สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ i

บทคัดย่อภาษาไทย ii

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ iii

บทสรุปผู้บริหาร iv

สารบัญ v

สารบัญตาราง vi

สารบัญรูป vii

บทที่ 1 บทนำ 1-22

1.1 ความสำคัญ ที่มา และปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 1

1.3 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง 1

1.3.1 Polyhydroxybutyric acid(PHB) 1

1.3.2 การนำ PHB ไปใช้ประโยชน์ 6

1.3.3 การทดสอบความสามารถของพลาสติกชีวภาพในการย่อยสลายทางชีวภาพและความเป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม 8

1.3.4 วัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิต PHB 11

1.3.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต PHB 16

บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง 23-36

2.1 วัสดุอุปกรณ์ 23

2.2 วิธีการทดลอง 25

2.2.1 การบำบัดน้ำแช่ข้าวโพด 25

2.2.2 การบำบัดกากน้ำตาล 27

2.2.3 วิธีเตรียมอาหารสูตร DSMZ medium 28

2.2.4 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดต่างๆ เพื่อผลิต PHB 28

2.2.5 การเพาะเลี้ยง *Bacillus megaterium* 28

2.2.6 การเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* 29

2.2.7 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดต่างๆ 30

2.2.8 ขยายขนาดการผลิต 30

2.2.9 วิธีการเก็บเกี่ยวเซลล์ (Cell harvest) 30
2.2.10 วิธีการแตกเซลล์เพื่อสกัด PHB (Cell debris for PHB extraction) 31
2.2.11 การศึกษา PHB ที่สะสมภายในเซลล์ 33
2.2.12 การวิเคราะห์ PHB (PHB Analysis) 35
บทที่ 3 ผลการทดลอง 37-50
3.1 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดต่างๆในอาหารสูตร DSMZ 37
3.2 ความเข้มข้นของกากน้ำตาลและน้ำแช่ข้าวโพดที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 37
3.3 การจริญเติบโตและการผลิต PHB ของ *Alcaligenes eutrophus* 41
3.4 การเจริญเติบโตและการผลิต PHB ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ 42
3.5 การศึกษาลักษณะการสะสม PHB ภายในเซลล์ 44
3.6 การวิเคราะห์โครงสร้างและมวลโมเลกุลของ PHB 45
3.7 การทดสอบคุณสมบัติการทนความร้อน 50
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลองและสรุป 51-53
4.1 วิจารณ์ผลการทดลอง 51
4.2 สรุปผลการทดลอง 52
4.3 ข้อเสนอแนะ 53
เอกสารอ้างอิง 54
ภาคผนวก 56

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1.1	แสดงสมบัติทางกายภาพ และเคมีของ Polypropylene และ PHB	5
ตารางที่ 1.2	แสดงส่วนประกอบในกากน้ำตาลชนิดต่างๆ	12
ตารางที่ 1.3	แสดงแร่ธาตุในกากน้ำตาลชนิดต่างๆ	12
ตารางที่ 1.4	แสดงวิตามินในกากน้ำตาลชนิดต่างๆ	12
ตารางที่ 1.5	แสดงส่วนประกอบของน้ำแช่ข้าวโพด	15
ตารางที่ 1.6	แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิของ PHB ด้วยเทคนิค DSC	19
ตารางที่ 2.1	ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	23
ตารางที่ 2.2	สรุปสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง *B. megaterium* เพื่อผลิต PHB	29
ตารางที่ 3.1	เปรียบเทียบปริมาณการผลิต PHB ได้สูงสุดของแบคทีเรียชนิดต่างๆ	44
ตารางที่ 3.2	The chemical shift signals obtained the ^{13}C NMR spectra for PHB sample and commercial PHB, compared to the results by Fabiane et al. (2007)	47
ตารางที่ 3.3	The molecular weight of PHB; weight average ($\overline{M_w}$), number average ($\overline{M_n}$) and polydispersity ($\overline{M_w}/\overline{M_n}$) was determined by GPC.	49
ตารางที่ 3.4	คุณสมบัติทนต่อความร้อนของ PHB ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ	50

