

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายงบประมาณแผ่นดินประมาณ
ประจำปี 2557 ของสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร และได้รับการสนับสนุน จากภาควิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

Research Title Production of Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from Crude Glycerol

Researcher 1. Asst. Prof. Dr.Phimchanok Jaturapiree (Project Leader)

Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University

2. Dr.Adisak Jaturapireee (Co-Researcher)

Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University

Reaearch Grants Fiscal Year 2014,

Research and Development Institute, Silpakorn University

Year of completion 2015

Type of research experimental development

Subjects Biotechnology

Abstract

Polyhydroxybutyrate (PHB) is polyester produced by a variety of microbes under unbalanced nutrient conditions and stored as an intracellular carbon and energy material. However, the price of PHB is more expensive than petrochemical polymers produced from petrochemical industry due to the high cost of carbon source for cell growth. The aim of this study is to produce PHB using a cheap carbon source, crude glycerol, which is a major byproduct in the biodiesel manufacturing process. The effects of carbon and nitrogen sources on the biosynthesis of PHB were investigated. The crude glycerol samples of various sources affected the production of PHB. The suitable conditions for the PHB production were 10 g/L of crude glycerol (No.1) as a carbon source and 1.5 g/L of Beef extract and 2.5 g/L of Peptone as nitrogen sources. The maximum PHB content of 23.59% was obtained from the ratio of C to N equal to 2.5:1 by weight under the cultivation growth time of 24h at 37 °C.

Key words : Bioplstic, Poly- β -hydroxybutyrate, Production, Glycerol, Biodiesel

ชื่อโครงการ การผลิตพอลิ-ปีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรตจากกลีเซอรอลที่เป็น byproduct จากการผลิตไบโอดีเซล

ชื่อผู้วิจัย 1. ผศ.ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ (หัวหน้าโครงการ)
 คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร
 2. อ.ดร.อดิศักดิ์ จตุรพิริย์ (ผู้ร่วมวิจัย)
 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2557

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ พ.ศ. 2558

ประเภทการวิจัย การพัฒนาการทดลอง

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

พอลิ-ปีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต (PHB) เป็นพอลิเอสเทอร์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดภายใต้สภาวะสารอาหารไม่สมดุล และสะสมไว้ในเซลล์ของจุลินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แต่ราคาของ PHB ยังคงแพงเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เนื่องจากราคาของแหล่งคาร์บอนที่ใช้เพาะเลี้ยง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือผลิต PHB จากแหล่งคาร์บอนราคาถูก คือ กลีเซอรอลดิบ ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล โดยศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการผลิต PHB พบว่า แหล่งคาร์บอนมีผลต่อการผลิต PHB และภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB คือ ใช้กลีเซอรอลดิบ หมายเลข 1 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและ Beef extract 1.5 กรัมต่อลิตร และ Peptone 2.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนโดยน้ำหนักของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 2.5:1 ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณ PHB content 23.59%

คำสำคัญ : พลาสติกชีวภาพ พอลิ-ปีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต การผลิต กลีเซอรอล ไบโอดีเซล

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
Abstract	2
บทคัดย่อ	3
สารบัญ	4
บทที่ 1 บทนำ	5
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	8
บทที่ 3 วิธีทดลอง	13
บทที่ 4 ผลการทดลอง	15
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	24
บรรณานุกรม	25
ภาคผนวก	28
เอกสารตีพิมพ์เผยแพร่	31

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เนื่องจากน้ำมันเชื้อเพลิงที่ได้จากการสังเคราะห์จากปิโตรเลียมมีราคาเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ผู้บริโภคลดอัตราการใช้น้ำมันประเภทนี้หรือใช้เชื้อเพลิงชนิดอื่นทดแทน นั่นคือ ไบโอดีเซล (Biodiesel) กระบวนการผลิตไบโอดีเซลจะทำให้เกิดผลพลอยได้ (byproduct) หลายชนิด และ byproduct ที่สำคัญ คือ กลีเซอรอลดิบ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการเป็นสารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิตสารชีวภาพต่างๆ ต่อไปได้หลายชนิด และปัจจุบันโลกมีการพัฒนาให้มีการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ (Biodegradable plastic) เช่น PHB (Poly-3-hydroxybutyrate) เป็นต้น เพื่อนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่สังเคราะห์จากปิโตรเคมีซึ่งย่อยสลายได้ยากกว่า โดยกระบวนการผลิตพลาสติกชนิดนี้จะเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์ตลอดทั้งกระบวนการรวมถึงสามารถย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในสภาวะที่เหมาะสมได้เป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ แต่เนื่องจากการผลิต PHB นี้ยังคงมีต้นทุนที่สูงอยู่มาก การใช้แหล่งอาหารของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมและมีราคาถูก หรือเป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากภาคการเกษตร/ภาคอุตสาหกรรมจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต PHB ให้สูงขึ้น

คณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงประโยชน์ที่สำคัญของ PHB และศักยภาพของการผลิต PHB รวมถึงการเพิ่มมูลค่ากลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล จึงมุ่งเน้นการวิจัยไปที่การผลิต PHB จากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHB ในสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนและนำไปขยายผลการศึกษาต่อในด้านต่างๆ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB จากจุลินทรีย์โดยใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน
- 2) ผลิต PHB โดยการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) ในสภาวะที่เหมาะสม โดยควบคุมค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ขอบเขตของการวิจัย

- 1) ศึกษาและเปรียบเทียบความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบต่อการผลิต PHB
- 2) ศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) เพื่อให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์และ PHB ที่ผลิตได้มีปริมาณสูง

- 3) วิเคราะห์คุณสมบัติของกลีเซอรอลทางการค้า และกลีเซอรอลดิบที่เป็น byproduct จากการผลิตไบโอดีเซล
- 4) ศึกษาและเปรียบเทียบผลของกลีเซอรอลทางการค้า และกลีเซอรอลที่เป็น byproduct จากการผลิตไบโอดีเซลต่อการผลิต PHB
- 5) ศึกษาและทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ PHB ที่ผลิตได้

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิด (Conceptual Framework) ของโครงการวิจัย

Poly-3-hydroxybutyrate หรือ PHB เกิดจากการสะสมภายในแกรนูลของจุลินทรีย์หลายชนิดเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานให้กับเซลล์ จุลินทรีย์ที่มีการสะสม PHB มีหลากหลายสายพันธุ์ เช่น *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Rhizobium sp.* เป็นต้น (Byrom, 1987) การสะสม PHB จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตสูงสุด และมีแหล่งอาหารไม่สมดุล เช่น แหล่งคาร์บอนมากเกินไปในขณะที่มีการจำกัดสารอาหารบางชนิด (Anderson and Dawes, 1990; Poirier *et al.*, 1995) ปัญหาที่สำคัญของการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม คือ ต้นทุนการผลิต PHB สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ การสังเคราะห์พลาสติกจากปิโตรเคมี สารตั้งต้นที่มีราคาถูกหรือการใช้วัตถุดิบเหลือใช้จากภาคอุตสาหกรรมจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าว และปัจจุบันการผลิตไบโอดีเซลมีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว อันเนื่องมาจากปัญหาราคาน้ำมันที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้เกิด byproduct ได้จากกระบวนการผลิตนี้อีกด้วย นั่นคือ กลีเซอรอลดิบ จากงานวิจัยของ Zhu และคณะ (2009) ได้ทำการผลิต PHB จาก *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 โดยใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ปริมาณ PHB ที่ได้เท่ากับ 7.4 กรัมต่อลิตร และ *Vibrio natriegens* สามารถผลิต PHB ได้ 41% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีลักษณะเด่นอีกอย่างหนึ่ง คือ มีระยะเวลาในการแบ่งตัวสั้น (9.8 นาที) (Chien และคณะ, 2007) การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHB ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมโดยใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูกและผลิต PHB ได้ปริมาณมากจะเป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิต PHB ให้ก้าวหน้าในระดับอุตสาหกรรม จนสามารถผลิตพลาสติกชนิดนี้นำมาใช้จริงได้ในอนาคต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิต PHB ได้ปริมาณมาก อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าเพิ่มจากกลีเซอรอลดิบที่เป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ได้อีกทางหนึ่งด้วย
- 2) เป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม จนสามารถนำพลาสติกชนิดนี้ไปใช้ได้จริงในอนาคต

- 3) เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป โดยมีกลุ่มเป้าหมาย คือ นักวิจัย นักวิชาการและผู้สนใจเรื่อง PHB
- 4) บริการความรู้แก่ประชาชน โดยมีกลุ่มเป้าหมาย คือ ประชาชนจะได้รับความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับพลาสติกชีวภาพ ตลอดจนประโยชน์ของการใช้พลาสติกชีวภาพ และหันมาใส่ใจกับสิ่งแวดล้อม
- 5) นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ โดยมีกลุ่มเป้าหมาย คือ โรงงานอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ เพื่อเป็นแนวทางทำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพ และสามารถนำไปใช้ในการผลิตในเชิงพาณิชย์ได้
- 6) เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต โดยมีกลุ่มเป้าหมาย คือ การเพิ่มประสิทธิภาพ การผลิต PHB เพื่อการจำหน่ายในตลาดภายในและต่างประเทศได้
- 7) สามารถเสนอผลงานวิจัยในการประชุมระดับชาติและนานาชาติได้
- 8) สามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้

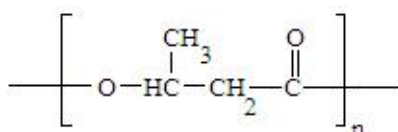
แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

