



การพัฒนากระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตในแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01

ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง

DEVELOPMENT OF POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION PROCESS

USING SOLID STATE FERMENTATION BY *BACILLUS MEGATERIUM* SWU01

แพรวสุภา เหล่าศิริ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนากระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตในแบคทีเรีย *Bacillus megaterium*

SWU01 ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION PROCESS
USING SOLID STATE FERMENTATION BY *BACILLUS MEGATERIUM* SWU01



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF EDUCATION
(Chemistry)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การพัฒนาระบบการผลิตพอลิไฮดรอกซีบีวทีเรตในแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ในกระบวนการ
หมักบนอาหารแข็ง
ของ
แพรวสุภา เหล่าศิริ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป) (ดร.เปรมฤทัย สุพรรณกุล)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ชัชฎาภรณ์ พิณทอง)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนากระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตในแบคทีเรีย <i>Bacillus megaterium</i> SWU01 ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง
ผู้วิจัย	แพรวสุภา เหล่าศิริ
ปริญญา	การศึกษามหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริขวัญ พลประทีป
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ

พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต หรือ พีเอชบี เป็นพลาสติคชีวภาพที่สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิด โดยแบคทีเรียผลิตและสะสมพีเอชบีเพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำรองให้กับเซลล์เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียด งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนากระบวนการผลิตพีเอชบีในแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ด้วยกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง โดยมีการใส่กากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกเพื่อเพิ่มผลผลิตพีเอชบี จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย พบว่าบนอาหาร Nutrient agar (NA) ที่มีกากน้ำตาลร้อยละ 2 (มวลต่อปริมาตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จานเพาะเชื้อขนาด 63.6 ตารางเซนติเมตร โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตพีเอชบีได้มากที่สุดเท่ากับ 3.83 ± 0.23 g/L และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.81 ± 0.32 g/L จากนั้นได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดพีเอชบีจากเซลล์แบคทีเรีย 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์และการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระบบอะซิโตน/เอทานอล/ไพโรฟีนคาร์บอนเนต เพื่อให้ได้ปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์ พบว่าการสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เป็นวิธีการสกัดที่ดีที่สุดซึ่งได้ปริมาณพีเอชบีมากที่สุดเท่ากับ 1.99 ± 0.27 g/L จากน้ำหนักเซลล์แห้ง 11.06 g/L และมีความบริสุทธิ์ของพีเอชเท่ากับ 90.60% จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีที่ได้มาใช้ในการขยายขนาดการผลิตพีเอชบีในอาหารแข็ง ปริมาตร 1 ลิตร และ 5 ลิตร พบว่าสามารถผลิตพีเอชบีได้ 3.27 ± 0.20 g/L และ 3.36 ± 0.22 g/L ตามลำดับ ซึ่งปริมาณพีเอชบีที่ผลิตได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตพีเอชบีซึ่งได้ในปริมาณใกล้เคียงกันเมื่อขยายขนาดการผลิต

คำสำคัญ : พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต, กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง, บาซิลลัส เมกะทีเรีย

Title	DEVELOPMENT OF POLYHYDROXYBUTYRATE PRODUCTION PROCESS USING SOLID STATE FERMENTATION BY <i>BACILLUS</i> <i>MEGATERIUM</i> SWU01
Author	PRAEWSUPA LAOSIRI
Degree	MASTER OF EDUCATION
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Assistant Professor Sirikwan Ponprateep
Co Advisor	Assistant Professor Piyada Jittangprasert

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biodegradable thermoplastic synthesized by numerous bacteria as an intracellular carbon source for energy preservation under stressful conditions. This work aimed to develop a process for PHB production by *Bacillus megaterium* SWU01 using solid state fermentation. Molasses, inexpensive carbon sources were used to increase the amount of PHB production. The study of optimization condition for bacterial culture using the nutrient agar supplemented with 2% of molasses, inoculum sizes at an OD600 of 1.0, with an incubation time of 24 hours, and the volume of the media was 20 mL/plate showed produced the highest PHB at 3.83 ± 0.23 g/L and CDW at 5.81 ± 0.32 g/L. In order to achieve a high recovery and a high purity of PHB extraction, three extraction methods such as chloroform extraction, sodium hypochlorite extraction and mixture solvent extraction were used to compare the recovery yield and product purity. The best extraction method was obtained by using sodium hypochlorite provided a high yield of PHB reached 1.99 ± 0.27 g/L from the CDW of 11.06 g/L and a maximum product purity up to 90.60%. Then, the optimization condition from the lab-scale used to expand the PHB production in solid media with volumes 1 liter and 5 liters. It was found that the PHB production reached to 3.27 ± 0.20 g/L and 3.36 ± 0.22 g/L in 1L and 5L of media, respectively. Expanding the solid-state fermentation for PHB production, the amount of PHB showed the efficiency of the PHB production process.

Keyword : Polyhydroxybutyrate, *Bacillus megaterium*, Solid state fermentation

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี ตลอดจนการให้คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ ในการวิจัย การเขียนปริญญานิพนธ์ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และการดูแลตลอดในระยะเวลาที่ทำการศึกษาและทำการวิจัยเป็นอย่างดีจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์หลัก และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา จิตรตั้ง ประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะรัตน์ ตรีบัณฑิต ที่ได้ให้ความกรุณาในการมาเป็นประธานในการสอบเค้าโครงปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวลลออ รัตนวิมานวงศ์ และอาจารย์ ดร. ชัชฎาภรณ์ พิณทอง ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการสอบในการสอบเค้าโครงปริญญานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณ ดร. เปรมฤทัย สุพรรณกุล ที่ได้ให้ความกรุณาในการมาเป็นประธานในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธิปปชัย วัฒนวิจารย์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สารเคมีเครื่องมือในการตรวจสอบคุณสมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์ ตลอดจนให้คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ ในการวิจัยอย่างยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ได้เชื้อเพื่อสถานที่ อุปกรณ์ตลอดจนสารเคมีที่ใช้ในการทำการวิจัย และขอกราบขอบพระคุณทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2561 สัญญาเลขที่ 093/2562 และโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) สำหรับการศึกษาและการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงที่ให้ความอนุเคราะห์แก่ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณนางสาวสมพร ตียะศรี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเครื่องมือวิเคราะห์ทางเคมีที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ต่อการทำการวิจัย

ขอขอบคุณนางสาววิสันต์ เชื้อวงศ์ และนางสาววัชรายา มาศแจ้ง ที่ได้ให้คำปรึกษาตลอดจนให้ความช่วยเหลือในระหว่างการทำงานวิจัยเป็นอย่างดีรวมถึงกัลยาณมิตรและพี่ๆ น้องๆ ทุกท่านที่อยู่เคียงข้างเสมอมาทั้งในยามทุกข์และสุข คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดมา

ท้ายสุดผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดามารดา ที่สนับสนุนด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจตลอด
มา และครูอาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนประสิทธิ์ประสาทความรู้ทั้งปวงแก่ผู้วิจัย

แพรวสุภา เหล่าศิริ



สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ	ฆ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความสำคัญของงานวิจัย	4
ขอบเขตของงานวิจัย	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	5
1. พลาสติกชีวภาพ	5
1.1 ความหมายของพลาสติกชีวภาพ	5
1.2 ประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้	6
1.3 ความสำคัญและสถานการณ์ของพลาสติกชีวภาพในตลาดโลก	6
2. พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate: PHA)	7
2.1 ความหมายของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต	7
2.2 โครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต	8
2.3 วัฏจักรการหมุนเวียนของคาร์บอนอินทรีย์ของพีเอชเอ	9
3. พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate: PHB)	9
3.1 ความหมายของพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต	9

3.2 คุณสมบัติทั่วไปของพีเอชบี	10
3.3 การสังเคราะห์และสะสมพีเอชบีในจุลินทรีย์	12
3.4 การประยุกต์ใช้พีเอชบีในอุตสาหกรรม	13
3.4.1 การประยุกต์ใช้ด้านอุตสาหกรรมเกษตร	13
3.4.2 การประยุกต์ใช้ด้านบรรจุภัณฑ์	13
3.4.3 การประยุกต์ใช้ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม	14
3.4.4 การประยุกต์ใช้ด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอ	14
4. แบคทีเรียที่สะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต	14
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต	14
4.2 จุลินทรีย์ที่สะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต	14
4.3 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย <i>Bacillus megaterium</i> SWU01	15
5. แหล่งคาร์บอน	17
5.1 กากน้ำตาล	17
6. เทคนิคกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง	18
6.1 ความหมายของกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง	18
6.2 ข้อดีและข้อจำกัดของกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง	18
7. เทคนิคการสกัดพีเอชบี	20
8. การวิเคราะห์คุณสมบัติของพอลิเมอร์	20
8.1 การระบุหมู่ฟังก์ชันเอกลักษณ์ของพีเอชบีด้วย Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)	20
8.2 คุณสมบัติด้านอุณหภูมิจากพอลิเมอร์	21
8.3 เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติทางอุณหภูมิจากพอลิเมอร์	22
8.3.1 Differential Scanning Calorimetry	22

8.3.2 Thermogravimetric Analysis (TGA)	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	24
1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	24
2. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	25
3. วิธีการดำเนินงาน	26
บทที่ 4 ผลการศึกษา	34
1. ตรวจสอบการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซีลิวที่เรตของแบคทีเรีย <i>Bacillus megaterium</i> SWU01 ด้วยการย้อมสี Sudan Black B	34
2. การวิเคราะห์คุณสมบัติของกากน้ำตาล	34
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีบนอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน	35
4. ศึกษาวิธีการสกัดและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพีเอชบีจากแบคทีเรีย <i>Bacillus megaterium</i> SWU01	36
5. การขยายขนาดการผลิตพีเอชบีโดยใช้สภาวะต้นแบบ	39
6. ศึกษาคุณสมบัติทางพอลิเมอร์ของพีเอชบี	39
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	45
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	45
ข้อเสนอแนะ	50
บรรณานุกรม	51
ภาคผนวก	57
ประวัติผู้เขียน	71

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 การเปรียบเทียบพลาสติกชีวภาพกับพลาสติกสังเคราะห์	7
ตาราง 2 ลักษณะโครงสร้างพีเอชเอแบบต่างๆ	8
ตาราง 3 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของพอลิโพรพิลีนและพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต	11
ตาราง 4 เปรียบเทียบกระบวนการหมักบนอาหารแข็งและกระบวนการหมักในอาหารเหลว	19
ตาราง 5 เปรียบเทียบผลการสกัดและความบริสุทธิ์ของพีเอชบีที่สกัดได้จากจากแบคทีเรีย	37
ตาราง 6 เปรียบเทียบการผลิตพีเอชบีจากแบคทีเรีย <i>Bacillus megaterium</i> SWU01	39
ตาราง 7 คุณสมบัติด้านอุณหภูมิของพีเอชบีที่สกัดได้จากการสกัดทั้ง 3 วิธี	43
ตาราง 8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการคำนวณ	61
ตาราง 9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดที่ได้จากการคำนวณ	63
ตาราง 10 ผลการ Normalization ของ PHB, Impurity และร้อยละความบริสุทธิ์จากการสกัด ...	65

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 โครงสร้างทั่วไปของพีเอชเอ	8
ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างทางเคมีและลักษณะของพีเอชบี	10
ภาพประกอบ 3 การสังเคราะห์และการย่อยสลายพีเอชบีในแบคทีเรีย	13
ภาพประกอบ 4 ทดสอบการติดสี Sudan Black B ของแบคทีเรีย <i>Bacillus megaterium</i> SWU01	15
ภาพประกอบ 5 แบคทีเรีย <i>Bacillus megaterium</i> SWU01 ที่คัดแยกได้จากกากตะกอนน้ำเสียของโรงงาน วนากระป๋อง ย้อมด้วย Nile Blue A โดยส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบแบบ bright field เรืองแสงสีส้มแดงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์ใต้กล้องจุลทรรศน์	16
ภาพประกอบ 6 ลักษณะแกรนูลของพีเอชบีภายในเซลล์แบคทีเรีย <i>Bacillus megaterium</i> SWU01 โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM) แถบแสดงขนาดของรูป 0.5 μm	16
ภาพประกอบ 7 IR spectrum ของพีเอชบี	21
ภาพประกอบ 8 การวิเคราะห์ปริมาณความร้อน และการเปลี่ยนแปลงความร้อนของพอลิเมอร์..	23
ภาพประกอบ 9 เทอร์โมแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย TGA	23
ภาพประกอบ 10 การบ่มแบคทีเรียในรูปแบบการขยายขนาดการผลิตพีเอชบี โดยหมักแบคทีเรียบนอาหารแข็งในถาดอะลูมิเนียม	29
ภาพประกอบ 11 แบคทีเรีย <i>Bacillus megaterium</i> SWU01 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (ก) และหลังจากย้อม Sudan Black B (ข)	34
ภาพประกอบ 12 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีของแบคทีเรีย	36
ภาพประกอบ 13 พีเอชบีที่ได้จากการสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ก), พีเอชบีที่ได้จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (ข) และพีเอชบีที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/ ..	38
ภาพประกอบ 14 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas chromatography ของพีเอชบี	38

ภาพประกอบ 15 FT-IR ของพีเอชบีมาตรฐานและพีเอชบีที่ได้จากการสกัดจาก 3 วิธี.....	40
ภาพประกอบ 16 เทอโมแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย TGA ของพีเอชบีที่ได้จากการสกัดจาก 3 วิธี	42
ภาพประกอบ 17 เทอโมแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย TGA ของพีเอชบีมาตรฐาน.....	42
ภาพประกอบ 18 เทอโมแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย DSC ของพีเอชบีที่ได้จากการสกัด	44
ภาพประกอบ 19 จากการวิเคราะห์ด้วย DSC ของพีเอชบีมาตรฐาน	44



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ผลิตภัณฑ์พลาสติกจากปิโตรเคมีเป็นที่นิยมนำมาใช้งานอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความทนทาน น้ำหนักเบา มีความยืดหยุ่น และคงทนต่อสภาวะต่างๆ ได้ดี สามารถนำไปใช้งานได้หลากหลายวัตถุประสงค์ตามความเหมาะสม อย่างไรก็ตาม หลังการใช้งานพลาสติกเหล่านี้กลายเป็นขยะที่ต้องใช้เวลานานมากในการย่อยสลายหรือไม่สามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ จึงทำให้ขยะเหล่านี้ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม กลายเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลกระทบต่อชุมชนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ รวมถึงเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมากในการกำจัดพลาสติกปิโตรเคมี และยังคงหลงเหลือสารเคมีที่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมมาจากกระบวนการกำจัดด้วย เช่น การกำจัดโดยการฝังกลบ ซึ่งใช้เวลานานกว่าร้อยปีกว่าพลาสติกจะมีการย่อยสลายได้หมด อีกทั้งยังหลงเหลือสารเคมีปนเปื้อนสู่ดิน หรือการกำจัดโดยการเผาทำลาย ซึ่งก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจกสู่สิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ ขยะพลาสติกที่ถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมยังส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตรวมถึงส่งผลกระทบต่อมนุษย์ด้วย จากปัญหาดังกล่าว พลาสติกชีวภาพจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีเพื่อช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้

พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic หรือ Biodegradable plastic) คือ พลาสติกสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งสามารถนำวัตถุดิบทางธรรมชาติมาผ่านการหมักทางชีวภาพมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตได้ ภายหลังจากการใช้งานสามารถย่อยสลายได้โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น แบคทีเรีย รา และสาหร่าย เป็นต้น โดยเมื่อผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพถูกฝังกลบในดิน จะถูกดูดซึมและย่อยสลายได้เนื่องจากเอนไซม์ของจุลินทรีย์ โดยสามารถย่อยสลายได้รวดเร็วเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ สารอินทรีย์ มวลชีวภาพที่สามารถปลูกหมุนเวียนและทดแทนกันได้ (ไบโอ-อีโค, 2562) พลาสติกชีวภาพมีหลายประเภท เช่น พอลิแล็กติกแอซิด พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต พอลิบิวทีลีนซัคซิเนต และพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (สุขสวัสดิ์ ศิริวิมล & วสุปฐมอารีย์, 2556)

พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (polyhydroxybutyrate, PHB) หรือ พีเอชบี เป็นพลาสติกชีวภาพที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติคล้ายพลาสติกสังเคราะห์ Polypolyene และ Polyethylene เช่น ทนความร้อนสูง มีความแข็งแรง ยืดหยุ่นและน้ำหนักเบา ไม่ละลายน้ำ ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมได้อย่างหลากหลาย (Srija D., Amrita M., Vasu S., Priya S., & Radha P., 2018) โดยพีเอชบีจัดอยู่ในกลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัล

คาโนเอต เป็นสารประเภท Hydroxy acid Polyester ซึ่งเป็นสารที่ผลิตและสะสมในแกรนูลของแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เพื่อเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนภายในเซลล์ การสะสมพีเอชบีภายในเซลล์จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ไม่สมดุล คือ มีปริมาณคาร์บอนมากเกินไปในขณะที่ไนโตรเจนและแร่ธาตุอื่นๆ มีจำกัด (Iftikhar A. & Nazia., 2018) โดยพีเอชบี สามารถผลิตจากวัตถุดิบที่ผลิตทดแทนขึ้นใหม่ได้ในธรรมชาติ (renewable resource) เช่น แป้งหรือน้ำตาลที่มาจากทรัพยากรธรรมชาติ เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง อ้อย ซึ่งพืชเหล่านี้มีแป้งหรือน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก และนอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้จากของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น กากน้ำตาล ชานอ้อยและกากกาแฟได้ด้วย (Obruca Stanislav; et al, 2014)

การสะสมพีเอชบี พบในแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Bacillus*, *Ralstonia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Aeromonas* และ *Pseudomonas* มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus megaterium* เป็นแบคทีเรียอีกสายพันธุ์หนึ่งที่สามารถผลิตพีเอชบีได้ในปริมาณมาก (Uma M. & Stella M., 2017) โดยในกระบวนการสังเคราะห์พีเอชบีในแบคทีเรียเริ่มจาก acetyl-coA เปลี่ยนเป็น acetoacetyl-CoA ด้วยเอนไซม์ β -ketothiolase จากนั้นเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase จะเปลี่ยน acetoacetyl-CoA เป็น 3-hydroxybutyryl-CoA ต่อมาเกิดการสร้างสายพอลิเมอร์เป็น Polyhydroxybutyrate ด้วยเอนไซม์ Polyhydroxybutyrate synthase ในการสังเคราะห์เป็นพีเอชบี จะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญ 3 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ β -ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase และ PHB synthase ซึ่งแบคทีเรียจะเกิดการสะสมพีเอชบีเมื่อแบคทีเรียอยู่ในสภาวะอาหารที่ไม่สมดุล ดังนั้นเมื่อต้องการให้แบคทีเรียสะสมพีเอชบีจึงต้องทำการหมักแบคทีเรียเพื่อปรับสภาวะให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปและจำกัดปริมาณแร่ธาตุอื่นๆ ให้มีปริมาณน้อย เพื่อเอื้อต่อสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบี (ศุภรัตน์ ลีศิริตันอัศว, 2561)

การหมักแบคทีเรียเพื่อสังเคราะห์พีเอชบีในแบคทีเรีย นิยมหมัก 2 รูปแบบคือ การหมักในอาหารเหลว (Submerged fermentation) และการหมักบนอาหารแข็ง (solid-state fermentation) ซึ่งในการหมักแบคทีเรียบนอาหารเหลวจะทำให้สามารถควบคุมค่าพีเอช อุณหภูมิและเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่าย แต่มีการใช้สารตั้งต้นในปริมาณมากและราคาแพง รวมถึงมีขั้นตอนการควบคุมสภาวะในการหมักค่อนข้างมาก ส่วนการหมักแบคทีเรียบนอาหารแข็ง สามารถทำการหมักได้ง่ายกว่ากระบวนการหมักในอาหารเหลว เนื่องจากต้องการพลังงานที่ใช้ในการหมักน้อยกว่าและมักต้องการเงินลงทุนต่ำ สามารถใช้สารตกค้างจากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น เปลือกถั่ว กากน้ำตาล ชานอ้อย นอกจากนี้ ความเข้มข้นของสารตั้งต้นของกระบวนการหมักบนอาหาร

แข็งจะมากกว่าความเข้มข้นในอาหารเหลว ทำให้บนอาหารแข็งได้ปริมาณเซลล์ที่มากกว่า (Sindhu R., Ashok P., & Binod P., 2015) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยพบว่า การหมักบนอาหารแข็งให้ผลผลิตฟิเคอซีที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับพอลิเมอร์ที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ แต่ก็ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติบางประการของพอลิเมอร์ชีวภาพที่สังเคราะห์ คือ มีมวลโมเลกุลสูงขึ้นและมีระดับผลึกที่ต่ำ (Fabiane C. & Oliveira A., 2006)

