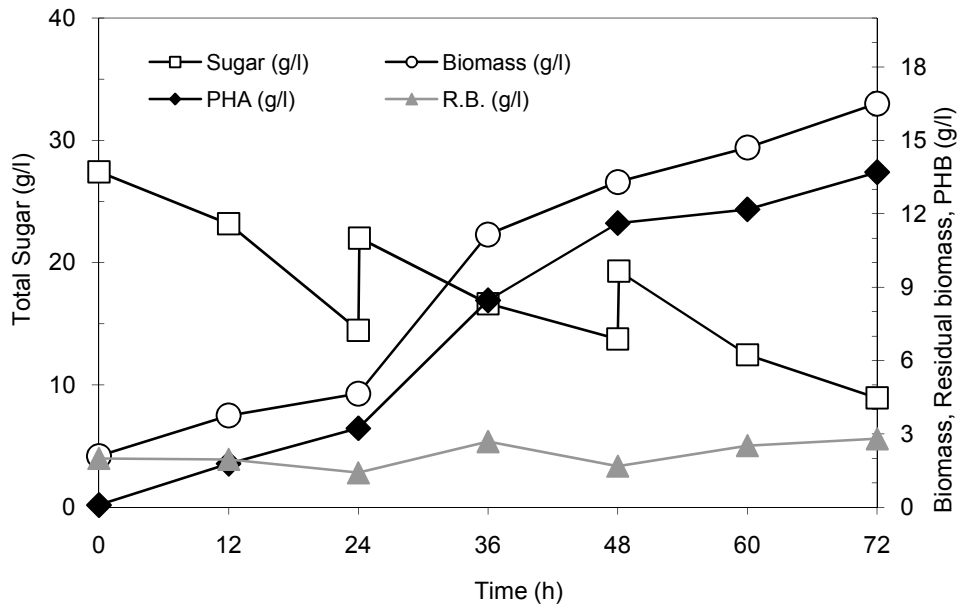


รูปที่ 4.35 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักแบบเฟดแบช ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

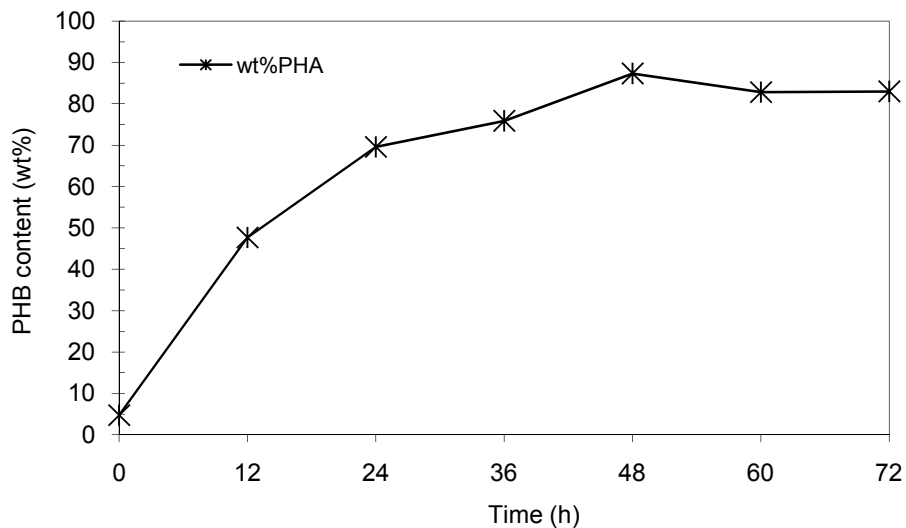
ตารางที่ 4.37 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) และสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) และ เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร แบบเฟดแบชที่มีน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร C/N 200 ผลิตแบบเฟดแบช อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm							
	ซูโครส ใน น้ำเชื่อม ที่เติม (กรัมต่อ ลิตร)	น้ำหนัก เซลล์ แห้ง (กรัมต่อ ลิตร)	น้ำหนัก เซลล์ เรซิดิวส์ (กรัมต่อ ลิตร)	น้ำตาล ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	น้ำตาล หลังเติม (กรัมต่อ ลิตร)	(NH ₄) ₂ SO ₄ ที่เหลือ (มิลลิกรัม ต่อลิตร)	PHB (กรัม ต่อ ลิตร)	สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนัก เซลล์ แห้ง (%wt)
0	30	2.1	2.00	27.43	-	75.09	0.100	4.74
12	-	3.75	1.96	23.18	-	-	1.788	47.67
24	10	4.65	1.41	14.48	22.01	50.27	3.23	69.57
36	-	11.15	2.69	16.65	-	-	8.461	75.88
48	10	13.3	1.69	13.76	19.31	42.16	11.641	87.32
60	-	14.7	2.52	12.47	-	-	12.175	82.82
72	-	16.5	2.80	8.95	-	-	13.696	83.00

(A)



(B)



รูปที่ 4.36 (A) แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์เรซิดิวส์ ปริมาณ PHB และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร) (B) สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%wt) เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในการผลิตระดับถังหมักแบบเฟดแบช ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm

จากข้อมูลในตารางที่ 4.36 – 3.47 พบว่าการผลิต PHB แบบเฟดแบชเมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 20.15 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การผลิต PHB แบบแบชให้ปริมาณเซลล์ 11.60 กรัมต่อลิตร การผลิตแบบเฟดแบชให้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 16.90 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการผลิต PHB แบบแบชที่ให้ปริมาณ PHB 9.08 กรัมต่อลิตร การผลิต PHB แบบเฟดแบชให้สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 83.89 % ที่ชั่วโมงที่ 72 และการผลิตแบบแบชให้สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 82.94 % ที่ชั่วโมงที่ 48 และเมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว พบว่าการผลิตแบบเฟดแบชให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 16.5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การผลิต PHB แบบแบช ให้ปริมาณเซลล์ 10.45 กรัมต่อลิตร การผลิตแบบเฟดแบชให้ปริมาณ PHB เท่ากับ 13.69 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การผลิต PHB แบบแบชที่ให้ปริมาณ PHB ต่ำกว่าคือ 7.15 กรัมต่อลิตร การผลิตแบบเฟดแบชโดยมีสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 87.32 % ที่ชั่วโมงที่ 48 และแบบแบชให้สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเท่ากับ 79.04 % ที่ชั่วโมงที่ 48

ลำดับต่อมา นำข้อมูลในตารางที่ 4.36 - 4.37 เพื่อคำนวณค่าจลนศาสตร์และนำเสนอข้อมูลในตารางที่ 4.38

ตารางที่ 4.38 ค่าจลนศาสตร์ของการผลิต PHB โดย *A. lata* DSM 1123 แบบเฟดแบช เปรียบเทียบกับแบบแบช เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครสเท่ากับ 30 กรัม และ น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร ให้ อัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราเร็วการกวน 500 rpm

แหล่งคาร์บอน	เทคนิคการเพาะเลี้ยง	พารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์					
		μ (h ⁻¹)	Productivity (g/l/h)	ρ (g- PHA/g- CDW/h)	γ (g-sugar/g- CDW/h)	$Y_{P/S}$ (g-PHA/g- sugar)	$Y_{X/S}$ (g-CDW/g- sugar)
น้ำเชื่อม	แบช	0.002	0.142	0.0554	0.11	0.33	0.02
	เฟดแบช	0.022	0.234	0.0712	0.14	0.50	0.12
น้ำตาล ทรายขาว	แบช	0.002	0.096	0.0590	0.02	0.37	0.01
	เฟดแบช	0.003	0.190	0.1376	0.31	0.44	0.01

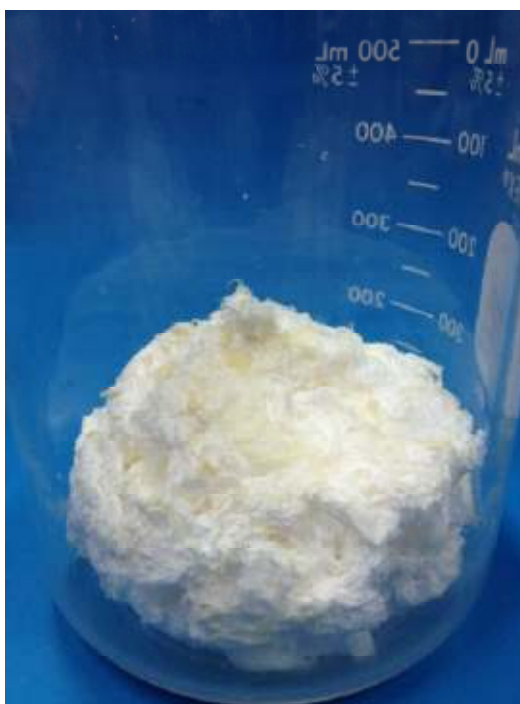
เมื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์ทางจลพลศาสตร์พบว่าการผลิต PHB แบบเฟดแบช เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อม ให้ μ เท่ากับ 0.022 h^{-1} ประสิทธิภาพการผลิตเท่ากับ 0.234 g-PHA/l/h ρ เท่ากับ $0.0712 \text{ g-PHA/g-CDW/h}$ และค่าสัมประสิทธิ์การผลิต PHA จากหนึ่งกรัมน้ำตาลเท่ากับ $0.50 \text{ g-PHA/g-sugar}$ เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทราย ที่ให้ μ เท่ากับ 0.003 h^{-1} ประสิทธิภาพการผลิตเท่ากับ 0.19 g-PHA/l/h ρ เท่ากับ $0.1376 \text{ g-PHA/g-CDW/h}$ และ $Y_{P/S}$ เท่ากับ $0.44 \text{ g-PHA/g-sugar}$ ซึ่งค่าพารามิเตอร์ทางจลพลศาสตร์ของการผลิตแบบเฟดแบช มีค่ามากกว่าการผลิตแบบแบช ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการผลิต PHB แบบเฟด-แบช ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHB ได้ และยังคงต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้สูงขึ้นได้

4.3 การสกัด PHB จากเซลล์แห้งและทำให้บริสุทธิ์

เมื่อเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรการทำงาน 3 ลิตร ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองจากข้อ 4.2 คือใช้น้ำเชื่อมเป็นแหล่งคาร์บอน โดยกำหนดความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 pH 7 ความคุมอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm และอัตราการกวนเท่ากับ 500 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อสกัด PHB ตามวิธีของ Doi และคณะ (1995) โดยสกัดพอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไประเหยคลอโรฟอร์มในตู้ดูดควันได้ PHB ที่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์ม ดังรูปที่ 4.37 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการละลายในคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส อีกครั้ง แล้วนำมาตกตะกอนด้วยเฮกเซนปริมาตร 4 เท่า ได้ PHB เป็นผงพอลิเมอร์สีขาว ดังรูปที่ 4.38



รูปที่ 4.37 ลักษณะของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จาก *A. lata* DSM 1123 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHB ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200



รูปที่ 4.38 ลักษณะของผงพอลิเมอร์ที่สกัดได้จากเซลล์แห้ง และทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนในเฮกเซน ปริมาตร 4 เท่า

4.4 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและเชิงกลของ PHB

4.4.1 การขึ้นรูป PHB เป็นแผ่นฟิล์ม

นำผงพอลิเมอร์ PHB 0.5 กรัมมาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มด้วยวิธีโซลเวนต์ แคสติง (solvent casting) โดยละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเทสารละลายลงบนแม่พิมพ์ขนาดกว้าง 9 เซนติเมตร ยาว 18 เซนติเมตร ที่มีพื้นผิวเรียบและอยู่ในแนวระดับเดียวกัน ตามวิธีของ Yoshie (1995) ระเหยคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทิ้งให้แผ่นฟิล์มตกผลึกที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วแกะแผ่นฟิล์มออกจากแม่พิมพ์จะได้แผ่นฟิล์ม PHB ลักษณะ เป็นแผ่นบางสีขาวขุ่น มีความอ่อนตัว สามารถงอรูปได้ดี แสดงในรูป 4.39 ความหนาเฉลี่ยเท่ากับ 0.04 มิลลิเมตรเมื่อวัดด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ ยี่ห้อ Mitutoyo แผ่นฟิล์มที่ขึ้นรูปได้สามารถตัดได้ด้วยกรรไกรและได้ขอบที่เรียบ จากคุณลักษณะทางกายภาพที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าพบว่าแผ่นฟิล์ม PHB ที่ขึ้นรูปได้มีลักษณะคล้ายพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี จึงนำแผ่นฟิล์ม PHB ไปศึกษาคุณสมบัติด้านต่างๆต่อไป

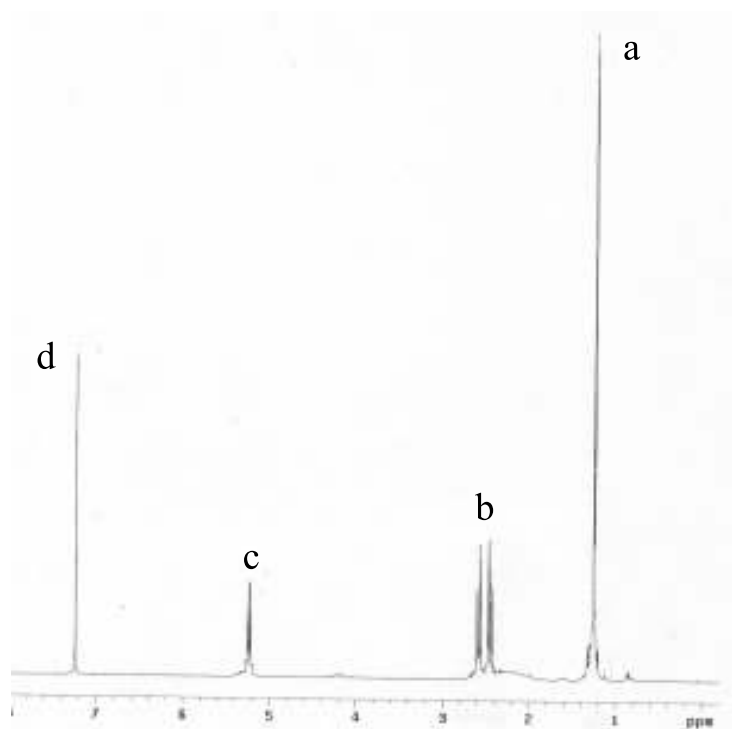


รูปที่ 4.39 ลักษณะแผ่นฟิล์ม PHB

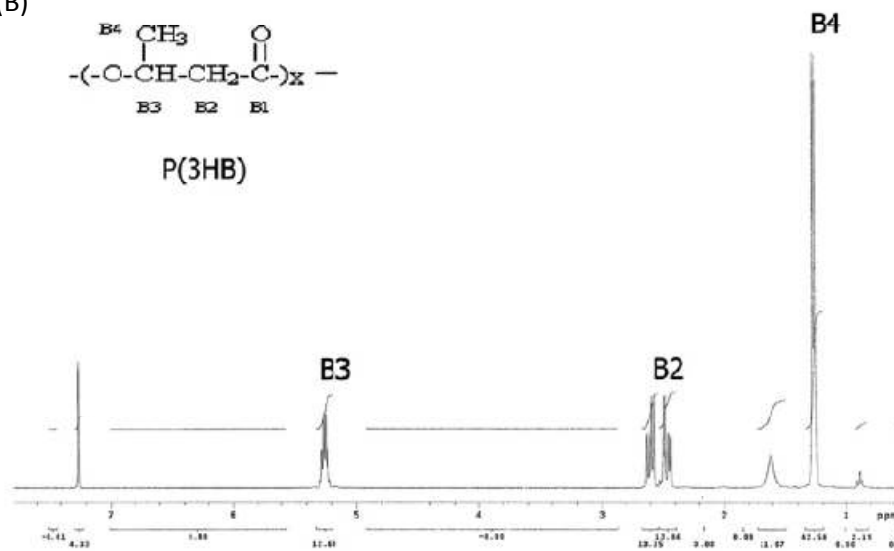
4.4.2 วิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$

นำ PHB ที่ทำบริสุทธิ์แล้วมาวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ด้วย เครื่องโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$) ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.40 และคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ($^{13}\text{C-NMR}$) วิเคราะห์ที่ความถี่ 500 MHz อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สเปกตรัมวิเคราะห์โดย ฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม์นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ผลแสดงดังรูปที่ 4.41

(A)