นำผลการวิจัยเผยแพร่สู่สาธารณชน โดยการเผยแพร่ในการประชุมวิชาการและการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการทั้งภายในประเทศและระดับนานาชาติ ตลอดจนบริการความรู้แก่ภาคธุรกิจและอุตสาหกรรม โดยมีกลุ่มเป้าหมาย คือ การจัดอบรมถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับการผลิตพอลิ-บิวทิเรต (PHB) เพื่อนำไปสู่การผลิตพลาสติกชีวภาพในเชิงพาณิชย์ที่สามารถใช้ได้จริงในอนาคต

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ในปี ค.ศ. 1925 Maurice Lemoigne ค้นพบ PHB เป็นครั้งแรก ณ สถาบันปาสเตอร์ กรุงปารีส โดย การสกัด PHB ออกจาก *Bacillus megaterium* ด้วยคลอโรฟอร์ม (Doi, 1990) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูป 2.1



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของ PHB (Sudesh และคณะ, 2000)

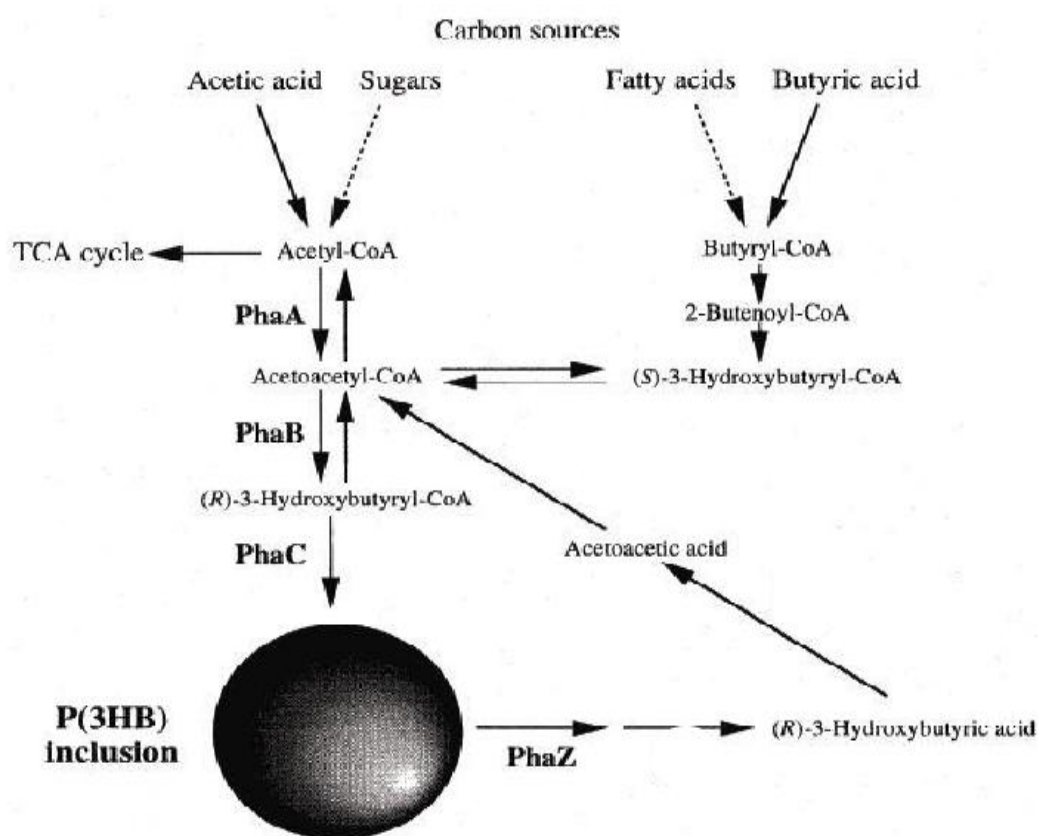
จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การสะสม PHB ภายในแกรนูล (granule) ของเซลล์นั้น (Byrom, 1987; Amor และคณะ, 1991) เกิดได้ในเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและลบ หลากหลายสายพันธุ์ เช่น *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Rhizobium sp.* เป็นต้น (Byrom, 1987) PHB มีลักษณะเป็นก้อนกลมๆ คล้ายไขมัน ลอยอยู่ในไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ (ดังรูป 2.2) หลังจากเซลล์ตายและมีการแตกเซลล์ พอลิเมอร์จะถูกปล่อยออกมา (Doi, 1995) กลไกการสะสม PHB จะทำหน้าที่เป็นเสมือนแหล่งคาร์บอนและพลังงานให้กับเซลล์



รูปที่ 2.2 ลักษณะของ PHB ที่สะสมอยู่ภายในแกรนูลของเซลล์ *Alcaligenes eutrophus* โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Wieczorek *et al.*, 1995)

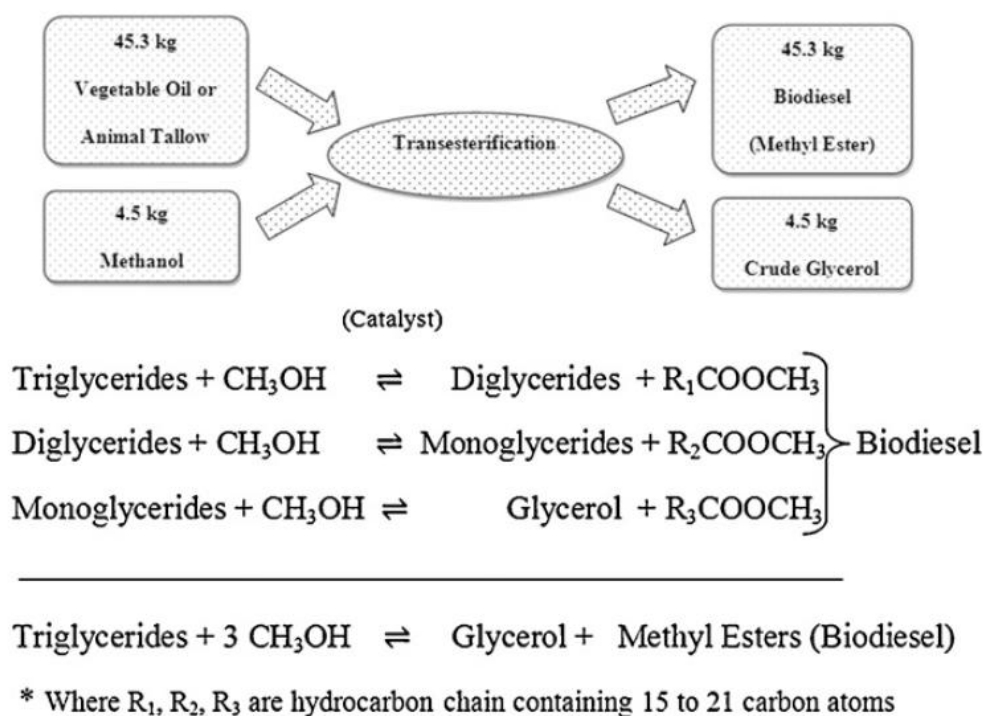
กระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHB จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์จุลินทรีย์ผ่านเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตสูงสุดแล้ว ภายใต้ภาวะที่สารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป แต่มีปัจจัยบางชนิดจำกัด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือ ซัลเฟอร์ เป็นต้น (Lee, 1996b; Anderson และ Dawes, 1990; Poirier และคณะ, 1995)

PHB สามารถสังเคราะห์ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของแบคทีเรีย วิธีการสังเคราะห์ PHB ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.3 มีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางที่เข้าสู่วัฏจักรเครปส์ โดยเริ่มต้นจากอะซีติลโคเอนไซม์ เอ เปลี่ยนเป็นอะซีโตะซิติลโคเอนไซม์เอ และไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ ด้วยการทำงานของเอนไซม์ beta-ketothiolase (PhaA) และ acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) ตามลำดับ หลังจากนั้นเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน ไฮดรอกซีบิวทิริล-โคเอนไซม์เอไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB synthase (PhaC) อย่างไรก็ตาม PHB ที่เกิดขึ้นสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลุ่ม PHA depolymerase



รูปที่ 2.3 วิธีการสังเคราะห์ PHB และการย่อยสลายในแบคทีเรีย (Sudesh และคณะ, 2000)

ประเทศไทยประสบปัญหาเรื่องราคาน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีราคาสูงขึ้นมาก โดยเฉพาะราคาน้ำมันดีเซล จึงทำให้มีการผลิตไบโอดีเซลขึ้นมาทดแทนเชื้อเพลิงดังกล่าว ไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่เป็นพลังงานหมุนเวียน ซึ่งสามารถใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลได้ เนื่องจากมีสมบัติการเป็นเชื้อเพลิงใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมากที่สุด นอกจากนี้ไบโอดีเซลยังเป็นพลังงานสะอาดซึ่งมีการปลดปล่อยมลภาวะน้อยกว่าน้ำมันดีเซลโดยเฉพาะแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไบโอดีเซลเกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาทางเคมีของน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์กับเมทานอลหรือเอทานอลโดยเรียกปฏิกิริยานี้ว่า ปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชัน (transesterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ของไขมันสัตว์หรือน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์ โดยมีเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ เมทิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซล และได้กลีเซอรอลดิบเป็น byproduct ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 กลีเซอรอลดิบที่เกิดจากการผลิตไบโอดีเซล (Ayoub และ Abdullah, 2012)