ในปัจจุบัน แม้ว่าพลาสติกชีวภาพจากฟิเคอซี ที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะเป็นทางเลือกที่ดีในการนำมาใช้ทดแทนปิโตรพลาสติก เพื่อสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการใช้พลาสติกปิโตรเคมี แต่การผลิตพลาสติกชีวภาพก็ยังมีข้อจำกัดอยู่มาก เช่น การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ต้องควบคุมสภาวะให้เหมาะสมเพื่อเอื้อต่อการสะสมฟิเคอซีในเซลล์ของจุลินทรีย์ และการเก็บเกี่ยวผลผลิตรวมถึงการสกัดฟิเคอซีจากเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งกระบวนการดังกล่าวต้องใช้ต้นทุนค่อนข้างสูง ทำให้อาจไม่คุ้มทุนในการผลิต ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์จากพลาสติกชีวภาพราคาสูงไปด้วย จึงไม่เหมาะสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์ เนื่องจากไม่สามารถแข่งขันทางการค้ากับพลาสติกจากปิโตรเคมีได้ การพัฒนาระบบการผลิตเพื่อลดต้นทุนจึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางในการผลิตพลาสติกชีวภาพราคาถูกลงและสามารถนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ได้จริง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสภาวะในการผลิตฟิเคอซีให้ได้ปริมาณมากโดยใช้กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง และลดต้นทุนการผลิตโดยใช้วัตถุดิบราคาถูก รวมถึงศึกษาการเก็บเกี่ยวผลผลิตฟิเคอซีจากเซลล์แบคทีเรีย โดยสกัดให้ได้ปริมาณมากและความบริสุทธิ์สูง ในงานวิจัยนี้สนใจที่จะนำกากน้ำตาล มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตฟิเคอซี เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบเหลือใช้จำนวนมากจากอุตสาหกรรม ที่ประกอบไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจำนวนมาก เช่น กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส รวมถึงวิตามินและสารอาหารอื่นๆ นอกจากนี้ในส่วนของกระบวนการสกัดฟิเคอซี คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาวิธีการสกัดที่ทำให้ได้ปริมาณฟิเคอซีจากเซลล์แบคทีเรีย โดยศึกษาวิธีการสกัด 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม การสกัดด้วยไฮเดียมไฮโปคลอไรต์ และการสกัดด้วยตัวทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพพิลีนคาร์บอนเตต โดยเปรียบเทียบวิธีที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์สูง เพื่อพัฒนาระบบการผลิตฟิเคอซีในแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ให้สามารถผลิตฟิเคอซีได้ในปริมาณมาก

ความสำคัญของงานวิจัย

ทราบกระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีลิวที่เรดโดยแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 บนอาหารแข็งให้ได้ปริมาณมากและทราบวิธีการสกัดพีเอชบีที่เหมาะสมซึ่งมีความบริสุทธิ์สูง

ขอบเขตของงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบและพัฒนากระบวนการหมักเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 บนอาหารแข็งโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและทำการสกัดพีเอชบีให้ได้ปริมาณมากและความบริสุทธิ์สูง โดยขอบเขตงานวิจัยแบ่งออกเป็นหัวข้อดังนี้

1. หมักแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ด้วยกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation)
2. ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพีเอชบี ในขั้นตอนการหมักแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01
3. หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพลาสติคชีวภาพ ตัวแปรที่ศึกษาคือ
 - 3.1 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียที่เริ่มต้น ได้แก่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 1.75 และ 2.00
 - 3.2 ความเข้มข้นของกากน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 4 และ 6 โดยมวลต่อปริมาตร
 - 3.3 ระยะเวลาในการผลิตพีเอชบี ได้แก่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง
 - 3.4 ปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ 15.00, 17.50, 20.00, 22.50, 25.00 mL/plate
4. นำสภาวะต้นแบบมาใช้ในการผลิตพีเอชบีปริมาณมาก ได้แก่ 1 ลิตร และ 5 ลิตร
5. เปรียบเทียบวิธีสกัดพีเอชบี 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม การสกัดด้วยไฮโดรโปคลอไรต์ และการสกัดด้วยตัวทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/ไพโรพิลีนคาร์บอนเนต
6. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพีเอชบีที่ได้จากการสกัด ด้วยเทคนิค Gas chromatography
7. ตรวจสอบคุณสมบัติทางโครงสร้างจากหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)
8. ตรวจสอบคุณสมบัติความร้อนของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ด้วยเทคนิค Thermogravimetric Analysis (TGA) และ Differential Scanning Calorimetry (DSC)

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

งานวิจัยนี้เป็นกระบวนการผลิตพีเอชบีในแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 บนอาหารแข็งให้ได้ปริมาณมาก และมีความบริสุทธิ์สูง โดยคณะผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. พลาสติคชีวภาพ
2. พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate: PHA)
3. พอลิไฮดรอกซีลิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate: PHB)
4. แบคทีเรียที่สะสมพอลิไฮดรอกซีลิวทีเรต
5. แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย
6. กระบวนการหมักแบบที่เรียบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation)
7. เทคนิคการสกัดพอลิไฮดรอกซีลิวทีเรต
8. เทคนิคการวิเคราะห์คุณสมบัติด้านคุณสมบัติของพอลิเมอร์

1. พลาสติคชีวภาพ

1.1 ความหมายของพลาสติคชีวภาพ

พลาสติคชีวภาพ (Bioplastic) คือ พลาสติคที่สามารถย่อยสลายได้ (Biodegradable plastics) ชนิดหนึ่ง ด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เมื่อพลาสติคชีวภาพอยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่กำหนดไว้เฉพาะ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีและสูญเสียสมบัติบางประการ เมื่อถูกสลายหมดจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นมวลชีวภาพ น้ำ ก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Indira M., Abraham K., Venkates W., John B., & Vidya K., 2014) ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิตของพืชได้ จึงไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังสามารถนำวัตถุดิบทางธรรมชาติ เช่น ข้าวโพด อ้อย มันสำปะหลัง มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติคชีวภาพได้ ดังนั้น พลาสติคชีวภาพจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการแก้ไขปัญหาพลาสติคได้อย่างยั่งยืน (อนุพันธ์ ยังปรีดา, 2558) เนื่องจากมีสมบัติเช่นเดียวกับพลาสติคปิโตรเคมีทั่วไป แต่สามารถย่อยสลายได้รวดเร็วเพียงพอที่จะไม่สะสมในสิ่งแวดล้อมและในการย่อยสลายไม่ทิ้งสารตกค้างที่เป็นอันตรายสู่สิ่งแวดล้อม

1.2 ประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้

ประเภทของพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้โดยทั่วไป สามารถแบ่งกลไกการย่อยสลายของพลาสติกเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ คือ (วันกุล ชนะลิทธิ, 2553)

1.2.1 การย่อยสลายได้โดยแสง (Photodegradation) เป็นการเติมสารประเภท Photoactivate เช่น เหล็ก ทองแดง ลงในพลาสติกหรือการสังเคราะห์จากหมู่ฟังก์ชันหรือพันธะเคมีที่แตกหักง่ายภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต แต่พลาสติกประเภทนี้จะไม่เกิดการย่อยสลายเมื่อไม่มีแสงหรือมีการใช้หมึกเคลือบบนผลิตภัณฑ์เนื่องจากทำให้พลาสติกไม่เกิดการสัมผัสรังสีอัลตราไวโอเล็ตโดยตรง

1.2.2 การย่อยสลายทางกล (Mechanical Degradation) เป็นวิธีการที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการทำให้พลาสติกแตกเป็นชิ้นเล็กๆ โดยการให้แรงกระทำแก่พลาสติก ทำให้ชิ้นส่วนพลาสติกแตกออกเป็นชิ้นๆ

1.2.3 การย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation Degradation) เป็นวิธีที่มีการเติมออกซิเจนลงในโมเลกุลพอลิเมอร์ โดยพลาสติกสัมผัสกับอากาศและเกิดการสลายตัวได้เองตามธรรมชาติอย่างช้าๆ ทำให้สายพอลิเมอร์เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกล

1.2.4 การย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis Degradation) เป็นวิธีการย่อยสลายของสายพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชัน Ester หรือ Amide เป็นองค์ประกอบก่อให้เกิดการแตกหักของสายโซ่พอลิเมอร์

1.2.5 การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) เป็นการย่อยสลายของสายพอลิเมอร์ที่สามารถเกิดได้เองตามธรรมชาติโดยอาศัยกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์ ซึ่งเมื่อพลาสติกกลุ่มนี้ใช้งานแล้ว และนำไปฝังกลบในดิน จะเกิดการย่อยสลายจนหมดไม่มีการปลดปล่อยสารพิษสิ่งแวดล้อม

1.3 ความสำคัญและสถานการณ์ของพลาสติกชีวภาพในตลาดโลก

การลงทุนผลิตพลาสติกชีวภาพยังไม่ค่อยแพร่หลายมากนัก พบในเฉพาะตลาดบางกลุ่มเท่านั้น เนื่องจากการผลิตไบโอพลาสติกคุณภาพดีมีต้นทุนการผลิตที่สูง แต่เนื่องจากปัญหาสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลกระทบต่อชุมชนแรงขึ้นเรื่อยๆ เพื่อสร้างความตระหนักในปัญหาสิ่งแวดล้อมและช่วยลดปัญหาการกำจัดขยะพลาสติก ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเป็นที่น่าสนใจมากขึ้น พลาสติกชีวภาพเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ช่วยลดปัญหานี้ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายได้ง่ายและสามารถผลิตได้จากทรัพยากรที่นำมาหมุนเวียนได้ ทำให้พลาสติกชีวภาพ มีคุณสมบัติบางประการที่สามารถนำมาใช้ทดแทนปิโตรพลาสติกได้ จากตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบของพลาสติกชีวภาพกับพลาสติกสังเคราะห์ (สถาบันพลาสติก, 2554)

ตาราง 1 การเปรียบเทียบพลาสติกชีวภาพกับพลาสติกสังเคราะห์

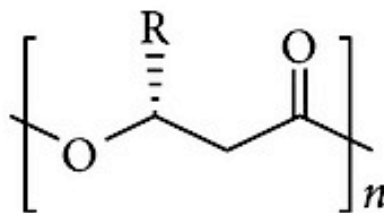
	พลาสติกธรรมดา (Conventional Plastic)	พลาสติกชีวภาพ (Biodegradable Plastic)
วัตถุดิบ	ปิโตรเลียม (Non-renewable resource) ไม่สามารถทดแทนได้	ปิโตรเลียม (Renewable resource) สามารถหาทดแทนได้
ตัวอย่างเม็ดพลาสติก	Polypropylene (PP), Polycarbonate (PC), Polyvinylchloride (PVC)	Polylactic acid (PLA) Polybutylene succinate (PBS) Polyhydroxalcanoate (PHA)
ราคาเฉลี่ยต่อกิโลกรัม	40 บาท	60-130 บาท
ระยะเวลาการย่อยสลาย ในธรรมชาติ	ใช้เวลาย่อยสลายโดยเฉลี่ย 200 ปี หรือไม่สามารถย่อยสลายได้	ใช้เวลาย่อยสลายโดยเฉลี่ย 2 เดือน ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม และอุณหภูมิ
การนำกลับมารีไซเคิล	สามารถรีไซเคิลได้ แต่ต้องมีการคัดแยกที่ดี	สามารถรีไซเคิลได้เฉพาะชนิดที่ มีโครงสร้างพอลิเมอร์เหมือนกับ พลาสติกทั่วไป และต้องมีการคัดแยกที่ดี

ที่มา: สถาบันพลาสติก (2554)

2. พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxalcanoate: PHA)

2.1 ความหมายของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต หรือ พีเอชเอ คือ พอลิเมอร์ชีวภาพตามธรรมชาติที่สามารถสังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม Aliphatic polyester พีเอชเอแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการรวมตัวกันของหน่วยย่อยมอนอเมอร์ที่มีหมู่แทนที่ต่างกัน โดยโครงสร้างทั่วไปของพีเอชเอแสดงในภาพประกอบที่ 1



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างทั่วไปของพีเอชเอ

ที่มา : Stanislav O., Sinisa P., Pavla B., and Zdenek S. (2014)

2.2 โครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต

กลุ่มของพีเอชเอจะแตกต่างกันตามลักษณะของหมู่แทนที่คือ poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) ซึ่งมีหมู่เมทิล ($-\text{CH}_3$) เป็นหมู่แทนที่ เช่น นอกจากนี้พบว่ามีสารประกอบของพีเอชเอมากกว่า 80 ชนิด ซึ่งทำให้โครงสร้างและคุณสมบัติทางกายภาพเคมีของพีเอชเอแตกต่างกันออกไป เช่น พีเอชบีมีสมบัติคล้ายกับพอลิโพรพิลีน ส่วน (3-hydroxyvalerate) หรือ PHV มีหมู่เอทิลเป็นแทนที่ ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$) ทำให้ PHV สามารถยืดหยุ่นมากขึ้นและมีความเป็นผลึกน้อยกว่า PHB ตัวอย่างลักษณะโครงสร้างของพีเอชเอแบบต่างๆ แสดงในตาราง

ตาราง 2 ลักษณะโครงสร้างพีเอชเอแบบต่างๆ

หมู่แทนที่	พอลิเมอร์	ตัวย่อ
ไฮโดรเจน	พอลิ(3-ไฮดรอกซีโพรพิเนต)	PHP
เมทิล ($-\text{CH}_3$)	พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต)	PHB
เอทิล ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$)	พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	PHV
โพรพิล ($-(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$)	พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซานเอต)	PHex
เพนทิล ($-(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$)	พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกทานเอต)	PHO
เฮปทิล ($-(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$)	พอลิ(3-ไฮดรอกซีเดคาโนเอต)	PHD

ที่มา: Ross G., Ross S., and Brian J. Tighe (2017)

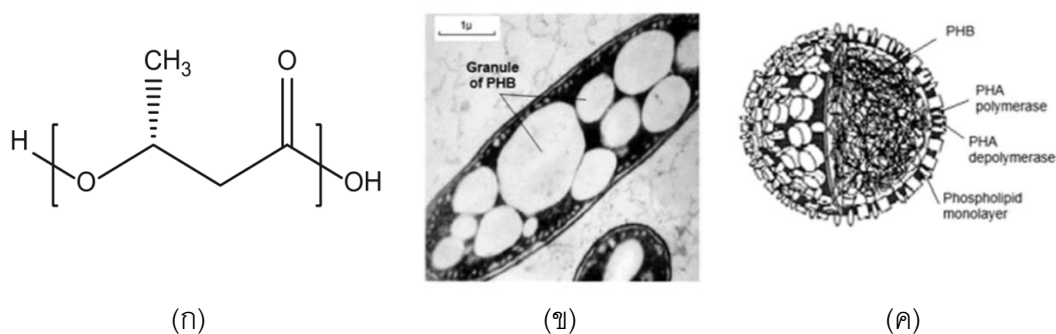
2.3 วงจรการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของพีเอชเอ

การผลิตพีเอชเอจากแบคทีเรีย เริ่มจากกระบวนการหมักแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้แบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่เอื้อต่อการสะสมพีเอชเอภายในเซลล์ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่มีการนำเอาทรัพยากรที่ผลิตทดแทนใหม่ได้ (Renewable resource) เช่น แป้ง ข้าวโพด มันสำปะหลัง หรือวัตถุดิบทางการเกษตรมาให้เป็นแหล่งคาร์บอนภายในเซลล์ (Ashok P., 2008) แบคทีเรียจะสร้างและสะสมพีเอชเอในแกรนูลผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ เมื่อทำการสกัดเอาพีเอชเอออกจากเซลล์เพื่อนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพต่างๆ ภายหลังจากที่พลาสติกเหล่านี้ถูกใช้งานแล้วถูกนำไปกำจัดโดยการฝังกลบในดินจะเกิดการย่อยสลายทางชีวภาพโดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินได้เป็นสารประกอบอินทรีย์ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Lee W., Loo C., Nomura C., & Sudesh K., 2018) ได้เป็นปุ๋ยที่อุดมไปด้วยสารอินทรีย์แก่ดินและช่วยเพิ่มปริมาณน้ำเพื่อรักษาสารอาหารในดิน ทำให้พืชได้สารอาหารในดินและสามารถนำผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายพีเอชเอไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชเพื่อการเจริญเติบโตต่อไป จากนั้นจึงสามารถนำวัตถุดิบจากการเกษตรเหล่านี้มาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักแบคทีเรียเพื่อผลิตพีเอชเอต่อไปอย่างเป็นวัฏจักรต่อเนื่อง

3. พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate: PHB)

3.1 ความหมายของพอลิไฮดรอกซีบิวเตต

พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต หรือพีเอชบี เป็นพอลิเมอร์อนุพันธ์ของพีเอชเอชนิดที่พบมากที่สุดโดยมีหมู่เมทิลเป็นหมู่แทนที่ในโครงสร้างทั่วไปของพีเอชเอ (ภาพประกอบ 2) พีเอชบีจัดเป็น Polyester สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ เกิดจากการสะสมสารประกอบคาร์บอนในกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียหลายชนิด พีเอชบีที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นก้อนกลมๆ คล้ายไข่ม้วน ลอยอยู่ในพลาสมาของเซลล์ที่สะสมอยู่ในแกรนูล พีเอชบีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางจาก 0.2-0.5 ไมครอนเมตร ดังแสดงในภาพประกอบ 2 ซึ่งแบคทีเรียใช้เป็นแหล่งพลังงานภายในเซลล์ เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่ไม่ละลายน้ำ ย่อยสลายได้สมบูรณ์ มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี เช่น โพลีเอทิลีน และโพลีโพรพิลีน



ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างทางเคมีและลักษณะของพีเอชบี
 โครงสร้างทางเคมีของพีเอชบี (ก) ลักษณะแกรนูลของ PHB ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย (ข)
 และโครงสร้างแกรนูลของ PHB (ค)

ที่มา: Jayven C., Joseph K., Warintorn T., Zibiao L., and Chaobin H. (2018);
 Santos A., Valentina L., Schulz A., Adriana M., and Tomaz D. (2017)

3.2 คุณสมบัติทั่วไปของพีเอชบี

1. ไม่ละลายน้ำ ทำให้พีเอชบีต่างจากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ หรือไวต่อความชื้น
 2. ทนต่อรังสี UV แต่ไม่สามารถทนต่อปฏิกิริยากรดเบสได้
 3. ละลายได้ในคลอโรฟอร์มและสารประกอบคลอรีนไฮโดรคาร์บอน
 4. สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (Biocompatible)
 5. มีจุดหลอมเหลว 175 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิทรานซิชัน 15 องศาเซลเซียส และมีความทนแรงดึง 15 เมกะปาสคาล (MPa)
 6. พีเอชบี จมน้ำทำให้เกิดการย่อยสลายโดยไม่ใช้อากาศและไม่มีความเป็นพิษ
- นอกจากคุณสมบัติทั่วไปที่กล่าวข้างต้นคุณสมบัติทางเคมีอื่นๆ ของพีเอชบีเปรียบเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของพอลิโพรพิลีนและพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต

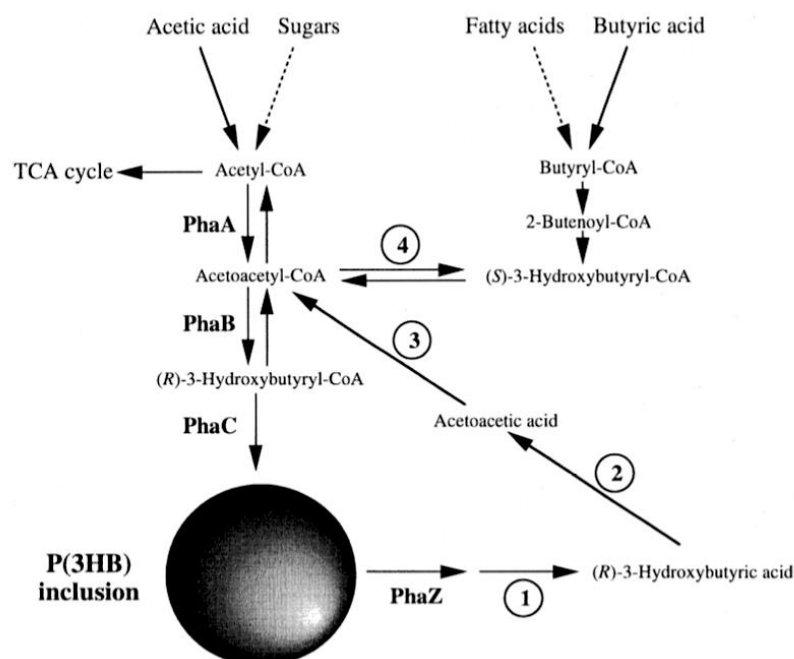
พารามิเตอร์	พอลิโพรพิลีน	พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต
อุณหภูมิหลอมเหลว ($^{\circ}\text{C}$) (Melting point Temperature, T_m)	171-186	171-182
อุณหภูมิเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว ($^{\circ}\text{C}$) (Glass Transition Temperature, T_g)	-15	5-10
ความเป็นผลึกของพอลิเมอร์ (%) (%Crystallinity)	65-70	65-80
ความหนาแน่น (g/cm^3) (Density)	0.905-0.94	1.23-1.25
น้ำหนักโมเลกุล ($\times 10^{-5}$) (Molecular weight, Mw)	2.2-7	1-8
การกระจายตัวน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight distribution)	5-12	2.2-3
ความแข็ง (GPa) (Flexural modulus)	1.7	3.5-4
ความสามารถในการขยายตัว (%) (Extension to break)	400	6-8
ความสามารถในการทนต่อแสงแดด (UV resistance)	ไม่ดี	ดี
ความสามารถในการทนต่อตัวทำละลาย (Solvent resistance)	ดี	ไม่ดี
การซึมผ่านออกซิเจน ($\text{cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ atm}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (Oxygen permeability)	1700	45

ที่มา: ชนะสิทธิ์ (2553); ถนนแก้ว (2553)

3.3 การสังเคราะห์และสะสมพืเอชบีในจุลินทรีย์

พืเอชบีสามารถสะสมได้ตามธรรมชาติ โดยมีการสังเคราะห์และสะสมในแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมบวก และแกรมลบ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สะสมไว้ในแกรนูลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน และ พลังงานเมื่อสารอาหารไม่สมดุล ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งพลาสติกที่ผลิตจากพืเอชบีภายหลังการใช้งานจะมีการย่อยสลายได้โดยกระบวนการทำงานของแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติได้ โดยมีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตและสะสมพืเอชบีได้ในปริมาณมาก เช่น *Ralstonia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Aeromonas* และ *Pseudomonas*