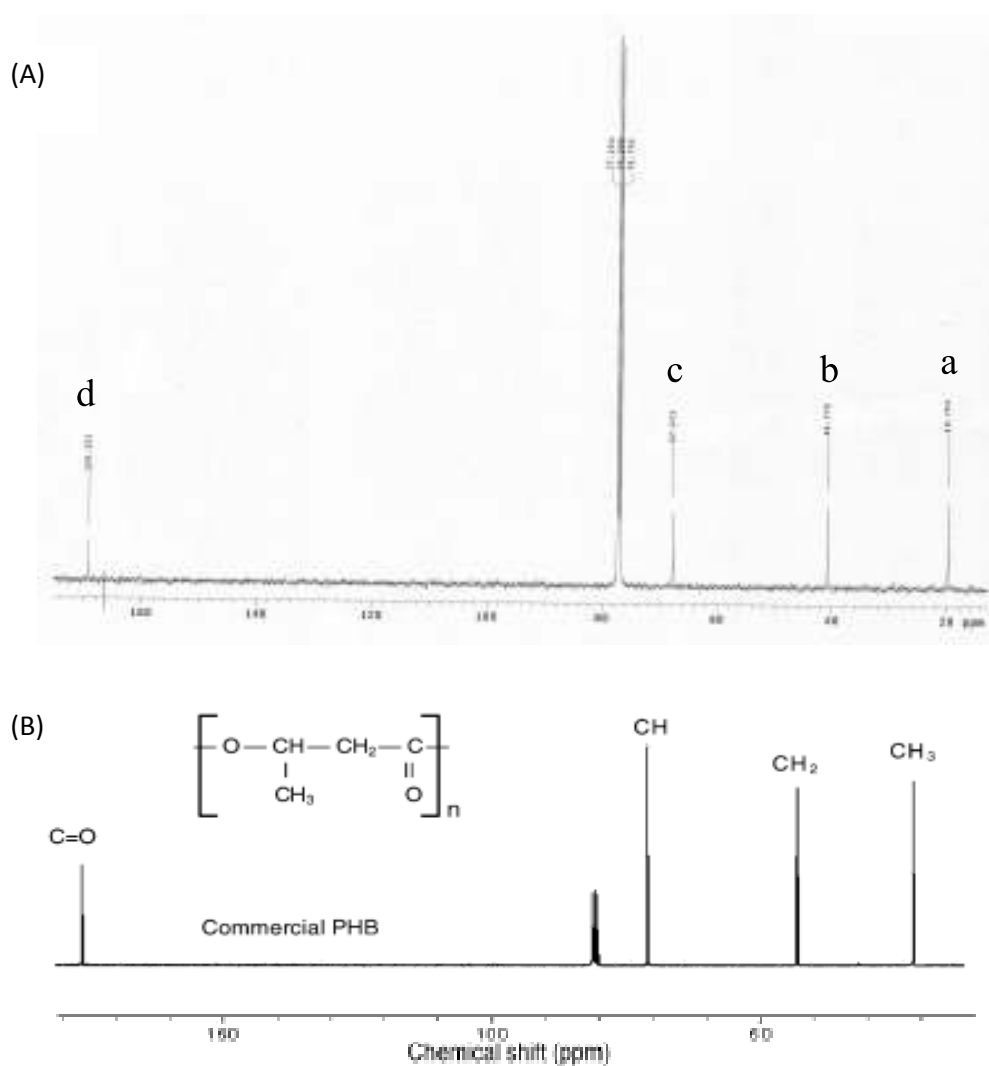


(B)



รูปที่ 4.40 (A) สเปกตรัมของ PHB ที่ผลิตจาก *A. lata* DSM 1123 จาก ¹H-NMR ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (B) สเปกตรัมของ P(3HB) ที่ผลิตจาก *C. nicator* A-04 จาก ¹H-NMR ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Chanprateep และคณะ, 2010)

เมื่อพิจารณารูปที่ 4.40 ซึ่งแสดงสเปกตรัมจากการวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ ของ PHB ที่ผลิตจาก *A. lata* DSM 1123 พบว่ามี 4 สัญญาณชัดเจนในช่วงที่เคมีคัลชิฟ (δ) เท่ากับ 0.85 – 5.35 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของอะโนเมอร์ิก โปรตอน (anomeric proton) โดยให้ชื่อตำแหน่งเป็น a b c และ d ที่ตำแหน่ง δ เท่ากับ 1.33 ppm (a) แสดงสัญญาณชัดเจน ซึ่งเป็นสัญญาณ โปรตรอนจากหมู่เมทิล (CH_3) ที่ตำแหน่ง δ ระหว่าง 2.45 – 2.65 ppm (b) เป็น สัญญาณโปรตรอนจากหมู่เมทิลีน (CH_2) ที่ตำแหน่ง δ เท่ากับ 5.35 ppm (c) เป็นสัญญาณโปรตรอน จากหมู่อะซิมเมตริก คาร์บอน (asymmetric carbon) (CH) และ ที่ตำแหน่ง δ เท่ากับ 7.23 ppm (d) เป็นสัญญาณของโปรตรอน จาก CDCl_3 ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ PHB (Zhu และคณะ, 2009)



รูปที่ 4.41 (A) สเปกตรัมของ PHB ที่ผลิตจาก *A. lata* DSM 1123 จาก $^{13}\text{C-NMR}$ ความถี่ 500 MHz ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (B) สเปกตรัมของ PHB มาตรฐาน จาก $^{13}\text{C-NMR}$ (Doi และคณะ, 1986)

สำหรับรูปที่ 4.41 เป็นรูปที่แสดงสเปกตรัมจากการวิเคราะห์ ^{13}C -NMR ของ PHB ที่ผลิตจาก *A. lata* DSM 1123 พบว่ามี 4 สัญญาณที่แสดงถึงคาร์บอนชนิดต่างๆ ในโมเลกุลของ PHB โดยให้ชื่อตำแหน่งเป็น a b c และ d ที่ตำแหน่ง δ เท่ากับ 19.75 ppm (a) แสดงสัญญาณของหมู่เมทิล (CH_3) ที่ตำแหน่ง δ เท่ากับ 40.77 ppm (b) เป็น สัญญาณของหมู่เมทิลีน (CH_2) ที่ตำแหน่ง δ เท่ากับ 76.61 ppm (c) เป็นสัญญาณของอะซิมเมตริก คาร์บอน (asymmetric carbon) (CH) และ ที่ตำแหน่ง δ เท่ากับ 169.15 ppm (d) เป็น สัญญาณของหมู่คาร์บอนิล ($\text{C}=\text{O}$) ซึ่งค่าเหล่านี้ล้วนใกล้เคียงตำแหน่ง δ จากผลวิเคราะห์ของ PHB มาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 4.39

ตารางที่ 4.39 ตารางเคมีคัลซิฟ (ppm) ^{13}C -NMR ของ PHB

C atom	Chemical shift (ppm)	
	PHB จาก <i>A. lata</i> DSM 1123	PHB (Doi และคณะ, 1986)
CH ₃	19.75	19.76
CH ₂	40.77	40.77
CH	67.61	67.40
C=O	169.15	169.14

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า *A. lata* DSM 1123 ผลิตซอมอพอลิเมอร์ ชนิดพอลิไฮดรอกซีบีวทิเรต หรือ PHB

4.4.3 วิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature, T_M) อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (Glass transition temperature, T_G) ด้วยเครื่อง ดิฟเฟอเรนเชียล สแกนนิ่ง แครอลิเมทรี (differential scanning calorimetry, DSC)

สมบัติทางความร้อน ได้แก่ อุณหภูมิหลอมเหลว และอุณหภูมิกลาสทรานซิชันของพอลิเมอร์เป็นข้อมูลที่แสดงถึงคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยที่อุณหภูมิหลอมเหลว พอลิเมอร์จะอยู่ในสถานะที่อ่อนนุ่มและยืดหยุ่นเหมือนยาง และเมื่อลดอุณหภูมิจนต่ำกว่าอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว พอลิเมอร์จะมีลักษณะแข็ง และเปราะคล้ายแก้ว และการใช้ประโยชน์ของพอลิเมอร์มักเกิดที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นหากพอลิเมอร์มีอุณหภูมิกลาสทรานซิชันสูงกว่าอุณหภูมิห้องจะทำให้พอลิเมอร์มีลักษณะแข็ง และเปราะ แต่หากอุณหภูมิกลาสทรานซิชันของพอลิเมอร์ต่ำกว่าอุณหภูมิใช้งาน พอลิเมอร์จะมีสมบัติยืดหยุ่นคล้ายยาง การทดลองนี้วิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์ โดยใช้เครื่อง DSC ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.40

ตารางที่ 4.40 แสดงอุณหภูมิหลอมเหลว ($^{\circ}\text{C}$) เอนทัลปีของการหลอมเหลว (J/g) อุณหภูมิการเกิดผลึก ($^{\circ}\text{C}$) และอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน ($^{\circ}\text{C}$) ของ PHB ที่ผลิตโดย *A. lata* DSM 1123 และ PHB มาตรฐาน

สมบัติทางความร้อน	Tm ($^{\circ}\text{C}$)	ΔHm (J/g)	Tc ($^{\circ}\text{C}$)	Tg ($^{\circ}\text{C}$)
PHB จากงานวิจัยนี้	178.5	92.31	77.8	10
PHB มาตรฐาน (Oliveira และคณะ, 2007)	173.0	77.6	92.6	1.1

4.4.4. วิเคราะห์คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม PHB

เมื่อขึ้นรูป PHB ตามวิธีข้อ 3.9.1 ได้เป็นแผ่นฟิล์ม นำไปทดสอบด้วยเครื่อง Universal Testing Machine รุ่น LLOYD LR 5K เพื่อวิเคราะห์ค่า Stress at Max.Load (Mpa) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงค่าการต้านทานแรงดึงสูงสุดก่อนแผ่นฟิล์มขาด ค่า Strain at Max.Load (%) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงระยะยืดของแผ่นฟิล์มเมื่อถูกดึงจนขาด และค่า Young's Modulus (MPa) ซึ่งแสดงถึงความยืดหยุ่นของวัสดุ โดยเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มที่ขึ้นรูปจาก PHB มาตรฐาน (Sigma aldrich) ที่มีความหนาเฉลี่ยเท่ากัน (0.04 มิลลิเมตร) และทำการวิเคราะห์ภายใต้ภาวะการทดลองเดียวกัน ค่าแสดงดังตารางที่ 4.41 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ค่า Stress at Max.Load และค่า Strain at Max.Load ของ PHB ที่ผลิตจาก *A. lata* DSM 1123 น้อยกว่าแผ่นฟิล์มของ PHB มาตรฐานเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่า PHB ที่ผลิตจาก *A. lata* DSM 1123 ทนแรงดึงได้ใกล้เคียงกับ PHB มาตรฐาน แต่ฟิล์ม PHB ที่ผลิตจาก *A. lata* DSM 1123 มีค่า Young's Modulus สูงกว่า PHB มาตรฐานแสดงว่ามีความยืดหยุ่นสูงกว่าแผ่นฟิล์ม PHB มาตรฐาน

ตารางที่ 4.41 สมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม PHB ที่ผลิตโดย *A. lata* DSM 1123 เปรียบเทียบกับ PHB มาตรฐาน (Sigma- Aldrich)

คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม	PHB มาตรฐาน (Sigma- Aldrich)	PHB ที่ผลิตจาก <i>A. lata</i> DSM 1123
Stress at Max.Load (MPa)	36.696	24.951
Strain at Max.Load (%)	1.703	1.477
Young's Modulus (MPa)	15523.079	16191.927

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

PHAs เป็นพอลิเอสเทอร์ที่สังเคราะห์และสะสมอยู่ในเซลล์ของแบคทีเรีย เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองของเซลล์ โดย PHAs จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายใต้ภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปและจำกัดสารอาหารบางชนิด PHAs จัดจำแนกได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับโครงสร้างและองค์ประกอบมอนอเมอร์ของพอลิเมอร์ ซึ่งชนิดของ PHAs ที่สังเคราะห์ได้จะขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์ของแบคทีเรีย และแหล่งคาร์บอนที่ใช้

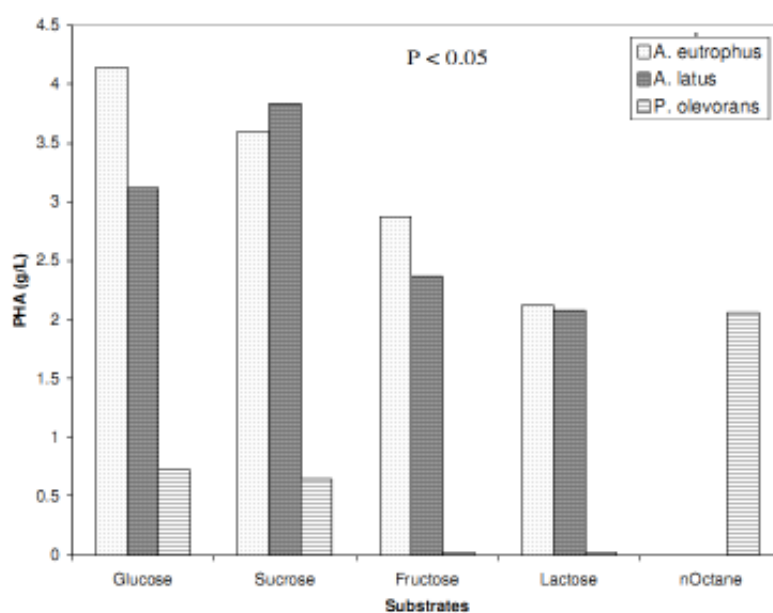
งานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Azohydromonas lata* DSM 1122 (ชื่อเดิมคือ *Alcaligenes latus* IAM 12599T) และ *Azohydromonas lata* DSM 1123 (ชื่อเดิมคือ *Alcaligenes latus* IAM 12665) ซึ่งมีรายงานว่าแบคทีเรียที่สามารถใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและสังเคราะห์ PHAs ชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติกที่มีศักยภาพพัฒนาเป็นพลาสติกชีวภาพเพื่อใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ จึงสนใจศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดย *Azohydromonas lata* จากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตระดับอุตสาหกรรม ผู้วิจัยได้ดำเนินการทดลอง โดยการแปรผันปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการผลิต PHB ได้แก่ ชนิดของแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน อัตราการให้อากาศ และอัตราเร็วการกวน โดยทำการศึกษาที่ละตัวแปรเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมและได้ข้อมูลเบื้องต้น เพื่อใช้ในการออกแบบการทดลอง (Experimental design) ในอนาคต โดยเริ่มจากหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่า จากนั้นจึงเปรียบเทียบศักยภาพของแหล่งคาร์บอน แปรผันอัตราการให้อากาศ และอัตราเร็วการกวน ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบแบชและแบบเฟดแบชในเบื้องต้น

5.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ระดับขวดเขย่า

ในขั้นตอนแรกของการวิจัย เป็นการทดลองระดับขวดเขย่าในพลาสติกปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อโดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทรายที่เหลือ และปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร)

5.1.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

Palleroni และคณะ (1987) รายงานว่า *Azohydromonas lata* เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ได้หลายชนิด รวมทั้งแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครส โดยสามารถสะสมและสังเคราะห์ PHB ไว้ภายในเซลล์ได้สูงถึง 80% ของน้ำหนักเซลล์แห่ง งานวิจัยของ Santanam และ Sasidharan (2010) เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิต PHAs ของแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Alcaligenes eutrophus*, *Azohydromonas lata* และ *Pseudomonas oleovorans* โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนหลายชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส และแลคโตส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5.1 พบว่า *A. lata* สังเคราะห์ PHAs ได้สูงสุดเมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส คือเท่ากับ 3.8 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือกลูโคส 3.2 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Ugwu และคณะ (2011) ได้ทดลองเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB โดย *A. lata* ซึ่งได้แก่ ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร กากน้ำตาล 76 กรัมต่อลิตร เอทิลอะซีโทอะซีเตท 20 กรัมต่อลิตร และ 1,3-บิวเทนไดออล 30 กรัมต่อลิตร พบว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 12 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็น 0.756 กรัมต่อลิตร ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจใช้น้ำตาลจากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยในประเทศไทยเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB เพื่อให้เกิดการพัฒนาอย่างยั่งยืน และมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาไปสู่อุตสาหกรรมการผลิต PHB ในประเทศไทย