กลีเซอรอลดิบที่เกิดจากการผลิตไบโอดีเซล สามารถนำมาใช้ในการเป็นสารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิตสารชีวภาพต่างๆ ต่อไปได้หลายชนิด เช่น 1, 3-propanediol, Citric acid, Docosahexaenoic acid, Lipids และ ผลิตภัณฑ์พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ (Biodegradable plastic) เช่น PHB (Poly-3-hydroxybutyrate) เป็นต้น (Yang และคณะ, 2012) ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การประยุกต์ใช้กลีเซอรอลดิบ (Yang และคณะ, 2012)

Product	Pathway	Product productivity
1, 3-propanediol	Fed-batch cultures of <i>Klebsiella pneumoniae</i> strain	1.7 g/L/h
	Maximum 1,3-propanediol production from <i>K. pneumoniae</i>	138 g/L
	Optimize 1,3-propanediol production from <i>K. pneumoniae</i> ATCC 15380	56 g/L
	Integrated bioprocess combining biodiesel production by lipase with microbial production of 1, 3-propanediol by <i>K. pneumoniae</i> strain	1.7 g/L/h
	<i>Clostridium butyricum</i> strain VPI 3266 on a synthetic medium	0.60 mol/mol glycerol
	<i>C. butyricum</i> strain F2b (process modelling)	NA ^a
	<i>C. butyricum</i> VPI 1718; fed-batch operation under non-sterile culture conditions	679 g/L
	One vessel bio- and chemocatalytic process; in a biphasic system without intermediate separation of 1, 3-propanediol; <i>C. butyricum</i> DSM10703	134 m mol/L
Citric acid	<i>Y. lipolytica</i> strain ACA-DC 50109 (process modelling)	NA ^a
	Acetate Mutants of <i>Y. lipolytica</i> Watislavla AWG7 strain; Fed-batch operation	139 g/L
	<i>Yarrowia lipolytica</i> strain LGAM 5 (7)1	35 g/L
	<i>Y. lipolytica</i> N15	71 g/L
Erythritol	Fed-batch cultures of <i>Y. lipolytica</i> Watislavla K1	1 g/L/h
Hydrogen	Photofermentative conversion process; <i>Rhodospirillum rubrum</i> strain	6 mol/mol glycerol
	<i>Enterobacter aerogenes</i> strain HU-101; continuous culture; porous ceramics as a support material to fix cells	63 mmol/L/h
	Optimize some media compositions of <i>E. aerogenes</i> ATCC 35029	0.85 mol/mol glycerol
	Anaerobic treatment process; crude glycerol was a co-substrate	2.9 mmol/g glycerol
Poly (hydroxyalkanoates) (PHAs)	<i>Pseudomonas oleovorans</i> NRRL B-14682 and <i>P. corrugata</i> 388 grew and synthesized PHB and mcl-PHA, respectively	NA ^a
	Producing PHB; <i>Paracoccus denitrificans</i> and <i>Cupriavidus necator</i> JMP 134 strains	48%
	Producing PHB; <i>Cupriavidus necator</i> strain DSM 545	50%
	Producing PHB; <i>Zobellia denitrificans</i> MW1; fed-batch cultivation	660% ± 7.6%
	Producing PHB; Mixed microbial consortia (MMC)	> 50%
	<i>Pseudomonas oleovorans</i> NRRL B-14682; batch culture	30%
Phytase	High cell density fermentations; recombinant <i>Pichia pastoris</i>	1125 U/mL
Lipase	<i>Staphylococcus carnosus</i> EX17	127.3 U/L
Succinic acid	<i>Bacillus succiniciproducens</i> DD1; continuous cultivation process	1.02 g/g glycerol
Docosahexaenoic acid-rich algae	Fermentation of the algae, <i>Schizochytrium limacinum</i> strain; continuous culture	0.52 g/L-day
Bicosapentaenoic acid	Fungus <i>Pirithium irregulare</i>	90 mg/L
Lipid	<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21; batch culture	733%
	<i>Cryptococcus curvatus</i> ; two-stage fed-batch process	52%
	Oleaginous red yeast <i>Rhodotorula glutinis</i> TISTR 5159; fed-batch fermentation	60.7%
	<i>Chlorella protothecoides</i>	3 g/L per day
Recombinant human erythropoietin etc.	Fungi	426%
	<i>Pichia pastoris</i> medium	31 mg/L
Ethanol	Nonpathogenic <i>Kluyvera cryocrescens</i> S26; batch fermentation	27 g/L
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> mutant strain (GEM167)	21.5 g/L
Methane	Anaerobic digestion	0.306 m ³ /kg glycerol
Butanol	<i>Clostridium pasteurianum</i> (ATCC [®] 6013 TM)	0.30 g/g glycerol
Fungal protein	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	0.88 ± 0.02 g/g glycerol

^a represents data are not available

ปัญหาสำคัญสำหรับการผลิต PHB คือมีต้นทุนการผลิตที่ค่อนข้างสูง การแก้ไขปัญหาดังกล่าวสามารถทำได้โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต PHB ได้ปริมาณมาก โดยการใช้สารตั้งต้นราคาถูก เช่น ของเสียที่ได้จากการเกษตรหรือ byproduct จากกระบวนการอุตสาหกรรม การใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิต PHB นั้นสามารถใช้ได้จริงและมีประสิทธิภาพสูง (ดังตารางที่ 2.2) ทางผู้วิจัยจึงได้เสนอโครงการวิจัยนี้ เพื่อพัฒนากระบวนการผลิต PHB โดยจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นและเป็นการเพิ่มมูลค่า byproduct ที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล รวมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม จนสามารถนำพลาสติกชนิดใหม่นี้ไปใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ได้ต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 2.2 การผลิต PHB โดยใช้กลีเซอรอลชนิดต่างๆ (Posada และคณะ, 2011)

Microorganism	Carbon and nitrogen source ^a	Maximum PHB accumulation (g/L)	% of PHB (dry cell weight)	Yield (g _{PHB} /L h)
<i>Cupriavidus necator</i>	CG/(NH ₄) ₂ SO ₄	51.2	62	1.51
DSM 545		38.1	50	1.1
<i>Osmophilic organism</i>	WG/YE	16.2	49.6	0.05
<i>Methylobacterium rhodesianum</i>	CG/CH	11	50	0.23
MB 126				
<i>Ralstonia eutropha</i>	CG/CP	9.7	42	0.210
DMS 11348	CG/CA	17.6	65	0.39
<i>Cupriavidus necator</i>	CG/(NH ₄) ₂ SO ₄	-	70	-
JPM 134	WG/(NH ₄) ₂ SO ₄	-	48	-
<i>Escherichia coli</i> CT 1061	CG (microaeration)	18.8	51	0.18
<i>Escherichia coli</i> (ATCC:PTA-1579)	CG as the sole carbon source, and yeast extract and peptone as nitrogen source	-	60	-

^aCA: casaminoacids, CG: commercial glycerol, CH: casein hydrolysates, CP: casein peptone, WG: waste glycerol, YE: yeast extract.

บทที่ 3

วิธีทดลอง

3.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น

ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาบน NA slant (ที่มีกลีเซอรอลติดเป็นแหล่งคาร์บอน) ลงในอาหารเหลว NB 5 มิลลิลิตร (ที่มีกลีเซอรอลติดเป็นแหล่งคาร์บอน) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหารเหลว NB (ที่มีกลีเซอรอลติดเป็นแหล่งคาร์บอน) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร อีกครั้งด้วยวิธีการปลอดเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นที่ใช้สำหรับการทดลองแต่ละครั้งคือ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

3.2 การศึกษาผลของปริมาณสารอาหารต่อการผลิต PHB

การศึกษาผลของปริมาณสารอาหารต่อการผลิต PHB โดยการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) จะทำการทดลองในระดับขวดแก้วทรงกรวย โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้ แหล่งของกลีเซอรอลติด ความเข้มข้นของกลีเซอรอลติด อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และการใช้กลีเซอรอลทางการค้าและกลีเซอรอลติด ต่อการผลิต PHB รายละเอียดดังนี้

3.2.1 การศึกษาผลของแหล่งของกลีเซอรอลติด

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในขวดแก้วทรงกรวย โดยการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นที่ผ่านการเจือจางแล้ว (ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7-0.8) ลงในอาหาร NA ที่มีกลีเซอรอลติดจากแหล่งต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน (ควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 5 g/L) ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยวิธีปลอดเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนไปหาความหนาแน่นของเซลล์และวิเคราะห์ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลติด

ทำการทดลองตามข้อ 3.2.1 โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของกลีเซอรอลติดที่ใช้ ให้อยู่ในช่วง 0-15 g/L

3.2.3 การศึกษาผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิต PHB

ทำการทดลองตามข้อ 3.2.1 โดยเปลี่ยนอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ใช้ ให้อยู่ในช่วงอัตราส่วน 0.625-2.5

3.2.4 การศึกษาผลของกลีเซอรอลทางการค้า และกลีเซอรอลติดที่เป็น byproduct จากการผลิตไบโอดีเซลต่อการผลิต PHB

ทำการทดลองตามข้อ 3.2.1 โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ใช้ระหว่างกลีเซอรอลทางการค้า และ กลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

3.3 การวัดปริมาณเซลล์

ปั่นแยกเซลล์จากน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนของตะกอนเซลล์ไว้ ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำการกระจายเซลล์ให้เข้ากัน นำสารละลายเซลล์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณเซลล์จากกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ วิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ PHB

