การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมโดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม

พรทิพพา พิญญาพงษ์

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์
ประจำปีงบประมาณ 2561
พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยในหัวข้อเรื่อง การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมโดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2561 (เสนอผ่าน วช) เพื่อมุ่งหวังที่จะศึกษาการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต และการตรวจสอบชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ และ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้เห็นคุณค่าของโครงการวิจัยและให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยในครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวิณี คณาสวัสดิ์ ผู้ล่วงลับไปแล้วที่ได้มอบความรู้ในการทำวิจัยแก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ เจ้าหน้าที่ศูนย์บริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ศวท มช) และ คุณนพดล บุณรัตนพันธุ์ ที่ได้สละเวลาอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษามาโดยตลอด และขอขอบคุณกำลังใจจากครอบครัวที่รักยิ่ง ที่ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พรทิพพา พิญญาพงษ์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์
2561

ชื่อเรื่อง การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมโดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรทิพพา พิญญาพงษ์

คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบัน มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) คัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม 2) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม และ 3) ศึกษาชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม

ในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งโรงงานแหนมในอาหารวุ้น E2 ที่มีอะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอน มีเชื้อเพียง 4 ไอโซเลท เท่านั้นที่เจริญในอาหารดังกล่าวได้ ซึ่งรหัสของเชื้อคือ FMI-1, FMI-2, FMI-3 และ FMI-4 ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้โดยการย้อมสีด้วย Sudan Black B เลือกเฉพาะโคโลนีที่ให้ผลบวก คือ FMI-2, FMI-3 และ FMI-4 นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด nitrogen-free mineral salts medium ซึ่งมีน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอชให้เป็น 7 ใช้ปริมาตรเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เชื้อ FMI-3 ผลิต PHA ได้สูงที่สุดร้อยละ 69.16 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 48 ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปจึงเลือกศึกษาเฉพาะเชื้อ FMI-3 โดยศึกษาแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมได้แก่ น้ำแช่เปลือกสับปะรด น้ำแช่ขนุน แบะแซ กากน้ำตาล น้ำมันใช้แล้ว กลีเซอรอลดิบ และ น้ำทิ้งจากโรงอาหาร ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมได้แก่ แอมโมเนียม-ซัลเฟต โมโนโซเดียมกลูตาเมท โซเดียมไนเตรท ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมอะซีเตท ผลการทดลองพบว่าแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ กลีเซอรอลดิบเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และ แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยเชื้อ FMI-3 พบว่าการเลี้ยงเชื้อแบบสองขั้นตอนคือ ขั้น pre-culture และ ขั้นเลี้ยงในอาหารเหลว mineral salt medium ซึ่งมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนและกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7

เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 3.046 และ 2.351 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นผลผลิตของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตร้อยละ 77.18 และองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อรหัส FMI-3 เป็นชนิดสายโซ่กลางได้แก่ 3-ไฮดรอกซีออกทาโนอิกแอซิด 3-ไฮดรอกซีเดคาโนอิกแอซิด และ 3-ไฮดรอกซีโดเดคาโนอิกแอซิด

คำสำคัญ : พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต กลีเซอรอลดิบ แบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม

มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์
UTTARADIT RAJABHAT UNIVERSITY

Research Title Production of Polyhydroxyalkanoate from Agricultural Waste and Industrial Byproducts by Bacterial that Isolated from Wastewater of Nahm Industry
Name Asst. Prof. Dr. Porntippa Pinyaphong
Faculty Science and Technology
University Uttaradit Rajabhat University
Academic Year 2018

ABSTRACT

The objective of this research was to 1) select suitably carbon source and nitrogen source for polyhydroxyalkanoate production from agricultural waste and industrial byproducts 2) study optimum condition of polyhydroxyalkanoate production from agricultural waste and industrial byproducts and 3) study kind and component of polyhydroxyalkanoate that produced from agricultural waste and industrial byproducts.

For selection bacteria from wastewater of Nahm Industry, E 2 medium containing acetate as carbon source was used for picking. Only 4 isolated bacteria grew on E 2 medium which was called FMI-1, FMI-2, FMI-3 and FMI-4. Besides, three isolates including FMI-2, FMI-3 and FMI-4 were stained with Sudan Black B. Afterward, the positive isolates were cultivated in nitrogen-free mineral salts medium (MSM) containing palm oil 1% as carbon source, pH was adjusted to 7, 5% of initial bacteria volume was added and incubated in shaking incubator at 200 rpm, 30 $^{\circ}$C for 72 hours. It was found that FMI-3 gave the highest PHA production (69.16%) at 48 hours. Therefore, FMI-3 was used for investigation of polyhydroxyalkanoate production from agricultural waste and industrial byproducts such as pineapple bark soaked, bagasse soaked, glues, molasses, used oil, crude glycerol and canteen wastewater. The suitable sources of nitrogen such as ammonium sulphate, monosodium glutamate, sodium nitrate, urea, ammonium chloride, ammonium nitrate and ammonium acetate. The result revealed that crude glycerol (50 g/L) and ammonium sulphate (5 g/L) were suitable source of carbon and nitrogen, respectively. In addition, optimum condition of polyhydroxyalkanoate fermentation by FMI-3 was investigated. It was found that the optimum conditions were two-stage culture which consisted of pre-

culture and then inoculum in mineral salt medium containing ammonium sulphate and crude glycerol as nitrogen source and carbon source, C : N ratio was 40, temperature of fermentation at 40^{o}C, pH of medium at 7 and shaking with 160 rpm for 72 hours. The highest yield of dried cell weight and PHA was 3.046 and 2.351 g/L, respectively (77.18% PHA). The compositions of synthesized polyhydroxyalkanoate were 3-hydroxyoctanoic acid, 3-hydroxydecanoic acid and 3-hydroxydecanoic acid.

Key words: polyhydroxyalkanoate, crude glycerol, isolated bacterial from Nahm Industry wastewater

มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์
UTTARADIT RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		ก
บทคัดย่อ		ข
สารบัญ		ฉ
รายการตารางประกอบ		ซ
รายการภาพประกอบ		ฌ
บทที่ 1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	2
	สมมติฐานการวิจัย	3
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
	กรอบแนวคิดในการวิจัย	3
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	4
	การสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในเซลล์จุลินทรีย์	6
	คุณสมบัติของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	16
	การเก็บเกี่ยวพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากเซลล์จุลินทรีย์	18
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย	23
	ศึกษาการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม	23
	ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	26
	ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	28
	การตรวจสอบชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	29
บทที่ 4	ผลการวิจัย	31
	การเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม	31
	แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	34
	สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด	37
	ผลการตรวจสอบชนิด และองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	42

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 5	สรุป อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	44
	สรุป	44
	อภิปรายผลการวิจัย	45
	ข้อเสนอแนะ	48
บรรณานุกรม		49

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พลาสติกเป็นวัสดุสังเคราะห์ที่มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์แทนโลหะ ไม้ หรือวัสดุธรรมชาติอื่น ๆ มีความทนทาน แข็งแรง สามารถนำมาขึ้นรูปได้ จึงทำให้พลาสติกมีบทบาทอย่างยิ่งในชีวิตประจำวัน พลาสติกเป็นวัสดุที่สังเคราะห์ขึ้นจากน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งเป็นพลังงานสิ้นเปลืองที่ใช้แล้วหมดไป (Gironi and Piemonte, 2011) พลาสติกที่ใช้แล้วมักถูกทิ้งเป็นขยะพลาสติกและมีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากพลาสติกมีน้ำหนักโมเลกุลสูง และพันธะระหว่างโมเลกุลแข็งแรงทำให้พลาสติกย่อยสลายได้ยากในธรรมชาติ จึงทับถมอยู่ในดินซึ่งจะมีปริมาณมากขึ้นตามปริมาณการใช้พลาสติก (Ramadas et al., 2009) ดังนั้นการผลิตพลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่สังเคราะห์จากน้ำมันปิโตรเลียม แต่สลายได้โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติและสภาวะแวดล้อม เช่น แสงแดด ความชื้น และ ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมจากการใช้พลาสติกสังเคราะห์ (Numata et al., 2009)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates; PHAs) เป็นพลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพชนิดหนึ่งที่ไม่ละลายน้ำ ไม่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม เป็นเทอร์โมพลาสติกเช่นเดียวกับพอลิเอทิลีน และ พอลิโพรไพลีน เป็นวัสดุหมุนเวียนตามธรรมชาติ และมีความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย และมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ได้ (Chen, 2009) จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ เช่น *Alcaligenes eutrophus*, *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putida* และ *Escherichia coli* ที่ตัดต่อพันธุกรรม เป็นต้น (Steinbuchel et al., 1992) โดยพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะสะสมอยู่ในรูปของเม็ดกรานูลกระจายภายในเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานภายใต้สภาวะที่จำกัดสารอาหาร เช่น แอมโมเนียม เหล็ก แมงกานีส แมกนีเซียมและฟอสเฟต แต่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินพอ (Reddy et al., 2003) แต่มีแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ในสภาวะที่ไม่ได้จำกัดสารอาหาร เช่น *A. eutrophus* และ *A. latus* (Ojumu et al., 2004) พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตแบ่งตามจำนวนคาร์บอนได้เป็น 3 ชนิด คือ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตชนิดสายโซ่สั้น (shortchain-length PHAs; scl-PHAs) มีจำนวนคาร์บอนประมาณ 3-5 อะตอม พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตชนิดสายโซ่กลาง (mediumchain-length PHAs; mcl-PHAs) มีจำนวนคาร์บอนประมาณ 6-14 อะตอม และพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตชนิดสายโซ่ยาว (longchain-length PHAs; lcl-PHAs) มีจำนวนคาร์บอนมากกว่า 14 อะตอม (Anderson and Dawes, 1990; Aldor and Keasling, 2003) ในปัจจุบันมี

การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในระดับอุตสาหกรรมได้บ้างแล้ว แต่ก็ยังพบว่ามีข้อจำกัดอยู่มาก โดยเฉพาะเรื่องต้นทุนการผลิตที่ยังอยู่ในระดับสูง ซึ่งเมื่อเทียบกับต้นทุนการผลิตพลาสติกจากปิโตรเลียมพบว่าต้นทุนการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงกว่าต้นทุนการผลิตพลาสติกจากปิโตรเคมีอยู่ถึง 8-10 เท่า ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นค่าใช้จ่ายของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน (Ojumu and Solomon, 2004) ต้นทุนการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสามารถถูกทำให้ลดลงได้โดยใช้สารตั้งต้นราคาถูก เช่น ใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อจุลินทรีย์ (Pandey et al., 2009) ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจำนวนมากซึ่งมักจะถูกทิ้งไว้ในไร่นาหรือถูกเผาทิ้ง รวมไปถึงของเสียจากภาคอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นส่วนน้อย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมโดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนมซึ่งสามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซี-อัลคาโนเอตในสภาวะที่จำกัดธาตุไนโตรเจนได้ (พรทิพพา พิญญาพงษ์ และคณะ. 2555) เพื่อเป็นการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมมาแปรรูปเพื่อให้มีคุณค่าเพิ่มมากขึ้น และเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) เพื่อคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซี-อัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม

2) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม

3) เพื่อศึกษาชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม

ขอบเขตของการวิจัย

ในงานวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ศึกษาการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ เปลือกสับปะรด ชานอ้อย น้ำเชื่อมข้าวโพด กากน้ำตาล น้ำมันที่ใช้แล้ว กลีเซอรอลดิบ และน้ำทิ้งจากโรงอาหาร เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงาน แล้วคัดเลือกเฉพาะวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญหรือมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ในการวิเคราะห์ผลการทดลองเชิงสถิติใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 นำแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมมาศึกษาหาปริมาณที่

เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ เช่น ทริปโทน สารสกัดจากยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต โมโนโซเดียมกลูตาเมท โซเดียมไนเตรท และ น้ำหมักข้าวโพด ที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต นำแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมมาศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง อัตราเร็วในการกวน และ อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่มีต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม ทำการสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตออกจากเซลล์ของแบคทีเรียและวิเคราะห์หาปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยเครื่องยูวี-สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบและชนิดของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตได้ด้วย GC-MS

สมมติฐานการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนมสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1) สามารถลดต้นทุนในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม

2) สามารถนำไปเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติ หรือ ตีพิมพ์บทความวิจัยในวารสารได้

กรอบแนวคิดในการวิจัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาวิจัยเรื่อง การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมโดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม ผู้วิจัยได้ทำการทบทวนแนวคิดทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องดังนี้

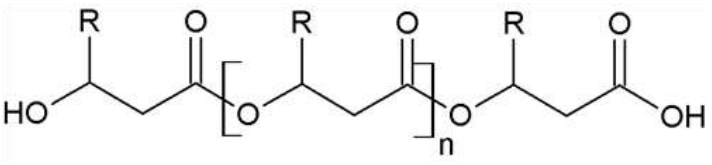
1. พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต
2. การสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในเซลล์จุลินทรีย์
3. คุณสมบัติของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต
4. การเก็บเกี่ยวพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากเซลล์จุลินทรีย์
5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจัดเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้และมีลักษณะเด่นกว่าพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ชนิดอื่นๆ คือ มีองค์ประกอบของมอโนเมอร์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก ในปัจจุบันที่พบมากที่สุดคือ พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทีเรต (poly-β-hydroxybutyrate, PHB) พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจัดเป็นเทอร์โมพลาสติกชนิดหนึ่ง ที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถนำมาใช้ทางชีวภาพ และสามารถย่อยสลายได้ นอกจากนี้สามารถผลิตได้จากแหล่งทรัพยากรหมุนเวียน สามารถตกผลึกได้ดี โปร่งแสง และไม่ละลายน้ำ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับพอลิโพรพิลีน (polypropylene) ซึ่งเป็นพลาสติกที่สังเคราะห์จากกระบวนการทางปิโตรเคมี

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate, PHA) เป็นพอลิเอสเทอร์ที่สะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดในลักษณะเม็ดแกรนูลภายใต้สภาวะที่สารอาหารไม่สมดุล ขาดแคลนไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือ ออกซิเจน แต่มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ (Satoh et al., 1998) แบคทีเรียจะใช้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเป็นพลังงานสำรอง พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตประกอบด้วยโมโนเมอร์ของกรดไฮดรอกซี (hydroxyl acid, HA) มากกว่า 80 ชนิด โดยจะมีคุณสมบัติเชิงกลแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับการรวมตัวกันของโมโนเมอร์ (Lee, 1996)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีองค์ประกอบของโครงสร้างสายหลักอยู่ในรูปของ 3-กรดไฮดรอกซีอัลคาโนอิค (R-(3)-hydroxyalkanoic หรือ R-β-hydroxyalkanoic) โดยมีโครงสร้างทั่วไปดังภาพที่ 2.1 ซึ่งจะมีความแตกต่างกันของหมู่ฟังก์ชันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) หรือตำแหน่งบีตา (β-position) ซึ่งทำให้เกิดเป็นพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตแต่ละชนิด น้ำหนักโมเลกุลของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตอยู่ในช่วง 200,000-3,000,000 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะในการเจริญของเชื้อ (Sudesh et al., 2000)



n = 600-3500
R= hydrogen เรียกว่า Poly (3-hydroxypropionate)
R= methyl เรียกว่า Poly (3-hydroxybutyrate)
R= ethyl เรียกว่า Poly (3-hydroxyvalerate)
R= propyl เรียกว่า Poly (3-hydroxyhexanoate)
R= pentyl เรียกว่า Poly (3-hydroxyoctanoate)
R= nonyl เรียกว่า Poly (3-hydroxydodecanoate)

ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต
ที่มา : Khanna and Srivastava, 2005.

ประเภทของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

องค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีหน่วยย่อยของโมโนเมอร์ชนิดต่าง ๆ มารวมกัน เกิดเป็นสายพอลิเมอร์ยาวหรือสั้นขึ้นอยู่กับจำนวนโมโนเมอร์ที่มาต่อรวมกัน (Doi, 1990) จำแนกออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่สั้น (short chain length PHAs หรือ scl-PHAs) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีคาร์บอนตั้งแต่ 3-5 อะตอม โดยพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตเป็นสารในกลุ่มนี้ด้วย โดยพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่สั้นจะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่สังเคราะห์จากปิโตรเคมีมากที่สุด

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลาง (medium chain length PHAs หรือ mcl-PHAs) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีคาร์บอน 6-14 อะตอม ซึ่งสารในกลุ่มนี้ได้แก่ พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮกซาโน-เอต) P(3HHx) พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮปทาโนเอต) P(3HHp) พอลิ (3-ไฮดรอกซีออกทาโนเอต) P(3HO) และ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโดดีคาโนเอต) P(3HDD) เป็นต้น พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลางจะมีคุณสมบัติคล้ายยาง (elastomers) (Suriyamongkol et al., 2007)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ยาว (long chain length PHAs หรือ lcl-PHAs) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีคาร์บอนมากกว่า 14 อะตอม

นอกจากนี้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตยังสามารถแบ่งได้ตามลักษณะการเชื่อมต่อกันของโมโนเมอร์ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ โฮโมพอลิเมอร์ และ โคพอลิเมอร์ ดังนี้

โฮโมพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อรวมกัน เช่น การเชื่อมต่อกันของกรดไฮดรอกซีบิวทีเรต ซึ่งมีหมู่เมธิลมาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่ง β

หรือ ตำแหน่งที่ 3 และมีโมโนเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์เกิดเป็นสารประกอบพอลิเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทีเรต (poly-β-hydroxybutyrate, PHB) โดยมีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ คือ พอลิโพรพิลีน หรือ พอลิเอทิลีน ซึ่งสามารถนำมาอัด ปั่น ให้เป็นเส้นใยเพื่อทำเป็นแผ่นฟิล์มได้ (Khanna and Srivastava, 2005)

โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยโมโนเมอร์หลายชนิดมาต่อรวมกัน เช่น พอลิ ไฮดรอกซีบิวทิเรตโคไฮดรอกซีวาลีเรต (poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, PHBV) ประกอบด้วยโมโนเมอร์สองชนิดคือไฮดรอกซีบิวทีเรตและไฮดรอกซีวาลีเรต (hydroxyvalerate, HV) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่เกิดแบบสุ่มและมีโอกาสเกิดได้สูงประมาณร้อยละ 50 โดยเฉพาะไฮดรอกซีวาลีเรตเกิดได้ตั้งแต่ร้อยละ 0-95 โดยโมล ซึ่งจะช่วยปรับปรุงลักษณะทางกายภาพของพลาสติกชีวภาพให้ดีขึ้น โดยสัดส่วนของไฮดรอกซีวาลีเรตยิ่งสูงจะช่วยให้โคพอลิเมอร์มีความแข็งแรงมากขึ้น จุดหลอมเหลวลดลง มีความยืดหยุ่นและมีค่าการยืดออก (elongation) เพิ่มขึ้น ดังนั้นสามารถเพิ่มคุณภาพของพอลิเมอร์ได้โดยการควบคุมสัดส่วนของ 3HV ให้เหมาะสม (Khanna and Srivastava, 2005)

2. การสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในเซลล์จุลินทรีย์

การสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์มีความเครียด กล่าวคือ มีการจำกัดสารอาหารจำพวกไนโตรเจน หรือ ฟอสฟอรัส ในขณะที่ยังคงมีปริมาณแหล่งคาร์บอนอยู่ในสภาวะนี้เซลล์จะเกิดการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เซลล์จะไม่มีการเจริญเติบโตหรือแบ่งตัว แต่กระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ยังคงมีต่อไปเพื่อสร้างไฮดรอกซีอัลคิลโคเอ (hydroxyalkyl-CoA, HA-CoA) จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ จะมีเอนไซม์ PHA synthase เป็นเอนไซม์สำคัญทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของพอลิไฮดรอกซีอัลคา-โนเอต โดยใช้ไฮดรอกซีอัลคิลโคเอ เป็นซับสเตรท (Rehm, 2003) ซึ่งแบคทีเรียสามารถสร้างไฮดรอก-ซีอัลคิลโคเอจากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้โดยอาศัยวิถีเมแทบอลิซึมที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการสังเคราะห์ ซึ่งศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล (2552) ได้สรุปไว้ดังนี้

2.1 ชีวสังเคราะห์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) ผ่านวิถีเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต

พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) หรือ P(3HB) จัดเป็นพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่สั้นชนิดที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ สามารถพบได้ในเซลล์ของแบคทีเรียหลากหลายชนิด ชีวสังเคราะห์ของพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) ส่วนใหญ่จะทำการศึกษาในแบคทีเรีย *Ralstonia eutropha* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์และสะสม พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) ในปริมาณสูง ชีวสังเคราะห์พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) ของ *R. eutropha* จะดำเนินการผ่านวิถีเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตเพื่อให้ได้อะซีติลโคเอ จากนั้นอะซีติลโคเอจะถูกส่งต่อเข้าสู่วิถีชีวสังเคราะห์อีกสามขั้นตอน เพื่อให้ได้

พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) โดยมีเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้อง 3 ชนิด ได้แก่ β-ketothiolase (PhaA), acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) และ PHB synthase (PhaC) ซึ่งเอนไซม์ β-ketothiolase ทำหน้าที่สังเคราะห์อะซีโตอะซีติลโคเอจากอะซีติลโคเอ 2 โมเลกุล แล้วอะซีโตอะซีติลโคเอจะถูกรีดิวซ์ต่อไปด้วยสารรีดิวซ์ชนิดนิโคตินาไมด์แอดินีนไดนิวคลีโอไทด์ (NADH) จากการเร่งปฏิกิริยาของ acetoacetyl-CoA reductase ได้ *(R)*-3-hydroxylbutyryl-CoA ซึ่งท้ายที่สุดจะถูกนำไปสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้เป็น พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) โดยการเร่งปฏิกิริยาของ PHB synthase

2.2 ชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลางผ่านวิถีบีตาออกซิเดชันของกรดไขมัน