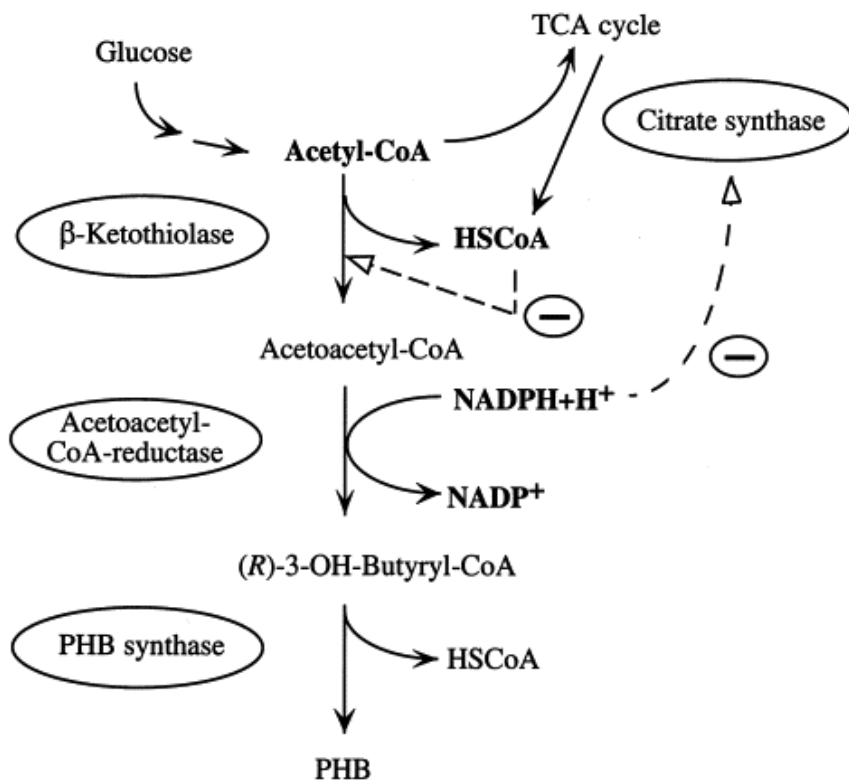


รูปที่ 5.1 ปริมาณการผลิต PHAs โดย *A. eutrophus*, *A. lata* และ *P. oleovorans* เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (Santanam และ Sasidharan, 2010)

งานวิจัยนี้ทำการทดลอง โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครสในรูปของน้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลดิบ โดยแปรผันความเข้มข้นของซูโครสเป็น 20 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เป็น 20 และ 200 เพื่อศึกษาในเบื้องต้นว่าการจำกัดไนโตรเจนมีผลต่อการส่งเสริมประสิทธิภาพในการผลิต PHB หรือไม่ ผลการทดลองพบว่า *A. lata* DSM 1122 ผลิต PHB ได้สูงสุด เมื่อใช้น้ำตาลทรายขาว 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 200 โดยได้ PHB 5.25 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 44.27 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมาคือใช้น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 200 ผลิต PHB ได้สูงสุด 4.02 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 44.17% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จึงเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของซูโครสมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Suwannasing และคณะ (2011) ที่ทำการทดลองผลิต PHAs จาก *Alcaligenes eutrophus* โดยแปรผันปริมาณน้ำตาลรวมในน้ำอ้อยในช่วงระหว่าง 20 – 50 กรัมต่อลิตร และพบว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้น น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และ ปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร) เพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นของน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณ PHB มากที่สุดเท่ากับ 1.84 กรัมต่อลิตรในเวลา 60 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumalaningsih (2011) ซึ่งผลิต PHAs โดย *Alcaligenes latus* (ปัจจุบันคือ *A. lata*) โดยใช้ น้ำส่วนใสของเต้าหู้ถั่วเหลือง ที่มีความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และรายงานว่ ความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตรเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต PHB สามารถผลิต PHB ได้ 2.48 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 66.56% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้ปริมาณเซลล์ 3.73 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 60 ชั่วโมง Hangii และคณะ (1990) อภิปรายผลว่า *A. lata* เป็นแบคทีเรียที่สร้างและสะสม PHB ไปพร้อมๆกับการเจริญของเซลล์ ดังนั้นการเพิ่มปริมาณเซลล์จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHB ด้วย จึงแสดงว่าการหาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน มีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์และการผลิต PHB และการเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่ทำให้ได้ปริมาณเซลล์เจริญมากขึ้น และปริมาณ PHB ที่สังเคราะห์ได้มากขึ้น

สำหรับงานวิจัยนี้ เมื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์(ตารางที่ 4.15) แล้วพบว่า เมื่อใช้น้ำตาลทรายขาว 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน 200 นั้น *A. lata* DSM1122 มี อัตราการผลิต PHA จำเพาะ (ρ) สูงสุดเท่ากับ 0.0109 g-PHB/g-CDW/h โดยมีสัมประสิทธิ์การผลิต PHA จากหนึ่งกรัมน้ำตาล ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.2016 g-PHB/g-sucrose และมีค่าประสิทธิภาพการผลิตสูงสุด 0.066 g-PHB/l/h ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB

การสังเคราะห์ PHB ถูกส่งเสริมภายใต้ภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอและถูกจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือ ซัลเฟอร์ (Medison and Huisman, 1999) และการจำกัดปริมาณไนโตรเจนเป็นแนวทางที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHAs ได้ดีที่สุด (Wang และคณะ, 1997) จากการเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 และ 200 พบว่าเมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20 ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) สูงกว่าเมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 ในทุกค่าความเข้มข้นของน้ำตาล สาเหตุเนื่องจากในภาวะที่มีไนโตรเจนเพียงพอ ปริมาณโคเอนไซม์เอ (CoA) จะสูงขึ้นซึ่งมีผลยับยั้งเอนไซม์ β -Ketothiolase ในการเปลี่ยนอะเซทิลโคเอ (Acetyl-CoA) เป็น อะซิโตอะเซทิลโคเอ (Acetoacetyl CoA) ซึ่งจะถูกละลายไปเป็น PHB ต่อไป แต่ในภาวะที่ถูกจำกัดไนโตรเจน ปริมาณโคเอนไซม์เอจะลดลง NADPH จะถูกสะสม ทำให้มีผลยับยั้ง การเปลี่ยนอะเซทิลโคเอเป็นซิเตรตในวิถี TCA อะเซทิลโคเอจึงเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB (Chodak, 2008) ดังนั้น *A. lata* DSM 1123 จึงผลิต PHB ภายใต้ภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยการจำกัดปริมาณไนโตรเจน

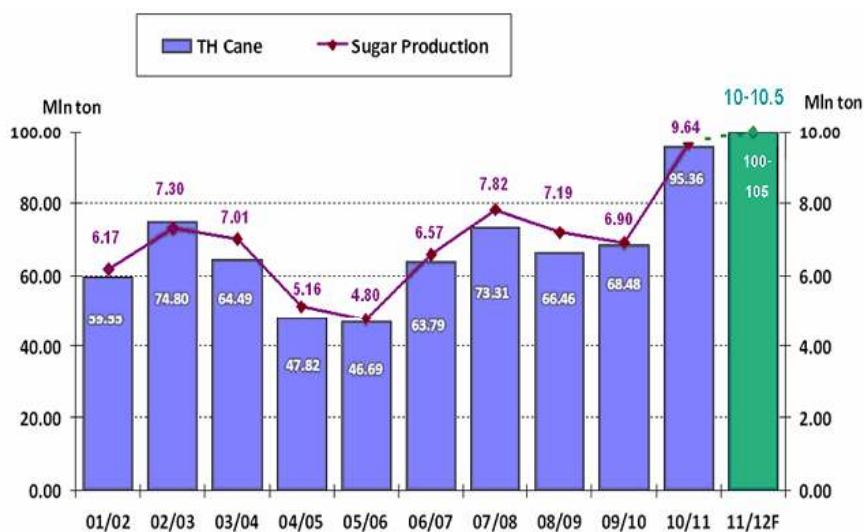


รูปที่ 5.2 วิถีการสังเคราะห์ PHB (Kessler และ Witholt, 2001)

การทดลองในขั้นตอนนี้ไปจึงศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมคือ 30 กรัมต่อลิตร ในการศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ผู้วิจัยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนอย่างละเอียดเท่ากับ 20 50 100 200 และ ไม่เติมไนโตรเจน จากผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในงานวิจัยนี้ มีค่าเท่ากับ 200 เนื่องจากเป็นอัตราส่วนที่ให้ค่า ρ สูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0109 g-PHA/g-CDW/h และ $Y_{P/S}$ สูงสุด เท่ากับ 0.2106 g-PHA/g-sugar แต่เมื่อไม่เติมไนโตรเจน พบว่า μ ต่ำสุด และเมื่อลดอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (ปริมาณไนโตรเจนสูงขึ้น) พบว่า μ สูงขึ้น และสูงสุดเมื่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 20 เมื่อพิจารณาค่า ρ พบว่าการเพิ่มอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (ปริมาณไนโตรเจนลดลง) มีผลทำให้ ρ สูงขึ้น และสูงสุดเมื่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 200 แสดงให้เห็นว่าภาวะจำกัดปริมาณไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการผลิต PHB และต้องควบคุมให้เท่ากับ 200 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wang และคณะ (2006) ซึ่งรายงานว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิต PHAs โดย *A. lata* เท่ากับ 100 เมื่อแหล่งคาร์บอนคือ กลูโคสและฟรุกโตสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และรายงานว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 120 และ 140 (ปริมาณไนโตรเจนลดลง) ส่งผลให้การเจริญของเซลล์ลดลง แต่ปริมาณ PHAs ที่สะสมในเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด และเมื่อลดอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนให้ต่ำกว่า 80 (ปริมาณไนโตรเจนสูงขึ้น) พบว่าการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณ PHAs ในเซลล์ลดลง และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และ Lee (1997) ที่ศึกษาประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ PHB ของ *A. lata* ในภาวะที่จำกัดไนโตรเจน เปรียบเทียบกับภาวะที่มีไนโตรเจนเพียงพอ เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส พบว่าภาวะที่จำกัดไนโตรเจน *A. lata* สามารถสังเคราะห์ PHB ได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและได้ PHAs สะสมในเซลล์สูงสุดถึง 83% และปริมาณเซลล์ 14 กรัมต่อลิตรในเวลา 30 ชั่วโมง ในขณะที่ในภาวะที่มีไนโตรเจนเพียงพอ พบว่าปริมาณ PHB สะสมในเซลล์มีค่าเท่ากับ 50% และปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากข้อมูลข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าภาวะที่จำกัดไนโตรเจน มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์ PHB ของ *A. lata* DSM1122 เนื่องจากในภาวะที่มีไนโตรเจนเพียงพอ ไพรูเวทที่ได้จากปฏิกิริยาไกลโคไลซิสจะเปลี่ยนเป็นอะเซทิล-โคเอ และเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ได้เป็นพลังงานซึ่งใช้ในการสร้างชีวมวล แต่ในภาวะที่จำกัดไนโตรเจน อะเซทิล-โคเอ จะเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB ดังแสดงในภาพที่ 5.2

5.2 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

ปัญหาหลักที่ทำให้ยังไม่มีการใช้ PHB ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์อย่างแพร่หลายเป็นเพราะ PHB ที่ผลิตและจำหน่ายในปัจจุบันมีราคาแพงกว่าพลาสติกสังเคราะห์ (Grothe, 1999) ตัวอย่างเช่น PHB ที่ผลิตโดยบริษัท Mirel มีราคาสูงถึง 2.25 เหรียญสหรัฐต่อ 1 ปอนด์ ซึ่งนับว่ามีราคาสูงกว่าพลาสติกสังเคราะห์อย่าง พอลิโพรพิลีน (polypropylene) ถึง 3 เท่า (DiGregorio, 2009) สาเหตุหลักที่ทำให้ PHB มีราคาแพง คือต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์ ซึ่งต้นทุนหลักในการผลิต PHB คือ แหล่งคาร์บอนที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต PHB จึงมีการศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก หรือหาได้ง่ายในท้องถิ่นมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB เช่น ยางจากต้นเมเปิล (maple sap) (Yezza และคณะ, 2007) น้ำส่วนใสของเต้าหู้ถั่วเหลือง (liquid bean curd) (Kumalaningsih และคณะ, 2011) หางนม (Sharifzadeh Baei และคณะ 2010 ; Koller และคณะ 2010) น้ำมัน (Lee และคณะ 2008) และ น้ำเสียจากโรงงานกระดาษ (Bengtsson และคณะ, 2008) เป็นต้น งานวิจัยนี้สังเกตเห็นความสำคัญดังกล่าว และประเทศไทยมีความสามารถในการผลิตน้ำตาลอ้อยได้เป็นอันดับสี่ของโลก (Sugar Nutrition UK, 2012) และอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลอ้อยก็เป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ โดยในประเทศไทยมีโรงงานผลิตน้ำตาลทั้งสิ้น 46 โรงงานทั่วประเทศ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล, 2552) และเมื่อพิจารณาสถานการณ์ผลผลิตน้ำตาลอ้อยในไทย แสดงดังรูปที่ 5.3 พบว่า การผลิตอ้อยและน้ำตาลอ้อยในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2009 – 2012 มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ



รูปที่ 5.3 สถานการณ์ผลผลิตน้ำตาลอ้อยในไทย (ที่มา: สำนักงานอ้อยและน้ำตาล, 2554)

ปัจจุบันผู้ประกอบการอุตสาหกรรมน้ำตาลแสดงความต้องการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย ได้แก่ น้ำอ้อย น้ำเชื่อม กากน้ำตาล น้ำตาลทรายดิบ และน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB

5.3 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับถังหมัก 5 ลิตร แบบแบช

จากผลการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับขวดเขย่า พบว่า ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมคือซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 200 ดังนั้นจึงใช้ภาวะดังกล่าวในการผลิต PHB โดยแปรผันชนิดของผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายดิบ น้ำเชื่อม น้ำอ้อย และกากน้ำตาล เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพและความคุ้มค่าในการผลิต PHB ในขั้นตอนนี้ได้ขยายระดับการผลิตสู่ระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรในการทำงาน เท่ากับ 3 ลิตร

การผลิตในระดับถังหมักมีข้อดีคือ สามารถควบคุมปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิต PHB ให้คงที่ตามค่าที่กำหนดได้ ซึ่งปัจจัยดังกล่าว ได้แก่ อุณหภูมิ pH และความเข้มข้นของออกซิเจน งานวิจัยนี้จึงกำหนดให้อุณหภูมิและ pH เป็นปัจจัยคงที่ และควบคุมให้เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 7 ตามลำดับ จากรายงานของ Karbasi และคณะ (2011) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ของ *A. lata* DSM 1123 ในระดับขวดเขย่า โดยมีปริมาตรอาหาร 200 มิลลิลิตรพบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *A. lata* DSM 1123 มีประสิทธิภาพในการผลิต PHAs ได้สูงสุด และจากงานวิจัยของ Palleroni และ Palleroni (1978) รายงานว่าค่า pH ที่เหมาะสมกับการเจริญและสังเคราะห์ PHAs ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. lata* คือ 6.0 – 7.5 ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกควบคุมภาวะดังกล่าวตามที่มีการรายงานก่อนหน้า เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHB

5.3.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB

Choi และ Lee (1997) รายงานว่า ราคาของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHB นับเป็นปัจจัยที่มีผลต่อต้นทุนการผลิต คิดเป็น 60% - 70% ของต้นทุนวัตถุดิบทั้งหมด ดังนั้นการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีต้นทุนต่ำจึงส่งผลให้ต้นทุนในการผลิต PHB ต่ำลงด้วย การทดลองนี้ต้องการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิต PHB โดย *A. lata* DSM 1123 เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยที่มีราคาต่ำกว่า น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายดิบ ได้แก่ น้ำเชื่อม น้ำอ้อย และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการผลิต

ในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรในการทำงาน 3 ลิตร และเพาะเลี้ยงแบบแบช โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองในระดับขวดเขย่า โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °C pH เท่ากับ 7 ตลอดการเพาะเลี้ยงแบบแบชเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ทุกๆ 12 ชั่วโมง จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ (% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) และค่าประสิทธิภาพในการผลิต PHB พบว่า *A. lata* DSM 1123 สามารถใช้ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ได้ทุกชนิด ยกเว้นกากน้ำตาลซึ่ง *A. lata* DSM 1123 สามารถใช้กากน้ำตาลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ โดยให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์สูงกว่าน้ำเชื่อม และน้ำอ้อย แต่ไม่สามารถนำมาใช้เพื่อผลิต PHB ได้ โดยแหล่งคาร์บอนที่ผลิต PHB สูงสุดคือ น้ำตาลทรายขาว ให้ปริมาณ PHB 13.51 กรัมต่อลิตร รองมาเป็นน้ำตาลทรายดิบ น้ำเชื่อม และน้ำอ้อยตามลำดับ งานวิจัยของ นรมน สารานูรัตน์ (2555) ที่ศึกษาการผลิต PHB จาก *A. lata* DSM 1123 ในระดับขวดเขย่า ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร โดยใช้ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย ได้แก่ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายดิบ น้ำเชื่อม น้ำอ้อย และกากน้ำตาล ที่มีความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราส่วน C/N เท่ากับ 200 พบว่า น้ำเชื่อมเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณ PHB สูงสุด คือ 8.6 กรัมต่อลิตร รองมาเป็นน้ำตาลทรายดิบ ให้ปริมาณ PHB เท่ากับ 7.10 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทรายขาวให้ปริมาณ PHB เท่ากับ 7.04 กรัมต่อลิตร น้ำอ้อยให้ปริมาณ PHB เท่ากับ 4.68 กรัมต่อลิตร และ กากน้ำตาลให้ปริมาณ PHB 1.94 กรัมต่อลิตร โดยได้ปริมาณเซลล์มากที่สุดเท่ากับ 12.00 กรัมต่อลิตร เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นกากน้ำตาล ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้

เมื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ให้ค่าประสิทธิภาพในการผลิต PHB สูงสุดคือ น้ำตาลทรายขาว ตามด้วยน้ำตาลทรายดิบ น้ำเชื่อม และน้ำอ้อย ตามลำดับ ซึ่งให้ค่าประสิทธิภาพในการผลิตเท่ากับ 0.184 g-PHB/l/h 0.159 g-PHB/l/h 0.087 g-PHB/l/h และ 0.070 g-PHB/l/h ตามลำดับ และน้ำตาลทรายขาวก็เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่า Y_{PS} สูงสุดเท่ากับ 0.620 g-PHB/g-sugar ทำให้สรุปได้ว่าน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีศักยภาพในการผลิต PHB สูงสุด ซึ่งน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายดิบล้วนแล้วแต่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วยซูโครสเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Grothe และคณะ (1999) ที่รายงานว่า *A. lata* เมื่อเทียบกับกลูโคสและฟรักโตส สามารถใช้น้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ได้ และ จากงานวิจัยของ Santanam และ Sasidharan (2010) ที่พบว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิต PHB โดย *A. lata* ดังรูปที่ 5.1

เนื่องจากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือเพื่อลดต้นทุนการผลิต PHB โดยพิจารณาเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย 5 ชนิด ดังนั้น นอกจากประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB แล้ว ผู้วิจัยจึงต้องพิจารณาจากราคา ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย ทั้ง 5 ชนิดประกอบด้วย จากตารางที่ 5.1 ซึ่งแสดงราคาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย น้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายดิบ เป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยที่มีราคาสูงสุดสองอันดับแรก ซึ่งสูงกว่าผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยชนิดอื่นและเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร เมื่อกำหนดต้นทุนวัตถุดิบสำหรับการผลิต PHB 1 กิโลกรัม พบว่า น้ำเชื่อมเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ต้นทุนการผลิตต่ำสุดคือ 26.07 บาทต่อกิโลกรัม PHB ดังนั้นเมื่อพิจารณาในแง่ความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ น้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายดิบจึงไม่เหมาะสมเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม

ตารางที่ 5.1 ราคาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาล และ ต้นทุนวัตถุดิบต่อหน่วย (บาทต่อกิโลกรัม) ในการผลิต PHB ในระดับถึงหมักจากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาล 5 ชนิด

ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาล	ปริมาณวัตถุดิบ (กรัมต่อลิตร)	% Yield	ปริมาณวัตถุดิบที่ต้องใช้ (กิโลกรัม) (1)	ราคาวัตถุดิบ* (บาท/กิโลกรัม) (2)	ต้นทุนวัตถุดิบ (บาท/กิโลกรัม PHB) (1) x (2)
น้ำตาลทรายขาว	30	45.033	2.22	20.00	44.41
น้ำตาลทรายดิบ	30	39.133	2.56	17.00	43.44
น้ำเชื่อม	32.68	19.795	5.05	5.16	26.07
น้ำอ้อย	86.24	6.097	16.40	1.71	28.05
กากน้ำตาล	56.12	0.005	18706.67	3.00	56120.00

(ที่มา: รายงานโครงการผลิตพลาสติกชีวภาพ PLA และ PHB ในอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล)

หมายเหตุ * ราคาวัตถุดิบ เดือนสิงหาคม 2012

น้ำอ้อย น้ำเชื่อม และ กากน้ำตาล เป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย ที่มีราคาถูกกว่าน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายดิบ มีซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก และมีกลูโคสและฟรุกโตสเล็กน้อย ดังในตารางที่ 5.2 และ 5.3 จากผลการทดลองข้อ 4.2.1 ตารางที่ 4.2.2 กากน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์ที่ให้ปริมาณเซลล์สูงกว่าน้ำเชื่อม และน้ำอ้อย เนื่องจากกากน้ำตาลมีส่วนประกอบของวิตามิน และแร่ธาตุชนิด

ต่างๆ รวมทั้งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ (Olbrich, 1963) แต่ไม่สามารถผลิต PHB ได้ เนื่องจาก กากน้ำตาลเป็นส่วนหนึ่งของเหลือทิ้ง ที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อและระเหยน้ำ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ความร้อน จึงอาจเกิดปฏิกิริยาบราวน์นิ่ง (Browning reaction) และได้สารประกอบเชิงซ้อนที่ยากต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และสารปนเปื้อนบางชนิดที่อาจมีผลยับยั้งการชีวสังเคราะห์ PHB ของ *A. latus* และ *A. eutrophus* (Suwannasing, 2011) และกากน้ำตาลเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยก ผลิตภัณฑ์น้ำตาลทรายดิบ กากน้ำตาลจึงเป็นส่วนหนึ่งของสิ่งเจือปนต่างๆ รวมทั้งโลหะหนักบางชนิด เช่น ตะกั่ว และโคบอลต์ เป็นต้น (Olbrich, 1963) ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อชีวสังเคราะห์ PHB ด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 5.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยจากโรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ.นครสวรรค์ เดือนมกราคม 2553 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำตาลอ้อย	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		
	ซูโครส	ฟรุคโตส	กลูโคส
กากน้ำตาล	844.75	228.22	276.52
น้ำเชื่อม	812.16	38.1	45.54
น้ำอ้อย	577.49	52.46	29.83

ตารางที่ 5.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อยจากโรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ.นครสวรรค์ เดือนสิงหาคม 2554 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำตาลอ้อย	ปริมาณน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)		
	ซูโครส	ฟรุคโตส	กลูโคส
กากน้ำตาล	534.536	133.2367	189.2626
น้ำเชื่อม	917.8605	28.34242	139.6949
น้ำอ้อย	347.8548	11.85422	130.5916

นอกจากนี้ผลการทดลองข้อ 4.2.1 ตารางที่ 4.23 แสดงให้เห็นว่า น้ำอ้อยและน้ำเชื่อมให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHB เป็นที่น่าพอใจ ดังนั้น น้ำอ้อยและน้ำเชื่อมจึงเป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย ที่เหมาะสมในการผลิต PHB ทั้งในแง่ประสิทธิภาพในการชีวสังเคราะห์ และในแง่ความคุ้มค่าในการผลิต น้ำอ้อยและน้ำเชื่อมมีข้อดีคือ มีสถานะเป็นของเหลว ทำให้ขั้นตอนการเตรียมแหล่งคาร์บอนก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก (pretreatment) มีเพียงเล็กน้อย และเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากส่วนต้นของกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย จึงใช้พลังงาน และต้นทุนในการผลิตน้อยกว่าน้ำตาลทรายดิบและน้ำตาลทรายขาว

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิต PHB ของน้ำอ้อย และน้ำเชื่อม พบว่าน้ำเชื่อมให้ค่าประสิทธิภาพในการผลิต และค่า μ สูงกว่าน้ำอ้อย เนื่องจากในน้ำอ้อยอาจมีสารต้านจุลินทรีย์ที่เกษตรกรใช้ในระหว่างการเพาะปลูกและสิ่งปนเปื้อนเนื่องจากการเก็บเกี่ยวต้นอ้อย และการหีบ ซึ่งพบว่าอาจส่งผลต่อวิถีการชีวสังเคราะห์ PHB ของ *A. lata* DSM 1123 และ เมื่อพิจารณาข้อมูลจากตารางที่ 5.1 พบว่า น้ำเชื่อมเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ % Yield สูงกว่าน้ำอ้อย และใช้ปริมาณวัตถุดิบต่ำกว่า เพราะน้ำเชื่อมมีปริมาณซูโครสที่เข้มข้นต่อหน่วยปริมาตรมากกว่าน้ำอ้อย จึงทำให้การผลิต PHB จากน้ำเชื่อมมีต้นทุนวัตถุดิบ (บาท/กิโลกรัม PHA) ต่ำกว่า และน้ำเชื่อมผ่านกระบวนการให้ความร้อนและระเหยน้ำออกบางส่วนจึงลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้ง่ายต่อการเก็บรักษาวัตถุดิบในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจใช้น้ำเชื่อมเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB จาก *A. lata* DSM 1123

5.3.2 อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับถังหมัก 5 ลิตรแบบแบช

ความเข้มข้นของออกซิเจนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลกับการเจริญของเซลล์และการผลิต PHB (Pozo และคณะ, 2002) และมีผลต่อต้นทุนการผลิต ดังนั้น อัตราการส่งผ่านออกซิเจน (Oxygen transfer rate) จึงเป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการขยายระดับการผลิต และควบคุมให้เหมาะสม ในการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม (Portumarti และคณะ, 2009) Quagliano และ Miyazagi (1997) รายงานว่า เมื่อลดอัตราให้อากาศจาก 2.5 vvm เป็น 0.5 vvm ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้น 10 เท่า และรายงานของ Kim และ Chang (1998) ที่พบว่า *Azotobacter chroococcum* สามารถผลิต PHB ได้มากขึ้นในภาวะที่ถูกจำกัดออกซิเจน อย่างไรก็ตาม ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน และแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน มีผลทำให้อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่างกันด้วย (Page, 1992) ทั้งนี้ในการผลิตระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มีตัวแปรที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมประสิทธิภาพการส่งผ่านออกซิเจน ในระบบสองตัวแปรด้วยกัน ได้แก่ อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวน

งานวิจัยนี้เริ่มต้นจากกำหนดให้อัตราการกวนมีค่าคงที่เท่ากับ 500 รอบต่อนาที และทำการทดลองเปรียบเทียบอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.25 0.5 และ 1.0 vvm ผลการทดลองพบว่า ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm ให้ปริมาณ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์สูงสุด คือ 87.72 % ที่ชั่วโมงที่ 36 ปริมาณ PHB สูงสุดเท่ากับ 9.369 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 60 ค่าประสิทธิภาพในการผลิต PHB เท่ากับ 0.226 g/l/h และ ρ เท่ากับ 0.0491 g-PHA/g-CDW/h แต่เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันในทุกอัตราการให้อากาศ คือประมาณ 11.33-11.55 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองสรุปได้ว่าอัตราการให้อากาศส่งผลต่อการผลิต PHB แต่ไม่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ มีรายงานของ Zafar และคณะ (2012) ที่ศึกษาอิทธิพลของอัตราการให้อากาศและการกวน ในการผลิต PHAs โดย *A. lata* DSM1123 เมื่อใช้กากน้ำตาลอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตในถังหมักปริมาตร 3 ลิตร พบว่า เมื่ออัตรากาศเท่ากับ 0.85 vvm และอัตราเร็วการกวน 287 รอบต่อนาที *A. lata* DSM1123 สามารถผลิต PHAs ได้สูงสุดเท่ากับ 7.452 กรัมต่อลิตร สัดส่วน PHAs ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 67.92 %

Anderson และ Dawes (1990) ให้คำอธิบายเกี่ยวกับผลของปริมาณออกซิเจนต่อกลไกการสังเคราะห์ PHB ว่าในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ NADH จะเพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลยับยั้งเอนไซม์ซิเตรทซินเทส (citrate synthase) และ เอนไซม์ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถี TCA ที่มีหน้าที่เปลี่ยนอะเซทิลโคเอเป็นซิเตรท เมื่อเอนไซม์เหล่านี้ถูกยับยั้ง อะเซทิลโคเอ (acetyl-CoA) จึงเปลี่ยนเป็นอะซิโทอะเซทิลโคเอ (acetoacetyl-CoA) โดยเอนไซม์เบต้าคีโตนไทโอเลส (β -

ketothiolase) และเข้าสู่วัฏจักรสังเคราะห์ PHB แต่ในภาวะที่มีออกซิเจนมากเกินไป โคเอนไซม์เอ (CoA) จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น และส่งผลยับยั้งเอนไซม์เบต้าคีโดไทโอสเลส ทำให้อะเซทิลโคเอ เข้าสู่วัฏจักร TCA และไม่เกิดการสังเคราะห์ PHB แต่อย่างไรก็ตาม *A. lata* DSM 1123 เป็นแบคทีเรียที่อาศัยออกซิเจนในการเจริญ ดังนั้นออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ขาดไม่ได้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิต PHB แต่ต้องควบคุมไม่ให้มากเกินไปเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHB

5.3.3 อัตราการกวนที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในระดับถังหมัก 5 ลิตรแบบแบช

นอกจากอัตราการให้อากาศแล้ว อัตราการกวนเป็นอีกหนึ่งตัวแปรที่มีผลต่อความเข้มข้นของออกซิเจนในระบบ เนื่องจากการกวนจะทำให้ฟองอากาศแตกตัวเป็นฟองเล็กๆ ทำให้พื้นที่ผิวของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มมากขึ้น จึงเป็นการเพิ่มอัตราการส่งผ่านออกซิเจน ในการทดลองนี้ ได้แปรผันอัตราเร็วการกวนเป็น 200 400 500 และ 600 รอบต่อนาที พบว่า เมื่ออัตราเร็วการกวนสูง ก็อยู่ในช่วง 400 – 600 รอบต่อนาที ให้ปริมาณ PHB (8.2 – 9.2 กรัมต่อลิตร) และปริมาณเซลล์ (10 – 11 กรัมต่อลิตร) สูงกว่าเมื่ออัตราเร็วการกวนต่ำคือ 200 รอบต่อนาที ที่ให้ ปริมาณ PHB 5.0 กรัมต่อลิตร และปริมาณเซลล์ 6.5 กรัมต่อลิตร โดยเมื่ออัตราเร็วการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที เป็นอัตราเร็วการกวนที่ให้ค่าประสิทธิภาพในการผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 0.226 g/l/h

ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ching และคณะ (2012) ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลของอัตราเร็วในการกวนต่อการสังเคราะห์ PHA ชนิด โคพอลิเมอร์ของ *Delftia acidovorans* โดยแปรผันอัตราการกวนเป็น 50 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่าเมื่ออัตราการกวนต่ำในช่วง 50 -150 รอบต่อนาที ส่งผลให้ปริมาณ PHA ที่สังเคราะห์ได้ มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นจาก 17% เป็น 31% แต่เมื่อเพิ่มอัตราการกวนให้สูงขึ้นเป็น 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณ PHA ที่สังเคราะห์ได้ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก คือคงที่อยู่ที่ 31% และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Alejandra และคณะ (2010) ที่ผลิต PHB โดยแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่มียีน phaBAC และ phaP เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส พบว่า ที่อัตราเร็วการกวนต่ำที่ 125 รอบต่อนาที ρ มีค่า เท่ากับ 79 มิลลิโมลต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าเมื่ออัตราเร็วการกวนที่ 500 รอบต่อนาทีซึ่งให้ค่า ρ เท่ากับ 300 มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้งต่อชั่วโมง ดังนั้นจากผลการทดลองในขั้นตอนนี้จึงสรุปได้ว่า อัตราการกวนที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดย *A. lata* คือ 500 รอบต่อนาที