วิธีการสกัดแยก PHB

ปั่นแยกเซลล์จากน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนของตะกอนเซลล์ไว้ แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นลงไป 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 30 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็น ดูดสารละลายในชั้นของคลอโรฟอร์มใส่หลอดแก้วฝาเกลียวที่มีขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์มจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร PHB จะอยู่ในคลอโรฟอร์ม เก็บส่วนนี้ไว้ วิเคราะห์ปริมาณ PHB ต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณ PHB

นำสารละลาย PHB ที่สกัดได้มา 1 มิลลิลิตร ปล่อยให้ระเหยจนแห้ง เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทิ้งให้เย็น จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณ PHB จากกราฟมาตรฐาน

หมายเหตุ วิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ PHB content

การหาปริมาณ PHB content ทำได้โดยการเทียบอัตราส่วนระหว่างปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ในหน่วยของเปอร์เซ็นต์

3.6 การวิเคราะห์คุณสมบัติกลีเซอรอลทางการค้า และกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

ทำได้โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC (Cavalheiro และคณะ, 2009)

3.7 การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ PHB ที่ผลิตได้

ทำการสกัด PHB ออกจากเซลล์และทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ PHB ที่ผลิตได้

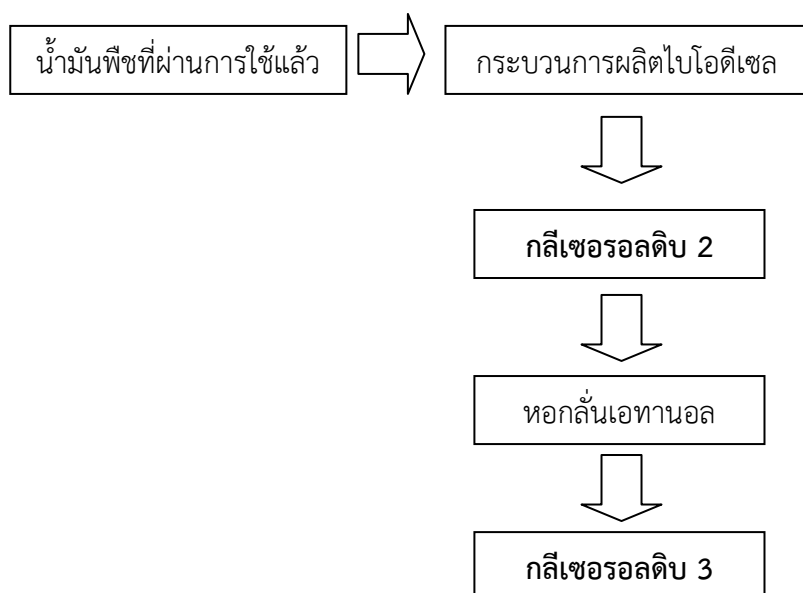
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาผลของปริมาณสารอาหารต่อการผลิต PHB โดยการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) จะทำการทดลองในระดับขวดแก้วทรงกรวย โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้ แหล่งของกลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และ การใช้กลีเซอรอลทางการค้าและกลีเซอรอลดิบ ต่อการผลิต PHB รายละเอียดดังนี้

4.1 การศึกษาผลของแหล่งของกลีเซอรอลดิบต่อการผลิต PHB

กลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของแหล่งของกลีเซอรอลดิบต่อการผลิต PHB ในระดับขวดแก้วทรงกรวย มาจากโรงงานผลิตไบโอดีเซล จ. พระนครศรีอยุธยา และบริษัทวีระสุวรรณ จำกัด จ. สมุทรสาคร รูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นของกลีเซอรอลดิบทั้ง 3 หมายเลข ดังรูปที่ 4.1 จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเครื่อง HPLC ได้ผลดังรูปที่ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบรูปที่ 4.2 พบว่ากลีเซอรอลดิบหมายเลข 2 มีสิ่งเจือปนอยู่ด้วย เนื่องจากเป็นกลีเซอรอลดิบที่ไม่ผ่านการกลั่นเอทานอล จึงอาจมีเอทานอลปนอยู่ได้ ในขณะที่กลีเซอรอลดิบหมายเลข 1 และ 3 ไม่พบสิ่งเจือปน ซึ่งการมีสิ่งเจือปนมากหรือน้อยนี้ ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา ตลอดจนวิธีการเตรียมกลีเซอรอลดิบ



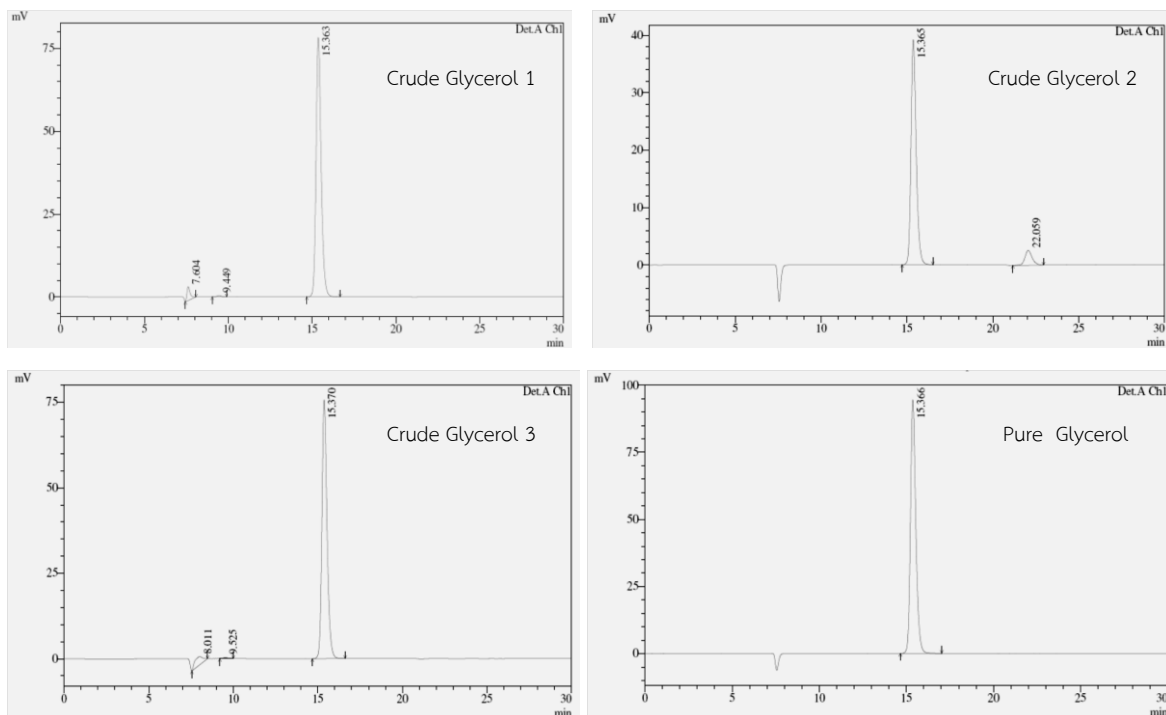
รูปที่ 4.1 กลีเซอรอลดิบจากบริษัทวีระสุวรรณ จำกัด

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มาของกลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการทดลอง

หมายเลข	แหล่งที่มา	ข้อมูลเบื้องต้น
1	โรงงานผลิตไบโอดีเซล จ. พระนครศรีอยุธยา	สีใส ไม่มีตะกอน เหลว
2	บริษัท วีระสุวรรณ จำกัด จ. สมุทรสาคร	สีน้ำตาลเข้ม หนืด มีตะกอน ไม่ผ่านการกลั่นเอทานอล
3		สีน้ำตาล เมื่อตั้งทิ้งไว้จะแยกชั้น ผ่านการกลั่นเอทานอล



รูปที่ 4.2 ลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นของกลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 4.3 องค์ประกอบของกลีเซอรอลดิบเมื่อวิเคราะห์ เครื่อง HPLC

จากการทดลองศึกษาผลของแหล่งของกลีเซอรอลดิบต่อการผลิต PHB โดยเชื้อ C5 (พิมพ์ชนก, 2558, Piwpan และคณะ, 2015) โดยการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นที่ผ่านการเจือจางแล้ว (ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7-0.8) ลงในอาหาร NA ที่มีกลีเซอรอลดิบจากแหล่งต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน (ควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 5 กรัมต่อลิตร) ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยวิธีปลอดเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนไปหาความหนาแน่นของเซลล์และวิเคราะห์ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าเชื้อ C5 สามารถเจริญและผลิต PHB เมื่อใช้กลีเซอรอลดิบหมายเลข 1 และ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยจะมี PHB content เป็น 7 และ 4 % ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ C5 ไม่สามารถเจริญและผลิต PHB ได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบหมายเลข 2 เป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลีเซอรอลดิบหมายเลข 2 มีเอทานอลผสมอยู่ ซึ่งส่งผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ C5 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mothes และคณะ (2007) ที่รายงานว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลดิบจากแหล่งต่างๆ เพื่อผลิต PHB จากเชื้อ *Cupriavidus necator* จะให้ปริมาณ PHB ที่แตกต่างกันขึ้นกับแหล่งกลีเซอรอลดิบที่ใช้

ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้กลีเซอรอลดิบหมายเลข 1 เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต PHB