สารบัญรูป

รูปที่ 1.1	การสะสมของ poly-hydroxybutyric acid ใน *Bacillus megaterium*	2
รูปที่ 1.2	วิถีชีวสังเคราะห์ของ Poly-hydroxybutyric acid	3
รูปที่ 1.3	แสดงความสัมพันธ์ของวิถีชีวสังเคราะห์ของ Polyhydroxybutyric acid กับวิถีชี สังเคราะห์อื่น	3
รูปที่ 1.4	แสดงลักษณะของ PHB แกรนูล	4
รูปที่ 1.5	แสดงโครงสร้างของ PHAs ที่มีสมบัติตามการจับของหมู่ alkyl (R)	5
รูปที่ 1.6	แสดงชนิดของ PHAs ที่ใช้ในทางการแพทย์	6
รูปที่ 1.7	แสดงลักษณะการนำ Biodegradable polymer มาใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering)	7
รูปที่ 1.8	แสดงลักษณะการนำ PHB มาใช้ในศัลยกรรม (Orthopedic)	7
รูปที่ 1.9	การนำ PHB ไปใช้ประโยชน์ในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ต่างๆ	8
รูปที่ 1.10	การย่อยสลายของ PHB ภายใต้สภาวะการทดสอบ 120 วัน	10
รูปที่ 1.11	การทดสอบความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม	10
รูปที่ 1.12	แสดงกระบวนการโม่แป้งข้าวโพด(Corn wet milling process) ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ต่างๆออกมา	14
รูปที่ 1.13	แสดงลักษณะของ *Bacillus megaterium*	16
รูปที่ 1.14	ลักษณะทั่วไปของ *Alcaligenes eutrophus*	17
รูปที่ 1.15	แสดงผลการวิเคราะห์โมเลกุล PHB ที่ได้จากเชื้อ *A. eutrophus* ด้วยเทคนิค ^{13}C NMR	18
รูปที่ 1.16	แสดงผลการวิเคราะห์โมเลกุล PHB ที่ได้จากเชื้อ *E. coli* ลูกผสมด้วยเทคนิค ^{13}C NMR	18
รูปที่ 1.17	แสดงแผนผังการสังเคราะห์ PHB โดยแบคทีเรียสกุล Alcaligenes	19
รูปที่ 1.18	แสดงหลักการของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission microscopy ,TEM)	21
รูปที่ 2.1	การเก็บน้ำแช่ข้าวโพดจากโรงงานผลิตแป้งข้าวโพด	26
รูปที่ 2.2	เครื่องระเหยน้ำแบบสูญญากาศ (Vacuum evaporator)	19
รูปที่ 2.3	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Micro-Kjedahl	27
รูปที่ 2.4	การไฮโดรไลซ์กากน้ำตาลด้วยด้วยกรดเจือจาง	27
รูปที่ 2.5	การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	

(Incubator shaker) 30
รูปที่ 2.6 การตกตะกอนเซลล์ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) 31
รูปที่ 2.7 การทำแห้งเซลล์โดยใช้ความเย็นในการระเหิด (Lyophilization) ด้วยเครื่อง Freeze Dryer 31
รูปที่ 2.8 แผนผังขั้นตอนการสกัด PHB จากเซลล์แห้ง 32
รูปที่ 2.9 การแยกบริสุทธิ์ PHB จากเซลล์จุลินทรีย์ 33
รูปที่ 2.10 ขั้นตอนการเตรียมชิ้นงานสำหรับ TEM 35
รูปที่ 3.1 อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารสูตร DSMZ 37
รูปที่ 3.2 การเจริญเติบโตของ *B. megaterium* ในอาหารที่มีกากน้ำตาล ความเข้มข้นแตกต่างกันร่วมกับแอมโมเนีย วัดจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 38
รูปที่ 3.3 การเจริญเติบโตของ *B. megaterium* ในอาหารที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้น 4% ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้นแตกต่างกัน วัดจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 38
รูปที่ 3.4 ปริมาณ PHB ที่สกัดจากเซลล์ *B. megaterium* ในอาหารที่มีกากน้ำตาล ความเข้มข้นแตกต่างกัน ร่วมกับแอมโมเนียความเข้มข้นคงที่ 39
รูปที่ 3.5 ปริมาณชีวมวลและ PHB จากการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* ในอาหาร ที่มีกากน้ำตาลความเข้มข้นแตกต่างกัน ร่วมกับแอมโมเนียความเข้มข้นคงที่ 39
รูปที่ 3.6 ปริมาณ PHB ที่สกัดจากเซลล์ *B. megaterium* ในอาหารที่มีกากน้ำตาล 4% ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้นแตกต่างกัน 40
รูปที่ 3.7 ปริมาณชีวมวลและ PHB จาก *B. megaterium* ในอาหารที่มีกากน้ำตาล ความเข้มข้น 4% ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้นแตกต่างกัน 40
รูปที่ 3.8 การเจริญเติบโตและการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* ในอาหารที่มีความ เข้มข้นของกากน้ำตาล 4% ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 4% 41
รูปที่ 3.9 อัตราส่วนความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อน้ำแช่ข้าวโพด (C:N) ที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ของ *A. eutrophus* 42
รูปที่ 3.10 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหารที่มีกากน้ำตาล 4% และน้ำแช่ข้าวโพด 4% 43
รูปที่ 3.11 การผลิต PHB ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหารที่มีกากน้ำตาล 4% และน้ำแช่ข้าวโพด 4% 43
รูปที่ 3.12 การสะสมของ PHB ภายในเซลล์ *Bacillus megaterium* 44
รูปที่ 3.13 การสะสมของ PHB ภายในเซลล์ของ *A. eutrophus* แบบ granule; ภาพตัดเซลล์ตามขวาง (ซ้าย) ภาพตัดเซลล์ตามยาว (ขวา) 45

รูปที่ 3.14 แสดง ^{13}C NMR spectra ของ PHB ที่ได้จากการสกัดได้จาก *B. megaterium* ด้วย Chloroform 46
รูปที่ 3.15 แสดง ^{13}C NMR spectra ของ PHB ที่ได้จากการสกัดได้จาก *A. eutrophus* ด้วย Chloroform 46
รูปที่ 3.16 แสดง ^{13}C NMR spectra ของ PHB จาก *A. eutrophus* 46
รูปที่ 3.17 แสดง ^{1}H NMR spectra ของ PHB ที่ได้จากการสกัดได้จาก *B. megaterium* ด้วย Chloroform 48
รูปที่ 3.18 แสดง ^{1}H NMR spectra ของ PHB ที่ได้จากการสกัดได้จาก *A. eutrophus* ด้วย Chloroform 48
รูปที่ 3.19 แสดง ^{13}H NMR spectra ของ PHB จาก *Azotobacter chroococcum* 48