การสร้างสารตัวกลางในการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลางเกิดผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ 3 วิถี คือ (1) ผ่านวิถีของการสังเคราะห์กรดไขมันซึ่งสังเคราะห์ *(R)*-3-hydroxyacyl-CoA เป็นสารตั้งต้นจากแหล่งคาร์บอนที่ไม่ใช่ไขมัน เช่น กลูโคส และ กลูโคเนต (2) ผ่านวิถีบีตาออกซิเดชันของกรดไขมัน และ (3) ผ่านวิถีการเพิ่มสายเอซิลโคเอด้วยอะซีติลโคเอ ซึ่งทั้ง 3 วิถีสร้างสารมัธยันตร์หลายชนิด เช่น *(R)*-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein (ACP), 2-*trans*-enoyl-CoA, (*S*)-3-hydroxyacyl-CoA และ 3-ketoacyl-CoA ซึ่งแสดงได้ในภาพที่ 2.2 โดยมีข้อสันนิษฐานว่า (*S*)-3-hydroxyacyl-CoA และ 3-ketoacyl-CoA จะถูกเปลี่ยนไปเป็น *(R)*-3-hydroxyacyl-CoA ด้วยเอนไซม์ 3-hydroxyacyl-CoA epimerase และ 3-ketoacyl-ACP reductase ตามลำดับ (Steinbuchel and Hein, 2001) รายละเอียดของวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน และ วิถีบีตา-ออกซิเดชัน อธิบายได้ดังนี้

2.2.1 การสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลางผ่านวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน จากการศึกษาการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลางจากกลูโคสของเชื้อ *Pseudomonas putida* KT2442 พบว่า พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลางที่สังเคราะห์ได้ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยโมโนเมอร์ชนิด 3-hydroxydecanoate (3HD) ที่เหลือจะเป็นโมโนเมอร์อื่น ได้แก่ 3-hydroxyhexanoate, 3-hydroxyoctanoate, 3-hydroxydodecanoate, 3-hydroxy-dodecenoate และ 3-hydroxytetradecanoate ซึ่งทั้งหมดเป็นโมโนเมอร์ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมมากกว่าหรือเท่ากับกลูโคส และโมเลกุลของโมโนเมอร์เหล่านี้ล้วนมีโครงสร้างที่ตรงกับโมเลกุลของ *(R)*-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นในวิถีของการสังเคราะห์กรดไขมัน (Huijberts et al., 1992)

2.2.2 การสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่กลางผ่านวิถีบีตาออกซิเดชัน ในวิถีบีตาออกซิเดชันจะมี trans-2-enoyl-CoA เป็นสารมัธยันต์ที่สามารถเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxyacyl-CoA ได้โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ enoyl-CoA hydratase ที่จำเพาะต่อ *R*-enantiomer ซึ่งมักจะพบในแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ชนิดสายโซ่กลางจากกรดไขมัน หรือ น้ำมัน เช่น *Pseudomonas aeruginosa* และ *Aeromonas punctata* เป็นต้น (Fukui et al., 1999)

ภาพที่ 2.2 วิถีเมแทบอลิซึมของชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตชนิดสายโซ่กลาง
ที่มา: Kim et al., 2007.

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของจุลินทรีย์

การสังเคราะห์พอลิเมอร์โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพมีกลไกการสังเคราะห์ที่ซับซ้อน และสามารถเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อมได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อชนิดและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ สำหรับปัจจัยที่สำคัญต่อการสังเคราะห์ PHA มีดังนี้ (ปิยะรัตน์ บุญแสวง, 2552)

2.3.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอน

สายพันธ์จุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิต พบว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันแต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กันในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตส่งผลทำให้ชนิดของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันออกไปด้วย กล่าวคือ จุลินทรีย์บางสายพันธุ์อาจผลิตพอลิเมอร์ในรูปโฮโมพอลิเมอร์ ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์อีกชนิดอาจผลิตพอลิเมอร์ที่เป็นโคพอลิเมอร์ ดังแสดงในตาราง 2.1 จะเห็นได้ว่าการใช้จุลินทรีย์ต่างชนิดกันคือ *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126 และ *Corynebacterium hydrocarboxydans* ATCC 21767 แต่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันคือ

อะซิเตต 10 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต PHA พบว่าจุลินทรีย์ทั้งสองมีความสามารถในการผลิต PHA ในเซลล์ต่างกันเท่ากับ 29 และ 21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สัดส่วนของ HB และ HV ใน PHA ก็แตกต่างกันด้วย เท่ากับ 31 : 69 และ 50 : 50 ตามลำดับ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสัดส่วน HB และ HV ในการผลิต PHA จากการใช้อะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ *R. eutropha* H16 พบว่า PHA ที่ผลิตได้มีเพียง HB ในสัดส่วน100 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 2.1 การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของจุลินทรีย์บริสุทธิ์โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

จุลินทรีย์	ซับสเตรท (ความเข้มข้น)	สภาวะที่จำกัด	PHA (%w/w)	องค์ประกอบของ PHA		เอกสารอ้างอิง
				PHB (%)	PHV (%)	
Azotobacter beijerinckii	กลูโคส (5 g/L)	O_2	35	-	-	Senior, 1972.
	กลูโคส 20 g/L		75	-	-	
Azotobacter vinelandii UWD	วาลิเรต (10 mM) + กลูโคส	-	94	72	18	Page and Manchak, 1995.
	วาลิเรต (20 mM) + กลูโคส		64	78	22	
	วาลิเรต (30 mM) + กลูโคส		74	75	25	
	วาลิเรต (10 mM)		67	84	16	
	วาลิเรต (20 mM)		36	79	21	
	วาลิเรต (30 mM)		29	72	28	
Rhodococcus sp. NCIMB 40126	อะซีเตต (10 g/L)	NH_4^+	29	31	69	Haywood et al., 1991.
	แลคเตต (10 g/L)		25	22	78	
	กลูโคส (10 g/L)		21	25	75	
Rhodococcus ruber NCIMB 40126	กลูโคส	SO_4^{2-}	16.2	30.3	69.7	Anderson et al., 1992.
	แวลีน		26.2	18	82	
	กลูโคส + แวลีน		27.7	21.9	78.1	
Corynebacterium hydrocarboxydans ATCC 21767	อะซีเตต (10 g/L)	NH_4^+	21	50	50	Haywood et al., 1991.
	แลคเตต (10 g/L)		2	61	39	
	กลูโคส (10 g/L)		8	28	72	
Alcaligenes latus	ซูโครส (20 g/L)		50	100	0	Yamane et al., 1996.
R. eutropha Strain R3	กลูโคเนต (0.5 g/L)	NH_4^+	35.7	94	6	Steinbuchel and Pieper, 1992.
	อะซีเตต (0.5 g/L)	NH_4^+	29.5	96	4	
	ซัคซิเนต (0.8 g/L)	NH_4^+	21.5	93	7	
	แลคเตต (0.5 g/L)	NH_4^+	43.2	96	4	
	ฟรุกโตส	Mg^{2+}	45	93	7	
	ฟรุกโตส	SO_4^{2-}	47	94	6	
	กลูโคเนต	Mg^{2+}	33	95	5	
	กลูโคเนต	SO_4^{2-}	38	96	4	
R. eutropha	ส่วนลอยของสลัดจ์	NH_4^+	34	-	-	Lee and Yu, 1997.
R. eutropha H16	อะซีเตต (22 g/L)	NH_4^+	53	100	0	Doi et al. 1986.
	อะซีเตต (22 g/L) + โพรพริโอเนต (10 g/L)		51	81	19	
	โพรพิโอเนต (22 g/L)		35	57	43	
R. eutropha H16 (ATCC 17699)	กรดบิวทีริก (0.03 g/L)	NH_4^+	44	100	0	Shimizu et al. 1994.
	กรดบิวทีริก (0.3 g/L)		55	100	0	
	กรดบิวทีริก (3 g/L)	NH_4^+	75	100	0	

จุลินทรีย์	ซับสเตรท (ความเข้มข้น)	สภาวะที่จำกัด	PHA (%w/w)	องค์ประกอบของ PHA		เอกสารอ้างอิง
				PHB (%)	PHV (%)	
	กรดบิวทีริก (10 g/L)		63	100	0	
	วาลิเรต (3 g/L)		38	-	-	
R. eutropha H16	อะซีเตต (20 g/L)	NH_4^+	51	100	0	Doi et al. 1987.
	อะซีเตต (5 g/L)		13	100	0	
	อะซีเตต (20 g/L) + โพรพิโอเนต (1 g/L)		46	98	2	
	อะซีเตต (20 g/L) + โพรพิโอเนต (2 g/L)		52	95	5	
	อะซีเตต (20 g/L) + โพรพิโอเนต (4 g/L)		51	91	9	
	อะซีเตต (5 g/L) + โพรพิโอเนต (5 g/L)		22	79	21	
	อะซีเตต (5 g/L) + โพรพิโอเนต (10 g/L)		38	74	26	
	อะซีเตต (5 g/L) +โพรพิโอเนต (20 g/L)		45	72	28	
	โพรพิโอเนต (2 g/L)		12	78	22	
	โพรพิโอเนต (6 g/L)		18	76	24	
	โพรพิโอเนต (10 g/L)		28	72	28	
	โพรพิโอเนต (14 g/L)		42	69	31	
	โพรพิโอเนต (18 g/L)		56	73	27	
	โพรพิโอเนต (22 g/L)		31	70	30	
	โพรพิโอเนต (26 g/L)		40	56	44	
	โพรพิโอเนต (30 g/L)		35	55	45	
R. eutropha NCIB 11599	กลูโคส (10 g/L) + โพรพิโอนิก (1 g/L)	NH_4^+	59	85	15	Haywood et al., 1989.
	กลูโคส (10 g/L) + วาลิเรต (1 g/L)		60	78	22	
Alcaligenes faecalis NCIB 8156	อะซีเตต (10 g/L) + โพรพิโอเนต (1 g/L)	NH_4^+	14	78	22	Haywood et al., 1989.
	อะซีเตต (10 g/L) + วาลิเรต (1 g/L)		5	52	48	
Pseudomonas extorquens MP4	เมทานอล (10 g/L) + โพรพิโอเนต (1 g/L)	NH_4^+	26	95	5	Haywood et al., 1989.
	เมทานอล (10 g/L) + วาลิเรต (1 g/L)		5	46	54	
Pseudomonas sp. K	เมทานอล 1 % (v/v)	NH_4^+	52-57	100	0	Suzuki et al. 1986.

ที่มา : ดัดแปลงจาก Punrattanasin, 2001.

จุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่แหล่งคาร์บอนต่างกัน มีผลทำให้ชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกัน เช่น จากการเลี้ยง *R. eutropha* H16 เพื่อผลิต PHA โดยใช้อะซิเตตเปรียบเทียบกับโพรพิโอเนต อย่างละ 22 กรัมต่อลิตร พบว่าความสามารถในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์แตกต่างกัน

เท่ากับ 53 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าชนิดของพอลิเมอร์ก็แตกต่างกันด้วย โดยอะซิเตตจะส่งเสริมให้ผลิตโฮโมพอลิเมอร์ ซึ่งมีสัดส่วนของ HB และ HV ใน PHA เท่ากับ 100 : 0 ส่วนโพรพิโอเนตส่งเสริมให้ผลิตโคพอลิเมอร์ มีสัดส่วน HB และ HV เท่ากับ 57 : 43 และเมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นของจุลินทรีย์ คือ กรดบิวทีริก และ วาริเลต พบว่า กรดบิวทีริกส่งเสริมให้ได้โฮโมพอลิเมอร์ ซึ่งมีสัดส่วน HB ใน PHA 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวาลิเรตเมื่อมีการใช้ร่วมกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นเช่นกลูโคส ส่งเสริมให้เกิดทั้งสัดส่วน HB และ HV โดยสัดส่วน HB และ HV ที่เกิดขึ้น ขึ้นกับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนด้วย (ตาราง 2.1)

จุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน แต่ความเข้มข้นต่างกันมีผลให้ปริมาณของพอลิเมอร์แตกต่างกันดังตาราง 2.1 การเลี้ยง *Azotobacter beijerinckii* โดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร พบว่าจุลินทรีย์ผลิต PHA ได้แตกต่างกันเท่ากับ 35 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเลี้ยง *R. eutropha* H16 โดยการใช้โพรพิโอเนตที่ความเข้มข้นต่างกัน ส่งผลให้การผลิต PHA ในเซลล์ และสัดส่วนของ HB และ HV ที่เกิดขึ้นก็แตกต่างกันด้วยเช่นกัน ดังนั้นการศึกษาการผลิต PHA ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ต้องมีการศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเพื่อการผลิต PHA ให้ได้มากที่สุด

ลีมอส และคณะ (Lemos et al., 2006) ศึกษาการสังเคราะห์ PHAจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากระบบตะกอนเร่ง ในอาหารสังเคราะห์ โดยศึกษาในระบบ SBR (Sequencing Batch Reactor) ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเติมอะซิเตตและโพรพิโอเนตเพื่อเป็นซับสเตรท พบว่า กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการเลี้ยงโดยเติมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ PHA ที่เป็นโฮโมพอลิเมอร์ชนิด HB ส่วนกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงโดยเติมโพรพิโอเนต ให้ PHA ที่เป็นโคพอลิเมอร์ชนิด HB และ HV เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนอะซิเตตร่วมกับโพรพิโอเนต จะได้โคพอลิเมอร์ คือ HB, HVและ hydroxymethylvalerate (HMV) แต่ค่าผลผลิตและอัตราการผลิต PHA จากการใช้อะซิเตตเป็นสารอาหารจะสูงกว่าการใช้โพร-พิโอเนต ทั้งนี้เนื่องจากอะซิเตตประกอบด้วยคาร์บอนสายสั้นกว่าทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้โดยจุลินทรีย์

เอเลียส และ แทน (Alias and Tan, 2005) ศึกษาการแยกเชื้อที่สามารถผลิต PHA จากกลุ่มเชื้อผสมในน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์ม พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 45 ไอโซเลต โดยการเกลี่ยเชื้อในอาหารวุ้น เมื่อนำมาทดสอบการย้อมสีด้วย Sudan Black B ได้เชื้อ 10 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตไขมันไว้ภายในเซลล์ได้ หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีการจำกัดไนโตรเจน และมีปาล์มโอเลอิน (palm olein) หรือ เกลือของกรดไขมัน (saponified palm oil) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมปาล์มโอเลอินเชื้อมีการเจริญดีกว่าการเติมเกลือของกรดไขมัน และนำไอโซเลทเดี่ยวๆ ที่ได้มาทดสอบด้วย Nile Blue A เพื่อหาเชื้อที่ผลิต PHA พบว่าวิธีนี้ไม่ดีพอในการเลือกเชื้อที่ผลิต PHA จึงมีการศึกษาการแยกเชื้อโดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณ (enrichment technique) โดยศึกษาการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายแบบ พบว่าการเติมปาล์มโอเลอิน 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมน้ำเสียที่เป็นแหล่งของกลุ่มเชื้อที่ใช้ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร นำไป

เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบจุลินทรีย์ทั้งหมด 7 ไอโซเลท แต่มีเพียง 2 ไอโซเลทที่เจริญได้ดี (FLP1 และ FPL2) โดยเชื้อ FLP1 สามารถเจริญและผลิต PHA ได้ดีกว่าในอาหารที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เมื่อนำไปบ่งชี้จุลินทรีย์โดยวิธี BIOLOG พบว่า FLP1 คือ *Burkholderia cepacia* เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมโพรพิโอเนตหรือวาลิเรต จุลินทรีย์สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ชนิด poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

เฉลิมราช วันทวิน และ อรรนพ ฤทธิปัญญาวงศ์ (2545) ได้ศึกษาการสังเคราะห์ PHA โดยสลัดจ์ที่เกิดจากกระบวนการบำบัดน้ำเสีย 2 ชนิด คือ ASBR และ GSBR พบว่าสลัดจ์ ASBR สามารถสะสม PHA ได้มากกว่าสลัดจ์ GSBR โดยสะสม PHA ตามสารอาหารดังนี้ สารอาหารอะซิเตต กลูโคสต่ออะซีเตตหนึ่งต่อสอง กลูโคสต่ออะซีเตตสองต่อหนึ่ง และ กลูโคส ได้ PHA เท่ากับ 19.8, 14.9, 12.8 และ 8.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และ องค์ประกอบของ PHA ที่ได้เป็นโคพอลิเมอร์ของ PHB และ PHV ซึ่งขึ้นกับสัดส่วนระหว่างอะซีเตตต่อกลูโคส การเพิ่มสัดส่วนของสารอาหารอะซีเตตจะมีแนวโน้มทำให้สลัดจ์สามารถสะสม PHA ได้สูงขึ้น และมีองค์ประกอบ PHB สูงขึ้น

ยู (Yu, 2001) ศึกษาการผลิต PHA จากน้ำเสียโรงงานแป้ง โดยศึกษา 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกใช้จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างกรดทำการผลิตกรด และ ขั้นตอนที่สองใช้จุลินทรีย์ที่ใช้กรดเพื่อสังเคราะห์พอลิเมอร์ น้ำเสียที่ใช้ทดลองขั้นตอนแรกใช้น้ำเสียจากโรงงานแป้งที่ผ่านการบำบัดในถัง UASB มีค่าสารอินทรีย์อยู่ระหว่าง 25-35 กรัมต่อลิตรต่อวัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้ในขั้นตอนแรกได้แก่ กรดอะซิติก (60-80 เปอร์เซ็นต์) กรดโพรพิโอนิก (10-30 เปอร์เซ็นต์) และ กรดบิวทีริก (5-40 เปอร์เซ็นต์) โดยมีกรดระเหยง่ายทั้งหมดเท่ากับ 4000 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามชนิดของกรดที่ผลิตในขั้นตอนที่หนึ่งขึ้นอยู่กับค่าสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้า โดยน้ำเสียที่มีค่าสารอินทรีย์ 9 กรัมต่อลิตรต่อวัน สามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงที่สุด ถ้าน้ำเสียมีค่าสารอินทรีย์ 26 กรัมต่อลิตรต่อวัน จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดบิวทีริกได้สูงที่สุด หลังจากนั้นนำน้ำหมักที่ได้มาศึกษาการผลิต PHA โดยเชื้อ *Alcaligenes eutropus* พบว่าเชื้อสามารถผลิต PHA ได้ 50 กรัม จากสารอินทรีย์ 100 กรัมที่อยู่ในน้ำหมัก ซึ่งปริมาณ PHA ในเซลล์คิดเป็น 34 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาการผลิต PHA แบบกึ่งกะโดยป้อนกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทีริกเข้าสู่ถังหมักด้วยอัตราการป้อน 3 ระดับ คือ 0.5, 0.7 และ 1 กรัมต่อลิตร โดยมีแอมโมเนียม 80-100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อสามารถผลิต PHA จากกรดบิวทีริกได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 45 (48 เปอร์เซ็นต์) และ สามารถผลิต PHA จากกรดโพรพิโอนิกได้ 53 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบของ PHA ที่ได้จากการเติมกรดบิวทีริกคือ PHB ส่วนองค์ประกอบของ PHA ที่ได้จากการเติมกรดโพรพิโอนิกคือ PHBV โดยมีสัดส่วนของ HV เท่ากับ 38 เปอร์เซนต์

นอกจากนี้พบว่าการใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่เชื้อ *A. eutrophus* R3 เชื้อสามารถผลิตพอลิเมอร์ในรูปโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) แต่เมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่ *A.*

eutrophus ATCC17697 พบว่าเชื้อจะมีการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตซึ่งเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (Anderson and Wynn, 1995)

2.3.2 แหล่งอาหารอื่นๆ

การสะสม PHA จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล แต่มีแหล่งคาร์บอนเพียงพอ แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการผลิต PHA กระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHA จะเกิดขึ้นสูงหลังจากแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดแต่อยู่ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือเมื่อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอแต่มีการจำกัดปัจจัยบางชนิด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน หรือ ฟอสฟอรัส เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามสารอาหารที่ต้องจำกัดนั้นจะต้องเป็นแร่ธาตุหลัก (major element) สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้างและการถ่ายเทพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ ดังนั้นในการสังเคราะห์พอลิเมอร์จึงจำเป็นต้องจำกัดปริมาณแร่ธาตุหลักเหล่านี้ให้เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์เท่านั้น เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสะสมแหล่งคาร์บอนและพลังงานให้อยู่ในรูปของพอลิเมอร์ภายในเซลล์

ในการศึกษาผลของการเติมและไม่มีการเติมธาตุอาหารรองในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยดูผลที่มีต่อการเจริญเติบโต และ การผลิตพอลีไฮดรอกซีบิวทีเรตของเชื้อ *A. latus* พบว่า การเติมธาตุอาหารรอง ได้แก่ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $NiSO_4$, $CaCl_2$, H_3BO_3, Na_2MoO_4, $CoCl_2$, $MnCl_2$ และ Ammonium Fe (III) citrate มีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์และปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตสูงขึ้นเป็น 6.8 และ 3.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Grothe et al., 1999)

แบคทีเรียที่นำมาใช้ผลิต PHAs แบ่งเป็น 2 กลุ่มตามการใช้สารอาหาร ได้แก่ (Lee, 1996)

กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียที่ใช้สารอาหารจำพวก ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โพแทสเซียม ออกซิเจน หรือ ซัลเฟอร์ ในปริมาณจำกัด แต่จะใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งอาหารในการสังเคราะห์ PHAs แบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *A. eutrophus, Protomonas extorquens* และ *Pseudomonas oleovorans*

กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียที่ไม่ต้องจำกัดปริมาณสารอาหารในการสังเคราะห์ PHAs และสามารถเพิ่มปริมาณพอลิเมอร์ในระหว่างการเติบโต ได้แก่ *A. latus, A. vinelandi* ที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์ และ รีคอมบิแนนต์เชื้อ *E. coli* ที่ได้รับยีนจาก *A. eutrophus*