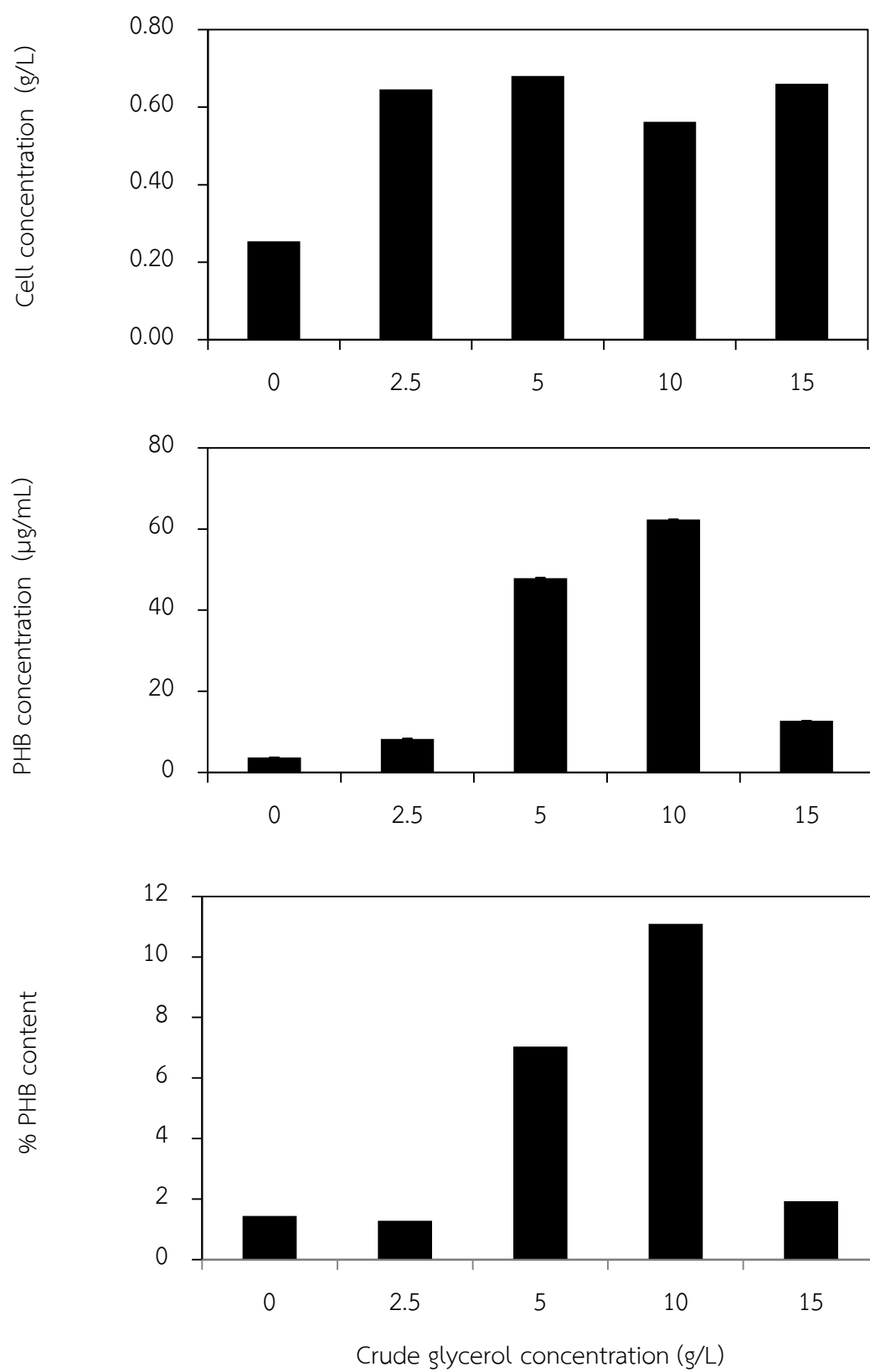
4.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิต PHB

ในการทดลองนี้จะเพาะเลี้ยงเชื้อ C5 ในอาหาร NB ที่มีกลีเซอรอลดิบหมายเลข 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบที่ใช้ให้อยู่ในช่วง 0-15 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.4 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ C5 ในกลีเซอรอลดิบแต่ละความเข้มข้น (2.5-15 กรัมต่อลิตร) เชื้อมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน (ระหว่าง 0.55-0.65 กรัมต่อลิตร) และมีปริมาณมากที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอล 5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อไม่มีการเติมกลีเซอรอลดิบเชื้อไม่ค่อยเจริญเติบโต (0.25 กรัมต่อลิตร) การสะสมของ PHB จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบจนกระทั่งได้ PHB สูงสุด (62 $\mu\text{g/mL}$) ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ 10 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเป็น 15 กรัมต่อลิตร จะส่งผลให้การสะสม PHB ลดลง อาจเนื่องมาจากเกิดการยับยั้งจากสารตั้งต้น จากนั้นหาปริมาณ PHB content ทำได้โดยการเทียบอัตราส่วนระหว่างปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ในหน่วยของเปอร์เซ็นต์ และเมื่อคิดเป็นปริมาณ % PHB content ของเชื้อ C5 พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แปรผันตามความเข้มข้นของกลีเซอรอล ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดที่กลีเซอรอล 10 กรัมต่อลิตรเช่นเดียวกัน โดยมี PHB content 11% ดังนั้นในการทดลองต่อไป จะใช้กลีเซอรอลดิบความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิต PHB

จากการทดลองของ Mothes และคณะ (2007) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Cupriavidus necator* JMP 134 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบ และ 5.5 % NaCl เซลล์สามารถผลิต PHB ได้ PHB content 48 % ในขณะที่ Sindhu และคณะ (2007) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus sphaericus* NII 0838 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ช่วงความเข้มข้น 1-5% (v/v) พบว่าที่ความเข้มข้น 1% จะได้ PHB yield สูงที่สุด และที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูงขึ้นจะเกิดการยับยั้งการผลิต PHB นอกจากนี้ยังมีการใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิต PHB โดยเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบการผลิต PHB โดยเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

Microorganism	Carbon source	Concentration	% PHB	References
<i>Osmophilic organism</i>	Waste glycerol	-	49.6	Koller และคณะ (2005)
<i>Cupriavidus necator</i> JMP134	Crude glycerol		48	Mothes และคณะ (2007)
<i>Cupriavidus necator</i> JPM134	Waste glycerol	-	48	Shen และคณะ (2009)
<i>Cupriavidus necator</i>	Crude Glycerol	-	38	Cavalheiro และคณะ (2009)
<i>Bacillus</i> spp.	Crude glycerol	2% (v/v)	13.3gm/ 100 ml	Sathianachiyar และ Devaraj (2013)
<i>Pseudomonas</i>	Crude glycerol	2% (v/v)	11.2gm/ 100 ml	Sathianachiyar และ Devaraj (2013)
strain C5	Crude Glycerol	10 g/L	11	This study



รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบต่อการผลิต PHB

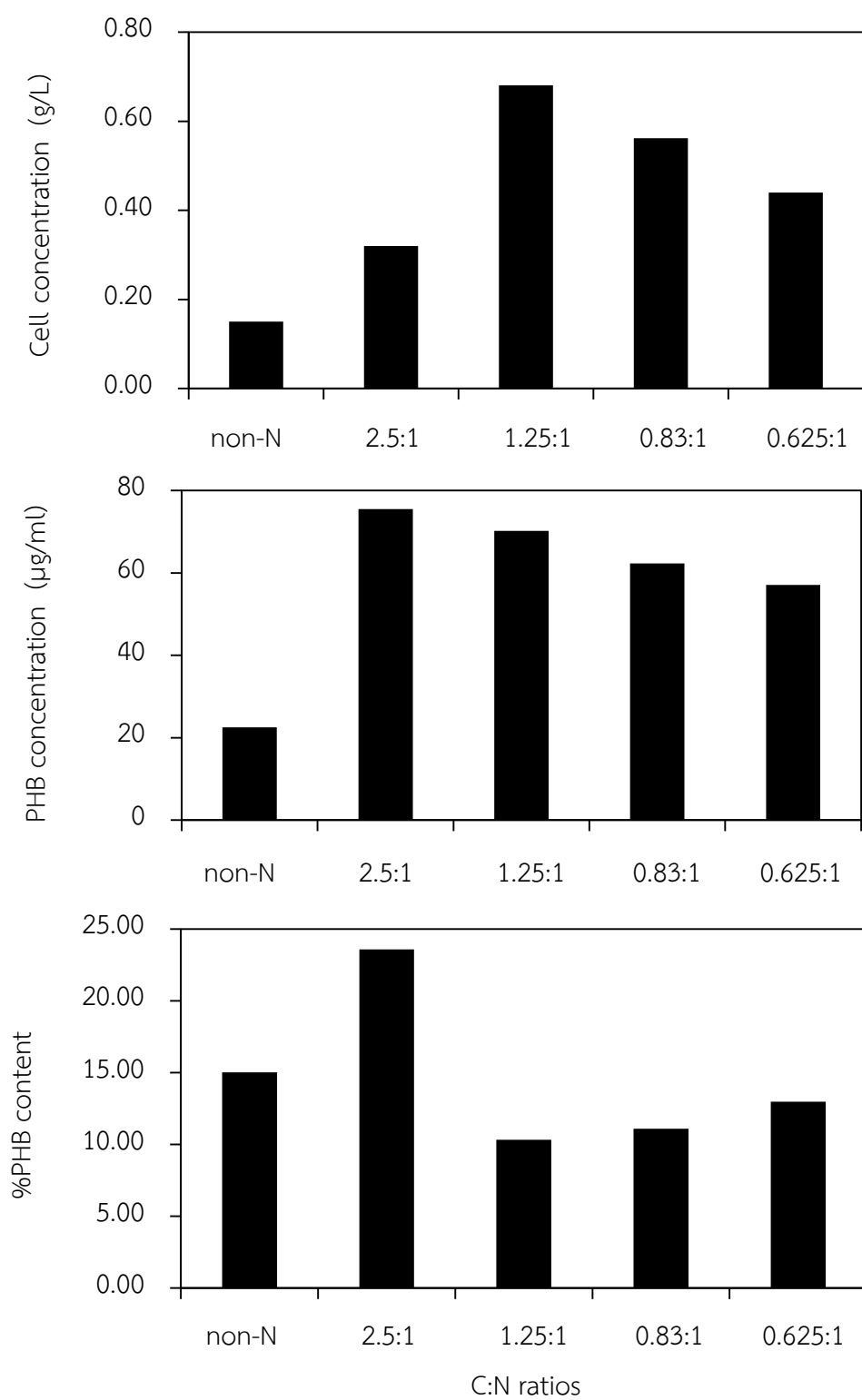
4.3 การศึกษาผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิต PHB

