สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
กิตติกรรมประกาศ	(3)
สารบัญ	(4)
สารบัญตาราง	(6)
สารบัญภาพ	(8)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 หลักการและเหตุผล	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
2.1 Polyhydroxyalkanoates (PHAs)	3
2.2 Polyhydroxybutyrate (PHB)	4
2.3 Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)	5
2.4 กระบวนการสังเคราะห์ PHA ที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์	8
2.5 กระบวนการสังเคราะห์ PHA ที่ผลิตจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์	10
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHA ของจุลินทรีย์	11
2.7 การสกัด PHA และทำให้บริสุทธิ์	18
บทที่ 3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	19
3.1 วัสดุ	19
3.2 วิธีวิเคราะห์	19
3.3 วิธีการทดลอง	22
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	28
4.1 การศึกษาลักษณะของน้ำเสีย	28
4.2 ลักษณะการเจริญและการผลิต PHA ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบ SBR ในอาหารสังเคราะห์	29
4.3 การแยกเชื้อที่สามารถผลิต PHA จากกลุ่มจุลินทรีย์จากระบบ SBR	31
4.3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต PHA จากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์	31
4.3.2 การเทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกได้ ด้วยเทคนิค 16s rDNA	34

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHA จากน้ำเสียโดยแบคทีเรียที่แยกได้ในขวดรูปชมพู่	36
4.4.1 การเตรียมเชื้อสำหรับเป็นเชื้อเริ่มต้น	36
4.4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHA ได้สูง	37
4.4.3 ผลของอัตราการเขย่า	40
4.4.4 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น	43
4.4.5 ผลของการเติมกรดโพรพิโอนิกและวาเลอริก	46
4.4.6 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	50
4.4.7 ผลของพีเอชเริ่มต้น	54
4.4.8 ผลของการฆ่าเชื้อน้ำเสีย	57
4.5 การศึกษาการผลิต PHA จากน้ำเสียโดยการเติมแบคทีเรียผสมในถังปฏิกรณ์	60
4.5.1 การศึกษาการผลิต PHA แบบเติมอาหารครั้งเดียว	60
4.5.2 การศึกษาการผลิต PHA แบบกึ่งต่อเนื่อง	65
4.6 การศึกษาองค์ประกอบหน่วยย่อยของ PHA ด้วย GC-FID	68
4.7 การศึกษาการผลิต PHA เชิงเศรษฐศาสตร์	69
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	71
เอกสารอ้างอิง	73
ภาคผนวก	79

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	คุณสมบัติของ PHB เปรียบเทียบกับ PP	6
ตารางที่ 2	เปรียบเทียบคุณสมบัติของพอลิเมอร์	7
ตารางที่ 3	การสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	13
ตารางที่ 4	องค์ประกอบของน้ำเสียจากถังสร้างกรด โรงงานอาหารทะเล บริษัททรอปิคอล แคนนิ่ง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)	29
ตารางที่ 5	คุณลักษณะของไอโซเลทในอาหารวุ้นสังเคราะห์ (GM1) ที่มีการเติมกรดอะซิติก 30 มิลลิโมลาร์	32
ตารางที่ 6	ผลการเทียบเคียงแบคทีเรีย *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I, *Achromobacter* sp. PSU-M, *Acinetobacter baumannii* PSU-V และ *Acinetobacter baumannii* PSU-X กับฐานข้อมูลใน gene bank	35
ตารางที่ 7	ค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถสะสม PHA ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิก ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง	39
ตารางที่ 8	ผลของอัตราการเขย่าต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราการเขย่าต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง	42
ตารางที่ 9	ผลของการเติมเชื้อเริ่มต้นต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง	45
ตารางที่ 10	ผลของการเติมกรดในน้ำเสียต่อการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง	49
ตารางที่ 11	ค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริก ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง	54

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 12 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 55

ตารางที่ 13 ผลของการฆ่าเชื้อน้ำเสียต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 58

ตารางที่ 14 ผลของอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M แบบการเติมอาหารครั้งเดียวในน้ำเสียที่เติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 64

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	3
ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของ (A) P(HB-*co*-HV) and (B) P(HB-*co*-HHx)	5
ภาพที่ 3 วิถีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและการย่อยสลายในแบคทีเรีย	8
ภาพที่ 4 วิถีความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ PHB และ PHBV	10
ภาพที่ 5 กระบวนการสังเคราะห์ PHA ในระบบ PAO/GAO ภายใต้สภาวะไร้อากาศ	11
ภาพที่ 6 การเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากในอาหารสังเคราะห์ GM1 โดยเติมกรดอะซิกความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับการใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น	30
ภาพที่ 7 ผลของอัตราการเขย่าต่อการเจริญจากการเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง	31
ภาพที่ 8 ลักษณะของ PHA granule ภายในเซลล์ โดยใช้ transmission electron microscope	33
ภาพที่ 9 การเจริญของแบคทีเรียที่แยกได้จากระบบ SBR เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ GM1 โดยเติมกรดอะซิติกความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	36
ภาพที่ 10 การเจริญ (a) และการผลิต PHA (b) จากการเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถสะสม PHA ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	38
ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถสะสม PHA ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	39
ภาพที่ 12 ผลของการเขย่าต่อการเจริญ (a) และการผลิต PHA (b) จากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง	41
ภาพที่ 13 ผลของการเขย่าต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 14 ผลของการเติมเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญ (a) และการผลิต PHA (b) จากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม Achromobacter xylosoxidans PSU-I และ Achromobacter sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง 44

ภาพที่ 15 ผลของการเติมเชื้อเริ่มต้นต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชจากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม Achromobacter xylosoxidans PSU-I และ Achromobacter sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 45

ภาพที่ 16 ผลของการเติมกรดในน้ำเสีย ต่อการเจริญ (a) และการผลิต PHA (b) จากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 48

ภาพที่ 17 ผลของการเติมกรดในน้ำเสียต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 50

ภาพที่ 18 การเจริญ (a) และการผลิต PHA (b) จากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้นต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 52

ภาพที่ 19 ผลของความเข้มข้นของกรดวาเลอริกที่เติมในน้ำเสียต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 53

ภาพที่ 20 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญ (a) และการผลิต PHA (b) จากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 56

ภาพที่ 21 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 57

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 22 ผลของการฆ่าเชื้อน้ำเสียต่อการเจริญ (a) และการผลิต PHA (b) จากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 59

ภาพที่ 23 ผลของการฆ่าเชื้อน้ำเสียต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 60

ภาพที่ 24 ผลของอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนต่อการเจริญ (a) และการผลิต PHA (b) จากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M แบบการเติมอาหารครั้งเดียวในน้ำเสียที่เติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 63

ภาพที่ 25 ผลของอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ในระหว่างการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M แบบการเติมอาหารครั้งเดียวในน้ำเสียที่เติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 64

ภาพที่ 26 การเจริญและการผลิต PHA (a) และ ปริมาณผลผลิต PHA ที่สะสมในเซลล์ (b) จากการเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องของแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่มีการให้อากาศที่ 1 vvm อัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 66

ภาพที่ 27 การเปลี่ยนแปลงพีเอชจากการเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องของแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่มีการให้อากาศที่ 1 vvm อัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 67

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 28 โครมาโตแกรมของ PHA ที่ผลิตจากการเลี้ยงแบคทีเรียผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่มีการให้อากาศที่ 1 vvm อัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 69