5.3.4 การผลิต PHB ในระดับถังหมักแบบเฟดแบช

จากผลการทดลอง ข้อ 4.1 – 4.3.3 ทำให้ได้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB คือ ภาวะที่แหล่งคาร์บอนคือน้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm และ อัตราเร็วการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHB การทดลองในขั้นตอนนี้จึงใช้การผลิตด้วยเทคนิคแบบเฟดแบช ซึ่งเป็นเทคนิคที่ช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ (Sun และคณะ, 2007) จากผลการผลิตแบบแบชทำให้สังเกตพบว่า ปริมาณเซลล์และปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเติมแหล่งคาร์บอน (น้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร) และแหล่งไนโตรเจน (C/N 200) ลงในระบบทุก 24 ชั่วโมง เพื่อรักษาภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนและอัตราส่วน C/N ให้คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการผลิตแบบเฟดแบช ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHB ให้สูงขึ้นได้ เนื่องจากได้ปริมาณเซลล์มากกว่าการผลิตแบบแบช โดยปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 11.33 กรัมต่อลิตร เป็น 20.15 กรัมต่อลิตร ภายใน 72 ชั่วโมง และยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แม้สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อผลิตแบบเฟดแบช มีค่า 83.89 % ซึ่งใกล้เคียงกับการผลิตแบบแบช ที่ได้สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 82.94 % แต่ด้วยปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นกว่าสองเท่า จึงทำให้ปริมาณ PHB เพิ่มจากการผลิตแบบแบช ซึ่งให้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้นจาก 9.088 กรัมต่อลิตร เป็น 16.9 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับเมื่อใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน ที่การผลิตแบบเฟดแบชให้ปริมาณเซลล์ 16.5 กรัมต่อลิตร มากกว่าการผลิตแบบแบช ที่ให้ปริมาณเซลล์ 10.45 กรัมต่อลิตร และการผลิตแบบเฟดแบชให้สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 87.32 % ซึ่งสูงกว่าการผลิตแบบแบชที่ให้ สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 79.04 % ทำให้การผลิตแบบแบชให้ปริมาณ PHB มากกว่าคือ 13.69 กรัมต่อลิตร

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yamane และคณะ (1995) ที่ศึกษาการผลิต PHB จาก *A. latus* โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส ใช้เทคนิคการผลิตแบบเฟดแบช และใช้ระบบควบคุม pH-สแตท (pH-stat) เป็นการควบคุมแบบพารามิเตอร์ย้อนกลับ (feedback parameter) ปริมาตรการผลิต 550 มิลลิลิตร มีการเติม ซูโครส และ แอมโมเนียมลงในระบบ โดยใช้ปั๊มอัตโนมัติ และควบคุมอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งมีปริมาณสูงถึง 142 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สัดส่วนของ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าค่อนข้างคงที่ประมาณ 50% และปริมาณ PHB เท่ากับ 71.4 กรัมต่อลิตรภายใน 18 ชั่วโมง ประสิทธิภาพในการ PHB เท่ากับ 3.97 g/l/h ซึ่งมีค่าสูงกว่าผลจากงานวิจัยนี้ซึ่งอาจเนื่องมาจาก

อัตราในการเติม แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เป็นแบบอัตโนมัติ ทำให้สามารถรักษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ได้ดีกว่า จึงทำให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHB สูงกว่า จากนั้น Wang และ Lee (1997) ได้ใช้เทคนิคเดียวกับ Yamane และคณะ (1995) ในการเพาะเลี้ยง *A. latus* เพื่อผลิต PHB แต่มีความแตกต่างตรงที่มีการจำกัดไนโตรเจน เมื่อได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 76 กรัมต่อลิตร และมีการควบคุมอัตราเร็วการกวนเพื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนให้สูงกว่า 40 % ของอากาศอิ่มตัว ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในเวลาการเพาะเลี้ยง 20 ชั่วโมง สามารถผลิต PHB ได้ 98.7 กรัมต่อลิตร ปริมาณเซลล์ 111.7 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB คิดเป็น 88% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีประสิทธิภาพการผลิตสูงกว่า คือเท่ากับ 4.97 g/l/h และจากงานวิจัยของ Lee และคณะ (1994) ที่ศึกษาการผลิต PHB จากเมทานอลโดยผลิตด้วยเทคนิคเฟด-แบช จาก *Protomonas extorquens* ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 121 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณเซลล์ 121 กรัมต่อลิตร สัดส่วนของ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 61% และปริมาณ PHB เท่ากับ 136 กรัมต่อลิตร

สังเกตได้ว่าการผลิต PHB ในถังหมักแบบเฟดแบช เป็นวิธีที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHB ได้เป็นอย่างดี เพราะเป็นเทคนิคที่ช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ และเป็นเทคนิคที่ช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้มากกว่าการผลิตแบบแบช เพราะมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB สูงกว่า และเนื่องจากการผลิตแบบเฟดแบชทำให้สามารถเพิ่มระยะเวลาการผลิตให้นานขึ้นได้ เป็นการลดค่าใช้จ่ายในการเตรียมถังหมักก่อนเริ่มการผลิตแต่ละครั้ง แต่อย่างไรก็ตาม อัตราการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นอีกหนึ่งตัวแปรที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการผลิต PHB จึงควรต้องทำการศึกษาในรายละเอียดในลำดับต่อไป

ตารางที่ 5.4 เปรียบเทียบการผลิต PHA ในระดับขวดเขย่า 100 มิลลิลิตร โดยจุลินทรีย์ และแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

แบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอน	Biomass (g/l)	PHA (g/l)	PHA (%wt)	Productivity (g/l/h)	อ้างอิง
<i>A. eutrophus</i>	น้ำอ้อย (50 g/l, 72h)	6.013	1.84	30.6	0.031	Suwannasing และคณะ, 2011
	น้ำอ้อย (30 g/l, 72h)	2.161	0.05	2.31	0.001	
<i>A. latus</i>	ซูโครส (30 g/l)	6.30	0.756	12.0	0.006	Ugwu และคณะ, 2011
	กลูโคส (30 g/l)	5.70	0.513	9.0	0.005	
	กากน้ำตาล (76 g/l, 7% w/v)	6.00	0.720	12.0	0.007	
<i>A. latus</i>	ยางจากคั้น เมเปิ้ล (ซูโครส 20 g/l)	4.4	3.41	77.6 ± 1.5	0.032	Yezza และคณะ, 2007
<i>A. latus</i>	น้ำส่วนใสของ เต้าหู้ถั่วเหลือง (ซูโครส 25 g/l)	3.69	2.48	67.2	0.011	Kumalaningsih และคณะ, 2011
<i>A. latus</i> DSM 1123	น้ำอ้อย (30 g/l C/N 200)	11.87	5.20	44.1	0.072	ชนารัตน์, 2554
<i>A. latus</i> DSM 1123	น้ำเชื่อม (30 g/l C/N 200)	10.80	8.60	79.62	0.12	นรมน, 2555
<i>A. latus</i> DSM 1122	น้ำตาลทรายขาว (30 g/l C/N 200)	9.4	4.02	44.72	0.066	งานวิจัยนี้
	น้ำตาลทรายดิบ (30 g/l C/N 200)	6.27	2.37	37.80	0.033	

ตารางที่ 5.5 เปรียบเทียบการผลิต PHA ในระดับถังหมัก โดยจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอน และเทคนิคการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน

แบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอน	เทคนิคการเลี้ยงเชื้อ	Biomass (g/l)	PHA (g/l)	PHA (%wt)	Productivity (g/l/h)	อ้างอิง
<i>A. latus</i>	ซูโครส	เฟด-แบช (3L)	111.7	98.7	88.3	4.94	Wang และ Lee, 1997
Recombinant <i>E. Coli</i>	สารละลายหางนม	เฟด-แบช	87	69	80	1.40	Wang และ Lee, 1998
<i>A. latus</i>	ซูโครส (15 g/l)	แบช(5L)	8.1	4.8	57.0	0.014	Wang และคณะ, 2001
<i>A. latus</i>	ยางจากคั้นเมเปิล (ซูโครส 20 g/l)	แบช(10L)	4.2	3.26	77.0 ± 2.6	0.032	Yezza และคณะ, 2007
<i>A. latus</i>	Sweet sorghum juice (น้ำตาลทั้งหมด 20 g/l)	แบช(2L)	1.73	0.68	39.3	0.0019	Tanamool และคณะ, 2009
<i>A. eutrophus</i>			0.92	0.034	3.69	0.0125	
<i>A. latus</i> DSM 1123	น้ำเชื่อม (ซูโครส 30 g/l)	แบช(3L) 0.5 vvm 500 rpm	11.33	9.369	87.72	0.226	งานวิจัยนี้
	น้ำเชื่อม (ซูโครส 30 g/l)	เฟด-แบช (3L) 0.5 vvm 500 rpm	20.15	16.904	83.89	0.2340	

5.4 การสกัด PHB จากเซลล์แห้งและการทำบริสุทธิ์

PHB เป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์และสะสมอยู่ภายในเซลล์ ดังนั้นการเก็บเกี่ยว PHB สามารถทำได้โดยการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก จากนั้นนำเซลล์ไปอบแห้งอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันเซลล์ไม่ให้ย่อย PHB ไปใช้เป็นพลังงาน จากนั้นนำเซลล์แห้งมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ PHB สามารถละลายได้ดี ได้แก่ คลอโรฟอร์ม ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นทำบริสุทธิ์โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเฮกเซนปริมาตร 4 เท่า PHB จะตกตะกอนอยู่ในรูปตะกอนสีขาวจับกันเป็นก้อน ส่วนสิ่งเจือปนจะแขวนลอยอยู่ในส่วนของเฮกเซน จากวิธีที่กล่าวมาข้างต้น เห็นได้ว่าเป็นวิธีการที่ต้องใช้ต้นทุนสูงและทำให้เกิดของเสียที่เป็นสารเคมีเป็นจำนวนมาก ทำให้ต้องใช้ต้นทุนสูงสำหรับซื้อสารเคมี และการจัดการระบบการกำจัดของเสีย นอกจากนี้คลอโรฟอร์มและเฮกเซนล้วนเป็นสารเคมีไวไฟที่ก่อให้เกิดอันตรายกับผู้สัมผัส หรือสูดดม ดังนั้นการสกัดและทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้จึงไม่เหมาะกับการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม Lee (1992) ทำการทดลองสกัด PHAs โดยใช้เอนไซม์ เช่น โปรติเอส นิวคลีเอส และ ไลโซไซม์เพื่อย่อยผนังเซลล์ ตามด้วยการล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวเพื่อกำจัดส่วนประกอบของเซลล์ ทดแทนการใช้สารเคมีอันตราย ซึ่งเป็นวิธีการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่า อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังคงใช้วิธีการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและทำบริสุทธิ์ PHB ตามวิธีของ Comeau และคณะ (1988)

5.5 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และเชิงกลของ PHB

5.5.1 ขึ้นรูป PHB เป็นแผ่นฟิล์ม

การขึ้นรูปฟิล์ม PHB ทำได้โดยการละลาย PHB ที่ทำบริสุทธิ์แล้วในคลอโรฟอร์มที่ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเทสารละลายลงบนแม่พิมพ์ ซึ่งแม่พิมพ์ที่ใช้ควรมีวัสดุเป็นแก้ว พื้นผิวเรียบ และวางอยู่ในแนวระดับ เพื่อให้ความหนาของแผ่นฟิล์มเท่ากันทุกจุด ซึ่งความหนาของแผ่นฟิล์มขึ้นอยู่กับปริมาณ PHB ที่ใช้ขึ้นรูป โดยการทดลองนี้ใช้ PHBหนัก 0.5 กรัม ในการขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม 1 แผ่น การวัดความหนาของฟิล์ม จะวัดแบบสุ่ม 10 ตำแหน่งทั่วแผ่นฟิล์ม แล้วนำมาหาค่าความหนาเฉลี่ย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.04 มิลลิเมตร ฟิล์มที่ได้มีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น ก่อนข้างทึบแสง ผิวสัมผัสคล้ายพลาสติกสังเคราะห์ มีความแข็งแรงและความยืดหยุ่นต่ำ

5.5.2 วิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

เพื่อเป็นการยืนยันว่า *A. lata* DSM1123 ผลิต PHAs ชนิด PHB จึงทำการวิเคราะห์โครงสร้างของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ด้วยเครื่องโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$) และคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ($^{13}\text{C-NMR}$) จากผลการทดลองเมื่อสังเกตผลค่าเคมีคัลชิฟ (δ) ของสัญญาณที่ปรากฏในสเปกตรัมของการทดสอบทั้งสองชนิด สรุปได้ว่า PHA ที่ *A. lata* DSM 1123 ผลิตได้ คือ สอมพอลิเมอร์ ชนิด พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรท (Polyhydroxybutyrate, PHB) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเคมีคัลชิฟจากสเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ PHB ที่สังเคราะห์โดย *Cupriavidus necator* เมื่อแหล่งคาร์บอนคือกากถั่วเหลือง (PHBsoy) และ เมื่อแหล่งคาร์บอนคือแหล่งคาร์บอนคือกากถั่วเหลืองที่เติมกากน้ำตาล 2.5% (PHBs/m) และ PHB มาตรฐาน ดังตารางที่ 5.6 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับค่าเคมีคัลชิฟจากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ที่มีค่าใกล้เคียงกับ PHB ที่สังเคราะห์โดยแบคทีเรีย *E. coli* ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมให้สามารถสังเคราะห์ PHB ได้ เมื่อกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน (PHBgly) ซึ่งแสดงดังตารางที่ 5.7

ตารางที่ 5.6 ตารางเคมีคัลชิฟ (ppm) $^{13}\text{C-NMR}$ ของ PHB จาก *A. lata* DSM 1123 จากงานวิจัยนี้เทียบกับ PHBsoy PHBs/m และ PHB มาตรฐาน (Oliveira และคณะ, 2007)

C atom	Chemical shift(ppm)			
	PHBsoy	PHBs/m	PHB จาก <i>A. lata</i> DSM1123	PHB (Doi และคณะ, 1986)
CH ₃	19.66	19.63	19.75	19.76
CH ₂	40.68	40.63	40.77	40.77
CH	67.49	67.47	67.61	67.40
C=O	169.01	169.03	169.15	169.14

ตารางที่ 5.7 ตารางเคมีคัลลิกซ์ (ppm) $^1\text{H-NMR}$ ของ PHB จาก *A. lata* DSM 1123 จากงานวิจัยนี้ และ PHBgly (Ramachander และคณะ, 2002)

C atom	Chemical shift (ppm)	
	PHB จาก <i>A. lata</i> DSM1123	PHBgly
CH3	19.75	19.76
CH2	40.77	40.77
CH	67.61	67.40
C=O	169.15	169.14

5.5.3 วิเคราะห์อุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature, T_M) อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (Glass transition temperature, T_G)

อุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature, T_M) และอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (Glass transition temperature, T_G) เป็นคุณสมบัติทางความร้อนของวัสดุที่แสดงถึงลักษณะของวัสดุที่อุณหภูมิต่างๆ จากผลการทดลอง พบว่า PHB ที่สังเคราะห์โดย *A. lata* DSM 1123 มีอุณหภูมิหลอมเหลว เท่ากับ 178.5 องศาเซลเซียส หมายความว่า ที่อุณหภูมิสูงกว่า 178.5 องศาเซลเซียส PHB จะมีลักษณะเปลี่ยนจากของแข็งเป็นของเหลว อุณหภูมิหลอมเหลวเป็นค่าที่ต้องคำนึงถึงในขั้นตอนการขึ้นรูป ที่ต้องให้ความร้อนกับพอลิเมอร์ให้ถึงอุณหภูมิหลอมเหลวเพื่อขึ้นรูปให้มีลักษณะตามต้องการจากนั้นจึงลดอุณหภูมิจนกระทั่งพอลิเมอร์มีลักษณะเป็นของแข็งอีกครั้ง ซึ่งอุณหภูมิหลอมเหลวของ PHB ที่สังเคราะห์โดย *A. lata* DSM 1123 คือ 178.5 องศาเซลเซียสมีค่าสูงกว่าอุณหภูมิหลอมเหลวของ PHB มาตรฐานในท้องตลาด คือ 173 องศาเซลเซียส (Oliveira และคณะ, 2007) อยู่เล็กน้อย แต่เมื่อพิจารณาช่วงของอุณหภูมิหลอมเหลวของพลาสติกสังเคราะห์อย่าง เช่น PP พบว่าอุณหภูมิหลอมเหลวของ PHB ที่สังเคราะห์โดย *A. lata* DSM 1123 อยู่ในช่วงของ อุณหภูมิหลอมเหลวของ PP คือเท่ากับ 171-182 องศาเซลเซียส (Jogdand, 2004)