ในการทดลองนี้จะเพาะเลี้ยงเชื้อ C5 ในอาหาร NB ที่มีกลีเซอรอลดิบหมายเลข 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่มีความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรและเปลี่ยนอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ใช้ ให้อยู่ในช่วงอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 0.625-2.5 ดังตารางที่ 4.3 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 2.5

ตารางที่ 4.3 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ใช้เปรียบเทียบการผลิต PHB

แหล่งคาร์บอน (g/L)	แหล่งไนโตรเจน (g/L)		อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน
	Beef extract	Peptone	
10	0	0	non-N
10	1.5	2.5	2.5
10	3.0	5.0	1.25
10	4.5	7.5	0.83
10	6.0	10.0	0.625

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ C5 ในอาหาร NB ที่มีการเปลี่ยนอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน และคำนวณหาปริมาณ PHB content โดยการเทียบอัตราส่วนระหว่างปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ในหน่วยของเปอร์เซ็นต์ และเมื่อคิดเป็นปริมาณ % PHB content พบว่าเชื้อ C5 สะสม PHB ได้สูงที่สุด (%PHB content เท่ากับ 23.59%) ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 2.5 (ประกอบด้วยกลีเซอรอล 10 กรัมต่อลิตร, Beef extract 1.5 กรัมต่อลิตร และ Peptone 2.5 กรัมต่อลิตร) เมื่ออัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนลดลงจะส่งผลให้การสะสม PHB ลดลงเหลือประมาณ 10-13 %PHB content



รูปที่ 2.5 ผลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิต PHB

4.4 การศึกษาผลของกลีเซอรอลทางการค้า และกลีเซอรอลดิบที่เป็น byproduct จากการผลิตไบโอดีเซลต่อการผลิต PHB

ในการทดลองนี้จะเพาะเลี้ยงเชื้อ C5 ในอาหาร NB ที่มีกลีเซอรอลดิบและกลีเซอรอลทางการค้า เป็นแหล่งคาร์บอน ที่มีความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรและอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ใช้ คือ 2.5:1 (ประกอบด้วย Beef extract 1.5 กรัมต่อลิตร และ Peptone 2.5 กรัมต่อลิตร) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 จะเห็นว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ %PHB content ที่สูงกว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cavallheiro และคณะ (2009) พบว่าการเพาะเลี้ยง *Cupriavidus necator* ด้วยกลีเซอรอลทางการค้าจะผลิต PHB ได้มากกว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน

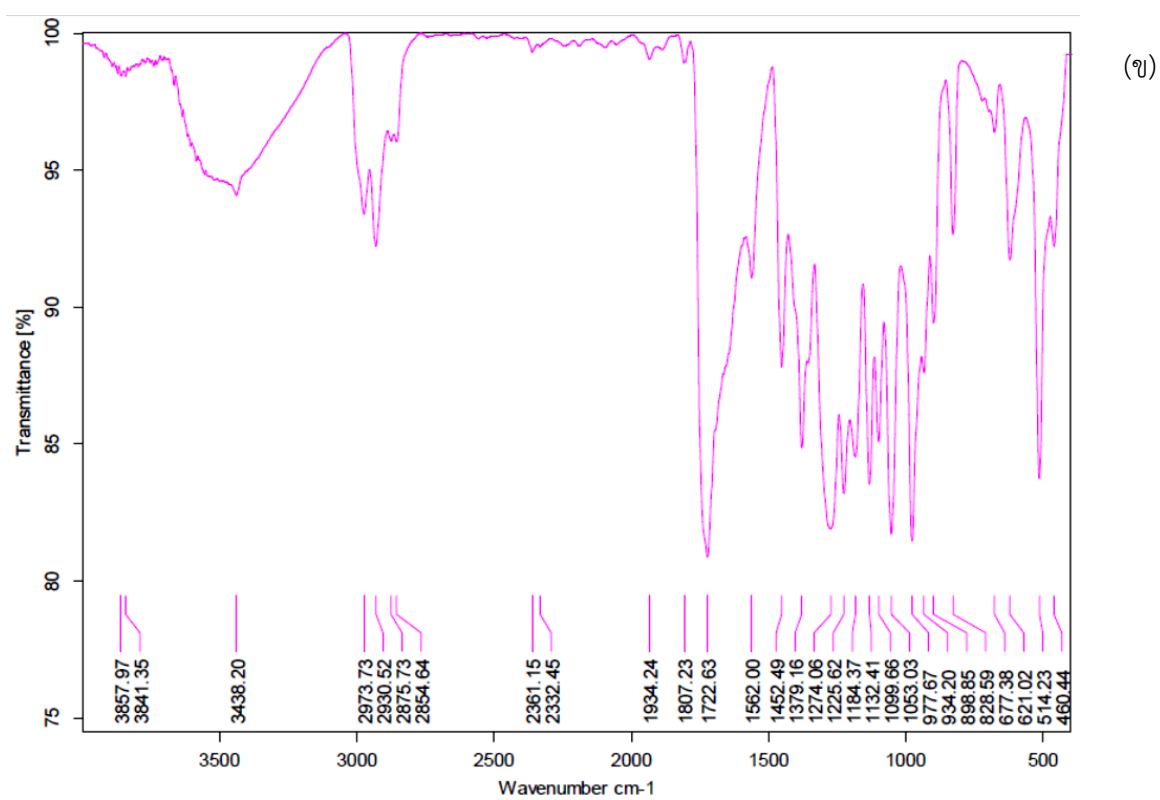
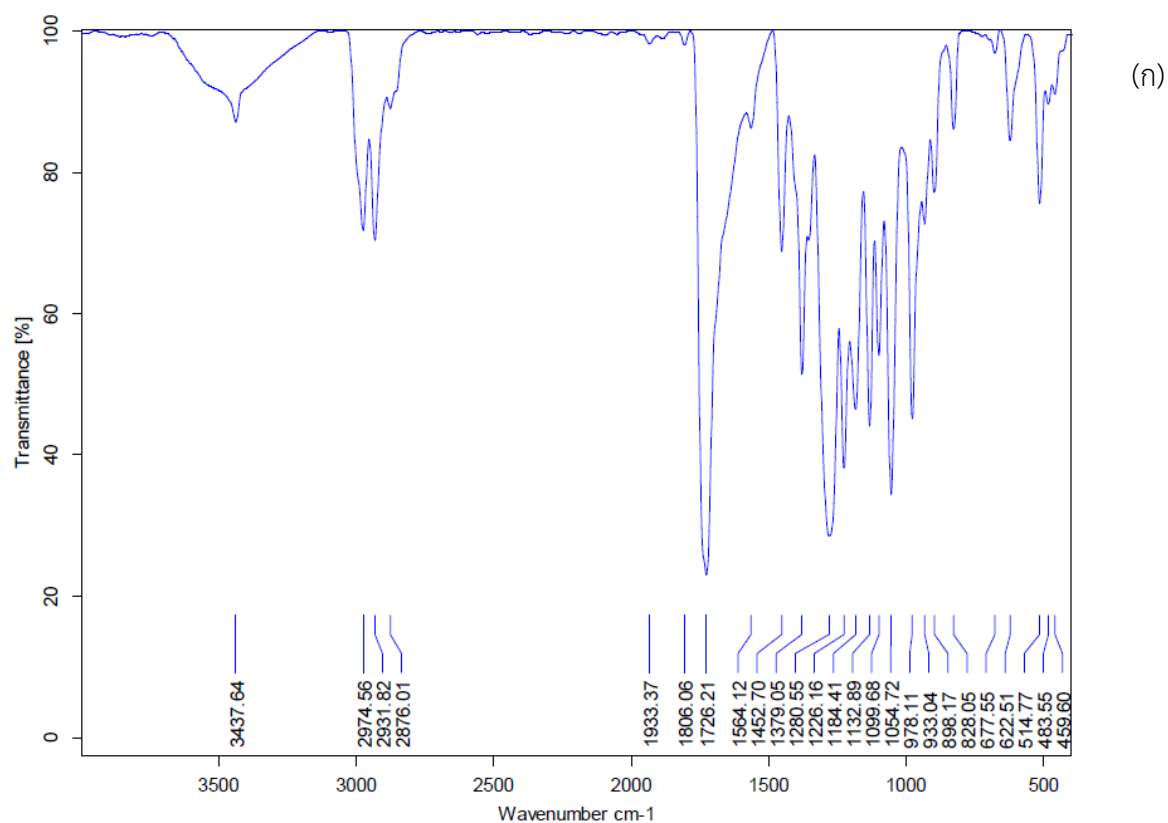
ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบการผลิต PHB จากแหล่งคาร์บอนต่างๆ