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในสภาวะที่มีออกซิเจนรวมทั้งสภาวะที่จำกัดธาตุอาหาร แล้วทำการวัดปริมาณ PHA ที่สะสมในเซลล์ของระบบ SBR แบบต่อเนื่อง พบว่าในสภาวะที่มีการจำกัดธาตุอาหารทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส แบคทีเรียจะมีการสะสม PHA สูงถึง 45 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total Suspension Solids, TSS) และเมื่อจำกัดไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวพบว่ามีการสะสม PHA เท่ากับ 36 เปอร์เซ็นต์ TSS แต่เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียต่อไปในสภาวะดังกล่าว จะพบว่าแบคทีเรียในระบบจะค่อย ๆ ลดจำนวนลงและไม่ทำการสะสม PHA อีกต่อไป ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียจะทำการสะสม PHA ในสภาวะจำกัดธาตุ

อาหารได้สูงขึ้นแต่ถ้าปล่อยให้ขาดธาตุอาหารต่อไปเรื่อยๆ แบคทีเรียจะตายเนื่องจากขาดธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต (Punrattanasin et al., 2001)

2.2.3 อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

คูมาร์ และ คณะ (Kumar et al., 2004) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวน จุลินทรีย์ผสมเพื่อเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารสังเคราะห์ โดยใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 500 ถึง 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรการใช้งาน 250 มิลลิลิตร โดยเติมจุลินทรีย์ผสมเริ่มต้น 430 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยการวิเคราะห์เอ็มแอลเอสเอส (Mix Liquor Suspended Solids, MLSS) ผลการทดลองพบว่า เมื่อเติมกรดอะซิติก 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 3,150 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการศึกษาการผลิต PHB ในอาหารสังเคราะห์ที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ได้แก่ 24, 96, 120, 144 และ 168 แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และ ปริมาณเซลล์ ซึ่งคำนวณในรูปของร้อยละของการสะสม PHB ต่อ ปริมาณเซลล์ ที่เวลาต่างๆ พบว่าเมื่ออัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้น จุลินทรีย์จะมีการสะสม PHB ต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น ชุดการทดลองที่มีการสะสม PHB สูงสุด คือ อาหารสังเคราะห์ที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 144 โดยจุลินทรีย์มีการสะสม PHB ร้อยละ 33

2.2.4 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHA เนื่องจากสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดเอนไซม์ซิเตรทซินเทสและไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนสถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้อะซิติลโคเอไม่เข้าสู่วัฏจักรกรดซิตริก หรือ วัฏจักรเครบส์ (Citric acid cycle หรือ Krebs cycle) แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอเพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHA โดยเอนไซม์เบต้าคีโตไธโอเลส (Luengo et al., 2003)

จากการทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบตะกอน 2 แบบ ได้แก่ ตะกอนแบบไม่ใช้ออกซิเจนกับใช้ออกซิเจน (Anaerobic-Aerobic Activated Sludge, A-A) และ ตะกอนแบบไม่ใช้ออกซิเจนบางส่วนกับตะกอนแบบใช้ออกซิเจน (Microanaerobic-Aerobic Activated Sludge, M-A) แล้วนำตะกอนจากทั้ง 2 ระบบมาวัดปริมาณ PHA ในปฏิกรณ์แบบกะ 2 แบบ คือ ไม่มีการเติมออกซิเจน และแบบที่มีการเติมออกซิเจนในปริมาณจำกัด พบว่าตะกอนจากระบบ A-A ในปฏิกรณ์ที่มีการเติมออกซิเจนในปริมาณจำกัดมีการสังเคราะห์ PHA ร้อยละ 33 ซึ่งสูงกว่าในปฏิกรณ์ที่ไม่มีออกซิเจนซึ่งสังเคราะห์ PHA ร้อยละ 22 ตามลำดับ ส่วนตะกอนจากระบบ M-A สามารถสังเคราะห์ PHA ได้ถึงร้อยละ 62 ในปฏิกรณ์ทั้งสองแบบ ดังนั้นจึงสรุปผลการทดลองได้ว่าปริมาณออกซิเจนที่ไม่มากจนเกินไปอาจจะทำให้มีการดำเนินไปของวัฏจักรกรดซิตริกซึ่งทำให้มีปริมาณของ NADH เพิ่มมากขึ้นและ NADH ที่เกิดขึ้นจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซิเตรทซินเทสและไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนสแล้วทำให้อะซิติลโคเอนไซม์เอไม่เข้าสู่วัฏจักรกรดซิตริกแต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอเพื่อเข้า

สู่กระบวนการสังเคราะห์ PHA ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์ PHA ได้มากขึ้น (Satoh et al., 1998)

2.2.5 พีเอช

พีเอชเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และการผลิต PHA โดยพบว่าหากต้องการผลิต PHA ควรทำการควบคุมพีเอชไม่ให้ต่ำกว่า 7 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าพีเอชลดลงอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดมากเกินไป

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อศักยภาพในการสังเคราะห์ PHA โดยใช้ชุดทดลองในสภาวะไร้อากาศ มีกรดอะซิติกเป็นสารอาหาร และ เปรียบเทียบการสะสม PHA จากตะกอนส่วนเกิน 2 ระบบ คือ RP5 และ RP15 ซึ่งในเซลล์ของทั้งสองระบบมีปริมาณพอลิฟอสเฟตสะสมอยู่ในเซลล์เท่ากับ 2 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีปริมาณไกลโคเจนภายในเซลล์เท่ากับ 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าเซลล์จะมีการสลายสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงาน ได้แก่ ไกลโคเจนและพอลิฟอสเฟตที่ค่าพีเอช 6 จะเกิดขึ้นได้น้อยที่สุด แต่การสลายจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อพีเอชสูงขึ้นตามลำดับ ที่พีเอช 6 เซลล์จะมีการสะสม PHA ได้มากที่สุดเพียง 17 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพีเอชสูงขึ้นพบว่าเซลล์จะมีการใช้พลังงานมากขึ้นโดยได้จากการสลายไกลโคเจน ซึ่งมีผลทำให้สัดส่วนของ HV ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของพลาสติกมีค่าสูงขึ้น ตะกอน RP5 จะมีสัดส่วนของ HV/PHA ที่พีเอช 8 สูงกว่าอาหารที่มีพีเอช 6 แต่สำหรับ RP 15 สัดส่วนดังกล่าวค่อนข้างคงที่ (Kasemsap and Wantawin, 2007)

เชา และคณะ (Chua et al., 2003) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการดำเนินการให้ระบบตะกอนที่ใช้บำบัดน้ำเสียชุมชนสามารถสะสม PHA ได้ โดยปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการสะสม PHA ของจุลินทรีย์ ได้แก่ ความเข้มข้นของอะซิเตตในน้ำเสียขาเข้า ค่าพีเอช และ อายุของตะกอน (Sludge Retention Time, SRT) จากการทดลองพบว่าตะกอนของน้ำเสียชุมชนที่มีการเติมอะซิเตตเพิ่มอีก 1,000 มิลลิกรัมคาร์บอนต่อลิตร สามารถสะสม PHA ได้สูงสุด 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ส่วนตะกอนของน้ำเสียชุมชนซึ่งไม่ได้เติมอะซิเตตจะสะสม PHA ได้เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งเท่านั้น และยังพบอีกว่าอายุของตะกอนที่สั้น (3 วัน) จะสามารถสะสม PHA ได้ดีกว่าอายุตะกอนที่ยาวนาน (10 วัน) ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าพีเอชจะไม่ค่อยมีผลต่อการสะสม PHA เท่าใดนักในระบบตะกอน โดยพีเอช 7-8 ยังให้การสะสมพอลิเมอร์ที่ไม่ต่างกัน แต่สำหรับการทดลองในระบบกะ พีเอชมีผลกระทบอย่างมากต่อการสะสมพอลิเมอร์ โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการสะสม PHA คือ ที่ 8-9

ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชต่ำจะขาดความสมดุลระหว่างปริมาณของไฮโดรเจนไอออนและไฮดรอกไซด์ไอออน ส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหาร และเซลล์ไม่สามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความเป็นพิษเนื่องจากมีปริมาณกรดในระบบมากเกินไป (Luli and Strohl, 1990) การปรับพีเอชเป็น 7 เป็นการปรับปริมาณไฮโดรเจนอิสระที่แสดง

ประจุบวกให้ลดลงด้วยไฮดรอกไซด์ซึ่งมีประจุเป็นลบ ทำให้ไฮโดรเจนไอออนไม่สามารถส่งผลกระทบโดยตรงต่อเซลล์ (Du et al., 2001)

2.2.6 อุณหภูมิ

อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มีผลต่อปริมาณการผลิต PHA ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตและการจำกัดธาตุอาหารอื่น ๆ ที่ไม่ใช่อาหารที่ให้คาร์บอนอิสระด้วย ดังเช่น โสภา ชินเวชกิจวานิชย์ (2547) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิต PHA ด้วยเชื้อผสมในน้ำเสีย โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา คือ 10, 20 และ 30 องศาเซลเซียส แต่ละอุณหภูมิได้ทำการทดลองกับการจำกัดธาตุอาหาร 3 แบบ คือ จำกัดเฉพาะไนโตรเจน จำกัดเฉพาะฟอสฟอรัส และ จำกัดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ใช้รูปแบบการเดินระบบแบบสองขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ผลิต PHA แล้วตามด้วยขั้นตอนการจำกัดธาตุอาหารเพื่อกระตุ้นการผลิต PHA ให้มากขึ้น จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิส่งผลต่ออัตราการผลิตและผลผลิตของ PHA อย่างเห็นได้ชัด คือ อัตราการผลิตและผลผลิต PHA จะเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ และ การจำกัดธาตุอาหารทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสให้ผลการผลิต PHA ดีกว่าการจำกัดธาตุอาหารแบบอื่น โดยชุดการทดลองที่ใช้อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พร้อมกับจำกัดธาตุอาหารเฉพาะไนโตรเจน ค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าความเข้มข้นของ PHA ในระบบคือ 2,830 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองการจำกัดธาตุอาหารเฉพาะฟอสฟอรัส ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 52 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเข้มข้นของระบบ คือ 1,491 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองจำกัดธาตุอาหารทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสผลผลิต PHA ในการทดลองที่ 10 และ 20 องศาเซลเซียสไม่แตกต่างกัน โดยค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของ PHA เท่ากับ 2,133 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยสรุปการผลิต PHA โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ พบว่าปริมาณ และ องค์ประกอบทางเคมีของ PHA จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ชนิดและความเข้มข้นของสับสเตรทที่ใช้ ตลอดจนสภาวะสิ่งแวดล้อมที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อด้วย

3. คุณสมบัติของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่มีการศึกษาคุณสมบัติกันอย่างกว้างขวาง คือ พอลิไฮดรอกซีบิว-ทีเรต (polyhydroxybutyrate; PHB) ลักษณะโดยทั่วไปของ PHB คือ เป็นฮอโมพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ของกรดไฮดรอกซีบิวทีริก (3-hydroxybutyric acid) มีจุดหลอมเหลว 175 องศาเซลเซียส เป็นเทอร์โมพลาสติกที่มีลักษณะคล้ายเรซิน กล่าวคือ มีความหนืดสูงและสามารถหล่อให้เป็นรูปร่างต่างๆ ได้ตามต้องการที่อุณหภูมิใกล้เคียงหรือสูงกว่าจุดหลอมเหลวเล็กน้อย มีเปอร์เซ็นต์การตกผลึกสูงร้อยละ 80 สำหรับคุณสมบัติที่สำคัญต่อสภาวะแวดล้อม คือ เป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Khanna and Srivastava, 2005) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาผลิตสารจำพวก

พลาสติก และ นำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ได้ PHB มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เช่น พอลิโพรไพลีน (polypropylene; PP) พอลิเอธิลีน (polyethylene; PE) และพอลิสไตรีน (polystyrene; PS) (Numat et al., 2009) ลักษณะทางกายภาพต่างๆ ของ PHB เทียบกับพอลิโพรไพลีน แสดงในตาราง 2.2

ตาราง 2.2 ลักษณะทางกายภาพของพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตเปรียบเทียบกับพอลิโพรไพลีน

คุณสมบัติทางกายภาพ	พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต	พอลิโพรไพลีน
จุดหลอมเหลว (°ซ)	175	176
ค่า Glass transition temperature หรือ T_g (°ซ)	15	-10
ความเป็นผลึก (%)	80	70
ค่ามอดุลัสของยัง (Young's modulus)	3.5	1.7
แรงต้านทานการดึง (Tensile strength) (MPa)	40	34.5
ร้อยละการยืด ณ จุดขาด (Elongation to break) (%)	6	400
ความต้านแรงกระแทก (Impact strength) (v/m)	50	45

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ojumu et al., 2004.