การสังเคราะห์พืเอชบีในแบคทีเรีย เริ่มจากแหล่งคาร์บอนจะถูกกลายสภาพเป็น acetyl-coA และเปลี่ยนต่อไปเป็น acetoacetyl-coA ด้วยเอนไซม์ β -ketothiolase จากนั้นเอนไซม์ acetoacetyl-coA reductase จะเปลี่ยน acetoacetyl-coA เป็น 3-hydroxybutyryl-coA ต่อมาเกิดการสร้างสายโพลิเมอร์ (polymerization) เป็นพืเอชบี ด้วยเอนไซม์ polyhydroxybutyrate synthase ดังแสดงในภาพประกอบ 3 การสังเคราะห์พืเอชบี ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญ 3 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ β -ketothiolase enzyme ทำหน้าที่เปลี่ยน acetyl-coA ให้เป็น acetoacetyl-coA จากนั้น acetoacetyl-CoA reductase จะเปลี่ยน acetoacetyl-coA ให้เป็น 3-hydroxybutyryl-coA และ PHB synthase จะเร่งปฏิกิริยาในการเกิดพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของโมเลกุลหนึ่งไปยังปลายคาร์บอนิล (-CO-) ของอีกโมเลกุลหนึ่ง ทำให้เกิดการสร้างสายพอลิเมอร์ของพืเอชบี ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดถูกควบคุมด้วยยีน 3-ketothiolase (PhaA), acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) และ PHB synthase (PhaC) โดยยีน PhaC ควบคุมการสร้างเอนไซม์ PHB synthase ยีน PhaB ควบคุมการสร้างเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase และ PhaA ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β -ketothiolase (Verliden R., Hill D., Kenward M., Williams C., & Radecka I., 2007)



ภาพประกอบ 3 การสังเคราะห์และการย่อยสลายพีเอชบีในแบคทีเรีย

ที่มา: Sudesh K. and Doi H. (2000)

3.4 การประยุกต์ใช้พีเอชบีในอุตสาหกรรม

พีเอชบีมี เป็นพลาสติกชีวภาพที่ไม่ละลายน้ำ ทนต่อรังสีอัลตราไวโอเลต สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (Biocompatible) ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้มีการนำเอาพีเอชบีมาประยุกต์ใช้งานในระดับอุตสาหกรรมหลากหลายด้าน

3.4.1 การประยุกต์ใช้ด้านอุตสาหกรรมเกษตร

แปรรูปเป็นภาชนะสำหรับปลูกพืช ถุงเพาะชำกล้าไม้ วัสดุห่อหุ้มผลผลิต ยากำจัดวัชพืชหรือปุ๋ยตามช่วงเวลาที่กำหนด (ถนนแก้ว, 2553)

3.4.2 การประยุกต์ใช้ด้านบรรจุภัณฑ์

ในด้านอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ พีเอชบีเป็นที่นิยมอย่างมากในอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกปิโตรเคมี เนื่องจากบรรจุภัณฑ์พลาสติกไม่นิยมนำกลับมารีไซเคิลหรือมีการใช้งานครั้งเดียวเป็นส่วนใหญ่ จึงมีการนำพีเอชบีมาผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์หลากหลายรูปแบบ เช่น ขวดน้ำ ถุงพลาสติก กล่องโฟมฟิล์มห่ออาหาร พลาสติกเคลือบภาชนะกระดาษ ถาด ช้อน (Bucci D. , Tavares L., & Sell I., 2007)

3.4.3 การประยุกต์ใช้ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

ในด้านอุตสาหกรรมทางการแพทย์ สามารถนำฟิเอชบีมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุชีวการแพทย์เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดสารอันตรายแก่ร่างกายและช่วยลดอัตราการนำเข้าวัตถุดิบจากต่างประเทศ เช่น ไหมเย็บแผล วัสดุปิดแผล วัสดุสำหรับพาหรือปล่อยยา ซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้ (Jayven C. et al., 2018)

3.4.4 การประยุกต์ใช้ด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอ

ปัจจุบันมีการพัฒนาเส้นใยจากพลาสติกชีวภาพเพื่อใช้ทดแทนการใช้ไหมหรือเส้นใยราคาแพง เช่น เลื้อผ้า เครื่องนุ่งห่ม ผ้าอ้อมสำเร็จรูป เส้นใยสำหรับบรรจุในเครื่องนอน นอกจากนี้ยังมีการนำฟิเอชบีเติมลงไป在线ใยเพื่อให้สมบัติในการรับความร้อนและคายความร้อนของเส้นใยช้าลงและเพิ่มความแข็งแรงให้กับเส้นใย (ถนนแก้ว, 2553)

4. แบคทีเรียที่สะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต

ในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีการสะสมฟิเอชบีภายในเซลล์เบื้องต้นใช้กลุ่มสีย้อม lipophilic dyes ย้อมเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างจุลินทรีย์ที่มีการสะสม และไม่สะสมฟิเอชบี โดยใช้ Sudan Black B จะย้อมติดสีกลุ่มกรดไขมัน และ ลิพโพรตีนบางชนิด (lipoproteins) ดังนั้นการย้อมฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) ด้วย Sudan Black B จึงเป็นแนวทางที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียที่มีการสะสมฟิเอชบีในเบื้องต้น แต่การย้อมด้วย Nile Blue A มีความจำเพาะเจาะจงมากกว่า Sudan Black B โดยแกรนูลที่มีการสะสมฟิเอชบีจะถูกกระตุ้นด้วยแสงที่ OD₄₆₀ และเรืองแสงสีส้มเมื่อสังเกตได้กล้องจุลทรรศน์ ความเข้มข้นของแสงจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟิเอชบีในแกรนูล (Srija D. et al., 2018)

4.2 จุลินทรีย์ที่สะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต

ในธรรมชาติมีพืช รา และแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตได้ แต่กลุ่มที่สังเคราะห์ฟิเอชบีได้ในปริมาณมากคือแบคทีเรียหลายสายพันธุ์สามารถผลิตและสะสมฟิเอชบีได้ แต่อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่สามารถผลิตฟิเอชบีได้ในปริมาณมาก มีเพียงไม่กี่สายพันธุ์เท่านั้น เช่น *Azohydromonas lata*, *Bacillus cereus*, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas oleovorans* เป็นต้น ซึ่งสายพันธุ์ของแบคทีเรียมีผลต่อกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการสังเคราะห์ โดยพบว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันกับแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ในการผลิตฟิเอชบี มีผลทำให้พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มีปริมาณและองค์ประกอบที่แตกต่างกันไปด้วย

นอกจากนี้สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดฟิโชนีออกจากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ก็มีความแตกต่างกันตามลักษณะพื้นฐานวิทยาของแต่ละสายพันธุ์นั้นๆ (Lee W. et al., 2018)

4.3 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01

Bacillus megaterium SWU01 เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก พบในตะกอนน้ำเสียโรงงานท่อน้ำประปอง จังหวัดสมุทรสาคร จากผลการทดลองนี้พบว่าการคัดแยกแบคทีเรียที่มีการสะสมฟิโชนี พบว่า เมื่อทำการย้อมสีแบคทีเรียด้วย Sudan Black B แบคทีเรียที่มีการสะสมฟิโชนีภายในเซลล์จะติดสีดำของ Sudan Black B โคโลนีของแบคทีเรียที่ได้รับการตรวจสอบการสะสมฟิโชนีโดยการย้อมด้วย Sudan Black B แล้วโคโลนีติดสีดำ แสดงว่ามีการสะสมฟิโชนีภายในเซลล์ (วิสันต์ เชื้อวงศ์ et al., 2561)

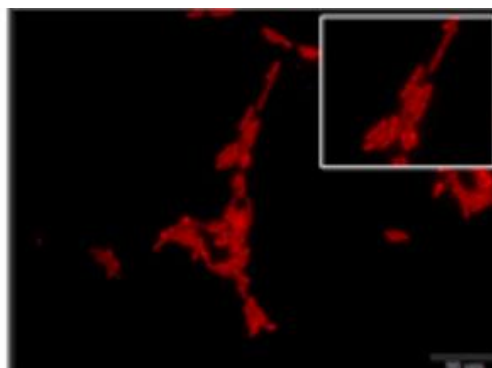


ภาพประกอบ 4 ทดสอบการติดสี Sudan Black B ของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ที่คัดแยกได้จากกากตะกอนน้ำเสียของโรงงานท่อน้ำประปองที่เจริญบนอาหารแข็ง NA (ก) และโคโลนีของแบคทีเรียที่ติดสีดำของ Sudan Black B (ข)

ที่มา: วิสันต์ เชื้อวงศ์ et al. (2561)

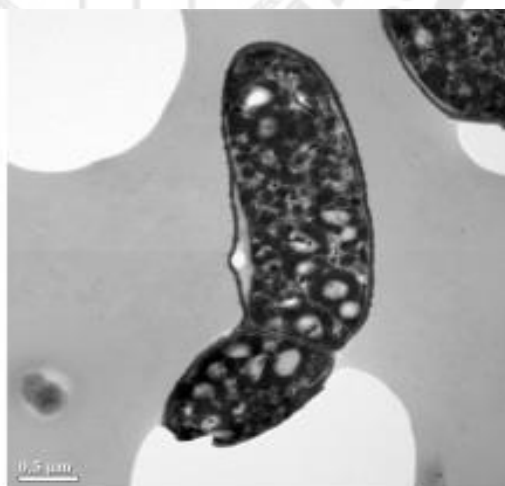
เนื่องจากส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ในโมเลกุลของ Sudan Black B จะติดสีดำกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำทั้งหมดภายในเซลล์ของแบคทีเรียรวมทั้งฟิโชนี ดังนั้นเพื่อยืนยันการสะสมฟิโชนีภายในเซลล์ แบคทีเรียที่ย้อมติดสีดำของ Sudan Black B จะนำมาย้อมอีกครั้งด้วยสี Nile Blue A ซึ่งมีความจำเพาะต่อแกรนูลฟิโชนีมากกว่า Sudan Black B โดย Nile Blue A พบว่า มีการเรืองแสงสีส้มแดงของ Nile Blue A จึงสามารถยืนยันได้ว่าแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 มีการสะสมฟิโชนี ดังแสดงในภาพประกอบที่ 7 จากการศึกษาการผลิตฟิโชนีจาก

แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตพีเอชบีได้ 2.01 g/L



ภาพประกอบ 5 แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ที่คัดแยกได้จากกากตะกอนน้ำเสียของโรงงาน ทุนำกระป๋อง ย้อมด้วย Nile Blue A โดยส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบแบบ bright field เรืองแสงสีส้มแดงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ได้กล้องจุลทรรศน์

ที่มา: วิสันต์ เชื้อวงศ์ et al. (2561)



ภาพประกอบ 6 ลักษณะแกรนูลของพีเอชบีภายในเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM) แถบแสดงขนาดของรูป 0.5 μm

ที่มา: วิสันต์ เชื้อวงศ์ et al. (2561)

5. แหล่งคาร์บอน

คาร์บอน เป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ สำหรับสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งแหล่งคาร์บอนที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต PHB จะเป็นกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ กลูโคส, ซูโครส และ ฟรุคโตส เนื่องจากปัจจุบันการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพยังมีต้นทุนสูงมากในการผลิตเมื่อเทียบกับการผลิตพลาสติกปิโตรเคมี จึงทำให้พลาสติกชีวภาพยังไม่เป็นที่นิยมนำมาใช้อย่างแพร่หลาย ดังนั้น แนวทางการแก้ปัญหาดังกล่าวคือ การลดต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพให้ต่ำลง เช่น หาสารตั้งต้นชนิดใหม่เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก ซึ่งของเสียหรือวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมหลายประเภท สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ตัวอย่างแหล่งคาร์บอนที่เป็นของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น เวียพอมิเอท คือ ส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้จากการกรองอัลตราฟิลเตรชันเพิ่มความเข้มข้นของเวียโปรตีน ซึ่งจะมีสารโมเลกุลเล็กที่สามารถผ่านเยื่อกรองอัลตราฟิลเตรชันได้ เช่น แลคโทสและแร่ธาตุต่างๆ เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเวียพอมิเอทมีปริมาณแลคโทสมาก สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการใช้เป็นหมักจุลินทรีย์ได้ (Srija D. et al., 2018) กากกาแฟ ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับแบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตพีเอชบีได้เช่นกัน เนื่องจากน้ำมันสกัดจากกากกาแฟประกอบไปด้วยกรดไขมันอิสระหลายชนิด ทำให้แบคทีเรียสามารถดูดซึมและใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยตรง ทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตและสะสมพีเอชบีได้มาก (Stanislav O. et al., 2014)

5.1 กากน้ำตาล

น้ำตาลเป็นผลพลอยได้ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลทราย จึงมีราคาถูก ซึ่งกากน้ำตาลมีลักษณะเป็นของเหลวที่มีลักษณะหนืดข้น สีดำอมน้ำตาล มีความเข้มข้นสูง โดยการผลิตน้ำตาลทราย 1 ตัน จะใช้น้ำอ้อยดิบ 10 ตัน และเกิดผลพลอยได้ของกากน้ำตาล ประมาณ 50 กิโลกรัม โดยในกากน้ำตาลมีองค์ประกอบที่สามารถนำไปประโยชน์มากมาย เช่น มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 50-60% อีกทั้งแร่ธาตุต่างๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตต่อพืชและสัตว์ ดังนั้นกากน้ำตาลจึงนิยมนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ เนื่องจากกากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่เหมาะสมและราคาไม่แพง และยังสามารถใช้เป็นปุ๋ยให้กับพืชได้ เนื่องจากในกากน้ำตาลมีไนโตรเจน(N), ฟอสฟอรัส(P) และโพแทสเซียม(K) ซึ่งเป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับพืช (Songsri K., Atipol B., Bunyarit M., & Nuttha T., 2009) นอกจากนี้กากน้ำตาลยังใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการหมักหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ สุรา กรดแลกติก ผงชูรส ยีสต์ขนมปัง และยีสต์อาหารสัตว์ (Puechkaset, 2017) เนื่องจากกากน้ำตาลมีราคาถูกและเหมาะสมกว่าเมื่อเทียบกับวัตถุดิบชนิดอื่น ดังนั้นงานวิจัยนี้ มีความสนใจที่จะใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตพีเอชบี เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นที่มีปริมาณ

คาร์บอนจากน้ำตาลรีดิวซ์และแร่ธาตุที่จำเป็นอื่นๆ ที่ช่วยในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและทำให้แบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่สามารถผลิตฟิเคซิปได้

6. เทคนิคกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

6.1 ความหมายของกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (Solid state fermentation: SSF) หมายถึง วิธีการหมักที่เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตบนอาหารแข็งที่ไม่ได้อยู่ในสภาพแขวนลอยในอาหารเหลว โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของแข็งจะปราศจากน้ำอิสระ แต่น้ำจะอยู่ในรูปของความชื้นที่ถูกดูดซับไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อรองรับการเจริญเติบโตและการเผาผลาญของเชื้อจุลินทรีย์ (ชนสุริยพันธุ์, 2545) โดยทั่วไปมีการใช้กระบวนการหมักบนอาหารแข็งอยู่ 2 แบบ (Sindhu R. et al., 2011) คือ

- 1) เกิดขึ้นในวัตถุดิบเฉื่อย คือ วัตถุดิบที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งที่อยู่ให้กับจุลินทรีย์ยึดเกาะเท่านั้นโดยไม่มีแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เช่น มูลสัตว์ กากตะกอน
- 2) เกิดขึ้นภายในวัตถุดิบที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งที่อยู่ให้กับจุลินทรีย์และเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วย เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ลงไปจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตเฉพาะบนผิวหน้าของวัตถุดิบ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar

6.2 ข้อดีและข้อจำกัดของกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง เป็นกระบวนการที่ต้องการเงินลงทุนต่ำเมื่อเทียบกับกระบวนการหมักบนอาหารเหลว เนื่องจาก สามารถใช้สารตกค้างหรือส่วนที่เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น เปลือกถั่ว กากน้ำตาล ชานอ้อย และใช้พลังงานในการหมักน้อยกว่า มีการปลดปล่อยของเสียสู่สิ่งแวดล้อมน้อยกว่า นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยกำจัดของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตรได้อีกด้วย ทำให้กระบวนการหมักบนอาหารแข็งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Ashok P., 2008) นอกจากนี้ ความเข้มข้นของสารตั้งต้นในกระบวนการหมักบนอาหารแข็งจะมากกว่าความเข้มข้นในอาหารเหลว ทำให้บนอาหารแข็งได้ปริมาณเซลล์ที่มากกว่า และเนื่องจากความชื้นที่มีอย่างจำกัดในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง ดังนั้น การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นจึงเป็นไปได้ยาก (Sindhu R. et al., 2015) อย่างไรก็ตาม การหมักบนอาหารแข็งยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น มีการใช้พื้นที่ในการหมักมากกว่าอาหารเหลว มีความยากลำบากในการดึงเซลล์แบคทีเรียจากพื้นผิวที่เป็นของแข็งหลังจากการหมัก นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยพบว่า การหมักบนอาหารแข็งให้ผลผลิตฟิเคซิปที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับพอลิเมอร์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม แต่ยังส่งผลต่อคุณสมบัติบางประการของฟิเคซิป คือ มวลโมเลกุลสูงขึ้นและมีระดับผลึกที่ต่ำ (Fabiane C. & Oliveira A., 2006) อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักบนอาหารแข็งมีข้อได้เปรียบมากกว่า

กระบวนการหมักในอาหารเหลว เช่น ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้มากกว่า มีความต้องการน้ำน้อยกว่า ความแตกต่างระหว่างการหมักแบคทีเรียในอาหารเหลวและการหมักบนอาหารแข็งแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 เปรียบเทียบกระบวนการหมักบนอาหารแข็งและกระบวนการหมักในอาหารเหลว

กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง	กระบวนการหมักในอาหารเหลว
ต้องการน้ำในการหมักต่ำ ไม่เกิน 12-70%	น้ำเป็นองค์ประกอบหลักในการหมัก
จุลินทรีย์ดูดซึมอาหารบริเวณความชื้นบนพื้นผิว	จุลินทรีย์ดูดซึมอาหารจากของเหลว
ระบบการหมักประกอบไปด้วย 3 เฟส (แก๊ส ของเหลว และของแข็ง)	ระบบการหมักเกิดในเฟสที่เป็นของเหลว เป็นส่วนใหญ่
ระบบหมักสามารถหมักได้ในขนาดใหญ่	ระบบหมักหมักได้ในขนาดเล็กกว่า
ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ต่ำกว่า	ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงกว่า
ควบคุมความร้อนจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียได้ยาก	ควบคุมความร้อนจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียได้ง่าย
สารตั้งต้นราคาถูก	สารตั้งต้นราคาแพงกว่า
สามารถควบคุมตัวแปรหรือสภาวะต่างๆ ระหว่างการหมักได้ยาก เช่น ค่า pH, ปริมาณสารอาหาร	สามารถควบคุมตัวแปรหรือสภาวะต่างๆ ระหว่างการหมักได้ง่าย
ใช้พลังงานในกระบวนการหมักน้อยกว่า	ใช้พลังงานในกระบวนการหมักมากกว่า
หมักในถังหมักชีวภาพอย่างง่ายได้	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีการออกแบบที่ซับซ้อน
กระบวนการเก็บเซลล์ภายหลังการหมักทำได้ง่าย เช่น ขูดเก็บเซลล์จากพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ	กระบวนการเก็บเซลล์ภายหลังการหมักทำได้โดยการปั่นตก กรอง
ปล่อยของเสียสู่สิ่งแวดล้อมน้อย	ปล่อยของเสียสู่สิ่งแวดล้อมในปริมาณมาก

ที่มา: Musaalbakri M. and Webb C (2017); Sindhu R. et al. (2015)

7. เทคนิคการสกัดพีเอชบี

พีเอชบีสะสมอยู่ในเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้นการแยกพีเอชบีออกมาทำได้โดยการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกโดยการทำลายผนังเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ต้องระมัดระวังไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของพอลิเมอร์ เช่น พีเอชบีที่ได้จากการสกัดแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน แต่อาจมีคุณสมบัติทางฟิสิกส์แตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลมาจากการสกัด (ปิยาภรณ์ วงศิริกุล, เทวัญ หนูหนู, นิษา ไพจิตร, & สังขวัชร, 2557) นอกจากนี้ กระบวนการสกัดพีเอชบีจากเซลล์แบคทีเรีย เป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนการผลิตพีเอชบีสูงขึ้น ซึ่งขั้นตอนการสกัดสามารถทำได้หลากหลายวิธีตามลักษณะที่แตกต่างกันของออกแกนซีมีในเซลล์จุลินทรีย์ การสกัดพีเอชบีจากเซลล์ของแบคทีเรียนิยมสกัดด้วยตัวทำละลายที่สามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ ทำให้แบคทีเรียปลดปล่อยพีเอชบีออกมาจากเซลล์ได้ ภายหลังจากการสกัดสามารถนำมานำมาปั่นแห้งเพื่อเก็บตะกอนพีเอชบี ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้สกัดและวิธีที่สกัดนอกจากจะมีผลต่อปริมาณพีเอชบีที่สกัดได้แล้วยังส่งผลต่อคุณสมบัติของพีเอชบีที่สกัดได้อีกด้วย การสกัดบางวิธีใช้ตัวทำละลายที่เป็นพิษ เช่น การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (CHCl_3) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากได้ร้อยละผลได้ของพีเอชบีสูงและการสกัดมีความบริสุทธิ์ของพอลิเมอร์สูง แต่เกิดสารละลายที่เป็นพิษในปริมาณมากหลังจากการสกัด จึงไม่เหมาะแก่การผลิตในขั้นอุตสาหกรรม (Tao F., Stacy C., Zhiyou W., Lei W., & Tong Wang., 2016) ดังนั้นในขั้นตอนการสกัดพีเอชบีออกจากเซลล์แบคทีเรีย นอกจากจะมุ่งหวังปริมาณผลผลิตให้ได้ปริมาณมากและความบริสุทธิ์สูงแล้ว ยังต้องการให้มีการใช้กระบวนการสกัดที่ปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดสารพิษสู่สิ่งแวดล้อมด้วย มีงานวิจัยมากมายที่สนใจนำตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดสารพิษสู่สิ่งแวดล้อมมาใช้ในขั้นตอนการสกัด เช่น วิธีการสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถสกัดที่มีความบริสุทธิ์สูง แต่ให้ร้อยละผลได้ของพีเอชบีค่อนข้างต่ำ (Brian S. et al., 2013) และวิธีการสกัดด้วยไพโรฟิลีนคาร์บอนเนต ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่เป็นพิษ เป็นวิธีที่ต้องใช้ความร้อนในการสกัดและให้ผลผลิตที่มีความบริสุทธิ์สูง