ในส่วนของอุณหภูมิกลาสทรานซิชันของ PHB ที่สังเคราะห์โดย *A. lata* DSM 1123 มีค่า 10 องศาเซลเซียส หมายความว่า ที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิลักษณะคล้ายแก้ว PHB จะมีลักษณะที่เป็นของแข็ง มีความเปราะคล้ายแก้ว เรียกสถานะนี้ว่า สถานะคล้ายแก้ว (glassy state) สำหรับอุณหภูมิกลาสทรานซิชันของ PHB มาตรฐานในท้องตลาด มีค่าเท่ากับ 1.1 องศาเซลเซียส (Oliveira และคณะ, 2007) และ

อุณหภูมิกลาสทรานซิชันของ PP มีค่าเท่ากับ -15 องศาเซลเซียส (Jogdand, 2004) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชันของ PHB ที่สังเคราะห์โดย *A. lata* DSM 1123 จึงแสดงว่า PP มีลักษณะอ่อนนุ่มคล้ายยางที่อุณหภูมิสูงกว่า -15 องศาเซลเซียส สำหรับ PHB ที่สังเคราะห์โดย *A. lata* DSM 1123 ในงานวิจัยนี้มีอุณหภูมิกลาสทรานซิชันเท่ากับ 10 องศาเซลเซียสแสดงว่า PHB อยู่ในสถานะคล้ายยางที่อุณหภูมิห้อง

5.5.4. วิเคราะห์คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม PHB

จากผลการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม PHB ที่ผลิตโดย *A. lata* DSM 1123 ดังแสดงในตารางที่ 4.41 พบว่ามีค่าใกล้เคียง PHB มาตรฐาน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ใช้ในปัจจุบัน เช่น พอลิโพรพิลีน (Polypropylene, PP) พอลิเอทิลีนทาเรพทาเลท (Polyethylene-tarephthalate, PT) พอลิสไตรีน (Polystyrene, PS) และพอลิโพรพิลีนความหนาแน่นต่ำ (LDPE) ดังตารางที่ 5.8 พบว่าค่า Stress at Max.Load ของ PHB มีค่าใกล้เคียงกับ PP ต่ำกว่า PT และ PS แต่สูงกว่า LDPE แสดงให้เห็นว่า PHB มีคุณสมบัติในการต้านทานแรงดึงใกล้เคียงกับ PP มากที่สุด เช่นเดียวกับ ค่า Young's Modulus ที่ PHB ให้ค่าใกล้เคียงกับ PP มากที่สุดอีกเช่นกัน แต่เมื่อพิจารณาค่า Strain at Max.Load พบว่า PHB มีค่า Strain at Max.Load ต่ำกว่า PP PT และ LDPE มาก แสดงให้เห็นว่า PHB มีความสามารถในการยืดตัวต่ำกว่าอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติเชิงกลของ PHB สามารถปรับปรุงให้เป็นไปตามความต้องการได้โดยการเติมสารจำพวก พลาสติกไซเซอร์ (Plasticizer) เช่น กลีเซอรอล โพลีไกลคอล และ ซิเตรท เป็นต้น (Volova, 2004) ดังนั้น PHB ที่ผลิตโดย *A. lata* DSM 1123 จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อทดแทนพลาสติกสังเคราะห์อย่าง PP ได้ หากมีการปรับปรุงคุณสมบัติโดยการเติมสารพลาสติกไซเซอร์ที่ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับ พอลิเมอร์

ตารางที่ 5.8 สมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม PHB ที่ผลิตโดย *A. lata* DSM 1123 เปรียบเทียบกับ PHB มาตรฐาน (Sigma- Aldrich) โพลีโพรพิลีน (PP) โพลีเอทิลีนทetraเลท (PT) โพลีสไตรีน (PS) และ โพลีโพรพิลีนความหนาแน่นต่ำ (LDPE) (Khanna และคณะ, 2005)

ชนิดของพอลิเมอร์	คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม		
	Stress at Max.Load (Mpa)	Strain at Max.Load (%)	Young's Modulus (MPa)
PHB ที่ผลิตจาก <i>A. lata</i> DSM 1123	24.951	1.477	16191.93
PHB มาตรฐาน (Sigma- Aldrich)	36.696	1.703	15523.08
PP	34.5	400	1700
PT	56	7300	2200
PS	50	3.5	3100
LDPE	10	620	200

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชนารัตน์ สุทธะนันท์. 2554. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตโดย *Azohydromonas lata* จากน้ำอ้อย รายงานโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชนาวดี ลีจากภัย. 2549. สาระนำรู้ด้านโพลีเมอร์. วารสารสมาคมโพลีเมอร์ ประเทศไทย.

ชนาวดี ลีจากภัย. 2549. พลาสติกย่อยสลายได้เพื่อสิ่งแวดล้อม. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. บริษัท ไทยเอฟเฟคท์สตูดิโอ จำกัด.

นรมน สารานูรัตน์. 2555. การผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลอ้อย โดย *Azohydromonas lata* DSM 1123. รายงานโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรวิทย์ จันทร์สุวรรณ. 2554. พอลิเมอร์ (Polymer). เอกสารประกอบการสอนรายวิชาเคมีประยุกต์ วิทยาลัยเทคโนโลยีภาคตะวันออก คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.

สุชาดา จันท์ประทีป. 2539. การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-4-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อัมทิกา เมืองวงศ์. 2553. การผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อัสวิทย์ ปัทมะเวณู. ตามรอยน้ำตาล (กรุงเทพฯ : ที.พี.พี.รินทร์ จำกัด, 2539).

ภาษาอังกฤษ

- Abate, R., Ballistreri, A., and Montaudo, O. 1995. Separation and Structural Characterization of Cyclic and Open Chain Oligomers Produced in the Partial Pyrolysis of Microbial Poly(hydroxybutyrates). Macromolecules. 28:7911-7916.
- 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.
- Anastasia A.P., Christos, P.P., Agathi, G.P., Maria L., and Dimitrios, A.K. 2011. Production of Polyhydroxyalkanoates From Whey by *Thermus thermophilus* HB8. Process Biochemistry. 44:847-853.
- Anderson, A.J., and Dawes, E.A. 1990. Occurance, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiology and molecular biology reviews. 54:450.
- Barry D. E. 2009. Chemistry & Biology Innovations Biobased Performance Bioplastic: Mirel. Chemistry & Biology, pp. 1-2.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M. and Welander, T. 2008. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. Bioresource Technology. 99:509-516.
- Bernfeld, F. 1995. Amylase, α and β . In Colowick, S.P., and Kaplan, N.O.(eds.) Method in Enzymology. Academic Press. New York. Vol.3 pp149-150.
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W. and Fuller, R.C. 1990. Plastics from bacteria and for bacteria: poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology. 41:77-93.

- Brzostowicz, P.C., Blasko, M.S., and Rouvire, P.E. 2002. Identification of two gene clusters involved in cyclohexanone oxidation in *Brevibacterium epidermidis* strain HCU. Applied Microbiology and Biotechnology. 58:781–789.
- Bucci, D.Z., Tavares, L.B.B., and Sell, I. 2005. PHB Packaging for the Storage of Food Products. Polymer Testing. 24:564–571.
- Byrom, D. 1994. Polyhydroxyalkanoates. In: Mobley D.P. (ed.), Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors, pp. 5-33. Hanser Munich.
- Caballero, K.P., Karel, S.F., and Register, R.A. 1995. Biosynthesis and characterization of hydroxybutyrate-hydroxycaproate copolymers. International Journal of Biology. 17:86–92.
- Chanprateep, S. 2010. Current Trends in Biodegradable Polyhydroxyalkanoates, Journal of Bioscience and Bioengineering and Bioengineering. 110(6):621-632.
- Chanprateep, S., Kikuya, K., Shimizu, H., Seki, S., Tegawa, S., and Shioya, S. 2003. Nonisothermal Crystallization Kinetics of Biodegradable Random Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Block One. Journal of Chemical Engineering Japan. 36:574-580.
- Chanprateep, S., and Kulpreecha, S. 2006. Production and Characterization of Biodegradable terpolymer po(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes sp.* A-04. Journal of Bioscience and Bioengineering. 101:51-56.
- Chen, C.W., Don, T.M. and Yen, H.F. 2006. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. Process Biochemistry. 41:2289-2296.
- Chen, G.Q., König, K.H., and Lafferty, R.M. 1991. Production of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate and poly-D(-)-3-hydroxyvalerate by strains of *Alcaligenes latus*. Antonie van Leeuwenhoek. 60:61-66.

- Chen, G.Q. 2010a. Industrial production of PHA. In Chen, G.Q. (ed.), Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications, pp. 121-132. China : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Chen, G.Q. 2010b. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. In Chen, G.Q. (ed.), Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications, pp. 17-37. China : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Chowdhury, A.A. 1963. Poly-3-hydroxybutyrate-ure abbauende Bakterien und Exoenzym. Archives of microbiology. 47:167-200.
- Chohan, S.N., and Copeland, L. 1998. Acetoacetyl coenzyme A reductase and polyhydroxybutyrate synthesis in *Rhizobium* (Cicer) sp. strain CC 1192. Applied and Environmental Microbiology. 64 : 2859–2863.
- Comeau, Y., Hall, J.K., and Oldham, K.W. 1988. Determination of Poly-3-Hydroxybutyrate and Poly-3-Hydroxyvalerate in Activated Sludge by Gas-Liquid Chromatography. Applied and Environmental Microbiology. 54:2325-2327.
- De Smet, M.J., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J., and Wynberg, H. 1993. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. J. Bacteriol. 154:870-878.
- Dennis, D.E. 1994. Expression of polyhydroxyalkanoates in recombinant bacteria. In: International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Montreal, Canada
- DiGregorio, B.E. 2009. Biobased Performance Bioplastic: Mirel. Chemistry and Biology Innovation. 10:1-2.
- Doi, Y. Microbial Polyesters. New York: VCH, 1990.
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., and Soga, K. 1987. Nuclear magnetic resonance studies on poly(β -hydroxybutyrate) and a copolyester of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16. Macromolecules. 19:2860–2864.

- Doi, Y., Kawaguchi, Y., Koyama, N., Nakamura, S., Hiramitsu, M., Yoshida, Y., and Kimura, U. 1992. Synthesis and Degradation of Polyhydroxyalkanoates in *Alkaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol. 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.
- Dubois, 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.
- El-Sayed, Azhar, A., Hemmat, M.A., Abdel Hafez, A.M., and Khodair, T.A. 2009. Batch Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Ralstonia Eutropha* and *Alcaligenes Latus* Using Bioreactor Different Culture Strategies. Journal of Applied Sciences Research. 5:556-564.
- Fuchtenbusch, B., and Fabritius, D. 1996. Incorporation of 2-methyl-3-hydroxybutyric acid into polyhydroxyalkanoic acids by axenic cultures in defined media. FEMS Microbiology Letters. 138:153-160.
- Goff, M., Ward, P.G., and O'Connor, K.E. 2007. Improvement of the conversion of polystyrene to polyhydroxyalkanoate through the manipulation of the microbial aspect of the process: A nitrogen feeding strategy for bacterial cells in a stirred tank reactor. Journal of Biotechnology. 132 : 283-286.
- Grothe, E., Young M.M., and Chisti, Y. 1999. Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. Enzyme and Microbial Technology. 25:132-141.
- Grothe, E., and Chisti, Y. 2000. Poly(b-hydroxybutyric acid) thermoplastic production by *Alcaligenes latus*: Behavior of fed-batch cultures. Bioprocess Engineering. 22:441-449.
- Hangii, U. J. 1990. Pilot scale production of PHB with *Alcaligenes latus*, In E. A. Dawes (ed.), Novel Biodegradable Microbial Polymers. pp. 65-70. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

- Holmes, P.A., 1988. Biological Produced PHA Polymers and Copolymer. In Developments in Crystalline Polymer, Bassett, D.C. (ed.), Elsevier, London. 2:1-65.
- Jogdand, S.N. 2004. Welcome to the Eco-friendly Plastic (online). Available: <http://www.biotechsupportindae.com/jogsn/.html> (2004, March)
- Kamper, A.J. 1974. Determination of sub-micro quantities of ammonium and nitrate in soils with phenol, sodium nitropusside and hypochloride. Geoderma. 12:201-206.
- Kessler, B., and Witholt, B. 2001. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. Journal of Biotechnology. 86:97-104.
- Khanna, S., and Srivastava A.K. 2006. Optimization of nutrient feed concentration and addition time for production of poly(β -hydroxybutyrate). Enzyme and Microbial Technology. 39:1145–1151.
- Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Fernandes, E.G., Horvat, P., Kutschera, C., Hesse, P., and Braunegg, G. 2008. Polyhydroxyaknaote production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. Bioresource Technology. 99:4854-4863.
- Kumalaningsih, S., Hidayat, N., and Aini, N. 2011. Potimization of Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production from Liquid Bean Curd Waste by *Alcanigenes latus* Bacteria. Journal of Agriculture and Food Technology. 1(5):63-67
- Kunioka, M., Kawagushi, Y., and Doi, Y. 1989. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 30:569-573.
- Kunioka, M., Nakamura, Y., and Doi, Y. 1988. New bacterial copolyester produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acid. Polymer Communications. 29:174-176.
- Haas, R., Jin, B. and Zepf, F.T. 2008. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. Bioscience Biotechnology and Biochemistry .72(1):253-256.

- Harbak, O. 1992. Industrial production of Poly- β -hydroxybutyrate. FEMS Microbial Reviews. 103: 251-256.
- Hazenberg, W., and Witholt, B. 1997. Efficient production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from octane by *Pseudomonas oleovorans*: economic considerations. Applied Microbiology and Biotechnology. 48:588-596.
- Hiramitsu, M., Koyama, N., and Doi, Y. 1993. Production of poly (3-hydroxybutyrate-Co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes latus*. Biotechnology Letters. 15: 461-464.
- Holmes, P.A. 1985. Application of PHB – amicrobially produced biodegradable thermoplastic. Physics in Technology. 16:32-36.
- Huisman, G. W., Leeuw, D., and Eggink, G. 1989. Synthesis of poly- β - hydroxybutyrates is a common feature of fluorescent *Pseudomonas*. Applied Environmental Microbiology. 55:1949-1954.
- Lafferty, R. M., Korsatko, B., and Korstako, W. 1988. Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. In : Rehm H. J., Reed, G., editors. Biotechnology Special Microbial Processes, pp. 136-176.
- Lee, S.Y. 1996a. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnology and Bioengineering. 49:1-14.
- Lee, S.Y. 1996b. Plastic bacteria, Progress and prospects for polyhydroxy alkanooate production in bacteria. Trends Biotechnology. 14:431– 438.
- Lee, S.Y., and Choi, J.I. 1998. Effect of fermentation of performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. Journal of Polymer Degradation and Stability. 59 : 387-393.
- Lee, S.Y., Choi, J.L., and Wong, H.H. 1999. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. International Journal of Biological Macromolecules. 25:31–36.
- Lemoigne, M. 1962. Production of dehydration and polymerization of β -hydroxybutyric acid. Bulletin de la Société de Chimie Biologique. 8:770-782.