จากตารางจะเห็นได้ว่า PHB มีคุณสมบัติที่มีประโยชน์หลายๆ ด้าน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับพอลิโพรไพลีน จะพบว่ามีข้อเสีย คือ มีความเสถียรของการหลอมเหลวต่ำ เนื่องจากเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลว นอกจากนี้ PHB มีความสามารถในการต้านทานต่อตัวทำละลายต่ำกว่าพอลิโพรไพลีน แต่ทนต่อรังสีอัลตราไวโอเลตได้ดีกว่า และ PHB จะเปราะเมื่อเวลาผ่านไปเพียงไม่กี่วันภายใต้สภาวะปกติ แต่สามารถลดความเปราะบางของ PHB ได้โดยการทำเป็นโคพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์ตัวอื่น

แนวทางหนึ่งในการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ คือ การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยดัดแปลงสารตั้งต้น เช่น การเพาะเลี้ยง *E. coli* ที่ใส่ยีนของ *A. eutrophus* โดยใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิด คือ กลูโคส และโพรพิโอเนต ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์จากการสังเคราะห์ของเซลล์เป็นโคพอลิเมอร์ของ P(HB-HV) โดยมีสัดส่วนของ HV (hydroxyvalerate) คิดเป็นร้อยละ 47 (Slater et al., 1992) ซึ่งโคพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไป เช่น มีความแข็งและเปราะน้อยกว่าโฮโมพอลิเมอร์ โคพอลิเมอร์ PHB-PHV มีข้อดีมากกว่า PHB ที่เป็นโฮโมพอลิเมอร์ คือ โคพอลิเมอร์มีจุดหลอมเหลวต่ำกว่าโฮโมพอลิเมอร์ และมีเปอร์เซ็นต์การตกผลึกต่ำ ทำให้มีความเหนียวและสามารถโค้งงอได้ดีกว่าโฮโมพอลิเมอร์ แต่เนื่องจากโคพอลิเมอร์มีค่าการตกผลึกต่ำจึงทำให้ต้องใช้ระยะเวลานานในบางขั้นตอน เช่น ในกระบวนการขึ้นรูป เป็นต้น

4. การเก็บเกี่ยวพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากเซลล์จุลินทรีย์

การผลิต PHA โดยวิธทางชีวภาพมีค่าใช้จ่ายที่ต้องคำนึงถึงแบ่งได้เป็น 3 ส่วน คือ ค่าใช้จ่ายของสับสเตรทซึ่งเป็นสารอินทรีย์ ค่าใช้จ่ายสำหรับสภาวะของการหมักที่ปราศจากการปนเปื้อน และค่าใช้จ่ายในกระบวนการแยก PHA ออกจากเซลล์และการทำ PHA ที่แยกได้ให้บริสุทธิ์อีกด้วย

โดยทั่วไปการแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกจากน้ำหมักหรืออาหารเหลวโดยการหมุนเหวี่ยง หรือ การกรอง หรือ การทำให้เซลล์ตกตะกอน จากนั้นทำตะกอนเซลล์ให้แห้งด้วยวิธีการแช่แข็งแห้ง (freeze dried or lyophilization) ลำดับต่อไปใช้สารที่มีขั้วเพียงเล็กน้อย เช่น อะซีโตน และ แอลกอฮอล์ ไปละลายองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ที่ไม่ใช่ PHA ได้แก่ กรดนิวคลีอิก ลิพิด โปรตีนฟอสโฟลิพิด และเพปติโดไกลแคน หลังจากนั้นใช้คลอโรฟอร์ม และ สารกลุ่มไฮโดรคาร์บอนที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบอื่น ๆ ละลาย PHA ออกมาจากเซลล์ ในลำดับสุดท้ายทำการแยก PHA ออกจากตัวทำละลายโดยการระเหยตัวทำละลายแล้วทำการตกตะกอน PHA ด้วยอะซีโตน หรือ แอลกอฮอล์

กระบวนการแยก หรือ การสกัด PHA ออกจากเซลล์จุลินทรีย์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (solvent extraction) การย่อยด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite digestion) และ การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic digestion) รายละเอียดของวิธีการต่าง ๆ สามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้ (Doi, 1990; Lee, 1996; Steinbuchel, 1996; Braunegg et al., 1998)

4.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)

วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางเพราะว่าสามารถใช้กับจุลินทรีย์ที่ผลิต PHA ได้หลาย ๆ ชนิด อย่างไรก็ตามวิธีนี้ต้องใช้ตัวทำละลายในปริมาณมากเนื่องจากสารละลายของ PHA มีความหนืดสูง อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อ PHA ที่ต้องใช้คือ 20 : 1 จึงทำให้วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูง (Lee, 1996) ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด PHA ออกจากเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ คลอโรฟอร์ม (chloroform) เมทธิลีน คลอไรด์ (methylene chloride) หรือ 1,2-ไดคลอโรอีเทน (1,2-dichloroethane) นอกจากนี้ตัวทำละลายในกลุ่มของเอธิลีน คาร์บอเนต (ethylene carbonate) โพรพิลีน คาร์บอเนต (propylene carbonate) ตัวทำละลายผสมของ 1,1,2-ไตรคลอโรอีเทนกับน้ำ ตัวทำละลายผสมของคลอโรฟอร์มกับเมธานอล เอธานอล อะซิโตน หรือ เฮกเซน สามารถใช้สกัด PHA ออกจากเซลล์ของแบคทีเรียได้เช่นกัน

ในวิธนี้จะต้องมีการกำจัดเอาน้ำจากเซลล์ที่มี PHA สะสมอยู่ออกมาก่อน โดยการอบที่อุณหภูมิสูง และกำจัดไขมันออกจากเซลล์โดยใช้ตัวทำละลายที่ไม่สามารถละลาย PHA ได้ เช่น อะซีโตนและเมทานอล หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์มร้อน หรือตัวทำละลายอื่นๆที่เหมาะสม จะทำให้ PHA ละลายออกมา แล้วทำการแยกเซลล์ออกจาก PHA โดยการกรองและการหมุนเหวี่ยง แต่สารละลายของ PHA มีความหนืดสูง จึงทำให้การแยกเป็นไปได้ยาก การตกตะกอน

PHA โดยการเติมเมทานอลลงไปในสารละลายที่ได้จากการกรอง จะทำให้การแยก PHA ออกจากสารละลายทำได้ง่ายขึ้น โดยทั่วไปการสกัดด้วยตัวทำละลายจะทำให้ได้ PHA ที่บริสุทธิ์ และโครงสร้างยังสมบูรณ์ แต่กระบวนการสกัด PHA ออกด้วยตัวทำละลายนี้จะได้สารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้นประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตรของ PHA ซึ่งมีความหนืดสูงมาก ทำให้กระบวนการแยกเศษชีวมวลออกไปทำได้ยากจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายในปริมาณมากจนให้ผลไม่คุ้มค่ากับการลงทุนถึงแม้จะมีการหมุนเวียนนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่

4.2 การย่อยด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite digestion)

โซเดียมไฮโปคลอไรต์จะไปละลายองค์ประกอบของเซลล์ที่ไม่ใช่สาร PHA โดย PHA ยังคงติดอยู่ในเซลล์ แล้วค่อยทำการแยก PHA ออกจากสารละลายทั้งหมดด้วยการหมุนเหวี่ยง แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ โซเดียมไฮโปคลอไรต์จะไปย่อยสลายสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยเช่นกัน เนื่องจากว่าโซเดียมไฮโปคลอไรต์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่แข็งแกร่ง ซึ่งพบว่าการย่อยเซลล์จุลินทรีย์ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์จะทำให้น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ลดลงร้อยละ 50 (Berger et al., 1989) ดังนั้นในการย่อยโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์จึงจำเป็นต้องทำอย่างทะนุถนอมเพื่อป้องกันไม่ให้ PHA ถูกทำลาย นอกจากนี้การย่อยด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ยังมีข้อจำกัดอีกอย่าง คือ สารละลาย PHA มีความหนืดสูงจะทำให้การกำจัดกากเซลล์ที่เหลือออกจาก PHA ทำได้ค่อนข้างยาก (Holmes and Lim, 1990)

ฮานส์และคณะ (1994) ได้เสนอวิธีการย่อยด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่สามารถแก้ปัญหาข้างต้นได้คือ การใช้สารละลายผสมของไฮโปคลอไรต์กับคลอโรฟอร์ม ซึ่งสามารถกำจัดเอาองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ที่ไม่ใช่ PHA ออกมาได้เกือบหมดซึ่งสามารถแยก PHA ออกจากเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและยังสามารถลดความหนืดของ PHA ซึ่งอยู่ในวัฏภาคของคลอโรฟอร์ม

4.3 การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic digestion)

กระบวนการนี้ประกอบด้วย (1) การให้ความร้อนแก่เซลล์จุลินทรีย์ที่อุณหภูมิประมาณ 100-150 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้เซลล์แตกและทำลายกรดนิวคลีอิก (2) การย่อยด้วยเอนไซม์ (3) การล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบเพื่อละลายองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ที่ไม่ใช่ PHA และ (4) ทำ PHA ให้เข้มข้นขึ้นโดยการหมุนเหวี่ยง แล้วฟอกขาวด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ แต่ผลที่ได้จากกระบวนการนี้มักจะมีความบริสุทธิ์ที่ไม่สูงนัก

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยมักจะประกอบด้วยเอนไซม์หลาย ๆ ชนิดผสมกัน ได้แก่ ไลโซไซม์ ฟอสโฟไลเพส เลซิทีเนส โปรตีเนส อัลคาเลส และอื่นๆ (Steinbuchel, 1996) ซึ่งเอนไซม์ทั้งหลายเหล่านี้จะไปย่อยองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ที่ไม่ใช่ PHA นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้กลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน เช่นทริปซิน เพปซิน และ พาเพนในขั้นตอนการย่อยอีกด้วย (Braunegg et al., 1998)

นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้กรดไปละลายองค์ประกอบอื่นๆ ของเซลล์ที่ไม่ใช่ PHA ออกจากเซลล์ แล้วทำการแยกเซลล์ที่ถูกทำลายออกโดยการกรอง หรือ การหมุนเหวี่ยง จากนั้นปรับพีเอชของสารละลายให้อยู่ในช่วง 7-11 เพื่อตกตะกอน PHA ออกจากสารละลาย แล้วทำการกรอง หรือหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง เพื่อแยกตะกอนของ PHA หลังจากนั้นละลาย PHA ในสารละลายฟอกจางสี เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือ ไฮโปคลอไรท์ แล้วทำผลึกให้แห้งโดยการอบ โดยวิธีนี้จะทำให้ได้สาร PHA บริสุทธิ์มากกว่า 97เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักและได้ปริมาณผลผลิตมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้กระบวนการหมักของจุลินทรีย์ ผู้วิจัยได้ทำการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องมาประกอบเป็นแนวคิดในการศึกษาดังนี้ การผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตจากกากน้ำตาลของหัวผักกาด (beet molasses) ด้วยเชื้อ *Azotobacter vinelandii* UWD ได้พอลิ-ไฮดรอกซีบิวทีเรตเข้มข้น 19-22 กรัม/ลิตร (Page, 1992) หลังจากปรับปรุงกระบวนการผลิตพอลิ-ไฮดรอกซีบิวทีเรตด้วยเชื้อ *A. vinelandii* UWD โดยทำการหมักแบบ 2 ขั้นตอน คือ (1) ขั้นตอนการเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์โดยเพิ่มการเติมอากาศในถังหมัก และ (2) ขั้นตอนการส่งเสริมการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตโดยปรับลดอัตราการเติมอากาศลงในถังหมัก ทำให้ได้พอลิไฮดรอกซีอัลคา-โนเอตเข้มข้น 36 กรัม/ลิตร (Chen and Page, 1997) ในการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากกากน้ำตาลอ้อยอาจทำได้โดยทำการหมัก 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) การหมักกากน้ำตาลอ้อยให้เป็นกรดอินทรีย์ (2) การเลี้ยงเซลล์ให้มีการเจริญเติบโตและพร้อมที่จะสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตภายในเซลล์ และ (3) การหมักแบบกะโดยผสมกากน้ำตาลอ้อยหมักในข้อ (1) และ น้ำเลี้ยงที่มีเซลล์ของจุลินทรีย์ในข้อ (2) (Albuquerque et al., 2007) การผลิตพอลิไฮ-ดรอกซีอัลคาโนเอตจากกากน้ำตาลหมักหรือน้ำเสียที่มีกรดไขมันระเหยได้เป็นองค์ประกอบโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์จะได้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตประมาณ 47-66% (Pisco et al., 2009; Bengtsson et al., 2010) การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากกากน้ำตาลอ้อยโดยเชื้อ *Bacillus* sp. JMa5 ที่แยกได้จากดิน ทำให้ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตประมาณ 25-35% ที่อุณหภูมิ 47°ซ (Wu et al., 2001) การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากกากน้ำตาลอ้อยเข้มข้น 4% และ น้ำหมักข้าวโพดเข้มข้น 4% โดยเชื้อ *B. megaterium* ATCC 6748 และ *B. megaterium* BA-019 จะได้พอลิไฮ-ดรอกซีบิวทีเรตประมาณ 43% และ 42% ตามลำดับ (Chaijamrus and Udpuay, 2008) นอกจากนี้กากน้ำตาลจากถั่วเหลืองซึ่งมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสูง สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อแบคทีเรียได้ เช่น ใช้เลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas corrugate* จะทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 1.5-3.6 กรัม/ลิตร และ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตชนิดสายโซ่กลาง (3-hydroxyl-dodecanoate, 3-

hydroxyl-octanoate และ 3-hydroxyl-tetradecenoate) ประมาณ 5-17% (Solaiman et al., 2006a)

ไขมัน น้ำมัน และ น้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารเป็นแหล่งวัตถุดิบที่ไม่มีวันหมดสามารถผลิตขึ้นมาใหม่ได้ และเป็นสารที่สร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ให้พลังงานแก่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารกลุ่มน้ำตาล (Solaiman et al., 2006) โดยพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ได้จากการใช้ไขมัน และน้ำมันเป็นสารตั้งต้นมักจะมีมอโนเมอร์ชนิดสายโซ่กลางและสายโซ่ยาว (Ashby and Foglia, 1998) ดังนั้นการใช้น้ำมัน ไขมัน และ น้ำมันใช้แล้วมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษา เช่น เชื้อ *Aeromonas caviae* สามารถย่อยไขมันแล้วนำไปสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้โดยตรง (Shimamura et al., 1994) เชื้อ *Pseudomonas resinovorans* สามารถสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากไขได้ 15% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ จากน้ำมัน (น้ำมันหมู น้ำมันมะกอก น้ำมันเนย น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันถั่วเหลือง) สะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ 1.2-1.9 กรัม/ลิตร ซึ่งมอโนเมอร์ของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ได้มีจำนวนคาร์บอน 4-14 อะตอม (Cromwick, 1996; Ashby and Foglia, 1998) เป็นที่น่าสังเกตว่าชนิดของมอโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะมีความสัมพันธ์กับชนิดของสับสเตรทด้วย เช่น การใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นสับสเตรทจะได้มอโนเมอร์ที่มีกรดไขมันอิ่มตัว และ การใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นสับสเตรทจะได้มอโนเมอร์ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Kahar et al., 2004)นอกจากนี้การเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. Strain DR2 ในน้ำมันพืชใช้แล้ว จะได้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตประมาณ 23.5% (Song et al., 2008) การเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหาร จะได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต 2.3-5.4% (Fernandez et al., 2005; Haba et al., 2007; Costa et al., 2009) ซึ่งจะได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตน้อยกว่าการใช้น้ำมันถั่วเหลืองบริสุทธิ์เนื่องจากน้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหารจะมีสิ่งเจือปนอยู่มาก

กลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งจะเกิดขึ้นประมาณ 10% ของไบโอดีเซล การศึกษาเกี่ยวกับการนำกลีเซอรอลมาเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต สรุปได้ดังนี้ เชื้อ *Pseudomonas putida* KT2442 สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตชนิดสายกลางจากกลีเซอรอลได้ (Huijberts et al., 1992) ในการเลี้ยงเชื้อ *Methylobacterium rhodesianum* และ เชื้อ *R. eutropha* แบบแยกกันในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมของกลีเซอรอลกับสารที่ได้จากการย่อยโปรตีนเคซีน ได้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตประมาณ 50% และ 65% ตามลำดับ ในเวลา 45 ชั่วโมง (Bormann and Roth, 1999) ในขณะที่เลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 และ *Pseudomonas corrugate* 388 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลอย่างเดียวจะได้พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตประมาณ 17% (Ashby, 2005) นอกจากนี้เชื้อ *P. oleovorans* NRRL B-14682 และ *P. corrugate* 388 สามารถเจริญเติบโตและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ในกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยเชื้อ *P. oleovorans* จะสังเคราะห์พอลิ-

ไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอล (Ashby et al., 2004) สำหรับไดโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ที่ปนเปื้อนอยู่ในกลีเซอรอลดิบไม่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซี-อัลคาโนเอตของเชื้อ *C. necator* DSM 545 ซึ่งสามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตจากกลีเซอรอลดิบได้ 38% (Cavalheiro et al., 2009)

สำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำทิ้ง พบว่าน้ำทิ้งจากแหล่งต่างๆ ที่มีสารอินทรีย์ เช่น น้ำทิ้งจากเทศบาล นำทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล น้ำทิ้งจากโรงงานแปรรูปอาหาร น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเครื่องดื่ม และน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ เป็นต้น สามารถนำมาเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ โดยในขั้นตอนแรกทำการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนในสารอินทรีย์ให้เป็นกรดอินทรีย์ที่ระเหยได้โดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีออกซิเจน แล้วจึงเปลี่ยนกรดอินทรีย์ให้เป็นพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในขั้นตอนต่อไป จะทำให้เซลล์สะสมพอลิ-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ประมาณ 50% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Liu et al., 2011; Bengtsson et al., 2008)

จากการทบทวนวรรณกรรมดังกล่าวจะเห็นได้ว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ กากน้ำตาล ไขมัน น้ำมัน น้ำมันใช้แล้ว น้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหาร กลีเซอรอลดิบ และน้ำทิ้งจากแหล่งต่าง ๆ สามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัล-คาโนเอตได้ โดยสารบางอย่างถ้านำมาใช้ควรจะมีการเตรียมก่อนเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เช่น กากน้ำตาลควรนำไปทำการหมักก่อนเพื่อให้ได้กรดอินทรีย์ที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ง่ายขึ้น ในส่วนของสารประเภทไขมันควรจะมีการทำให้ไขมันหรือน้ำมันละลายได้ในน้ำเลี้ยงเพื่อให้เซลล์ของจุลินทรีย์นำไปใช้ได้ สำหรับกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลสามารถนำมาใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้และควรจะใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับเชื้อนั้นๆ ควบคู่กันไป ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมเป็นสารที่น่าสนใจนำมาใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งอาจจะนำไปสู่การลดต้นทุนการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองมีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) คัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม (2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม และ (3) ศึกษาชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ส่วนที่ 1 ศึกษาการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม

ส่วนที่ 2 ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ส่วนที่ 3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ส่วนที่ 4 การตรวจสอบชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ส่วนที่ 1 ศึกษาการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม

1. การแยกเชื้อจุลินทรีย์

การเพาะเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทิ้งที่เก็บได้ โดยวิธี Pour Plate technique ทำการเก็บตัวอย่างน้ำในบ่อน้ำเสียของโรงงานแหนมแห่งหนึ่งในจังหวัดอุตรดิตถ์ โดยใช้ขวดแก้วปากกว้างขนาด 200 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 5 ขวด เก็บตัวอย่างน้ำในบ่อน้ำทิ้ง 5 จุด (ด้านมุม 4 มุม และ ตรงกลาง 1 จุด) นำมาผสมรวมกันก่อนนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างน้ำเสียโดยเขย่าตัวอย่างน้ำให้เข้ากันประมาณ 25 ครั้ง ปิเปตตัวอย่างน้ำออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลายฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ (phosphate-buffer dilution water, PB solution) 9 มล เขย่าให้ตัวอย่างเข้ากัน 25 ครั้ง (สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้น 10^{-1}) ปิเปตสารละลายซัสเพนชันของเชื้อที่ได้ (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มี PB solution ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ซัสเพนชันของเชื้อที่ 10^{-2} แล้วทำการเจือจางสารละลายซัสเพนชันของเชื้อที่ได้ต่อไปจนถึง 10^{-10} ปิเปตสารละลายตัวอย่างในแต่ละระดับการเจือจางลงในจานเพาะเชื้อ (Petri-dish) ละ 1 มิลลิลิตร (2 ซ้ำ) เทอาหาร R2A agar (ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ประมาณ 12-15 มิลลิลิตร ในแต่ละจานเพาะเชื้อเขย่าโดยหมุนจาน