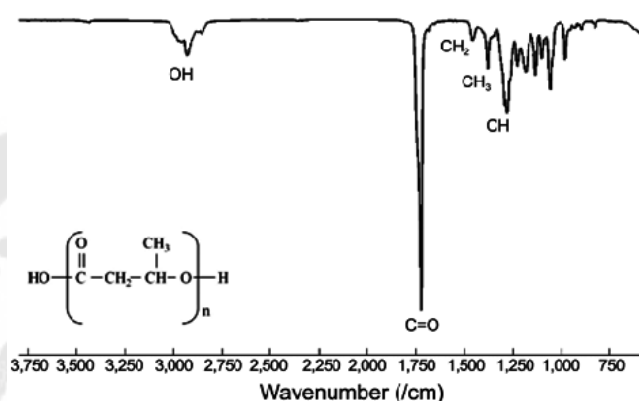
8. การวิเคราะห์คุณสมบัติของพอลิเมอร์

8.1 การระบุหมู่ฟังก์ชันเอกลักษณ์ของพีเอชบีด้วย Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)

FT-IR เป็นเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี ใช้ตรวจสอบ functional group ของสาร โดยการวัดการดูดกลืนรังสีที่อยู่ในช่วงอินฟราเรดที่อยู่ในช่วงเลขคลื่น (Wave number) $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ เมื่อรังสีอินฟราเรดตกกระทบกับโมเลกุลของสารจะเกิดการสั่นและหมุนของพันธะ โดย

ความถี่ในการสั่นของพันธะในโมเลกุลนั้นจะมีการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ความถี่เดียวกัน ซึ่งสารอินทรีย์แต่ละชนิดจะมีค่าความถี่ในการสั่นจำเพาะ จึงนำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์จำแนกชนิดของสารแต่ละชนิดได้

ในการแสดงผล จะแสดงเป็นความสัมพันธ์ระหว่างเลขคลื่น (Wave number) กับการส่งผ่าน (Transmittance) จะพบสัญญาณที่ช่วงเลขคลื่น 1,724 และ 1,278/cm ซึ่งเป็นสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล ($\text{C}=\text{O}$) และหมู่ -CH ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 IR spectrum ของพีเอชบี

ที่มา: Jimmy A. Lopez et al. (2012)

8.2 คุณสมบัติด้านอุณหภูมิของพอลิเมอร์

พอลิเมอร์เป็นสารโมเลกุลใหญ่ แต่ละสายพอลิเมอร์จะจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบเป็นส่วนใหญ่ เรียกว่า พอลิเมอร์อสัณฐาน (amorphous polymers) ส่วนพอลิเมอร์ที่มีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบอยู่ในสภาพผลึกจะเรียกว่า พอลิเมอร์สภาวะผลึก (crystalline polymers) พอลิเมอร์ที่อยู่ในลักษณะของแข็งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับความร้อนทั้งแบบอสัณฐานและสภาวะผลึก ซึ่งจะให้ผลการตอบสนองต่อความร้อนที่แตกต่างกัน ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์คุณสมบัติด้านอุณหภูมิของพอลิเมอร์ ประกอบด้วย (วงศ์ชนะพิบูลย์, 2556)

1. อุณหภูมิจุดหลอมเหลว (Melting point temperature, T_m) เป็นอุณหภูมิที่ส่วนที่เป็นผลึกของพอลิเมอร์ที่เกิดการเปลี่ยนสถานะจากของแข็งเป็นของเหลวขึ้น สามารถตรวจวัด T_m ได้จากการดูดพลังงานจากการหลอมผลึก ที่อุณหภูมินี้เป็นช่วงค่อนข้างกว้างเพราะผลึกที่เกิดขึ้นภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะมีค่า T_m ประมาณ 50 °C

2. อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature, T_g) คืออุณหภูมิที่เปลี่ยนสมบัติของพอลิเมอร์ที่มีสภาวะคล้ายแก้ว คือเป็นของแข็งและเปราะไปเป็นสภาวะคล้ายยาง โดยเมื่อให้ความร้อนกับพอลิเมอร์มากขึ้น สายโซ่พอลิเมอร์จะได้รับพลังงานมากพอที่จะเคลื่อนไหวได้และเกิดการสั่น จึงทำให้บริเวณออสซิลลูชันมีการขยายตัวและเกิดบริเวณว่างเพิ่มขึ้นทำให้มีความยืดหยุ่นมากขึ้น ส่วนสั้นๆ ของสายพอลิเมอร์และหมู่แขนงจะสามารถหมุนได้ง่ายขึ้น เป็นเหตุให้พอลิเมอร์มีสมบัติเปลี่ยนไป คือ มีความยืดหยุ่นและเหนียวคล้ายยาง แต่พอลิเมอร์จะยังคงอยู่ในสถานะของแข็ง เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นสายโซ่ยาวทำให้เคลื่อนไหวส่วนต่างๆ ได้ยากทำให้สถานะไม่เปลี่ยนแปลง

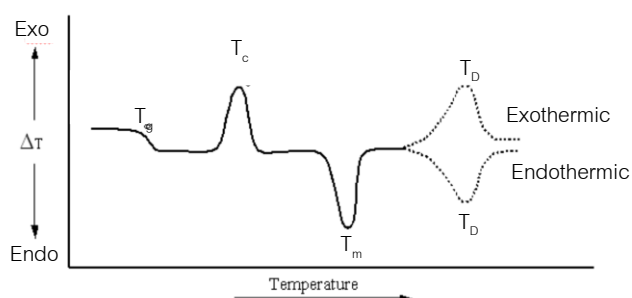
3. อุณหภูมิการเกิดผลึก (Crystallization temperature, T_c) เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดผลึกของพอลิเมอร์บางชนิด ซึ่งกระบวนการเกิดผลึกเป็นกระบวนการเทอร์โมไดนามิกส์ที่ต้องมีความเป็นระเบียบในโครงสร้างจึงเกิดผลึกได้ การเกิดผลึกของพอลิเมอร์สามารถเกิดได้ 2 ทางคือเกิดขึ้นในขณะที่ค่อยๆ ให้ความร้อนแก่พอลิเมอร์ และเกิดขึ้นในขณะที่ปล่อยให้พอลิเมอร์เย็นตัวลงอย่างช้าๆ

4. อุณหภูมิที่พอลิเมอร์เกิดการสลายตัว (Degradation temperature, T_d) เป็นกระบวนการแบบดูดความร้อนทำให้พอลิเมอร์เกิดการสลายตัว และหากให้ความร้อนกับพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ความร้อนที่ให้เข้าไปจะทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างสายโซ่โมเลกุลให้แยกออกจากกันและยังสามารถทำลายพันธะโควาเลนต์ในสายโซ่ด้วย ทำให้เกิดการสลายตัวเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลงเป็นเหตุให้สมบัติทางด้านเชิงกลของพอลิเมอร์เสียไป

8.3 เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติทางอุณหภูมิของพอลิเมอร์

8.3.1 Differential Scanning Calorimetry

DSC เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาปริมาณความร้อน และการเปลี่ยนแปลงความร้อนของพอลิเมอร์ โดยทำการทดสอบสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารอ้างอิงที่เฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยาที่บรรจุในถ้วยอะลูมิเนียมขนาดเล็กที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 800 องศาเซลเซียส จะถูกให้ความร้อนภายใต้ก๊าซไนโตรเจน หลังจากให้ความร้อน อุณหภูมิของสารตัวอย่างและสารอ้างอิงจะเพิ่มด้วยอัตราที่ไม่เท่ากัน โดยสารตัวอย่างจะต้องใช้พลังงานความร้อนมากกว่าสารอ้างอิง จากนั้นสมบัติทางอุณหภูมิของสารตัวอย่างที่เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิในตัวอย่างจะถูกตรวจวัดและแปลผล โดยสารตัวอย่างและสารอ้างอิงจะถูกให้ความร้อนและบันทึกค่าพลังงานความร้อนมาสร้างกราฟเทียบกับอุณหภูมิดังแสดงในภาพประกอบ 8

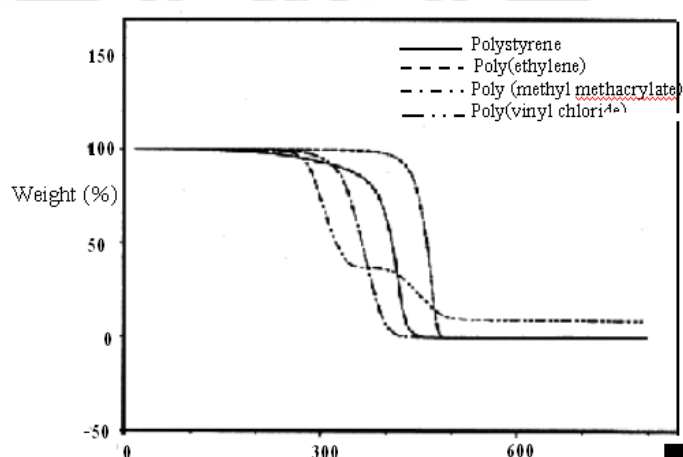


ภาพประกอบ 8 การวิเคราะห์ปริมาณความร้อน และการเปลี่ยนแปลงความร้อนของพอลิเมอร์

ที่มา: ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (2553)

8.3.2 Thermogravimetric Analysis (TGA)

TGA เป็นการวิเคราะห์ความเสถียรของพอลิเมอร์ โดยใช้การวัดน้ำหนักอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องซึ่งมีความไวสูงในการวิเคราะห์น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไป คุณสมบัติของสารตัวอย่างที่อยู่ในก๊าซเฉื่อยจะถูกทำให้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากนั้นข้อมูลจะถูกบันทึกและวิเคราะห์ ผลการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของตัวอย่างและอุณหภูมิ ดังภาพประกอบ 9 การสูญเสียน้ำหนักในช่วงแรกของการวิเคราะห์หรือที่อุณหภูมิต่างๆ อาจเกิดจากการระเหยของน้ำหรือตัวทำละลาย แต่หากอุณหภูมิสูงมากเกินไปจะทำให้พอลิเมอร์เกิดการสลายตัวได้ ซึ่งบ่งบอกถึงความเสถียรต่ออุณหภูมิของพอลิเมอร์



ภาพประกอบ 9 เทอร์โมแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย TGA

ที่มา: ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (2553)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

ในงานวิจัยนี้เป็นกระบวนการผลิตฟิโอฟีในแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 บนอาหารแข็งให้ได้ปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์สูง ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง ผู้ทำการวิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. ทดสอบการผลิตและสะสมฟิโอฟีของแบคทีเรีย
2. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิโอฟีบนอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน
4. ศึกษาการสกัดฟิโอฟีจากแบคทีเรีย
5. ศึกษาการนำสภาวะที่เหมาะสมไปใช้ในการขยายขนาดการผลิตฟิโอฟี
6. การวิเคราะห์ปริมาณฟิโอฟี
7. การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของฟิโอฟี
8. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางโครงสร้างและทางความร้อนของฟิโอฟี

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Hettish รุ่น 320R ประเทศเยอรมัน
2. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ยี่ห้อ ZHICHENG รุ่น ZHWY-100H ประเทศจีน
3. เครื่องไมโครเซนติฟิวจ์ ยี่ห้อ Witeg Wisd รุ่น CF-10 ประเทศเกาหลี
4. เครื่อง vortex ยี่ห้อ Scientific industries รุ่น G-560E ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. ตู้ปลอดเชื้อ (Larmina flow) ยี่ห้อ Microtech รุ่น V-3T-0811 ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. เครื่อง Spectrophotometer ยี่ห้อ MAPADA รุ่น UV-1200 ประเทศจีน
7. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ ZEALWAY รุ่น GI54TW ประเทศไทย
8. เครื่อง Ultrasonic processor Model VC 505, 500 watts ยี่ห้อ Sonic & materials, INC รุ่น SON-1 VC505 ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. เครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ยี่ห้อ Perkin Elmer SPECTRUM รุ่น GX FTIR System ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) ยี่ห้อ Discovery รุ่น DSC25 ประเทศเยอรมัน

11. เครื่อง Thermal gravimetric analysis ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น PYRIS 1 ประเทศสหรัฐอเมริกา

12. เครื่อง Gas chromatography ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-2010 ประเทศญี่ปุ่น
13. เตาไฟฟ้า (hot plate) ยี่ห้อ Scilogex รุ่น MA-H280-pro ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. ไมโครเวฟ ยี่ห้อ Sharp รุ่น R-220 ประเทศไทย
15. ไมโครปิเปต ยี่ห้อ BRAND ประเทศเยอรมัน
16. ทิปดูดสาร ยี่ห้อ AxyGen ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. หลอด Centrifuge ขนาด 50 mL
18. หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 mL
21. ลูปเขี่ยเชื้อ (Loops Inoculate)
22. จานเพาะเชื้อพลาสติก เส้นผ่าศูนย์กลาง 90 mm

2. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Agar powder ยี่ห้อ HIMEDIA ประเทศอินเดีย
2. Nutrient broth ยี่ห้อ HIMEDIA ประเทศอินเดีย
3. สีย้อม Sudan black B ยี่ห้อ AMRESCO ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. Sodium chloride (NaCl) ยี่ห้อ UNIVAR AR grade ประเทศออสเตรเลีย
5. sulfuric acid (H_2SO_4) ยี่ห้อ QRc AR grade ประเทศนิวซีแลนด์
6. Sodium hydroxide (NaOH) ยี่ห้อ CARLO ERBA AR grade ประเทศอังกฤษ
7. Sodium hypochlorite (NaOCl) ยี่ห้อ Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย
8. Absolute ethanol ยี่ห้อ LabScan AR grade ประเทศไทย
9. Acetone ยี่ห้อ LabScan AR grade ประเทศไทย
10. Glucose ยี่ห้อ UNIVAR AR grade ประเทศออสเตรเลีย
11. Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน
12. Hydrochloric acid (HCl) ยี่ห้อ RCI Labscan ประเทศไทย
13. Chloroform ยี่ห้อ VWR Chemicals ประเทศฝรั่งเศส
14. Methyl benzoate ยี่ห้อ CARLO ERBA AR grade ประเทศอังกฤษ
15. Propylene carbonate ยี่ห้อ Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. Isopropanol ยี่ห้อ CARLO ERBA AR grade ประเทศอังกฤษ
17. กากน้ำตาล 77% บริษัท อี เอ็ม เอ็ดมอนด์ ประเทศไทย

3. วิธีการดำเนินงาน

3.1 ทดสอบการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซิลบิวทีเรตของแบคทีเรีย

Bacillus megaterium SWU01 ด้วยการย้อมสี Sudan Black B

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 มาเพาะลงบนอาหารแข็ง NA (Nutrient Agar) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้น ตรวจหาแบคทีเรียที่ผลิตพีเอชบี โดยการย้อมด้วยสารละลาย 0.5 % Sudan Black B ใน 70% เอทานอล โดยเทสารละลาย Sudan Black B ลงบนเพลทที่มีโคโลนีเชื้อแบคทีเรียขึ้น ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างออกด้วย 95% เอทานอล ซึ่งแบคทีเรียที่มีการสะสมพีเอชบีภายในเซลล์จะติดสีดำของ Sudan Black B

3.2 วิเคราะห์คุณสมบัติของกากน้ำตาล

3.2.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาล

ผสมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid ปริมาตร 0.5 mL กับตัวอย่างกากน้ำตาล (เจือจาง 10, 100 และ 1000 เท่า) และสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.5, 0.4, 0.6 และ 0.8 mg/mL (ใช้น้ำกลั่นเป็นเบลงค์) ปริมาตร 0.5 mL ลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 4 mL จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₄₇₀ นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาล

3.2.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาล ด้วยวิธี Phenol Sulfuric method

เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 10 ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 µg/mL ลงในหลอดทดลองที่ 1- 10 ตามลำดับ และเจือจางกากน้ำตาลให้ได้เป็น 10, 100 และ 1000 เท่า แล้วเติมฟีนอล 5% ลงไป 1 mL แล้วเขย่า เดิมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 mL ลงไปอย่างรวดเร็ว ตั้งหลอดทดลองทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วรออีก 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₄₉₀ แล้วสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส จากนั้นคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

3.3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชบีบนอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

3.3.1 การเตรียมกากน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

เจือจางกากน้ำตาล 20 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 L เพื่อให้ได้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร

3.3.2 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NB (Nutrient Broth) ที่ประกอบไปด้วย peptone 5 g, NaCl 5 g, meat extract 1.5 g และ yeast extract 1.5 g กับผงวุ้น Agar (Nutrient Agar; NA) 15 g ผสมกับกากน้ำตาลในข้อ 3.3.1 ปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นนำมาเทในจานเพาะเชื้อ เส้นผ่าศูนย์กลาง 90 mm (ยี่ห้อ Hycon) เพื่อขึ้นรูปเป็นอาหารแข็ง ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว 15 นาที

3.3.3 เชื้อแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นโดยเชื้อโคโลนีของแบคทีเรียมา 1-2 โคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ ของหัวเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นทำการเจือจางหัวเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ให้ได้เท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 (ด้วยการคำนวณจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$) จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นที่เจือจางแล้ว 800 μ L ไปเปิดลงในอาหารแข็งที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3.2 ทิ้งไว้ให้เชื้อซึมลงบริเวณผิวของอาหารแข็ง แล้วปิดฝาให้สนิท บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์เพื่อหาปริมาณฟิเอชบีและน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.4 ความเข้มข้นของกากน้ำตาล

เตรียมอาหารแข็ง (NA) ที่มีกากน้ำตาลในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 4 และ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 มาไปเปิดลงในอาหารแข็งที่เตรียมไว้ 800 μ L ทิ้งไว้ให้เชื้อซึมลงบริเวณผิวของอาหารแข็ง แล้วปิดฝาให้สนิท บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการขูดเก็บเซลล์มาละลายใน 1X PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4 เพื่อนำไปทำการสกัดฟิเอชบีและหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.5 ผลของความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นต่อการผลิตฟิเอชบี

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเลี้ยงข้ามคืนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₆₀₀ และคำนวณเพื่อเจือจางให้หัวเชื้อแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 1.75 และ 2.00 ไปเปิด

เชื้อปริมาตร 800 μL ลงในอาหารแข็งที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมที่เตรียมไว้ (ผลจากข้อ 3.3.3) ทิ้งไว้ให้เชื้อซึมลงบริเวณผิวของอาหารแข็ง แล้วปิดฝาให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการขูดเก็บเซลล์มาละลายใน 1X PBS pH 7.4 เพื่อนำไปทำการสกัดพีเอชบี และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.6 ผลของเวลาในการหมักแบคทีเรียต่อการผลิตพีเอชบี

เปิดเชื้อเริ่มต้นที่เชื้อจางให้ได้ OD_{600} เท่ากับ 1 หน่วย ปริมาตร 800 μL ลงในอาหารแข็งที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ให้เชื้อซึมลงบริเวณผิวของอาหารแข็งในตู้ปลอดเชื้อ แล้วปิดฝาให้สนิท บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการขูดเก็บเซลล์มาละลายใน 1X PBS pH 7.4 เพื่อนำไปทำการสกัดพีเอชบีและหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.7 ผลของปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการผลิตพีเอชบี

นำเชื้อเริ่มต้นที่เชื้อจางเจือจางให้ได้ OD_{600} เท่ากับ 1 หน่วย ปริมาตร 800 μL เทลงในอาหารแข็งที่เตรียมไว้ที่ปริมาตร 15.0, 17.5, 20.0, 22.5 และ 25.0 mL ทิ้งไว้ให้เชื้อซึมลงบริเวณผิวของอาหารแข็ง แล้วปิดฝาให้สนิท บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3.3.5) เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการขูดเก็บเซลล์มาละลายใน 1X PBS pH 7.4 เพื่อนำไปทำการสกัดพีเอชบีและหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4 การนำสภาวะที่เหมาะสมไปใช้ในการขยายขนาดการผลิตพีเอชบี

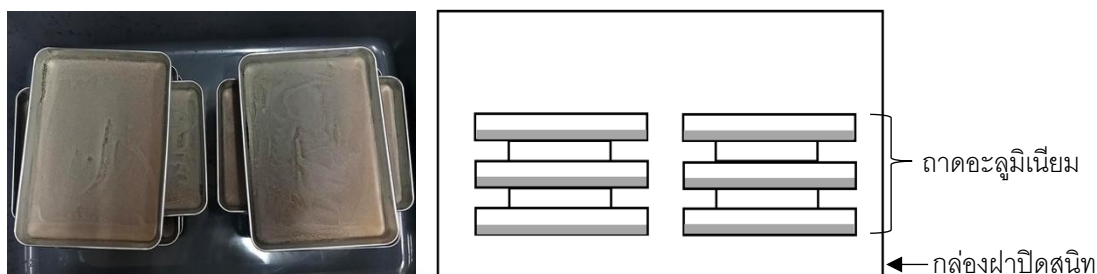
3.4.1 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเชื้อแบคทีเรีย