Carbon source	Cell dry weight (g/L)	PHB concentration ($\mu\text{g/mL}$)	%PHB content
Crude glycerol	0.32	75.50	23.59
Commercial glycerol	0.28	85.76	30.63

แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการใช้กลีเซอรอลทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ %PHB content ที่สูงกว่า ก็ต้องคำนึงถึงราคาของต้นทุนของการผลิต PHB ด้วย ซึ่งกลีเซอรอลทางการค้าจะมีราคาแพงกว่ากลีเซอรอลดิบมาก เนื่องจากกลีเซอรอลดิบเป็นผลได้จากการผลิตไบโอดีเซล จึงไม่ต้องเสียเงินในส่วนของราคาของแหล่งคาร์บอน ทำให้ต้นทุนในการผลิต PHB ลดลง

4.5 การตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ PHB ที่ผลิตโดยเครื่อง FTIR

การทดลองนี้ตรวจสอบ PHB ที่ผลิตจากเชื้อ C5 เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีเปรียบเทียบระหว่างการใช้กลีเซอรอลทางการค้าและกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนโดยเครื่อง FTIR เมื่อนำ PHB ที่ผลิตได้จากเชื้อ C5 มาวิเคราะห์คุณสมบัติเบื้องต้นด้วยวิธี FTIR (รูปที่ 2.6) พบว่า FTIR spectra ของ PHB มีพีคเกิดขึ้นบริเวณ $3437\text{--}3438\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งแสดงถึงกลุ่มของ OH-hydroxyl ของ alcohol ที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์ PHB และพีคที่ $2973\text{--}2974$ และ $2930\text{--}2931\text{ cm}^{-1}$ เป็นผลมาจาก stretching sp_3 ของ CH_3 และ CH_2 ตามลำดับ นอกจากนี้พีคบริเวณ $1722\text{--}1726\text{ cm}^{-1}$ แสดงให้เห็นว่า PHB ที่ผลิตจากเชื้อ C5 มี ester carbonyl group อยู่ด้วย



รูปที่ 2.6 FTIR spectra ของ PHB เมื่อใช้ (ก) กลีเซอรอลดิบ และ (ข) กลีเซอรอลทางการค้า เป็นแหล่งคาร์บอน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของปริมาณสารอาหารต่อการผลิต PHB โดยการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) ในระดับขวดแก้วทรงกรวย โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้ แหล่งของกลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบ อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน และการใช้กลีเซอรอลทางการค้าและกลีเซอรอลดิบต่อการผลิต PHB สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. แหล่งของกลีเซอรอลดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการผลิต PHB พบว่ากลีเซอรอลดิบหมายเลข 1 สามารถผลิต PHB ได้สูงที่สุด 7 % PHB content
2. เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบต่อการผลิต PHB พบว่ากลีเซอรอลดิบความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร สามารถผลิต PHB ได้ดีที่สุด 11 % PHB content
3. เมื่อใช้กลีเซอรอลดิบความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และ Beef extract 1.5 กรัมต่อลิตร และ Peptone 2.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน คิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 2.5:1 สามารถผลิต PHB ได้ดีที่สุด 23.59 % PHB content
4. เมื่อใช้กลีเซอรอลทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอนจะสามารถผลิต PHB ได้มากกว่าการใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองจะเห็นว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ C5 ในระดับขวดแก้วทรงกรวย สามารถเพิ่มปริมาณการผลิต PHB ได้ด้วยปัจจัยต่างๆ ที่ศึกษา แต่อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ยังให้ปริมาณ PHB น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อื่น ทำให้ยังไม่มีบทความคัมพูนของงานวิจัยนี้ ซึ่งแนวทางการแก้ไขอาจทำได้โดยพัฒนาการเพาะเลี้ยงแบบกะหรือกึ่งกะในระดับถังหมัก ซึ่งมีระบบควบคุมที่ดีกว่า เพื่อให้ได้ผลผลิต PHB ที่เพิ่มมากขึ้น จะได้นำงานวิจัยนี้ไปต่อยอดในภาคอุตสาหกรรมได้ในอนาคตต่อไป

นอกจากนี้ควรวิเคราะห์ปัจจัยต่างๆ ให้ครอบคลุม เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร

บรรณานุกรม

- พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ (2558) การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHB โดยใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน. รายงานฉบับสมบูรณ์. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- Anderson, A.J., Dawes, E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Review*. 54: 450-472.
- Amor, S.R., Rayment, T., Sanders, J.K.M. (1991) Poly(3-hydroxybutyrate) *in vivo*: NMR and X-ray characterization of the elastomeric state. *Macromolecules*. 24: 4583-4588.
- Ayoub, M. and Abdullah, A. Z. (2012) Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16: 2671–2686.
- Byrom, D. (1987) Polymer Synthesis by Microorganisms: Technology and Economics. *TIBTECH*. 5: 246-250.
- Cavalheiro, J., Almeida, M., Grandfils, C. and Fonseca, M.M.R.da. (2009) Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*. 44: 5, 509–515.
- Chien, C.C., Chen, C.C., Choi, M.H., Kung, S.S., Wei, Y.H. (2007) Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio spp.* isolated from marine environment. *Journal of Biotechnology*. 132: 259–263.
- Doi, Y. (1990) Microbial Polyester, Japan: VCH Publishers, Incorporated. 135: 266.
- Doi, Y. (1995) Microbial synthesis, physical properties and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. *Macromolecules Symptomatology*. 98: 585-599.
- Lee, S.Y. (1996b) Plastic bacterial Process and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*. 14: 431-438.
- Mothes, G., Schnorpfeil, C. and Ackermann, J. U. (2007) Production of PHB from Crude Glycerol. *Eng. Life Sci.* 7, No. 5, 475–479.
- Piwpan, P., Jaturapiree, A and Jaturapiree, P. (2015) Isolation and production of polyhydroxybutyrate (PHB) from isolated strain *Bacillus* sp. using crude glycerol as a

- carbon source. The 6th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural (FerVAAP 2015). 29-31 July 2015, Centara Hotel and Convention Centre, Khon Kaen, Thailand (Proceeding)
- Poirier, Y., Nawrath, C., Somerville, C. (1995) Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Biotechnology*. 13: 142-150.
- Posada, J.A., Naranjo, J.M., López, J.A., Higuera, J.C., Caradona, C.A. (2011) Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochemistry*. 46: 310-317.
- Sathianachiyar, S. and Devaraj, A. (2013) Biopolymer production by Bacterial Species using Glycerol, a by product of Biodiesel. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 3: 8, 1-5.
- Shen, L., Haufe, J., and Patel, M.K. (2009) Product overview and market projection of emerging biobased plastics PRO-BIP 2009: Final report. Utrecht University. Commissioned by European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE) and European Bioplastics, p. 243.
- Sindhu, R., Ammu, B., Binod, P., Deepthi, S. K., Ramachandran, K. B., Soccol, C. R. and Pandey, A. (2011) Production and Characterization of Poly-3-hydroxybutyrate from Crude Glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and Improving Its Thermal Properties by Blending with Other Polymers. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY*. 54:4, 783-794.
- Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y. (2000) Synthesis, Structure and properties of polyhydroxyalkanoates; biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 25: 1503–1555.
- Wieczorek, R., Pries, A., Steinbüchel, A., Mayer, F. (1995) Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*. 177: 2425-2435.
- Yang, F., Hanna M. A. and Sun, R. (2012) Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*. 5:13.

Zhu, C., Nomura, C.T., Perrotta, J.A., Stipanovic, A.J., Nakas, J.P. (2010) Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from biodiesel-glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. Biotechnology Progress. 26: 424-430.