- Lenz, R.W., Kim, Y.B., and Fuller, R.C. 1992. Production of Unusual Bacterial Polyesters by *Pseudomonas oleovorans* through Comatabolism. FEMS Microbiol. Rev.103: 207-214.
- Lindsay, K. 1992. 'Truly Degradable' resins are now truly commercial. Modern Plastic. 2:62-64.
- Luengo, J.M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G., and Olivera, E.R. 2003. Bioplastics from microorganisms. Current Opinion in Microbiology. 6:251-260.
- Madison L.L., and Huisman, G.W. 1999. Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. Microbiology and Molecular Biology Review. 63:21-53.
- Mattendorf, V., Robertson, E.J., Leech, R.M., Krüger, N., Steinbüchel, A., and Poirier, Y. 1998. Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis thaliana* using intermediates of peroxisomal fatty acid β -oxidation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95:13397-13402.
- Nakamura, S., Doi, Y., Scandola, M., 1992. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4hydroxybutyrate). Macromolecules. 25:4237-4241.
- Nakamura, S., Kunioka, M., and Doi, Y. 1989. Macromolecular.
- Nakamura, S., Kunioka, M., and Doi, Y. 1991. Biosynthesis and characterization of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3hydroxypropionate). Macromolecular Report. 28:15-24.
- Nikel, P.I., Almeida, A.D., Melillo, E.C., Galvagno, M.A., and Pettinari, M.J. 2006. New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agro-industrial by-products. Applied and Environmental Microbiology. 72:3949-3954.
- Ojumu, T.V., Yu, J., and Solomon, B.O. 2004. Production of Polyhydroxyalkanoates, a Bacterial Biodegradable Polymer. African Journal of Biotechnology. 43:18-24.
- Olbrich, H. 1963. The molasses (Berlin: Biotechnologie-Kempe GmbH, 2006c), p. 31.

- Oliveira, F.C., Dias, M.L., Castilho, L.R., and Freire, D.M.G. 2007. Characterization of poly (3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. Bioresource Technology. 98:633-638.
- Palleroni, N.I. and Palleroni, A.V. 1987. *Alcaligenes latus*, a New Species of Hydrogen Utilizing Bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology. 28:416-428.
- Penloglou, G., Kretza, E., Chatzidoukasa, C., Paroutib, S., and Kiparissides, C. 2012. On the control of molecular weight distribution of polyhydroxybutyrate in *Azohydromonas lata* cultures. Biochemical Engineering Journal. 62:39– 47.
- Philip, S., Keshavarz, T., and Roy, I. 2007. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. Journal of Chemical Technology Biotechnology. 82:233-247.
- Pozo, C., Martinez-Toledo, M. V., Rodelas, B., and Gonzalez-Lopez, J. 2002. Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechin (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. Journal of Biotechnology 97:125-131.
- Ramachander, T.V.N., Rohini, D., Belhekar, A., and Rawal, S.K. 2002. Synthesis of PHB by recombinant *E. coli* harboring an approximately 5 kb genomic DNA fragment from *Streptomyces aureofaciens* NRRL 2209. International Journal of Biological Macromolecules. 31:63-69.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi and Kalia, V.C. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresource Technology. 87:137-146.
- Reemmer, J. 2009. Advances in the synthesis and extraction of biodegradable polyhydroxyalkanoates in plant systems – A review. MMG basic Biotech. 5:1.
- Reusch, R. N., Sparrow, A. W., and Gardiner, J. 1992. Transport of poly-P-hydroxybutyrate in human plasma. Biochimica et Biophysica Acta. 1123:33-40.

- Saito, Y., and Doi, Y. 1993. Biosynthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas aeruginosa* AO-232 from ¹³C-labeled acetate and propionate. International Journal of Biological Macromolecules. 15:287-292.
- Santhanam, A., and Sasidharan, S. 2010. Microbial production of polyhydroxy alkanotes (PHA) from *Alcaligenes spp.* and *Pseudomonas oleovorans* using different carbon sources. African Journal of Biotechnology. 9:3144-3150.
- Savenkova, L., Gercberga, Z., Nikolaeva, V., Dzene, A., Bibers, I., and Kalnin, M. 1999. Mechanical Properties and Biodegradation Characteristic of PHB-based Films. Process Biochemistry. 35:573-579.
- Shafifzadeh Baei, M. 2010. Optimization Phas production from cheese whey by *Azohydromonas lata*. New Biotechnology . 25:268
- Shang, L., Jiang, M., Yun, Zh., Yan, H.Q. and Chang, H.N. 2008. Mass production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from hydrolyzed corn oil by fed-batch culture of *Pseudomonas putida*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24(12):2783-2787.
- Singh, A.K., and Mallick, N. 2009. Exploitation of inexpensive substrates for production of a novel SCL-LCL-PHA co-polymer by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 36:347-354.
- Solaiman, D., Ashby, R., Hotchkiss, A., and Foglia, T. 2006. Biosynthesis of medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) from soy molasses. Biotechnol Letters. 28:57-162.
- Stageman, J. F. 1984. "Extraction Process," European Patent, 124, 309
- Stanier, R.Y., Doudoroff, M., Kunisawa, R., and Contopoulou, R. 1959. The role of organic substrates in bacterial photosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S. 45:1246-1260.

- Steinbüchel, A. 1991. Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom D (ed) Biomaterials: novel materials from biological sources. Stockton, New York, pp. 124-213.
- Steinbüchel, A. 2001. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. Macromolecular Biosciences. 1(1):1-24.
- Steinbüchel, A., Debzi, E.M., Marchessault, R.H., and Timm, A. 1993. Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolymer by *Chromobacterium violaceum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 39:443-449.
- Steinbüchel, A., and Fuchtenbusch, B. 1998. Bacteria and other biological systems for polyester production. TIBTECH. 16: 419-427.
- Steinbüchel, A., and Hein, S. 2001. Biochemical and molecular basis of microbialsynthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. 71:81-123.
- Steinbüchel, A., Hustede, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A., and Valentin, H. 1992. Molecular Basis for Biosynthesis and Accumulation of Polyhydroxyalkanoic acid in Bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 103: 217- 230.
- Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Progress in Polymer Science. 25:1503–1555.
- Sun, Z., Ramsay, J.A., Guay, M., and Ramsay, B.A. 2007. Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440. Applied Microbiology and Biotechnology. 74:69-77.
- Suwannasing, W., Moonamart, S., and Kaewkannetra, P. 2011. Yields of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) during Batch Fermentation of Sugar Cane Juice by *Alcaligenes latus* and *Alcaligenes eutrophus*. Journal of Life Sciences. 5(11):960-966.

- Taguchi, K., Aoyagi, Y., Matsusaki, H., Fukui, and T., Doi, Y. 1999. Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB101. Biotechnology Letters. 21:579–584.
- Tajalli, K. and Ipsita, R. 2010. Polyhydroxyalkanoates: Bioplastic with Green Agenda. Current Opinion in Microbiology. 13:321-326.
- Takeda, M., Matsuoka, H., Ban, H., Ohashi, Y., Hikuma, M., and Koizumi, J. 1995. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a mutant of *Sphaerotilus natans*. Applied Microbial Biotechnology. 44:37-42.
- Tanamool, V., Danvirutaic, P., Thanonkeo, P., Imai, T., and Kaewkannetra, P. 2009. Production of Poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) from sweet sorghum juice by *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 and *Alcaligenes latus* ATCC 29714 via batch fermentation. The 3rd international conference of fermentation technology for value added agricultural product. 3:9-15.
- Tian, P.Y., Longan, S., Hong, R., Yu, M., Dai-Di, F., and Min, J. 2009. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Current research and development. African Journal of Biotechnology. 8:709-714
- Ugwu, C.U., Tokiwa, Y., and Ichiba, T. 2011. Production of (R)-3-hydroxybutyric acid by fermentation and bioconversion processes with *Azohydromonas lata*. Bioresource Technology. 102:6766–6768.
- Valentin, H.E., and Dennis, D. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. Journal of Biotechnology. 58:33–38.
- Valentin, H.E., and Steinbüchel, A. 1995. Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid-co-4-hydroxyvaleric acid) by mutants and recombinant strains of *Alcaligenes eutrophus*. Journal of Environmental Polymer Degradation. 3:169–175.
- Vandamme, P., and Coenye, T. 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54:2285–2289.

- Vanechoutte, M., Kampfer, P., De Baere, T., Falsen, E., and Verschraegen, G. 2004. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia [Pseudomonas] syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54:317–327.
- Verlinden, A.R., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., Piotrowska-Seget, Z., and Radecka, I.K. 2011. Production of Polyhydroxyalkanoates from Waste Frying Oil by *Cupriavidus necator*. AMB Express. 1:11
- 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.
- Volova, T., Shishatskaya, E., Sevastianov, V., Sergei Efremov, S., and Mogilnaya, O. 2003. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. Biochemical Engineering Journal 16:125–133.
- Wallen, L.L., and Rohedder, W.K. 1974. Polyhydroxyalkanoate from activated sludge. Environmental Science and Technology. 8:576-579.
- Wang, F., and Lee, S.Y. 1997. Poly(3-Hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. Applied and Environmental Microbiology. 63:3703-3706.
- Wang, Y.J., Hua, F.L., Tsang, Y.F., Chan, S.Y., Sin, S.N., Chua, H., Yu, P.H.F., and Ren, N.Q. 2006. Synthesis of PHAs from wastewater under various C:N ratios. Bioresource Technology. 98:1690–1693.
- Wilkinson, J.F. 1959. The problem of energy storage compounds in bacteria. Experimental Cell Research. 7:111-130.
- Xie, W.P., and Chen, G.Q. 2008. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *phaPCJ*. Biochemical Engineering Journal. 38:384–389.

- Yamane, T., Fukunaga, M., and Lee, Y.W., 1995. Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth associated PHB producer. Biotechnology and Bioengineering. 50:197-202.
- Yezza, A., Halasz, A., Levadoux W., and Hawari, J. 2007. Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. Applied Microbiology and Biotechnology. 77:269–274.
- Yim, K.S., Lee, S.Y., and Chang, H.N. 1996. Synthesis of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering. 49:495–503.
- Yoshie, N., Menju, H., and Inoue, Y. 1995. Complex Composition Distribution of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Macromolecule. 28:6516-6521.
- Yu, J., and Heiko, S. 2008. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. Bioresource Technology. 99:8042-8048.
- Zafar, M., Kumar, S., Kumar, S., and Dhiman, A.K. 2012. Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Azohydromonas lata* MTCC 2311 by using genetic algorithm based on artificial neural network and response surface methodology. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 1:70-79.
- Zafar, M., Kumar, S., Kumar, S., and Dhiman, A.K. 2012. Modeling and optimization of poly (3-hydroxybutyrate co-3hydroxyvalerate) production from cane molasses by *Azohydromonas lata* MTCC 2311 in a stirred-tank reactor: effect of agitation and aeration regimes. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 39:987–1001.
- Zheng, L.Z., Li, Z., Tian, H.L., Li, M., and Chen, G.Q. 2005. Molecular cloning and functional analysis of (*R*)-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein: coenzyme A transacylase from *Pseudomonas mendocina* LZ. FEMS Microbiology Letters. 252:299–307.

Zinn, M. 2010. Biosynthesis of medium-chain-length poly[(*R*)-3-hydroxyalkanoates]. In Chen, G.Q. (ed.), Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications. pp. 213-236. Switzerland : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

พอลิเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	2	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

2. สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) โดย NITE Biological Resource Center ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์	2	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	กรัม
พอลิเปปโตน	10	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิต PHA (Production Medium) สูตรปรับปรุงโดย Chanprateep และคณะ (2008) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต	4.5	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.02	กรัม
แอมโมเนียมไอออนทรีซีเทรต	0.05	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต แปรผันตามอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน		
สารละลาย trace element	2.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย trace element ใน HCl 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	1.67 กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	2.78 กรัม
แมงกานีสไดคลอไรด์เตตระไฮเดรต	1.98 กรัม
คอปเปอร์ไดคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.17 กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2 กรัม

แยกละลายเกลือ แมกนีเซียมซัลเฟต และ สารละลาย trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับ pH เป็น 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 โมลาร์ ینگมาเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีเตรียมที่ใช้ในการทดลอง

1. กลีเซอรอล 10%

เตรียมโดยนำกลีเซอรอล 87% ปริมาตร 11.5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุ ปริมาตร 88.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (NaOH 1 M)

เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5.844 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (HCl 3 M)

เตรียมโดยเติมน้ำกลั่นปลอดประจุไปปริมาตรหนึ่ง จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ลงไป 48.99 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 300 มิลลิลิตร

4. สารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ (0.85% NaCl)

เตรียมโดยละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

5. สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ (KCl 2 M)

เตรียมโดยละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 150 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

6. สารละลาย Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

เตรียมโดยละลายเกลือของ EDTA ไดโซเดียม (EDTA disodium salt) 6 กรัม ในน้ำกลั่น ปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด ต่างเท่ากับ 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

7. สารละลายฟีนอลในโทรฟัลไซค์รีเอเจนต์

เตรียมโดยละลายฟีนอล 7 กรัมและโซเดียมไนโทรพัสซายด์ 34 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น ปลอดภัยปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. สารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรต์รีเอเจนต์

เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.48 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดภัย ปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมไดโซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.98 กรัม และเติมสารละลาย โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (5-5.25 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 11.4-12.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับ ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

9. สารละลาย 3 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟูริกในเมทานอลที่มีกรดเบนโซอิกเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

เตรียมโดยละลายกรดเบนโซอิก 1 กรัม ในเมทานอลปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 16 มิลลิลิตร

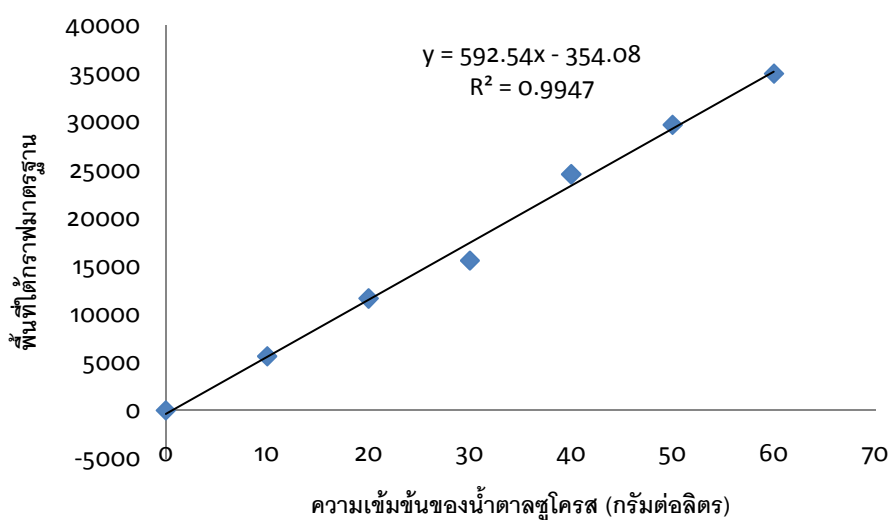
10. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

เตรียมโดยละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ละลายบนเครื่อง กวนสารแบบให้ความร้อน (*Hotplate Stirrer*) เติมโปแตสเซียมคาร์เตรต 30 กรัม จากนั้นปรับ ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดภัย เก็บไว้ในขวดสีชา

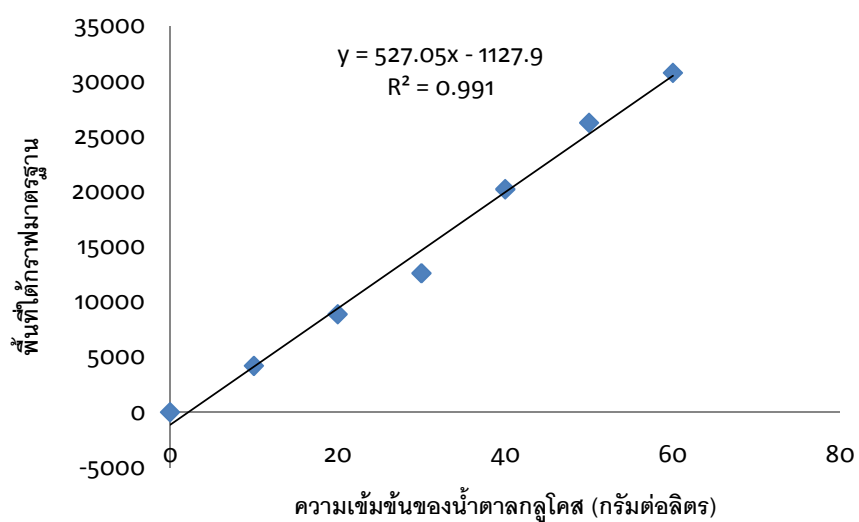
ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานและโครมาโตแกรม

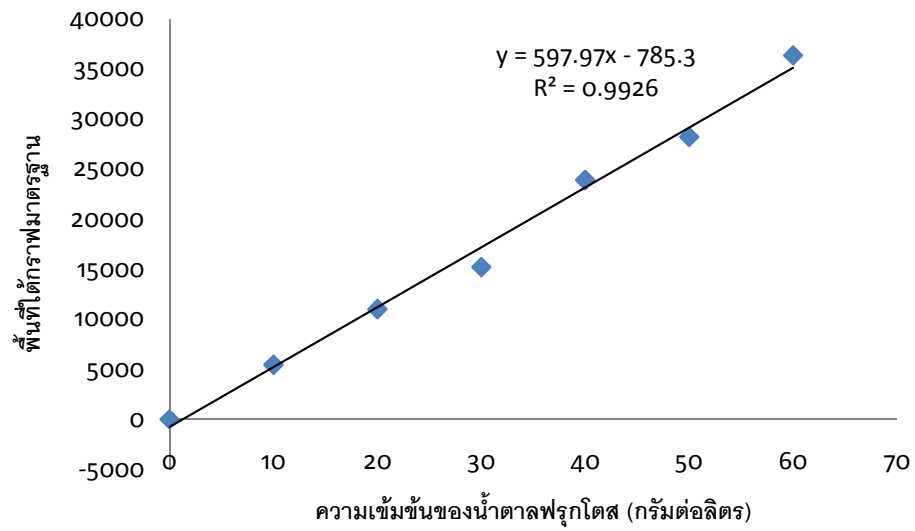
1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส



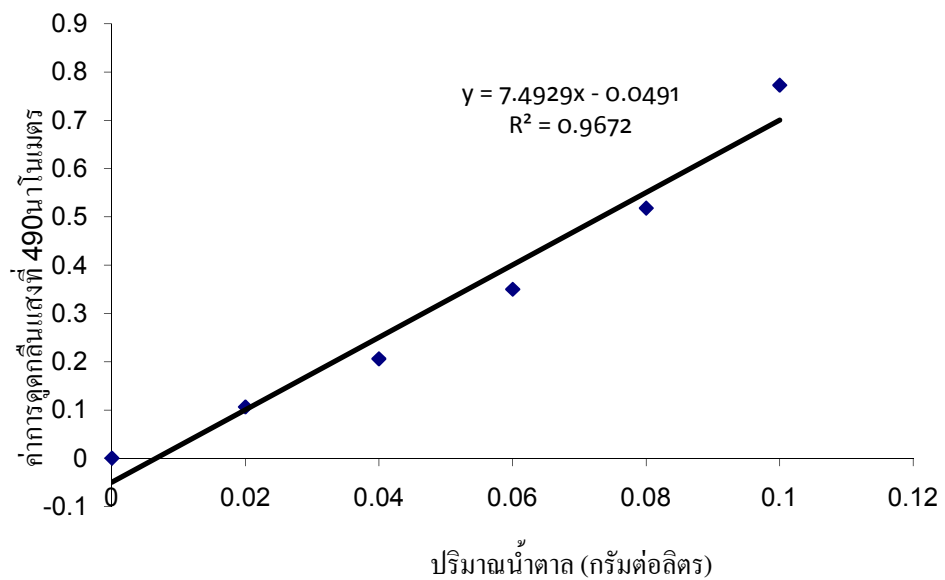
2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



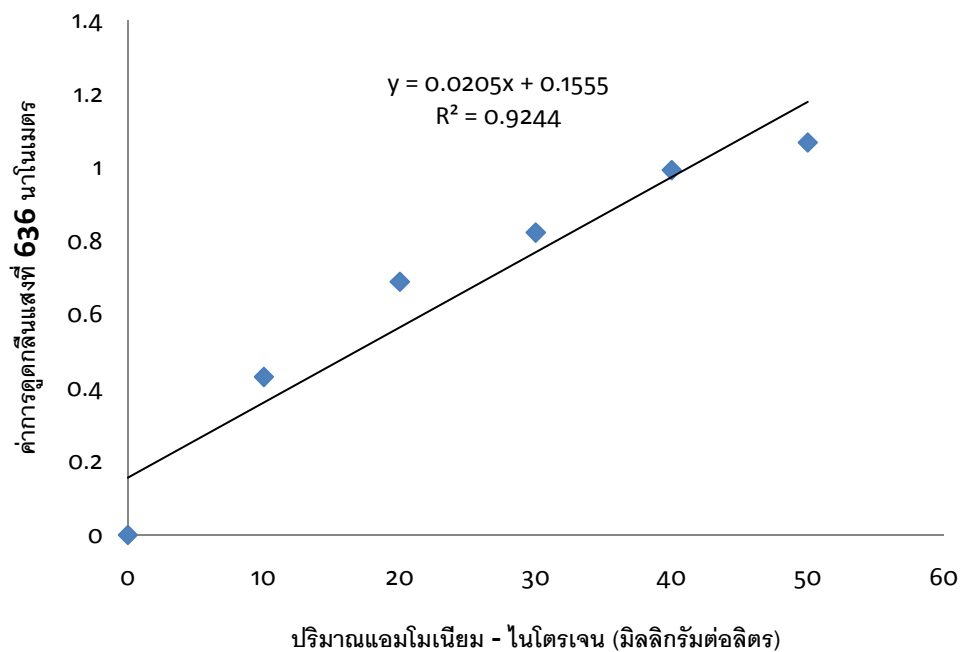
3. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรุคโตส



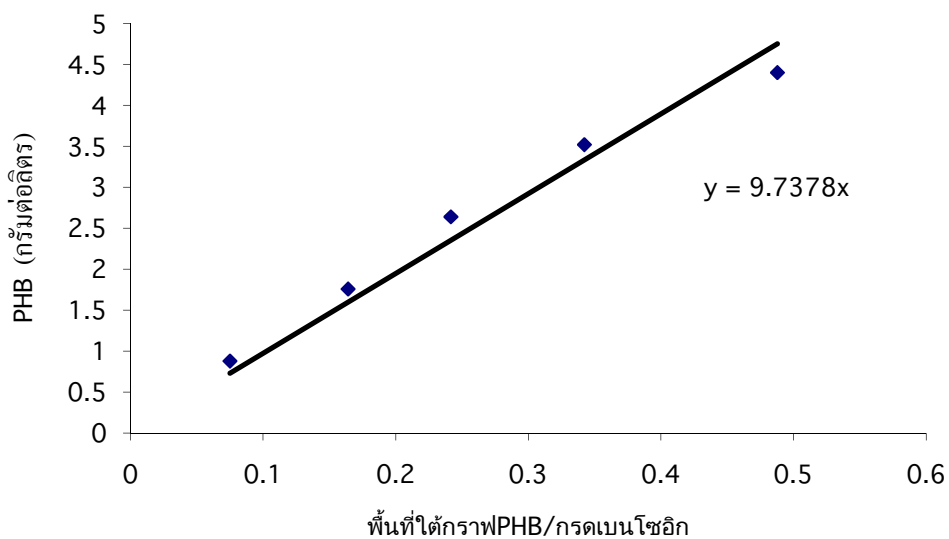
4. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลทั้งหมด



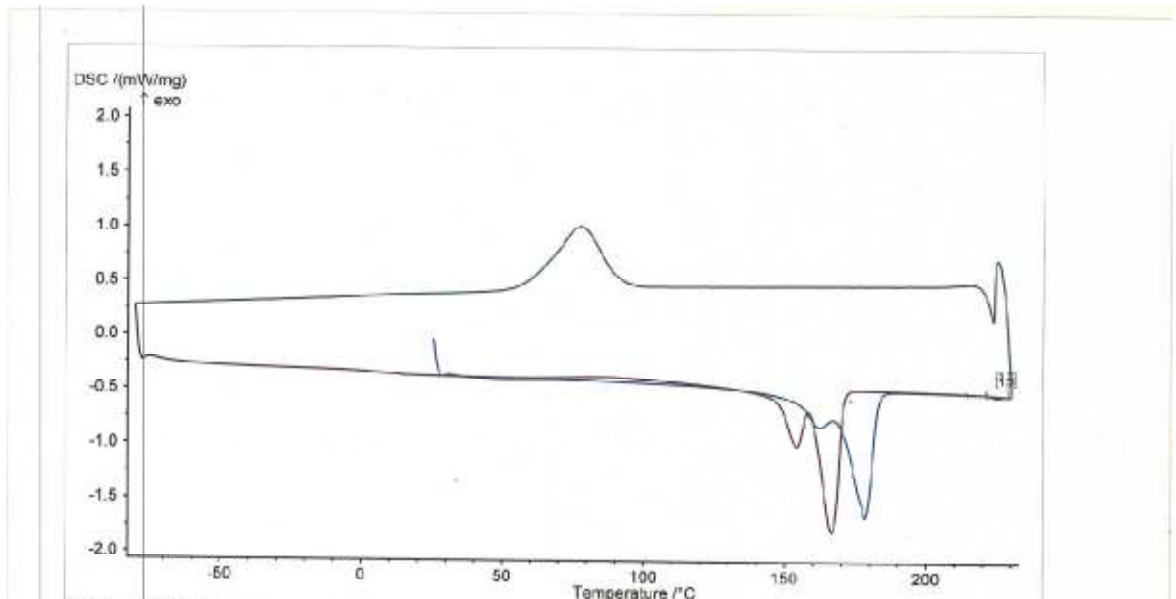
5. กราฟมาตรฐานของปริมาณไนโตรเจน



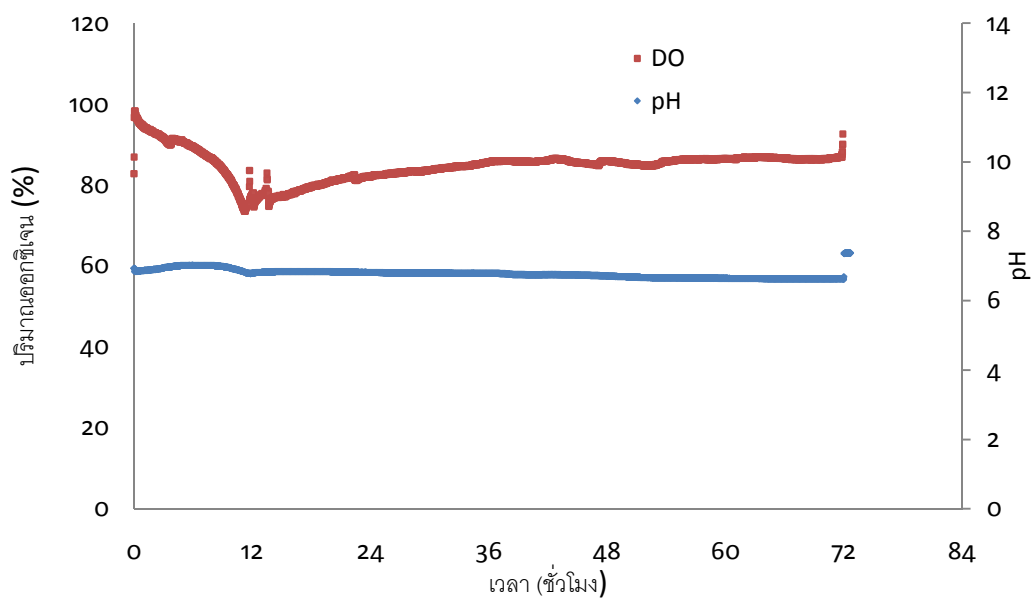
6. กราฟมาตรฐานของ PHB



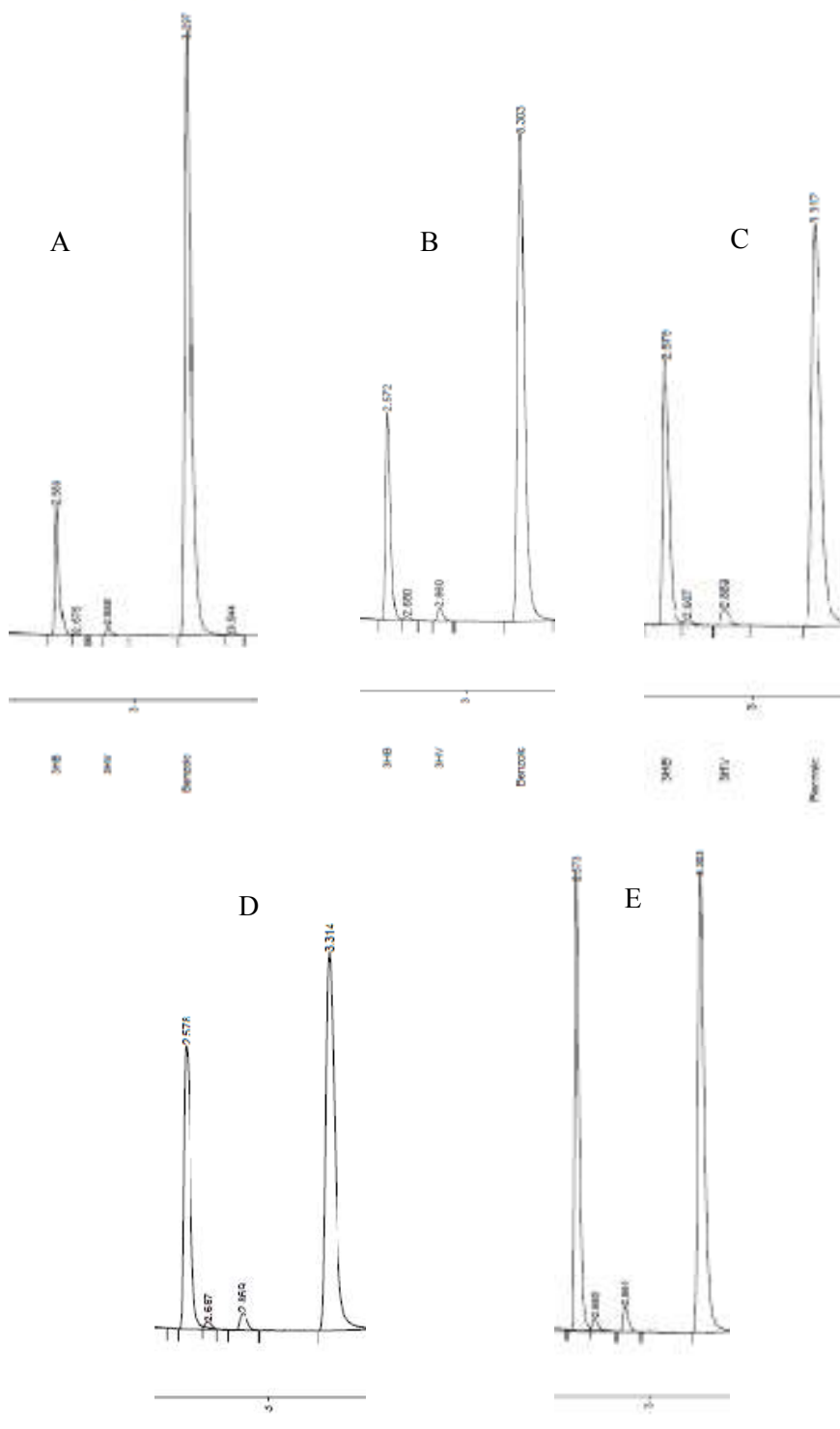
7. ผลการทดสอบคุณสมบัติด้านอุณหภูมิจของ PHB โดยเครื่อง differential scanning calorimeter



8. ปริมาณออกซิเจน และ pH ระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. lata* DSM 1123 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำเชื่อมที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 200 อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm



9. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB



รูปโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน HB ปริมาณ 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร แสดงดังรูป A B C D และ E ตามลำดับ

ประวัติผู้เขียน

นางสาวณิชาธิ์ วิสุทธิแพทย์ เกิดวันที่ 6 กันยายน พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553

ได้นำเสนอบทความเรื่อง “Optimization for Polyhydroxyalkanoates Production from Sugarcane Industry Products from *Azohydromonas lata*” ในการประชุมสัมมนาเชิงวิชาการ “The 38th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 38)” จัดโดยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 17 – 19 ตุลาคม 2555 ณ โรงแรม ดิเอมเพรส เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่