ทำการขยายขนาดเพาะเลี้ยงจากจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 mm. เป็นถาดอะลูมิเนียมขนาด 15.5 x 22.5 cm. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโดยเจือจางให้กากน้ำตาลมีความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร นำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (Nutrient Broth) ปรับปริมาตรเป็น 1.0 L แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นนำมาแบ่งใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL ครั้งละ 100 mL แล้วเติมผลวุ้น Agar 1.5 g คลุมปากขวดด้วยพลาสติกใสเจาะรู แล้วทำการอุ่นด้วยไมโครเวฟที่ไฟแรงปานกลางเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทลงในถาดเพื่อขึ้นรูปเป็นอาหารแข็ง ครั้งละ 100 mL ต่อถาด ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว 30 นาทีในตู้ปลอดเชื้อ

3.4.2 การบ่มเชื้อเริ่มต้นลงบนอาหารแข็ง

ทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นให้มีความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 1 หน่วย จากนั้นเปิดเชื้อลงบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ในตู้ปลอดเชื้อ ปริมาตร 4 mL ต่อถาด จากนั้นทำการบ่มในกล่องฝาปิดสนิทที่ทำการทำความสะอาดด้วยเอทานอล 70 % บ่มเป็น

เวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง โดยนำภาชนะที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่ได้เปิดเชื้อเริ่มต้นลงไปบ่มด้วยเพื่อเป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ



ลักษณะด้านข้างในการหมัก

ภาพประกอบ 10 การบ่มแบคทีเรียในรูปแบบการขยายขนาดการผลิตพีเอชบี โดยหมักแบคทีเรียบนอาหารแข็งในภาชนะลูมิเนียม

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพีเอชบีบนอาหารแข็งของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ซึ่งผู้วิจัยใช้เป็นสภาวะต้นแบบในการผลิตพีเอชบีโดยทำการขยายขนาดการผลิตจากจานเพาะเชื้อ (Petri dish) เส้นผ่านศูนย์กลาง 90 mm. มาเพาะเลี้ยงในภาชนะสเตนเลส ขนาด 15.5 x 22.5 เซนติเมตร ซึ่งทำการขยายขนาดการผลิตโดยหมักแบคทีเรียบนอาหารปริมาตร 1 L และ 5 L โดยในการทดลองได้ทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีกากน้ำตาลอยู่ร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร จำนวน 100 mL ต่อภาชนะ หลังจากการเพาะเลี้ยงเปิดเชื้อเริ่มต้นที่เจือจางแล้ว 4 mL ลงในอาหารแข็งที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มในกล่องฝาปิดสนิทเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการขูดเก็บเซลล์แบคทีเรียเพื่อนำไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณพีเอชบี และ น้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีในข้อ 7

3.5 ศึกษาการสกัดพีเอชบีจากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01

3.5.1 ศึกษาการสกัดพีเอชบีจากแบคทีเรียด้วยคลอโรฟอร์ม ตามวิธีของ Daniel Heinrich และคณะ

ซึ่งแบคทีเรียที่ทำการขูดเก็บจากการบ่มในอาหารแข็งมา 2 กรัม (เซลล์เปียก) เติมน้ำคลอโรฟอร์ม 30 mL ทำการรีฟลักซ์ในอ่างน้ำ 60 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองเพื่อแยกของสารละลายออกจากเศษเซลล์ชีวมวล แล้วทำการตกตะกอนพีเอชบีโดยการเติมอะซิโตนเย็นปริมาตร 20 mL ทำการปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 10 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 mL 2 รอบโดยการผสมตะกอนกับน้ำด้วยการวอร์เท็กซ์ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเก็บ

ตะกอน แล้วนำมาล้างตะกอนต่อด้วย อะซิโตน 1 mL และเอทานอล 1 mL ตามลำดับ นำตะกอนไปอบที่ 60 °C 24 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่ ทำการชั่งน้ำหนักตะกอนที่ได้ จะได้ตะกอนฟิเอชปี ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5.2 ศึกษาการสกัดฟิเอชปีจากแบคทีเรียด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ตามวิธีของ วิสันต์ เชื้อวงศ์ และคณะ

ชั่งแบคทีเรียที่ทำกรขูดเก็บจากการบ่มในอาหารแข็งมา 2 กรัม (เซลล์เปียก) เติมโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 12.5% ปริมาตร 5 mL ลงในตะกอนของเซลล์แบคทีเรียแล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการวอร์เทกซ์ แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการเก็บตะกอนโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 10 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 mL 2 รอบโดยการผสมตะกอนกับน้ำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการวอร์เทกซ์ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอน แล้วนำมาล้างต่อด้วยอะซิโตน 1 mL และเอทานอล 1 mL ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่ จะได้ตะกอนฟิเอชปี นำตะกอนที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5.3 ศึกษาการสกัดฟิเอชปีจากแบคทีเรียด้วยทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเต ตามวิธีของ Tao Fei และคณะ

ชั่งแบคทีเรียที่ทำกรขูดเก็บจากการบ่มในอาหารแข็งมา 2 กรัม (เซลล์เปียก) ละลายในเอทานอล 6 mL จากนั้นทำการโซนิเคชันด้วยเครื่อง Sonic dismembrator 10 นาที ที่ 70% amplitude เก็บตะกอนโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm 10 นาที จากนั้นเติมตัวทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเต (สัดส่วนโดยปริมาตร 1:1:1) 20 mL แล้วทำการรีฟลักซ์ในอ่างน้ำมันอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง หลังจากการรีฟลักซ์นำสารละลายมากรองด้วยกรวยกรองสุญญากาศทันทีเพื่อแยกตะกอนของเซลล์ออกเก็บส่วนสารละลายไว้ นำสารละลายที่ผ่านกระดาษกรองมาตกตะกอนฟิเอชปีโดยผสมอะซิโตน 20 mL ตั้งทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง เก็บตะกอนฟิเอชปีโดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 10 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 mL 2 รอบ หลังจากนั้นนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่ จะได้ตะกอนฟิเอชปี นำตะกอนไปชั่ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักแห้งเซลล์ในแบคทีเรียและฟิเอชปี *Bacillus megaterium* SWU01 จากสภาวะต้นแบบ

3.6.1 หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำแบคทีเรียที่เก็บเซลล์ (ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร) โดยใช้ช้อนตักสาร spatula ขูดแบคทีเรียที่อยู่บนบริเวณผิวของอาหาร แล้วนำเซลล์

แบคทีเรียทั้งหมดมาละลายใน 1X PBS buffer solution 3 mL ทำการเขย่าด้วยเครื่อง Vortex mixture เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียกระจายตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นใช้ปิเปตแบ่งสารละลายมา 500 μL เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์แห้ง (ส่วนที่เหลือนำไปสกัดพีเอชบี ซึ่งจำนวนเซลล์เปียกของเซลล์แบคทีเรียไว้ เป็นจำนวนเซลล์เปียกของแบคทีเรียที่แบ่งมา) นำเซลล์แบคทีเรียที่แบ่งมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนของเซลล์ที่ 8,000 rpm 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปอบให้น้ำหนักเซลล์คงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักและจุดบันทึก (น้ำหนักเซลล์แห้งที่แบ่งมา) คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดต่อจานเพาะเชื้อ ตามสูตร ด้านล่าง (น้ำหนักเซลล์เปียกของแบคทีเรียทั้งหมด คือ น้ำหนักเซลล์เปียกที่ใช้สกัดพีเอชบีพร้อมกับน้ำหนักเซลล์เปียกของแบคทีเรียที่แบ่งมาในการหาปริมาณเซลล์แห้ง)

$$\text{ปริมาณเซลล์แห้งทั้งหมด} = \frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งที่แบ่งมา} \times \text{น้ำหนักเซลล์เปียกของแบคทีเรียทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักเซลล์เปียกของแบคทีเรียที่แบ่งมา}}$$

3.6.2 หาปริมาณพีเอชบี

นำเซลล์แบคทีเรีย (เซลล์เปียก) ที่เหลือจากการแบ่งเพื่อหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมาสกัดพีเอชบีโดยนำเซลล์แบคทีเรียที่เหลือมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 10 นาที ซึ่งน้ำหนักตะกอนไว้ (น้ำหนักเปียกของเซลล์แบคทีเรียที่ใช้ในการสกัดพีเอชบี) แล้วทำการสกัดพีเอชบีจากแบคทีเรียสามวิธีในหัวข้อที่ 5.1, 5.2 และ 5.3 ภายหลังจากการสกัด นำพีเอชบีที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ให้น้ำหนักของตะกอนพีเอชบีคงที่แล้ว ซึ่งน้ำหนักและจุดบันทึก คำนวณหาปริมาณพีเอชบีในเซลล์แบคทีเรียโดยการเทียบน้ำหนักกับปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียทั้งหมดดังสมการตามสูตรด้านล่าง

$$\text{ปริมาณพีเอชบีทั้งหมด} = \frac{\text{น้ำหนักตะกอนพีเอชบีที่สกัดได้} \times \text{น้ำหนักเซลล์เปียกของแบคทีเรียทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักเซลล์เปียกที่ใช้สกัดพีเอชบี}}$$

$$\text{ร้อยละของพีเอชบี} = \frac{\text{น้ำหนักปริมาณพีเอชบีทั้งหมด} \times 100}{\text{ปริมาณเซลล์แห้งทั้งหมด}}$$

3.7 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดพีเอชบีโดยใช้ Gas Chromatography ตามวิธีของ Janina R. Juengert และคณะ

นำตัวอย่างพีเอชบีที่ได้จากการสกัดมา 5 mg ละลายในคลอโรฟอร์ม 1 mL เติมสาร methanol supplemented 15% โดยปริมาตร 1 mL ($150\ \mu\text{L}\ \text{H}_2\text{SO}_4 + 850\ \mu\text{L}\ \text{methanol}$ ต่อตัวอย่าง) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาที ทิ้งไว้ให้สารละลายเย็นตัวลง 5 นาที จากนั้น เติมน้ำ DI เพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วเติม methyl benzoate 0.2% โดยปริมาตร ($2\ \mu\text{L}\ \text{methyl benzoate} + 998\ \mu\text{L}\ \text{chloroform}$ ต่อตัวอย่าง) เพื่อใช้เป็นสาร internal standard ผสมให้เข้ากัน และเก็บตัวอย่างที่เกิดจากการแยกชั้น โดยนำส่วนของคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ที่มี 3-hydroxybutyrate methyl ester ละลายอยู่ไปวิเคราะห์ด้วย Gas chromatography-frame ionization detector (รุ่น GC-2010 Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น) คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ HP-5 capillary column ค่า Oven temperature เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส Injector temperature เท่ากับ 300 องศาเซลเซียส และ Detector temperature เท่ากับ 300 องศาเซลเซียส จากนั้น วิเคราะห์ความบริสุทธิ์จากการเปรียบเทียบอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของพอลิเมอร์ต่อพื้นที่ใต้พีคทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ Gas Chromatography ดังสมการตามสูตรด้านล่าง

$$\text{ร้อยละความบริสุทธิ์} = \frac{\frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของพีเอชบี} / \text{พื้นที่พีคของ Internal standard}}{\text{พื้นที่ใต้พีคทั้งหมด} / \text{พื้นที่พีคของ Internal standard}} \times 100$$

3.8. ศึกษาคุณสมบัติของพอลิไฮดรอกซิลบีทีเรต

3.8.1 ศึกษาคุณสมบัติทางโครงสร้างด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)

นำพีเอชบีมาตรฐานและพีเอชบีที่ได้จากการสกัดจากทั้ง 3 วิธีการสกัด ไปวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบพิกมู่ฟังก์ชันเอกลักษณ์ โดยนำพีเอชบีประมาณ 2 mg วางบนแท่นวางตัวอย่างของเครื่อง Perkin Elmer Spectrum GX FTIR System แล้วทำการวิเคราะห์ในช่วงเลขคลื่น $4000\text{--}400\ \text{cm}^{-1}$

3.8.2 วิเคราะห์ความเสถียรของพอลิเมอร์ด้วยเทคนิค Thermogravimetric Analysis (TGA) ตามวิธีของ Srijia Das และคณะ

ชั่งสารตัวอย่าง 10 mg ให้ความร้อน 50-900 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายใต้อัตราการแพร่ของก๊าซไนโตรเจน เท่ากับ $200\ \text{mL min}^{-1}$

โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการส่งตรวจที่ศูนย์ให้บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ประจำคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.8.3 ศึกษาค่าพลังงานความร้อนของพอลิเมอร์ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC) ตามวิธีของ Srija Das และคณะ

ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 mg ลงใน Aluminium pans เพื่อศึกษาค่าพลังงานความร้อนของพอลิเมอร์ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC) ช่วงอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียสถึง 300 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการส่งตรวจที่ศูนย์ให้บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ประจำคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

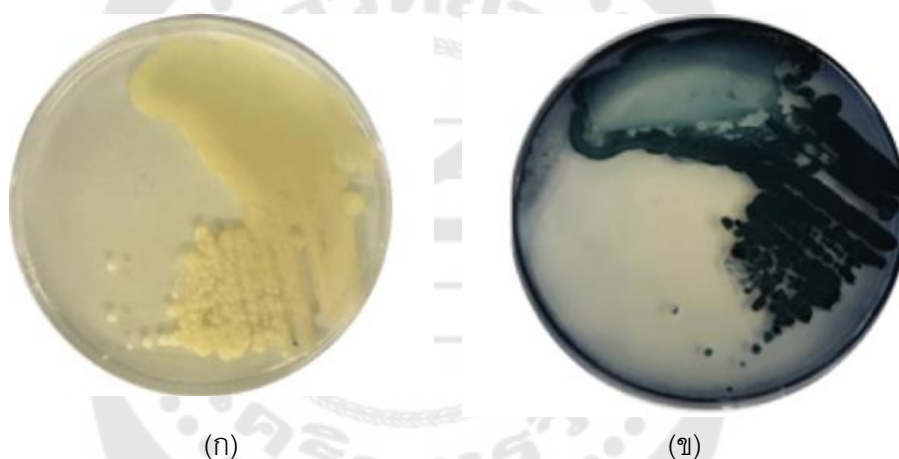
นำข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้งและพีเอชปีที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 26 วิเคราะห์ด้วย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. ตรวจสอบการผลิตและสะสมพอลิไฮดรอกซิลบิวทีเรตของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ด้วยการย้อมสี Sudan Black B

นำแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ที่ทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาตรวจสอบการสะสมพิเอชบีในเซลล์ โดยการย้อมด้วย Sudan black B พบว่า โคโลนีของแบคทีเรียมีการย้อมติดสีดำของ Sudan Black B อย่างชัดเจนดังแสดงดังภาพที่ 10 ซึ่งแสดงถึงการสะสมพิเอชบีภายในเซลล์ของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01



ภาพประกอบ 11 แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (ก) และหลังจากย้อม Sudan Black B (ข)

2. การวิเคราะห์คุณสมบัติของกากน้ำตาล

ในการทดลองนี้มีการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตพิเอชบี โดยได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาลด้วยวิธี DNS พบว่า มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ร้อยละ 20.09 โดยมวลต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก) และจากการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลด้วยวิธี Phenol sulfuric method พบว่า กากน้ำตาลที่ใช้ในการทดลอง มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่ร้อยละ 48.00 โดยมวลต่อปริมาตร (ภาคผนวก ข)

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิโอสปีบนอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

3.1 ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตฟิโอสปี

จากการผลิตฟิโอสปีบนอาหารแข็ง NA ที่มีกากน้ำตาลเป็นส่วนผสมเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 4 และ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมที่ทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตฟิโอสปีได้มากที่สุดคือ ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณฟิโอสปี เท่ากับ 4.90 ± 0.28 และ 1.12 ± 0.01 g/L ตามลำดับ ดังรูปที่ 12ก พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีการผลิตฟิโอสปีสูงขึ้นถึง 4.67 เท่า ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีกากน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ

3.2 ผลของความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นต่อการผลิตฟิโอสปี

จากการศึกษาปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียต่อการผลิตฟิโอสปี โดยนำหัวเชื้อแบคทีเรียมาทำการเจือจางให้เชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 0.25, 0.50, 1.00, 1.25, 1.50 และ 2.00 หน่วย ในการหมักบนอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 1 และ 1.5 หน่วย ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณฟิโอสปีที่สูงที่สุดและแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ค่าความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย OD₆₀₀ เท่ากับ 1 หน่วย ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณฟิโอสปีมากที่สุดคือ 5.12 ± 0.001 g/L และ 1.73 ± 0.007 g/L ตามลำดับ ดังรูปที่ 12ข

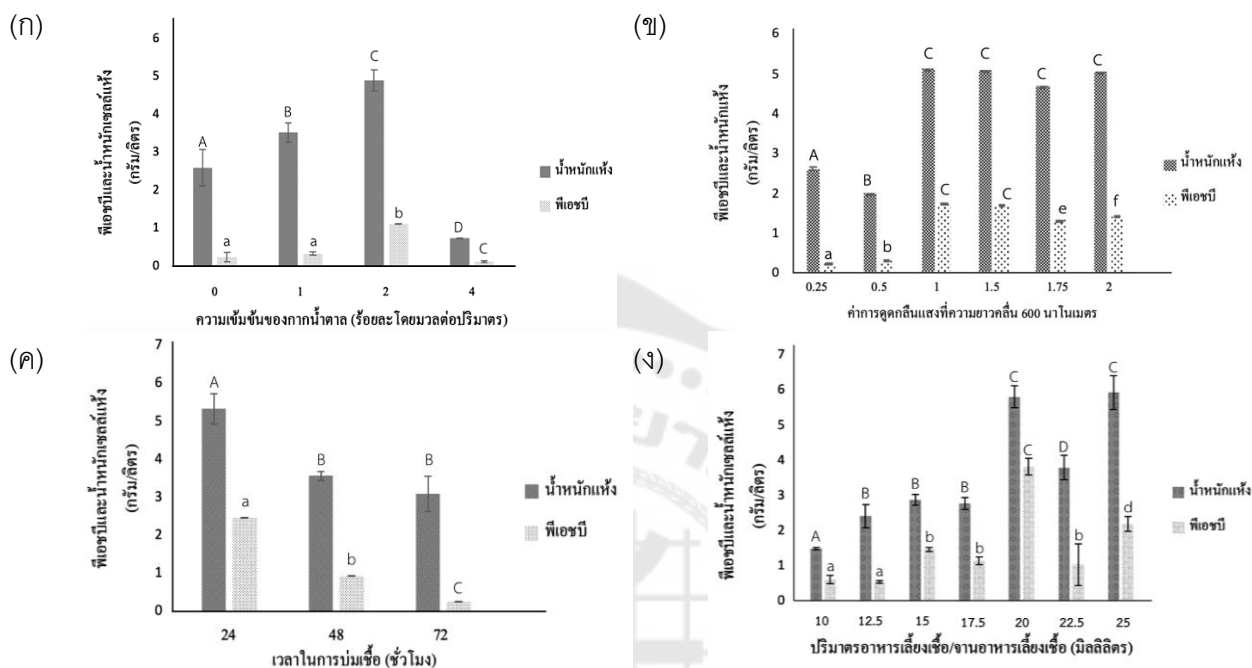
3.3 ผลของเวลาในการบ่มต่อการผลิตฟิโอสปี

การศึกษาระยะเวลาในการหมักแบคทีเรียต่อการผลิตฟิโอสปี โดยนำเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่ OD₆₀₀ เท่ากับ 1 หน่วย เติลงในอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลเข้มข้นร้อยละ 2 โดยบ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า ระยะเวลาในการหมักแบคทีเรียเพื่อสร้างฟิโอสปี 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียมีน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณฟิโอสปี มากที่สุดคือ 5.34 ± 0.40 g/L และ 2.47 ± 0.001 g/L ตามลำดับ โดยพบว่ามีความแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 12ค

3.4 ผลของปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการผลิตฟิโอสปี

ศึกษาปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตฟิโอสปี โดยนำเชื้อเริ่มต้นที่เจือจางแล้วเติลงในจานเพาะเชื้อเส้นขนาด 63.64 ตารางเซนติเมตร ที่บรรจุอาหารแข็ง NA ที่มีปริมาตรแตกต่างกันได้แก่ 10, 12.5, 15, 20, 22.5 และ 25 mL ต่อ จากนั้นบ่มเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชม. พบว่าปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 mL (คิดเป็น 0.31 mL/ต่อตารางเซนติเมตร)

เป็นปริมาณอาหารที่ทำให้แบคทีเรียมีการสะสมปริมาณฟิโอสปีมากที่สุดคือ 3.83 ± 0.23 g/L และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 5.81 ± 0.32 g/L ดังรูปที่ 12ง



ภาพประกอบ 12 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิโอสปีของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 บนอาหารแข็ง

ได้แก่ (ก) ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสม (ข) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ OD_{600} (ค) เวลาในการบ่ม และ (ง) ปริมาณอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสม และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย One-way ANOVA กราฟแท่งที่มีอักษร A,B,C,... และ a,b,c,... มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของน้ำหนักแห้งและฟิโอสปี ตามลำดับ

4. ศึกษาวิธีการสกัดและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของฟิโอสปีจากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิโอสปีบนอาหารแข็งของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ซึ่งผู้วิจัยใช้เป็นสภาวะต้นแบบในการผลิตฟิโอสปีในปริมาณมาก เพื่อนำมาศึกษาวิธีการสกัดฟิโอสปีที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ฟิโอสปีในปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์สูง โดยทำการขยายขนาดในการเลี้ยงแบคทีเรียจากจานเพาะเชื้อมาเพาะเลี้ยงในถังสแตนเลส

ขนาด 15.5 x 22.5 เซนติเมตร ซึ่งทำการหมักครั้งละ 1 ลิตร โดยเทอาหาร 100 mL ต่อภาต จำนวน 10 ภาต หลังจากการเพาะเลี้ยงแล้ว ได้ทำการชูดเก็บเซลล์แบคทีเรียมาผสมกันและแบ่งแบคทีเรีย (น้ำหนักเปียก) หลอดละ 2 กรัม ซึ่งได้น้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ได้เท่ากับ 0.41 g หรือได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 11.059 g/L จากนั้นได้นำมาศึกษาวิธีการสกัดพีเอชบีเพื่อเปรียบเทียบกัน 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ และการสกัดด้วยตัวทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต

จากผลการวิจัยพบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต เป็นวิธีการสกัดที่ทำให้ได้ปริมาณพีเอชบีมากที่สุดคือ 2.39 ± 0.16 g/L คิดเป็นร้อยละ 21.6 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงในตาราง 5 จากการทดลองพบว่าการสกัดที่แตกต่างกันทำให้ลักษณะทางกายภาพของพีเอชบีที่ได้จากการสกัดมีลักษณะแตกต่างกัน แสดงในภาพประกอบ 13 ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพีเอชบีที่สกัดได้ ได้ใช้เทคนิค gas chromatography ซึ่งแสดงตัวอย่างโครมาโตแกรมของพีเอชบีมาตรฐานและพีเอชบีที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ ดังแสดงภาพประกอบที่ 14 พบว่าสัญญาณสูงสุด (Peak) ของพีเอชบีมีค่า Retention time ประมาณ 4.5 นาที และสัญญาณสูงสุด (Peak) ของ Benzoic acid methyl ester ซึ่งใช้ เป็น internal standard มีค่า Retention time ประมาณ 14 นาที ในการเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของพีเอชบีที่ได้จากการสกัดพบว่า วิธีการสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ให้ร้อยละความบริสุทธิ์ของการสกัดมากที่สุดถึงร้อยละ 90.60 (ภาคผนวก ค)

ตาราง 5 เปรียบเทียบผลการสกัดและความบริสุทธิ์ของพีเอชบีที่สกัดจากจากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ทั้ง 3 วิธี

วิธีการสกัด	ปริมาณพีเอชบี (g/L)	ร้อยละพีเอชบีต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง	ร้อยละความ บริสุทธิ์
สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	1.85 ± 0.31	16.7	83.97
สกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์	1.99 ± 0.27	18.0	90.60
สกัดด้วยตัวทำละลายระบบอะซิโตน/ เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต	2.39 ± 0.16	21.6	82.98

Sodiumhypochlorite Extraction



(ก)

Chloroform Extraction



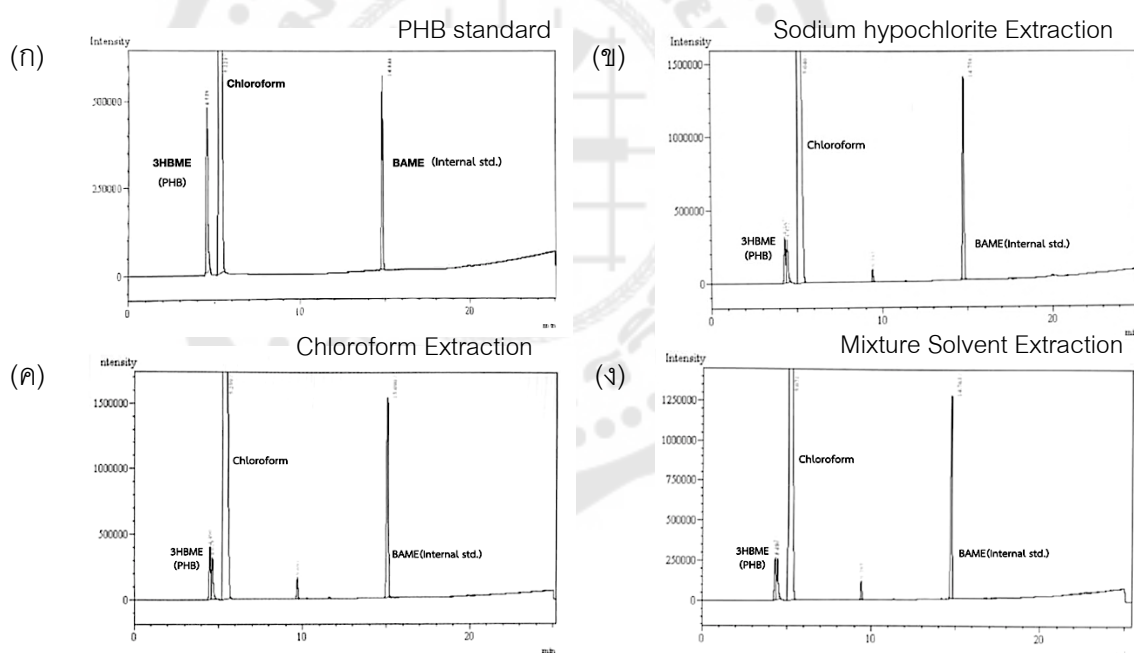
(ข)

Mixture Solvent Extraction



(ค)

ภาพประกอบ 13 พีเอชบีที่ได้จากการสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ก), พีเอชบีที่ได้จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (ข) และพีเอชบีที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนेट



ภาพประกอบ 14 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas chromatography ของพีเอชบี ได้แก่ พีเอชบีมาตรฐานมาตรฐาน (ก) พีเอชบีที่ได้จากการสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ข) พีเอชบีที่ได้จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (ค) และพีเอชบีที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนेट (ง) โดย 3HBME (3-hydroxybutyrate methyl ester) คือ PHB ที่ต้องการหา และ BAME คือ (Benzoic acid methyl ester) ซึ่งใช้ เป็น internal standard

5. การขยายขนาดการผลิตฟิเอชบีโดยใช้สภาวะต้นแบบ

ในการทดลองนี้ได้ทำการขยายขนาดการผลิตฟิเอชบีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 1 ลิตร และ 5 ลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงในภาชนะหมักที่มีพื้นที่เท่ากับ 348.75 ตารางเซนติเมตร (ขนาด 15.5 x 22.5 เซนติเมตร) ซึ่งบรรจุอาหารปริมาตร 100 mL ต่อภาชนะ จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดฟิเอชบีและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ พบว่า การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์เป็นวิธีการสกัดที่ได้ปริมาณฟิเอชบีเหมาะสมที่สุดโดยให้ฟิเอชบีปริมาณมากและให้ ความบริสุทธิ์สูง ดังนั้นในการขยายขนาดการผลิตคณะผู้วิจัยจึงได้ใช้วิธีโซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการสกัดฟิเอชบีจากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 จากการทดลองพบว่า การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารปริมาตร 1 ลิตร และ 5 ลิตร ได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียเท่ากับ 7.54 ± 0.50 g และได้ปริมาณฟิเอชบีเท่ากับ 2.37 ± 0.20 g จากอาหาร 1 ลิตร และได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 40.55 ± 0.03 g และได้ปริมาณฟิเอชบีเท่ากับ 16.82 ± 1.44 g จากอาหาร 5 ลิตร ดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 เปรียบเทียบการผลิตฟิเอชบีจากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01

ในปริมาตรอาหาร 1 ลิตร และ 5 ลิตร

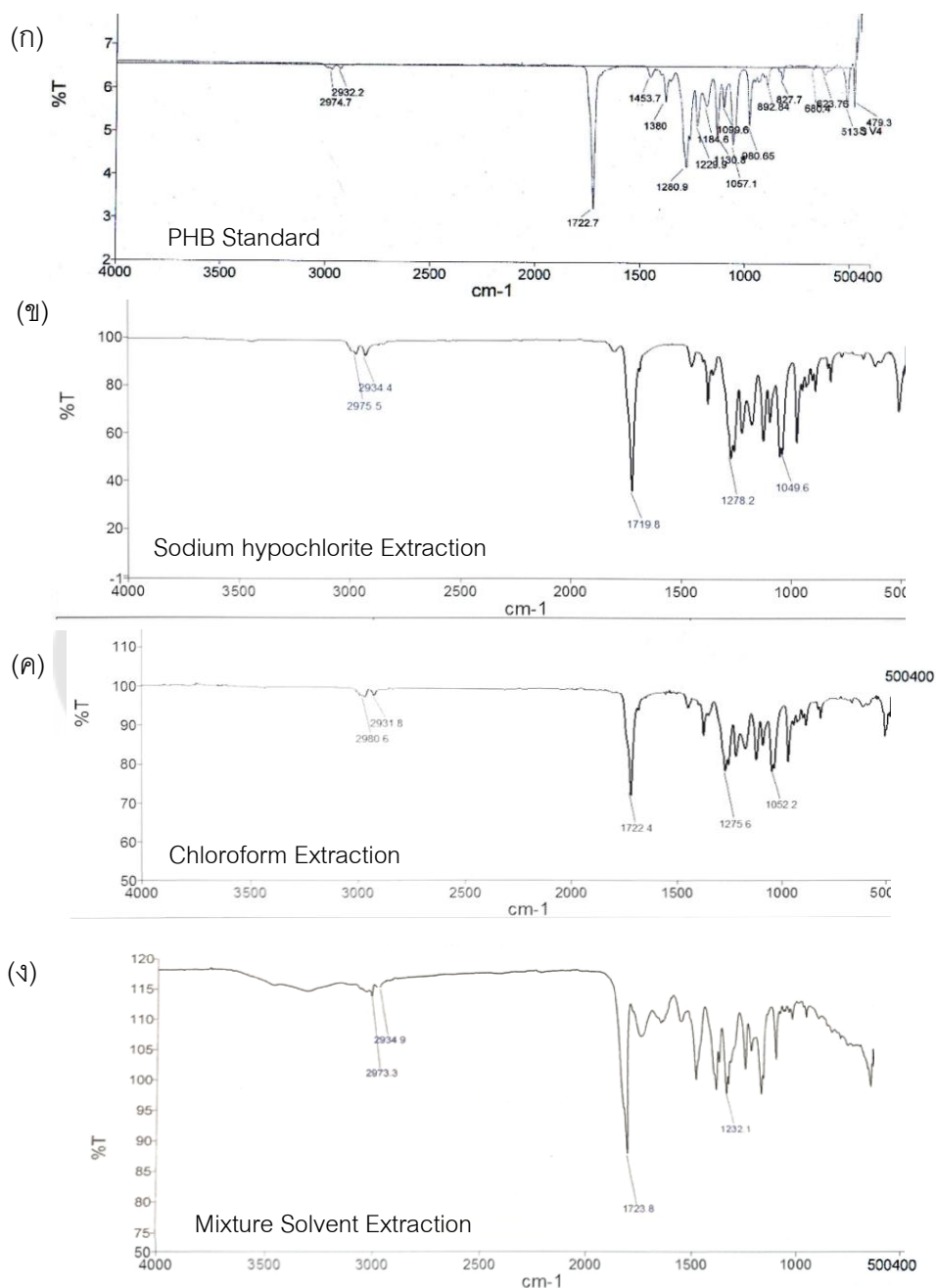
ปริมาตร อาหาร (L)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (g)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง (g/L)	น้ำหนัก ฟิเอชบี (g)	ปริมาณ ฟิเอชบี (g/L)	ร้อยละความ บริสุทธิ์ของ ฟิเอชบี
0.02	0.12 ± 0.01	5.81 ± 0.32	0.08 ± 0.01	3.83 ± 0.23	NA
1	7.54 ± 0.50	7.54 ± 0.50	2.37 ± 0.20	2.37 ± 0.20	86.98
5	40.55 ± 0.03	8.11 ± 0.66	16.82 ± 1.44	3.36 ± 0.22	89.46

6. ศึกษาคุณสมบัติทางพอลิเมอร์ของฟิเอชบี

6.1 วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันเอกลักษณ์ของฟิเอชบี

จากการนำฟิเอชบีที่สกัดได้จากทั้ง 3 วิธีมาวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FT-IR โดยเปรียบเทียบกับฟิเอชบีมาตรฐาน ผลที่ได้พบว่า ฟิเอชบีที่สกัดได้จากทั้ง 3 วิธี มีพิกของหมู่คาร์บอนิล C=O แถบการยืดอยู่ระหว่าง $1719.8 - 1723.8 \text{ cm}^{-1}$ OH stretch แถบการยืดอยู่ระหว่าง $2973.3 - 2980.6 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นพิกที่สำคัญของฟิเอชบี นอกจากนี้ยังพบพิกของหมู่ -CH ที่แถบการ

ยึดอยู่ระหว่าง $1232.1\text{--}1278.2\text{ cm}^{-1}$ ด้วย (ภาพประกอบ 15) ซึ่งสอดคล้องกับพีคของพีเอชบีมาตรฐาน จึงสามารถสันนิษฐานได้ว่าสารสกัดที่ผลิตได้คือ พีเอชบี



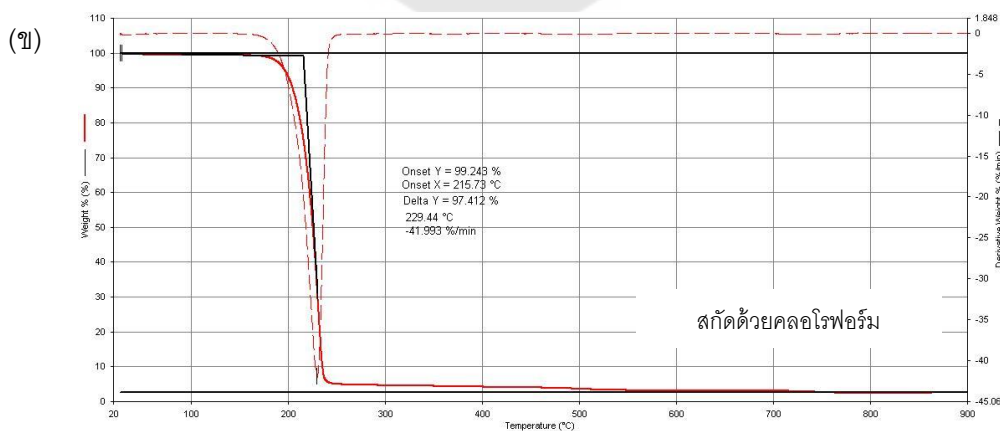
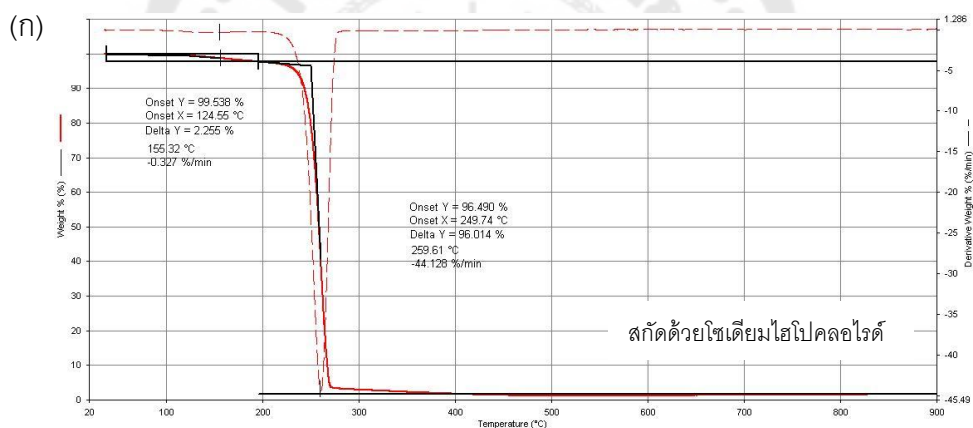
ภาพประกอบ 15 FT-IR ของพีเอชบีมาตรฐานและพีเอชบีที่ได้จากการสกัดจาก 3 วิธี

พีเอชบีมาตรฐาน (ก), พีเอชบีที่ได้สกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ข),
 พีเอชบีที่ได้สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (ค) และพีเอชบีที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายระบบอะซิโตน/
 เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต

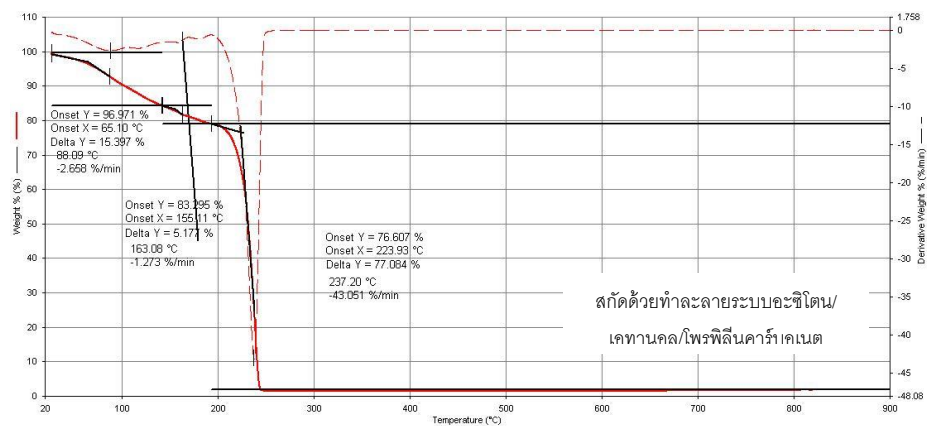
6.2 วิเคราะห์ความเสถียรของพอลิเมอร์ด้วยเทคนิค Thermogravimetric Analysis

6.2.1 วิเคราะห์ความเสถียรของพอลิเมอร์ด้วยเทคนิค Thermogravimetric Analysis (TGA)

จากการศึกษาคุณสมบัติทางความร้อนของพีเอชบีที่ทดสอบด้วย TGA ภายใต้อินโตรเจนของพีเอชบีที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 วิธี ได้แก่ คลอโรฟอร์ม โซเดียมไฮโปคลอไรต์ และตัวทำละลายผสมระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต พบว่า จากเทอร์โมแกรมแสดงร้อยละน้ำหนักคงเหลือกับอุณหภูมิของพีเอชบีที่ได้จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม สกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ และสกัดด้วยตัวทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต เกิดการสลายตัวสูงสุดหลังจาก 249.75 °C, 229.44 °C และและ 237.30 °C ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 16 และเทอร์โมแกรมแสดงร้อยละน้ำหนักคงเหลือกับอุณหภูมิของพีเอชบีมาตรฐานดังภาพประกอบที่ 17



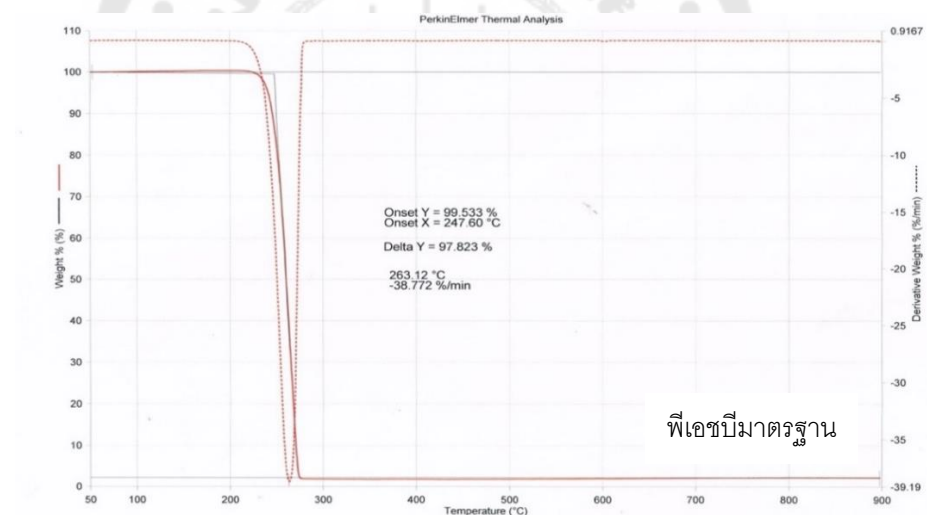
(ค)



ภาพประกอบ 16 เทอโมแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย TGA ของพีเอชบีที่ได้จากการสกัดจาก 3 วิธี

สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (ก) สกัดด้วยไซเตียมไฮโปคลอไรต์ (ข)

และสกัดด้วยทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต (ค)



ภาพประกอบ 17 เทอโมแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย TGA ของพีเอชบีมาตรฐาน

ที่มา : วิสันต์ เชื้อวงศ์ et al. (2561)

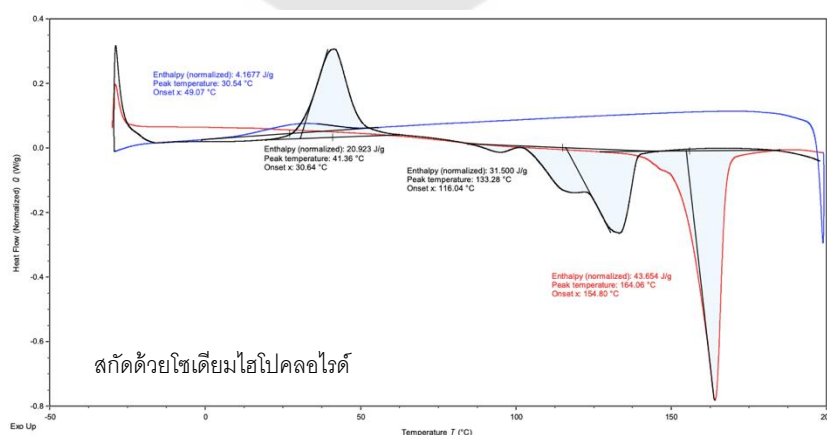
6.2.2 ศึกษาค่าพลังงานความร้อนของพอลิเมอร์ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC)