ภาคผนวก

1. การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

NB ใน 1 ลิตร มีองค์ประกอบดังนี้

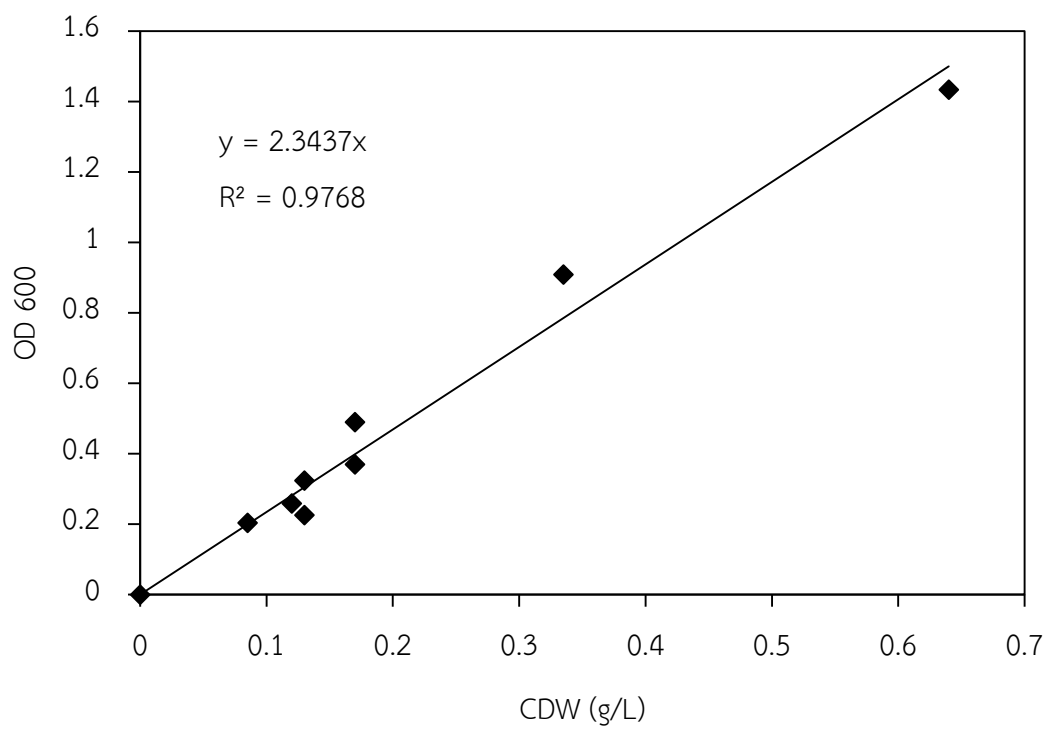
Beef extract 28 กรัม

Peptone 2.5 กรัม

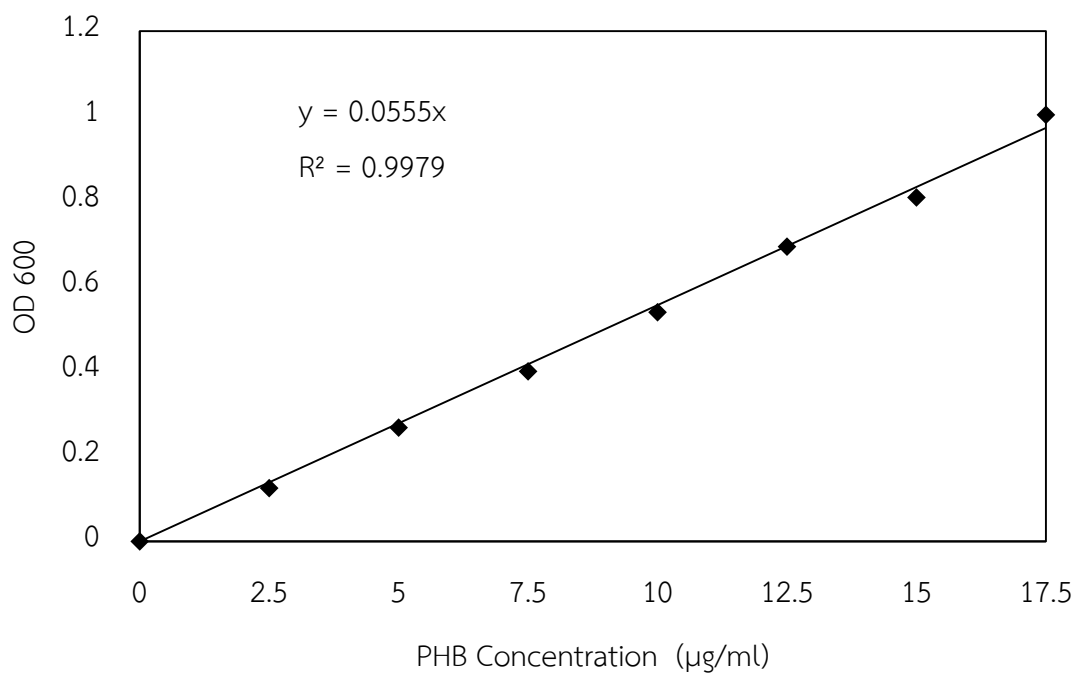
ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ *เติมในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารแข็ง (NA agar plate และ NA agar slant) จะต้องละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันก่อน ยกเว้นผงวุ้น แล้วเติมผงวุ้น (15 กรัม) พร้อมให้ความร้อนจนผงวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกับสารละลาย ก่อนนำไปฆ่าเชื้อ

2. กราฟมาตรฐานน้ำหนักรเซลล์



3. กราฟมาตรฐานพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB)



เอกสารตีพิมพ์เผยแพร่

Phakphimol Piwpan, Adisak Jaturapiree and Phimchanok Jaturapiree. Isolation and production of polyhydroxybutyrate (PHB) from isolated strain *Bacillus* sp. using crude glycerol as a carbon source. The 6th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural (FerVAAP 2015). 29-31 July 2015, Centara Hotel and Convention Centre, Khon Kaen, Thailand (Poster+Proceeding)

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย) นางพิมพ์ชนก จตุรพิริย์
(ภาษาอังกฤษ) Mrs Phimchanok Jaturapiree
2. วัน เดือน ปีเกิด 2 ตุลาคม 2518
3. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3 7109 00036 31 0
4. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
5. สถานที่ทำงาน
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
โทรศัพท์ 0-3421-9360, 089-1204518 โทรสาร 0-3421-9360
e-mail phimchanok@hotmail.com
6. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีที่จบ พ.ศ. 2539
ปริญญาโท	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขา วิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่จบ พ.ศ. 2543
ปริญญาเอก	Dr.nat.tech. สาขา วิศวกรรมชีวเคมี University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria ปีที่จบ พ.ศ. 2549
7. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา
 - ระดับปริญญาโท

ชื่อเรื่อง	“Poly- β -hydroxybutyrate production from <i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB 11599 by two stage continuous fermentation”
ปีที่ดำเนินการ	2542-2543
 - ระดับปริญญาเอก

ชื่อเรื่อง	“Development of a process for the hydrolysis of the milk sugar lactose employing novel extremophilic enzymes”
ปีที่ดำเนินการ	2547-2549
8. ความเชี่ยวชาญ

สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา
กลุ่มวิชาอุตสาหกรรมเกษตร
แขนงวิชา Fermentation Process และ Enzyme Technology

สาขาวิศวกรรมศาสตร์และอุตสาหกรรมวิจัย

กลุ่มวิชาวิศวกรรมศาสตร์

แขนงวิชา Biochemical Engineering และ Downstream Processes

9. ประสบการณ์งานวิจัย

- **Phimchanok Nakkharat** and Dietmar Haltrich, (2006) Purification and characterisation of an intracellular enzyme with beta-glycosidase and beta-galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. *Journal of Biotechnology*. 123: 304-313.
- **Phimchanok Nakkharat** and Dietmar Haltrich, (2006) Lactose hydrolysis and formation of galactooligosaccharides by a novel immobilized beta-galactosidase from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 129-132: 215-225.
- **Phimchanok Nakkharat**, Montarop Yamabhai, Klaus D. Kulbe and Dietmar Haltrich, (2006) Formation of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis by a novel beta-galactosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Biotechnology Journal*. 1: 633-638.
- **Phimchanok Nakkharat** and Dietmar Haltrich (2007) Beta-Galactosidase from *Talaromyces thermophilus* immobilized on to Eupergit C for production of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis in batch and packed-bed reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23: 759-764.
- **Phimchanok Nakkharat**, Arkom Tesnum, Arkira Maethawarakorn Dietmar Haltrich and Chirakarn Muangnapoh. (2008) Characterization of a Crude Thermostable beta-galactosidase by the Bacterium PD1 Isolated from the Pong Dueat Hot Spring. *Kasert Journal (Nat. Sci.)* 42: 264-268.
- Somyos Osiriphun and **Phimchanok Jaturapiree**. (2009) Isolation and characterization of beta-galactosidase from the thermophile B1.2. *As. J. Food Ag-Ind.* 135-143.
- Chantawongvuti, R., J. Veerajetbodithat, **P. Jaturapiree** and C. Muangnapoh (2010) Immobilization of *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 on Loofa Sponge Coated with Chitosan for Lactic Acid Fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(1), 110–116.

- Witsanu Srila, Budsaraporn Ngampanya and **Phimchanok Jaturapiree**. (2011) Cloning of Beta-Galactosidase Gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892 and Expression in *Escherichia coli*. Thai Journal of Agricultural Science. 44 (5): 471-476.
- **Phimchanok Jaturapiree**, Suganya Phuengjayaeam, Porntip Seangsawang, Witsanu Srila and Chirakarn Muangnapoh. (2012) Isolation and Production of Novel Beta-galactosidase from a Newly Isolated, Moderate Thermophile, *Bacillus* sp. Strain B1.1 Journal of Food Science and Engineering 2: 395-402.
- Sathita Phol-in, Donlaya Kamkalong, Adisak Jaturapiree and **Phimchanok Jaturapiree**. (2012) Poly (3-hydroxybutyrate) production from glycerol by marine microorganisms. KKU Research Journal. 17(4): 573-579.
- ชุติมา วันเพ็ญ, บุษราภรณ์ งามปัญญา, สุวัฒนา พฤกษ์ศรี, พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ และ ปราโมทย์ คูวิจิตร จารุ. (2556) ผลของการพรีทรีตเมนต์ด้วยอัลตราซาวด์ต่อการสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 36(2): 249-258.
- Ratthadaporn Phathiphotikun, Phakphimol Piwpan, Adisak Jaturapiree and **Phimchanok Jaturapiree**. (2014) Polyhydroxybutyrate(PHB) production by *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 from low-cost substrate as carbon source. KKU Research Journal. 19 (Supplement Issue): 53-59.
- Hemmaratchirakul, J., **Jaturapiree, P.**, Prueksasri, S. and Wichienchot, S. (2015). "Production of galactooligosaccharide by β -galactosidase from *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* BFP32." *International Food Research Journal*. 22(6): 2550-2557.
- Kaenpanao, P., Piwpan, P. and **Jaturapiree, P.** (2016). "Prebiotic Fructooligosaccharide Production from Yeast Strain ML1." *International Food Research Journal*. 23(1): 425-428.