จากผลการวิเคราะห์ค่าพลังงานความร้อนของพีเอชบีด้วยวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธี ได้แก่ พีเอชบีที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โซเดียมไฮโปคลอไรต์ และสกัดด้วยทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต พบว่า ทั้ง 3 วิธีการสกัด มีค่าอุณหภูมิการเกิดผลึก (Crystallization temperature, T_c) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดผลึกของพอลิเมอร์บางชนิด, อุณหภูมิการหลอมตัวของผลึก (Melting point temperature, T_m) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สายโซ่พอลิเมอร์ส่วนที่เป็นผลึกเปลี่ยนสถานะจากของแข็งเป็นของเหลวร้อยละความเป็นผลึก (% Crystallinity) จากการทดลองพบว่า การสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเป็นวิธีที่ได้ร้อยละการเกิดผลึกสูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 7 และเทอโมแกรมของพีเอชบีที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 วิธีแสดงในภาพประกอบ 18 และเทอโมแกรมของพีเอชบีมาตรฐานแสดงในภาพประกอบ 19

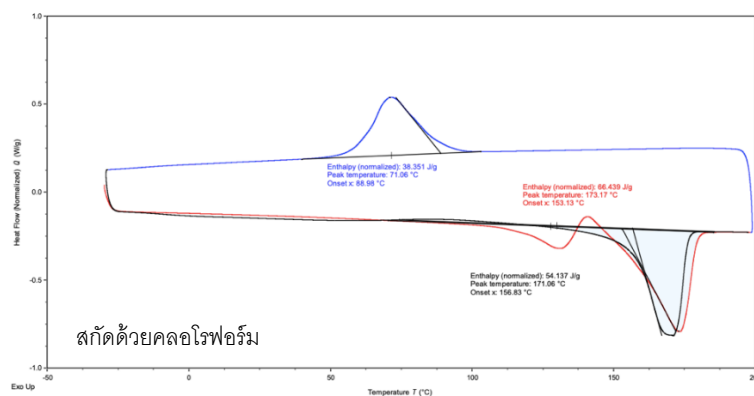
ตาราง 7 คุณสมบัติด้านอุณหภูมิของพีเอชบีที่สกัดได้จากการสกัดทั้ง 3 วิธี

วิธีการสกัด	T_m (°C)	T_c (°C)	% Crystallinity
สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	173.17	71.06	40.349
สกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์	164.06	41.36	29.298
สกัดด้วยทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/ โพรพิลีนคาร์บอนเนต	145.05	50.25	39.139

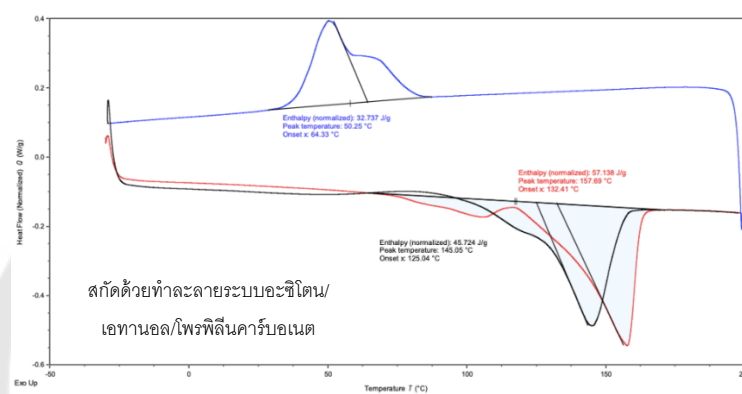
(ก)



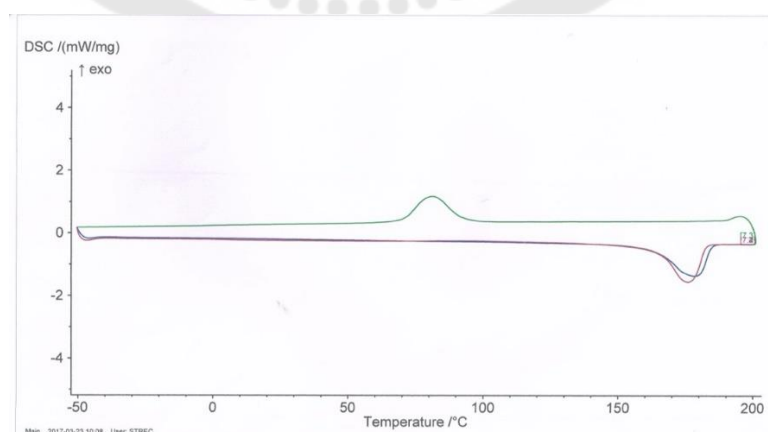
(๑)



(ค)



ภาพประกอบ 18 เทอโมแกรมจากการวิเคราะห์ด้วย DSC ของพีเอชบีที่ได้จากการสกัด สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (ก) สกัดด้วยไซเตียมไฮโปคลอไรต์ (ข) และสกัดด้วยทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต (ค)



ภาพประกอบ 19 จากการวิเคราะห์ด้วย DSC ของพีเอชบีมาตรฐาน

ที่มา : วิสันต์ เชื้อวงศ์ et al. (2561)

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเรื่อง การพัฒนากระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตในแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้แบคทีเรียสะสมพืเอชบีมากที่สุดและศึกษาวิธีการสกัดพืเอชบีจากแบคทีเรียเพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณมากและความบริสุทธิ์ จากนั้นทำการศึกษาคูณสมบัติทางโครงสร้างและทางความร้อนของพืเอชบีที่ได้ หลังจากได้ผลการวิจัยแล้ว สามารถสรุปผลการวิจัย โดยแบ่งหัวข้อในการสรุปผลได้ดังต่อไปนี้

1. สรุปและอภิปรายผลการวิจัย
2. ข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษากระบวนการผลิตพืเอชบีจากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU 01 ตั้งแต่การหมักจนถึงวิธีการสกัดจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ แบคทีเรียนี้สามารถผลิตพืเอชบีได้ในปริมาณมาก ซึ่งการหมักแบคทีเรียเพื่อสังเคราะห์พืเอชบี สามารถหมักได้ทั้ง 2 รูปแบบคือ การหมักในอาหารเหลว (Submerged fermentation) และการหมักบนอาหารแข็ง (solid-state fermentation) แต่กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง สามารถทำการหมักได้ง่ายกว่า เนื่องจากต้องการพลังงานที่ใช้ในการหมักน้อยกว่า ต้องการเงินลงทุนต่ำและความเข้มข้นของสารตั้งต้นของกระบวนการหมักบนอาหารแข็งจะมากกว่าความเข้มข้นในอาหารเหลว ทำให้บนอาหารแข็งได้ปริมาณเซลล์ที่มากกว่า (Sindhu R. et al., 2015) โดยการหมักแบคทีเรียให้เกิดการสะสมพืเอชบีจะต้องทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอแต่ธาตุอื่นๆ มีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้กากน้ำตาล ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูก ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลจากอ้อยเพื่อลดต้นทุนในการผลิต โดยในงานวิจัยชิ้นนี้ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NA ผสมกับกากน้ำตาล และหมักด้วยกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง โดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU 01 ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกมาจากมูลวัวจากการศึกษาก่อนหน้านี้ เพื่อให้แน่ใจได้ว่าแบคทีเรียที่นำมาใช้ในกระบวนการหมักสามารถผลิตพืเอชบีได้ จึงต้องทำการยืนยันการสะสมพืเอชบีโดยวิธีการย้อมแกรนูลของเซลล์แบคทีเรียด้วย Sudan Black B (Srija D. et al., 2018) ถ้าแบคทีเรียผลิตพืเอชบีได้โคโลนีจะติดสีดำ โดยสีย้อม Sudan Black B จะสามารถย้อมสารประเภทลิพิดได้ จากนั้นจึงได้เลือกแบคทีเรียนี้มาใช้ในการผลิตพืเอชบีเพื่อศึกษา

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชปีบนอาหารแข็ง จากผลการศึกษาพบว่า การใช้กากน้ำตาล ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมีมวลต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเซลล์ทำให้ได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียและมีการสะสมฟิเอชปีได้มากที่สุด ซึ่งผลการวิจัยสอดคล้องกับ (Mona K., Azza S., & Omar S. H., 2001) ที่ได้ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตฟิเอชปีในแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* ในอาหารเหลว Growth medium พบว่า ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ทำให้เซลล์สามารถสะสมฟิเอชปีได้มากที่สุดคือ กากน้ำตาลร้อยละ 2 เนื่องจากแบคทีเรียจะเกิดการสะสมฟิเอชปีเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีคาร์บอนมากเกินไป หากใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นต่ำจะทำให้เซลล์แบคทีเรียอยู่ในสภาวะปกติและเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นพลังงานโดยเข้าสู่กระบวนการหายใจระดับเซลล์และใช้ในการเจริญเติบโตโดยไม่เกิดการสะสมฟิเอชปี และหากเซลล์ของแบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะทำให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตได้น้อยลงเนื่องจากเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับแอกทิวิตีของน้ำ (water activity) ภายในเซลล์ (Verliden R. et al., 2007) นอกจากนี้จะทำให้แบคทีเรียชนิดนี้สร้างสปอร์ได้อีกด้วย เมื่อทราบถึงความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชปีแล้ว จึงได้นำมาใช้ในการศึกษาปริมาณเชื้อ เริ่มต้นที่เหมาะสมในการเป็นหัวเชื้อเพื่อผลิตฟิเอชปีโดยการวัดค่าความขุ่นหรือการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm พบว่าที่ความยาวคลื่นนี้เท่ากับ 1 หน่วย ได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียมากที่สุดและเซลล์มีการสะสมฟิเอชปีได้มากที่สุด ซึ่งหากความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นน้อยเกินไปจะทำให้ได้ปริมาณแบคทีเรียน้อยไม่เหมาะสมกับอาหารที่ใช้ในการผลิต (อาหารมากแต่แบคทีเรียน้อย) แต่หากปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้เกิดการแข่งขันแย่งสารอาหารระหว่างเซลล์แบคทีเรีย (competition between the organisms) ทำให้ผลิตฟิเอชปีได้น้อย (Srija D. et al., 2018) เมื่อทราบความเข้มข้นของกากน้ำตาลและเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมแล้ว จึงได้ทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในหมักเพื่อผลิตฟิเอชปีของแบคทีเรีย โดยพบว่า เวลา 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการหมักแบคทีเรียบนอาหารแข็ง เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่แบคทีเรียที่ได้จากการเพาะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหมดพอดี ถ้าใช้เวลาในการหมักนานเกินไปจะทำให้ฟิเอชปีน้อยเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ Death phase เนื่องจากอาหารหมด เชื้อจะนำอาหารสำรองมาใช้จนหมดและตาย จากนั้นทดลองนำความเข้มข้นของกากน้ำตาล ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นและระยะเวลาที่เหมาะสมมาศึกษาปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะแบคทีเรียบนจานเพาะเชื้อที่มีพื้นที่หน้าตัด 56.75 ตารางเซนติเมตร พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ 20 mL เป็นปริมาณอาหารที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้แบคทีเรียสะสมฟิเอชปีได้มากที่สุดในสภาวะดังกล่าว เนื่องจากทำให้ปริมาณสารอาหารเพียงพอกับการหมักเซลล์แบคทีเรียที่ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นและเวลาที่ 24

ชั่วโมง ถ้าปริมาณอาหารน้อยไป แบคทีเรียก็จะโตช้าหรือปริมาณอาหารมากเกินไปก็ไม่สามารถเพิ่มปริมาณของพีเอชบีได้ เนื่องจากถูกจำกัดด้วยพื้นผิวหน้าอาหาร

เมื่อทราบสถานะต้นแบบในการสกัดพีเอชบีแล้ว คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาวิธีการสกัดพีเอชบี โดยในการสกัดพีเอชบีจากเซลล์ของแบคทีเรียจะต้องทำการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อให้สามารถปลดปล่อยพีเอชบีออกมาจากเซลล์ เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้ *Bacillus megaterium* ในการผลิตพีเอชบี ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีผนังเซลล์หนา ซึ่งอาจจะไม่สามารถใช้วิธีทั่วไปในการสกัดได้ (Sabeel P., Valappil R., Christopher B., & Ipsita R., 2007) ในการวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบวิธีการสกัดพีเอชบีด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) 3 วิธี ได้แก่ คลอโรฟอร์ม และตัวทำละลายผสมระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต และสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ซึ่งเป็นสารประกอบคลอไรต์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ จากการศึกษาวิธีการสกัดพีเอชบีจากแบคทีเรียด้วยการตัวทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต ซึ่งเป็นสารที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์และคลอโรฟอร์ม พบว่า การสกัดพีเอชบีจากแบคทีเรียด้วยตัวทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนตเป็นวิธีการสกัดที่ทำให้ได้ปริมาณพีเอชบีมากที่สุด เนื่องจากตัวทำละลายผสมระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนตมีสภาพขี้ไคลใกล้เคียงกับพีเอชบีมากที่สุด ทำให้สกัดพีเอชบีออกมาจากเซลล์ของแบคทีเรียได้มาก (ธีระพล วงศ์ชนะพิบูลย์, 2556) อีกทั้งยังเป็นระบบตัวทำละลายที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่ากระบวนการผลิตทั่วไปที่นิยมใช้คลอโรฟอร์มในการสกัด (Tao F. et al., 2016) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพีเอชบีที่ได้จากการสกัดโดยใช้เทคนิค gas chromatography โดยวิเคราะห์ความบริสุทธิ์จากการเปรียบเทียบอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของพอลิเมอร์ต่อพื้นที่ใต้พีคทั้งหมด พบว่า การสกัดด้วยคลอโรฟอร์มให้ร้อยละความบริสุทธิ์ของพีเอชบีเท่ากับ 83.97 การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ให้ร้อยละความบริสุทธิ์ของพีเอชบีเท่ากับ 90.60 และการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนตมีร้อยละความบริสุทธิ์เท่ากับ 82.98 จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมดังกล่าวมีร้อยละความบริสุทธิ์น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์และคลอโรฟอร์ม เนื่องจากการสกัดด้วยระบบตัวทำละลายผสมนี้ต้องใช้ตัวทำละลายหลายชนิดเพื่อให้สภาพขี้ไคลของตัวทำละลายผสมมีสภาพขี้ไคลใกล้เคียงกับพอลิเมอร์มากที่สุด ทำให้ในการล้างตะกอนของพอลิเมอร์มีความยุ่งยากมากขึ้นเนื่องจากตัวทำละลายบางชนิดไม่ละลายและไม่สามารถล้างออกได้โดยการชะล้างจากการล้างตะกอนและไม่สามารถระเหยได้โดยการอบที่ 60 °C ทำให้ยังคงหลงเหลือตัวทำละลายอยู่ส่งผลให้พอลิเมอร์มีความบริสุทธิ์ต่ำ

อีกทั้งยังใช้ตัวทำลายในการสกัดในปริมาณมาก ทำให้ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม และในการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเป็นวิธีการสกัดที่ทำให้ได้ปริมาณฟิโอสปีออกมาน้อยที่สุด เนื่องจากฟิโอสปีสามารถละลายในคลอโรฟอร์มได้ดีมาก ดังนั้นในการทำการตกตะกอนให้พอลิเมอร์เกิดผลึกใหม่ (Recrystallization) จึงทำได้ยาก ทำให้ปริมาณผลึกฟิโอสปีน้อย (Tao F. et al., 2016) ดังนั้นในการขยายขนาดการผลิตฟิโอสปีคณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการสกัดฟิโอสปีจากเซลล์แบคทีเรียซึ่งให้ความบริสุทธิ์สูง และการสกัดทำได้ง่ายกว่าทั้ง 2 วิธี แต่อย่างไรก็ตามในการสกัดฟิโอสปีด้วยวิธีนี้ต้องคอยตรวจสอบปริมาณ active chlorine ในสารละลาย ซึ่งอาจจะลดน้อยลงตามอายุการใช้งานของสารภายหลังจากการเปิดใช้และส่งผลกระทบต่อ การสกัดฟิโอสปี ทำให้มีการปนเปื้อนของเศษซากเซลล์ได้ส่งผลให้ค่าความบริสุทธิ์ลดลง

เมื่อทำการนำสภาวะต้นแบบที่เหมาะสมที่ทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตฟิโอสปีได้มากที่สุด และวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่สุดแล้ว คณะผู้วิจัยได้ทำการขยายขนาดการผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 1 ลิตร และ 5 ลิตร โดยทำการขยายขนาดการผลิตจากจานเพาะเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 mm. มาเพาะเลี้ยงในภาตสแตนเลส ขนาด 15.5 x 22.5 เซนติเมตร โดยในการเตรียมอาหารจะเตรียมจากการเตรียมอาหารเหลว NB ที่มีกากน้ำตาลเป็นส่วนผสมร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันสูงก่อน จากนั้นจึงแบ่งมาทำการเตรียมอาหารแข็งครั้งละ 100 mL ในขวดรูปชมพู่แล้วเติมผงวุ้น Agar ลงไป แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟแล้วเทอาหาร ลงภาตเพื่อขึ้นรูปเป็นอาหารแข็ง แล้วปิเปตเชื้อแบคทีเรียลงไปบนภาตอาหารที่เตรียมไว้ในตู้ผลิต เชื้อ แล้วทำการบ่มเชื้อในกล่องพลาสติกที่ทำความสะอาดด้วย 70 %เอทานอลแล้ว เพื่อเป็นการ ป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ และทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย โดยทำการเตรียม อาหารด้วยวิธีเดียวกันแต่ไม่ได้ปิเปตเชื้อแบคทีเรียลงไปบนอาหาร 1 ภาต นำไปบ่มพร้อมกับภาตที่มี การบ่มเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากภาตอาหารที่ไม่มีการปิเปตเชื้อแบคทีเรียลงไปมี โคโลนีของแบคทีเรียเกิดขึ้น แสดงว่าขั้นตอนการเตรียมอาหารอาจมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จาก ผลการทดลองพบว่า ในการขยายขนาดการผลิต สามารถผลิตฟิโอสปีได้ 3.27 ± 0.20 g/L และ 3.36 ± 0.22 g/L และมีร้อยละความบริสุทธิ์เท่ากับ 86.98 และ 89.46 บนอาหารปริมาตร 1 ลิตร และ 5 ลิตร ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในการขยายขนาด การผลิต มีขั้นตอนการเตรียมอาหารที่ค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากในการเตรียมแบบขยายขนาดการ ผลิตจำเป็นต้องเตรียมอาหารเหลวแล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันสูงแยกแล้วเติมผง วุ้นทีหลัง เนื่องจากหากเติมผงวุ้นลงไปทำการฆ่าเชื้อเลยอาจทำให้ผลวุ้นเกิดการแข็งตัวก่อน ทำให้

ไม่สามารถเทอาหารลงในถาดได้ ดังนั้น กระบวนการหมักบนอาหารแข็งจึงอาจจะไม่เหมาะกับการทำในระดับอุตสาหกรรม

ในการผลิตพีเอชบี เมื่อทำการสกัดแล้วจำเป็นต้องตรวจสอบเอกลักษณ์ของพอลิเมอร์เพื่อทำการยืนยันชนิดของพอลิเมอร์โดยทำการทดสอบคุณสมบัติทางโครงสร้างโดยการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันเอกลักษณ์ของพีเอชบีด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) พบว่า พีเอชบีที่ได้จากการสกัดมีพีคเอกลักษณ์ที่สอดคล้องกับพีเอชบีมาตรฐานโดยมีพีคของหมู่คาร์บอนิล (-C=O) แถบการยืดอยู่ระหว่าง $1719.8 - 1723.8 \text{ cm}^{-1}$ และพีคของหมู่ไฮดรอกซี (-OH stretch) แถบการยืดอยู่ระหว่าง $2973.3 - 2980.6 \text{ cm}^{-1}$ และมีผล FT-IR spectra ที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Raveendran S. และคณะ ที่ทำการศึกษากาการผลิตพีเอชบีโดยใช้กลีเซอรอลและการศึกษาคุณสมบัติของพีเอชบีจาก *Bacillus sphaericus* NII 0838 (Raveendran S. et al., 2011) เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติทางความร้อนของพีเอชบีด้วยเทคนิค Thermogravimetric Analysis (TGA) และ Differential Scanning Calorimetry (DSC) พบว่า จากการวิเคราะห์ด้วย TGA พีเอชบีที่สกัดได้จากทั้ง 3 วิธี มีช่วงอุณหภูมิที่ทำให้พอลิเมอร์เกิดการสลายตัวได้มากที่สุดใกล้เคียงกันกับพีเอชบีมาตรฐาน (พีเอชบีที่สกัดด้วยด้วยคลอโรฟอร์ม สกัดด้วยไซเดียมไฮโปคลอไรต์ และสกัดด้วยทำละลายระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนต เกิดการสลายตัวสูงสุดที่อุณหภูมิ 249.75°C , 229.44°C และ 237.30°C ตามลำดับ) ซึ่งผลการวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Basavaraj H. ที่ได้ทำการทดสอบเอกลักษณ์ของพีเอชบี (Characterization) จาก *Bacillus cereus* PW3A พบว่าพีเอชบีที่สกัดได้เกิดการสลายตัวสูงสุดที่อุณหภูมิ 214.9°C (Basavaraj H., 2015) และจากการวิเคราะห์ด้วย DSC ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาปริมาณความร้อนและการเปลี่ยนแปลงความร้อนที่เกี่ยวข้องกับอุณหภูมิของพอลิเมอร์ พบว่า พีเอชบีที่สกัดได้จากทั้ง 3 วิธีการสกัด มีค่าอุณหภูมิการเกิดผลึก (T_c) อยู่ในช่วง $145.05 - 173.17^\circ\text{C}$, อุณหภูมิการหลอมตัวของผลึก (T_m) อยู่ในช่วง $41.36 - 71.06^\circ\text{C}$ และมีร้อยละความเป็นผลึก (% Crystallinity) อยู่ในช่วง $29.30 - 40.35^\circ\text{C}$ โดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มให้ค่าอุณหภูมิการเกิดผลึก, อุณหภูมิการหลอมตัวของผลึกและร้อยละความเป็นผลึกมากที่สุดเมื่อเทียบกับอีก 2 วิธี เนื่องจากการสกัดที่ผ่านกระบวนการที่ส่งผลต่อการคลายตัวของสายพอลิเมอร์น้อยที่สุด เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยระบบตัวทำละลายผสมระบบอะซิโตน/เอทานอล/โพรพิลีนคาร์บอนเนตที่ได้ทำการ Sonication ก่อน ซึ่งส่งผลต่อความเป็นผลึกของสายพอลิเมอร์ได้ รวมถึงการสกัดด้วยไซเดียมไฮโปคลอไรต์ ซึ่งเป็นการสกัดด้วยสารประกอบคลอไรด์ที่สามารถกัดกร่อนโครงสร้างของพอลิเมอร์และส่งผลต่อความเป็นผลึกของพอลิเมอร์ได้เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sergio L. และคณะ

ที่ได้ศึกษาความบริสุทธิ์และเอกลักษณ์ของพีเอชบีใน *Cupriavidus necator* โดยทำการสกัดด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) พบว่า พีเอชบีมีค่า melting point (T_m) ประมาณ $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ ขณะที่ได้ค่าอุณหภูมิการเกิดผลึก (T_c) ประมาณ $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sergio L. et al., 2010) ซึ่งค่อนข้างที่จะแตกต่างจากค่าอุณหภูมิการเกิดผลึกในงานวิจัยนี้เนื่องจากในการสกัดด้วยวิธีที่ต่างกัน ทำให้ได้ร้อยละการเกิดผลึกที่ต่างกัน ทำให้อุณหภูมิการเกิดผลึก (T_c) ต่างกันเช่นกัน ซึ่งในงานวิจัยนี้ การสกัดด้วยวิธีที่ต่างกันมีผลต่อร้อยละการเกิดผลึกของพอลิเมอร์โดยการสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์เป็นการสกัดที่ทำให้ได้ร้อยละการเกิดผลึกน้อยที่สุด อาจเนื่องมาจากคลอรีนไปทำลายสายพอลิเมอร์และทำให้โครงสร้างของพอลิเมอร์เปลี่ยนไปได้ และทำให้การเกิดผลึกน้อยลง (Aneesh B., Arjun J., & Harikrishnan K., 2018)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิในการบ่มเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้การผลิตพีเอชบีคงที่
2. โซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ใช้ในการสกัดควรตรวจสอบปริมาณ active chloride อย่างสม่ำเสมอ เนื่องจากมีผลต่อความบริสุทธิ์ของพอลิเมอร์ที่มีสกัดได้
3. ลดการเกิดการปนเปื้อนจากการหมักโดยการเทอาหารแข็งและลงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- Aneesh B., Arjun J., & Harikrishnan K. (2018). Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* and EDTA–microwave-assisted cell lysis for polymer recovery. *AMB Express*, 8(1), 142-146.
- Ashok P. (2008). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering*, 13(2-3), 81-84.
- Basavaraj H. (2015). Production and characterization of thermostable polyhydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PW3A. *Journal of Biochemical Technology*, 6, 990-995.
- Brian S., Jordan M., Ashik S., Asif R., Ronald S., & Charles M. (2013). Propylene Carbonate Extraction for Recovery of Poly-3-hydroxybutyrate. *SBI Science & Technology*, 9(6), 454 - 461.
- Bucci D. , Tavares L., & Sell I. (2007). Biodegradation and physical evaluation of PHB packaging. *Polymer Testing*, 26(7), 908-915.
- Fabiane C., & Oliveira A. (2006). Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 98, 633-638.
- Fabiane C., & Oliveira A. (2006). Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 98, 33-638.
- Iftikhar A., & Nazia., J. (2018). Biosynthesis and Characterization of Poly3-hydroxyalkanoate (PHA) from Newly Isolated Bacterium *Bacillus* sp. AZR-1. *Iranian Journal of Science and Technology*, 42(2), 371-378.
- Indira M., Abraham K., Venkates W., John B., & Vidya K. (2014). Isolate, Screening and Extraction of Polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacteria from Sewage sample. *International Journal of PharmTech*, 6(2), 850-857.
- Jayven C., Joseph K., Warintorn T., Zibiao L., & Chaobin H. (2018). Recent advances in the development of biodegradable PHB-based T toughening materials:

- Approaches, advantages and applications. *Materials Science and Engineering*, 69(2), 1092-1116.
- Jimmy A. López, Javier M. Naranjo, Juan C. Higueta, Maria A. Cubitto, Carlos A. Cardona, & Villar, M. A. (2012). Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain: Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17, 250-258.
- Lee W., Loo C., Nomura C., & Sudesh K. (2018). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresource Technology*, 99(15), 6844-6851.
- Mona K., Azza S., & Omar S. H. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 156, 201-207.
- Musaalbakri M., & Webb C. (2017). Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 4(1), 1-25.
- Obruca Stanislav; et al. (2014). Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 58-83. doi:10.1007/s00253-014-5653-3
- Puechkaset. (2017). กาบน้ำตาล ประโยชน์ และวิธีทำกาบน้ำตาล. Retrieved from <https://puechkaset.com/>
- Raveendran S., B., A., Parameswaran B., Deepthi R., Ramachandran K., Soccol C., & Pandey A. (2011). Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from crude glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and improving its thermal properties by blending with other polymers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 783-794.
- Ross G., Ross S., & Brian J. Tighe. (2017). Bioplastics: New Routes, New Products. In M. Gilbert (Ed.), *Brydson's Plastic MAterials* (pp. 631-642): Butterworth-Heinemann.

- Sabeel P., Valappil R., Christopher B., & Ipsita R. (2007). Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91, 1–17.
- Santos A., Valentina L., Schulz A., Adriana M., & Tomaz D. (2017). From Obtaining to Degradation of PHB: Material Properties. *Ingeniería y Ciencia*, 13(26), 296-298.
- Sergio L., De Rooy, Endang Tri Wahyuni, Wiratni Wiratni, Siti Syamsiah, & Jamil Ismail. (2010). Purification and Characterization of Poly-hydroxybutyrate (PHB) in *Cupriavidus necator* *Indo. J. Chem*, 7(3), 243-248.
- Sindhu R., Ammu B., Binod P., Sreelatha K., Ramachandran K. B, Carlos R., & P.', A. (2011). Production and Characterization of Poly-3-hydroxybutyrate from Crude Glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and Improving Its Thermal Properties by Blending with Other Polymers *ResearchGate*, 54(4), 783-794.
- Sindhu R., Ashok P., & Binod P. (2015). Solid-state Fermentation for the Production of Poly(hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering*, 29(2), 173-181.
- Songsri K., Atipol B., Bunyarit M., & Nuttha T. (2009). Inexpensive Fed-Batch Cultivation for High Poly(3-hydroxybutyrate) Production by a New Isolate of *Bacillus megaterium*. *Bioscience and Bioengineering*, 103(3), 240-245.
- Srija D., Amrita M., Vasu S., Priya S., & Radha P. (2018). Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) from Cheese Whey by *Bacillus megaterium* NCIM 5472. *journal of polymers and the environment*, 26, 4176-4187. .
- Stanislav O., Sinisa P., Pavla B., & Zdenek S. (2014). Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 58-83.
- Sudesh K., & Doi H. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates:biological polyesters. *Polymer Science*, 25, 1503-1555.
- Tao F., Stacy C., Zhiyou W., Lei W., & Tong Wang. (2016). Effect recovery of Poly-beta-hydroxybuterate (PHB) biopolymer from *Cupriavidus necator* using a novel and environmentally friendly solvent system. *American insititute of Chemical Engineers*, 32(3), 1-7.

- Uma M., & Stella M. (2017). A Comparative study on the PHB production by *Bacillus* Species under Solid State Fermentation by Agricultural wastes. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 1473-1487.
- Verliden R., Hill D., Kenward M., Williams C., & Radecka I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1437-1449.
- ไบโอ-อีโค. (2562). วงจรการย่อยสลาย ไบโอ-อีโค. Retrieved from <https://www.bio-eco.co.th/promotions.html?store=th>
- ชนะสิทธิ์, ว. (2553). ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต). (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- ชนันต์พิณรุฑ, ว. (2545). จุลนศาสตร์การเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและอะมิเลสโดย *Aspergillus oryzae* ด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง. วารสารมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ถนนแก้ว, พ. (2553). โพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต: พลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้ง่าย. วารสารศูนย์วิชาการมหาวิทยาลัยขอนแก่น(18).
- ธีระพล วงศ์ชนะพิบูลย์. (2556). เคมีพอลิเมอร์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปิยาภรณ์ วงศ์ศิริกุล, เทวัญ หยุ่น, นิชา ไพจิตร, & สังข์รักษ์, ก. (2557). การสกัดและการทำให้บริสุทธิ์พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตจากเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* ด้วยไบโรมีเลนจากสัปะรด. *Princess of Naradhiras University*, 1, 105-116.
- วงศ์ชนะพิบูลย์, พ. (2556). เคมีพอลิเมอร์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วันกุล ชนะสิทธิ์. (2553). ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต). In วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา. กรุงเทพฯ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิสันต์ เชื้อวงศ์, กตัญญู ชุกกลิ่น, กนกพรรณ อนันต์สกุลชัย, ปาณิสรา ลิ้มเทียน, ศิริขวัญ พลประทีป, & ธิปไตย วัฒนวิจารณ์. (2561). การใช้ขาน้อยและกากน้ำตาลในการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตโดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว, 2, 99-112.

ศุภรัตน์ จูฑิตรัตนอัศว. (2561). การผลิตพลาสติกชีวภาพพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำมัน
ปาล์มโดยใช้เชื้อ Pseudomonas aeruginosa TISTR 1287. วารสารวิชาการเทคโนโลยี
อุตสาหกรรม, 2, 24-36.

ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. (2553). การศึกษาลักษณะและการวิเคราะห์พอลิเมอร์.

Retrieved from

www.thaiplastics.org/content.../thailand_polymer_instrument_di.pdf.

สถาบันพลาสติก. (2554). โปโพลาสติกพอลิเมอร์แห่งอนาคต. *The world of plastic magazine*, 08-02.

สุขสวัสดิ์ ศิริวิมล, & วสุ ปฐมอารีย์. (2556). บทบาทของแบคทีเรียต่อพลาสติกชีวภาพ วารสาร
วิทยาศาสตร์ มศว, 28(2).

อนุพันธ์ ยังปรีดา. (2558). การหาจุดที่เหมาะสมในการย่อยสลายพอลิแลกไทด์ด้วยเอนไซม์จาก
Actinomadura keratinilytica สายพันธุ์ T16-1. (ปริญญาานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา)).
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นส่วนผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ

เตรียมอาหารแข็ง (NA) ที่มีกากน้ำตาลในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 4 และ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

1. เจือจางกากน้ำตาล 1 g ในน้ำกลั่น 100 mL
2. นำกากน้ำตาลที่เจือจางแล้วไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NB (Nutrient Broth) ที่ประกอบไปด้วย peptone 0.5 g, NaCl 0.5 g, meat extract 0.15 g และ yeast extract 0.15 g กับผงวุ้น Agar (Nutrient Agar; NA) 1.5 g จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทั้งหมด 100 mL
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของกากน้ำตาลไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที
4. นำอาหารที่ฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วมาเทในจานเพาะเชื้อเพื่อขึ้นรูปเป็นอาหารแข็ง ปริมาตร 20 mL ต่อจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว 15 นาทีในตู้ปลอดเชื้อ เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C เตรียมใช้งาน
5. ในการเตรียมอาหารแข็งที่มีกากน้ำตาลเป็นส่วนผสมความเข้มข้นร้อยละ 2, 4 และ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้เจือจางกากน้ำตาล 2, 4 และ 6 กรัม ตามลำดับ แล้วทำการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

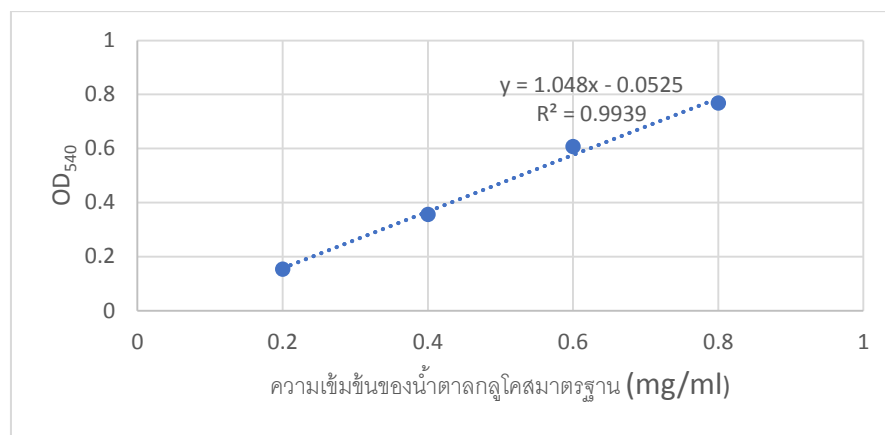


ภาคผนวก ข

การคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีวซ์และน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาล

1.1 จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.5, 0.4, 0.6 และ 0.8 mg/mL มาสร้างกราฟมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่า สามารถสร้างกราฟมาตรฐานได้ ดังภาพประกอบ 20



ภาพประกอบ 20 กราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1.2 จากการเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาล พบว่า กากน้ำตาลที่ทำการเจือจาง 10 เท่า, 100 เท่า, 1,000 เท่า และ 10,000 โดยเตรียมจาก Stock solution ที่มีความเข้มข้น 150 mg/mL แล้วทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 nm ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ตัวแปล x) ที่ได้จากการคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน มีค่าดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการคำนวณ

ความเข้มข้นของ กากน้ำตาล	OD ₅₄₀ กากน้ำตาล	ปริมาณน้ำตาล (mg/ml)	1x	หมายเหตุ
10x	0.958	1.016701881	10.1670188	ใช้ไม่ได้ค่าODเกิน
100x	0.247	0.301338163	30.1338163	
1000x	0.003	0.05483449	54.8344904	ใช้ไม่ได้ค่าODไม่ขึ้น
10000x	0.002	0.055840628	558.406278	ใช้ไม่ได้ค่าODไม่ขึ้น

3. คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกากน้ำตาลที่เจือจาง 100 เท่า

จะได้ กากน้ำตาล 150 mg/mL มี reducing sugar 30.1338 mg/mL

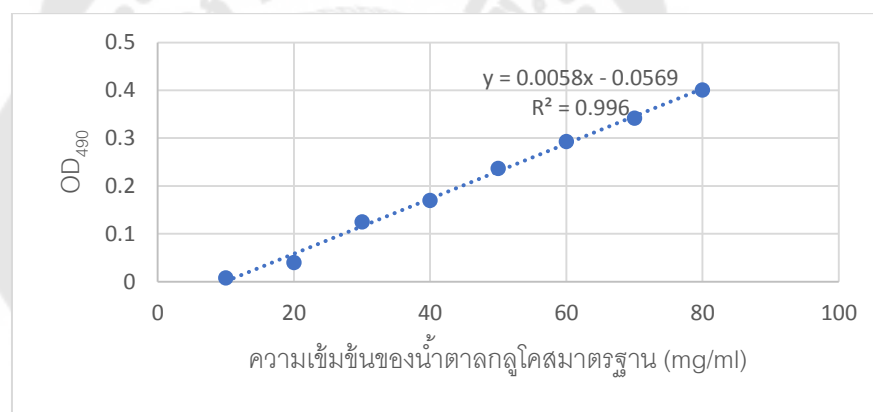
ดังนั้น กากน้ำตาล 100 mg/mL มี reducing sugar 20.086 mg/mL

ดังนั้น กากน้ำตาลที่นำมาทำการทดลอง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ร้อยละ 20.09

โดยมวลต่อปริมาตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล

2.1 จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 10 ความเข้มข้น (0-100 $\mu\text{g/mL}$) มาสร้างกราฟมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่า สามารถสร้างกราฟมาตรฐานได้ ดังภาพประกอบที่ 21



ภาพประกอบ 21 กราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสที่ใช้ในการเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

2.2 จากการเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล พบว่า กากน้ำตาลที่ทำการเจือจาง 10 เท่า, 100 เท่า, 1,000 เท่า และ 10,000 โดยเตรียมจาก Stock solution ที่มีความเข้มข้น 150 mg/mL แล้วทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด (ตัวแปร x) ที่ได้จากการคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน มีค่าดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการคำนวณ

[molasses]	OD ₄₉₀	Total sugar (ug/ml)	Total sugar x factor dilute	%Total sugar
10x	3	304.5353	3045.3535	over
100x	2.345	238.3737	23837.374	over
1000x	0.698	72.0101	72010.101	48.00
10000x	0.082	9.7878	97878.788	65.25

2.3 คำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เจือจาง 1000 เท่า

ความเข้มข้นกากน้ำตาลเริ่มต้น = 150 mg/mL (กากน้ำตาล 0.15 g ในน้ำ 1 mL)

กากน้ำตาล 150 mg/mL มีน้ำตาลทั้งหมด 72.01 mg/mL

กากน้ำตาล 100 mg/mL มีน้ำตาลทั้งหมด 48.00666667 mg/mL

ดังนั้น กากน้ำตาลที่นำมาทำการทดลอง มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่ร้อยละ 48.00 โดย
มวลต่อปริมาตร



ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของพีเอชบีที่ได้จากการสกัด

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของพีเอชบีที่ได้จากการสกัด

1. อินทิเกรตพื้นที่ใต้พีคของพีเอชบี internal standard และพื้นที่ใต้พีคของ impurity จากโปรแกรม Labsolution
2. คำนวณ Normalized area ของพีเอชบีจากอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคของพีเอชบีต่อพื้นที่ใต้พีคของ internal standard
3. คำนวณ Normalized area ของ impurity ทั้งหมดจากอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคของ impurity ต่อพื้นที่ใต้พีคของ internal standard
4. คำนวณร้อยละความบริสุทธิ์ (% purity) ดังสมการตามสูตรด้านล่าง ผลการทดลองเป็นไปดังตารางที่ 10

$$\text{ร้อยละความบริสุทธิ์} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของพีเอชบี} / \text{พื้นที่ใต้พีคของ Internal standard}}{\text{พื้นที่ใต้พีคทั้งหมด} / \text{พื้นที่ใต้พีคของ Internal standard}} \times 100$$

ตาราง 10 ผลการ Normalization ของ PHB, Impurity และร้อยละความบริสุทธิ์จากการสกัด

วิธีการสกัด	Normalized area	Total Normalized	Total Normalized	%purity
	of PHB	area of impurity	area	
NaOCl	2.2293	0.13387	2.3631	94.3352
AEP	2.1744	0.6567	2.8311	76.8036
CHCl ₃	1.5177	0.2634	1.7811	85.2116



ภาคผนวก ง
กาวีเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติในหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟิเอชบีของ
แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* SWU01 ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 26.0

1. ความเข้มข้นของกากน้ำตาล

CDW

	concentratio n	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan ^a	4%	3	.736133			
	NB	3		2.597100		
	1%	3			3.522400	
	2%	3				4.900033
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PHB

	Concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	4%	3	.124367		
	0%	3	.236167	.236167	
	1%	3		.326533	
	2%	3			1.119300
	Sig.		.066	.124	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2. ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น

CDW

Duncan^a

OD	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1.25	3	1.464233	3.076167	4.672393
0.5	3	1.984667		
0.25	3			
1.75	3			
1.0	3			
1.5	3			
1.0	3			5.115967
Sig.		.154	1.000	.255

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PHB

Duncan^a

OD	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1.50	3	1.723900	4.250833
0.50	3	1.955200	
0.25	3	2.606467	
2.00	3		
1.75	3		
1.00	3		
7	3		5.581933
Sig.		.248	.098

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

3. ระยะเวลาที่เหมาะสม

CDW

			Subset for alpha = 0.05	
	time	N	1	2
Duncan ^a	72	3	3.319633	
	48	3	3.575367	
	24	3		5.339567
	Sig.		.416	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PHB

			Subset for alpha = 0.05		
	time	N	1	2	3
Duncan ^a	72	3	.211733		
	48	3		.682733	
	24	3			2.472267
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4. ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ

CDWDuncan^a

volume	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
10	3	1.489967			
12.5	3		2.416333		
17.5	3		2.778900		
15	3		2.878533		
22.5	3			3.795933	
20	3				5.808033
25	3				5.929833
Sig.		1.000	.091	1.000	.624

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PHBDuncan^a

volume	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
12.5	3	.547933				
10	3	.615300	.615300			
22.5	3		1.036433	1.036433		
17.5	3			1.145433		
15	3			1.472333		
25	3				2.195500	
20	3					3.827800
Sig.		.752	.064	.067	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	แพรวสุภา เหล่าศิริ
วัน เดือน ปี เกิด	6 กรกฎาคม 2537
สถานที่เกิด	จังหวัดขอนแก่น
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2560 ปริญญาตรี หลักสูตรการศึกษาระดับบัณฑิต สาขาวิชาเคมี จากมหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2562 ปริญญาโท หลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	128 หมู่ 2 ตำบลแวงใหญ่ อำเภอแวงใหญ่ จังหวัดขอนแก่น 40330