เพาะเชื้อ (ซ้าย-ขวา-บน-ล่าง) เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายเข้ากันทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 $\pm$ 2 ชั่วโมง นับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญให้อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี

2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี Streak plate method ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) เขี่ยเอาเชื้อจากโคโลนีที่อยู่ในจานเพาะเชื้อข้างต้น ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วทำการลากหรือขีด (Streak) เชื้อที่อยู่ปลาย loop ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่แข็งสูตร E2 ซึ่งได้เตรียมไว้แล้ว (อาหารประกอบด้วย $NaNH_4HPO_4$. $4H_2O$ 3.5 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 10 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร กรดซิตริก 2 กรัมต่อลิตร วุ้น 15 กรัมต่อลิตร อะซีเตต 5.0 กรัมต่อลิตร) ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น หลังจากเสร็จในระนาบแรกซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุด แล้วให้นำห่วงเขี่ยเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดง เพื่อฆ่าเชื้อที่ติดให้หมด จากนั้นจึงขีดเชื้อจากส่วนของรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้งแล้วลากเป็นระนาบที่สอง 4-5 เส้นติดกันโดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สองจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณสี่ระนาบ ทำซ้ำแบบเดียวกับที่กล่าวข้างต้นแต่ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยเอาเชื้อจากโคโลนีอื่น ๆ ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ

3. การทดสอบเชื้อที่สามารถผลิต PHA

การทดสอบกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิต PHA โดยนำห่วงเขี่ยเชื้อที่สะอาดมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดง แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะตรงโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตร E2 มาเกลี่ยตรงกลางสไลด์ รอให้แห้งในอากาศ จากนั้นย้อมสีด้วย Sudan Black B (เตรียมจากผง Sudan Black B 0.3 กรัม ใน 60% เอทานอล 100 มล) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ล้างให้น้ำไหลผ่าน และทำสไลด์ให้แห้ง แล้วหยด Safranin O เข้มข้น 0.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทิ้งไว้ 10 นาที ล้างให้น้ำไหลผ่าน และรอให้แห้ง นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยายสูงสุดในหยดน้ำมัน จุลินทรีย์ที่มีการผลิตลิพิดภายในเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็น PHA จะติดสีม่วงแดงของ Sudan Black B (ดัดแปลงจาก Burdon, 1946)

4. การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ที่แยกได้

การศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิต PHA ของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหารเหลวสังเคราะห์ ซึ่งจากการทดสอบกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHA ได้ โดยดูจากกลุ่มเชื้อที่ย้อมติดสีม่วงแดงของ Sudan Black B พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 4 ไอโซเลต ที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายกันคือ รูปร่างกลมมีสีขาวขุ่นและมีขอบหยัก โดยตั้งชื่อเป็น FMI-1, FMI-2, FMI-3 และ FMI-4 พบว่า FMI-1 เจริญเติบโตอยู่ใต้อาหารวุ้น ขณะที่ FMI-2, FMI-3 และ FMI-4 เจริญอยู่ที่ผิวด้านบนของอาหารวุ้น นำกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ข้างต้นมาเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร)

เพปโทน (peptone) 10 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 10 สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) 5 และแอมโมเนียซัลเฟต 5 ที่มีการเติมกลีเซอรอล 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) ที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงทุก 4 ชั่วโมง ครั้งละ 2 มิลลิลิตร นำไปวัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

นำกลุ่มเชื้อเริ่มต้น FMI-2, FMI-3 และ FMI-4 จากข้างต้น มาเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด nitrogen-free mineral salts medium (N_2-free MSM) ซึ่งมีกลีเซอรอล 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอชให้เป็น 7 อาหารเหลว N_2-free MSM (กรัมต่อลิตร) ประกอบด้วย KH_2PO_4 3.70, K_2HPO_4 5.80, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2, MT solution 1 มิลลิลิตร ซึ่ง MT solution (กรัมต่อลิตรของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์) ประกอบด้วย $FeSO_4.7H_2O$ 2.78, $MnCl_2.4H_2O$ 1.98, $CoSO_4.7H_2O$ 2.81, $CaCl_2.2H_2O$ 1.67, $CuCl_2.2H_2O$ 0.17, $ZnSO_4.7H_2O$ 0.29 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ ที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซนต์ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงทุก 4 ชั่วโมง ครั้งละ 10 มิลลิลิตร นำไปวัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วแบ่งน้ำเลี้ยงที่ได้ออกเป็นสองส่วนเท่ากัน ส่วนที่ 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง และส่วนที่ 2 นำไปวิเคราะห์หาปริมาณของพอลิไฮดรอกซี-อัลคาโนเอต

5. การวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำเลี้ยงมาเหวี่ยงแยกเซลล์ ด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 2 ครั้งๆ ละ 10 มิลลิลิตร นำเซลล์ใส่ในจานเพาะเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส อบจนเซลล์แห้งและน้ำหนักคงที่ (Jung, Park and Lee, 2000)

6. การวิเคราะห์หาปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

สกัดสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเติมโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในน้ำหมักปริมาตร 30 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 24 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วคน เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 วินาที ตั้งไว้ให้เย็น แล้วดูดสารละลายในชั้นของคลอโรฟอร์มซึ่งจะอยู่ชั้นล่างด้วยหลอดดูดสารเก็บไว้ในขวดแก้วฝาเกลียว เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่อไป (สาธิตา ผลอินทร์, 2554)

นำสารละลายที่สกัดได้มา 1 มิลลิลิตร ปล่อยให้ระเหยจนแห้ง แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาที ตั้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากกราฟมาตรฐาน (สาธิตา ผลอินทร์, 2554)

ส่วนที่ 2 ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

1. ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดจากการทดลองในส่วนที่ 1 ข้อ 4 แบบสองขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 เขี่ยเชื้อจากจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง NB ลงในอาหารเหลวสำหรับเชื้อเริ่มต้นจำนวน 8 ขวด ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้เชื้อ 1 loop ต่อ อาหารเหลว 1 ขวด ปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำอาหารเหลวที่เติมเชื้อแล้วทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงทั้งหมดไปปั่นแยกด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์อีกสองครั้ง เก็บตะกอนเซลล์ไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

เตรียมอาหารเหลว N_2-free MSM ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่จำนวน 8 ขวด เติมน้ำแช่เปลือกสับปะรด น้ำแช่ชานอ้อย แป้งมัน กากน้ำตาล น้ำมันใช้แล้ว กลีเซอรอลดิบ และน้ำทิ้งจากโรงอาหาร อย่างละ 1 เปอร์เซนต์ ลงในขวดที่ 2 ถึง 8 ตามลำดับ (ขวดที่ 1 ใช้เป็นตัวควบคุม) นำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 8 ขวดไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ ที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ดูดตะกอนเซลล์ข้างต้นปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเหลว N_2-free MSM ขวดที่ 1 ถึง ขวดที่ 8 นำอาหารเหลวทั้ง 8 ขวด ไปบ่มในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงทุกๆ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร ปั่นแยกน้ำเลี้ยงด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ไว้ นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ เพื่อทดสอบชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิต PHA เลือกแหล่งคาร์บอนที่มีผลหลักต่อการผลิต PHA อย่างมีนัยสำคัญ (ค่า P-value < 0.05)

2. ศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

เตรียมอาหารเหลว N_2-free MSM ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด เติมแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด จากผลการทดลองในส่วนที่ 2 ข้อ 1 ร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 ลงในขวดอาหารเหลวที่ 1-5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมเซลล์แบคทีเรียที่เตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเหลวทั้ง 5 ขวด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

3. การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย FMI3 โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยแบคทีเรีย FMI3 จากจานเพาะเชื้อลงในอาหารเหลว pre-culture จำนวน 8 ขวด โดยใช้เชื้อ 1 loop ต่อ อาหารเหลว 1 ขวด ปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำอาหารเหลวทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงทั้งหมดไปปั่นแยกด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

ดูดตะกอนเซลล์ข้างต้นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ด้วยปิเปตแล้วเติมลงในอาหารเหลวชนิด MSM ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทั้ง 8 ขวด ที่มีแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2 เติมแอมโมเนียม-ซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซีเตท โมโนโซเดียมกลูตาเมต โซเดียมไนเตรท และยูเรีย ลงในขวดอาหารที่ 2 ถึง ขวดที่ 8 ใช้ขวดที่ 1 เป็นตัวควบคุม (N_2 – free MSM) นำขวดรูปชมพู่ทั้งหมดไปบ่มในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร ปั่นแยกน้ำเลี้ยงด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ไว้ นำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและสกัดสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่อไป

ทำการทดลองซ้ำในข้อ จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ เพื่อทดสอบชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิต PHA เลือกแหล่งไนโตรเจนที่มีผลหลักต่อการผลิต PHA อย่างมีนัยสำคัญ (ค่า P-value < 0.05)

4. ศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

เลือกแหล่งไนโตรเจนที่มีอิทธิพลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ FMI-3 สูงที่สุด 4 ชนิด จากการทดลองในข้อ 3 มาศึกษาปริมาณที่เหมาะสมดังนี้

เตรียมอาหารเหลว pre-culture เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตรรวม 150 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด เขี่ยเชื้อเขี่ยแบคทีเรีย FMI3 จากจานเพาะเชื้อลงในอาหารเหลว pre-culture โดยใช้เชื้อ 1 loop ต่อ อาหารเหลว 1 ขวด นำอาหารเหลวทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงทั้งหมดไปปั่นแยกด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

เตรียมอาหารเหลว MSM จำนวน 5 ขวด ปริมาตร 150 มิลลิลิตร มีแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 2 เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 1, 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ลงในขวดที่ 1-5 นำอาหารเหลวทั้ง 5 ขวดไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ ที่ความดัน 1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตรอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปิเปตเซลล์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากการทดลองข้างต้นเติมลงในขวดรูปชมพู่ใบที่ 1-5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ส่วนที่ 3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ FMI-3 แสดงได้ดังนี้

1. การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เตรียมอาหารเหลวสำหรับเชื้อเริ่มต้น pre-culture ซึ่งประกอบด้วยเพปโทน 5 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์และสารสกัดจากเนื้ออย่างละ 3 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเชื้อเริ่มต้นจำนวน 1 ลูปเต็มต่อขวด ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงทั้งหมดไปปั่นแยกด้วยเครื่องเซนติฟิวจ์ ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ไว้ใช้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตต่อไป

2. การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อ FMI-3 ในอาหารเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในสูตรอาหาร N_2-free MSM และ MSM ดังแสดงในตาราง 3.1 โดยใช้เชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมลงไปในอาหารเหลวทั้งสองสูตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ตาราง 3.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษา

องค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร)	N_2-free MSM	MSM
กลีเซอรอลดิบ	50	50
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3.70	3.70
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	5.80	5.80
แมกนีเซียมซัลเฟตเตตระไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.20	0.20
แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$	-	5
Trace element solution (มิลลิลิตร)	1	1

3. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไอดรอกซีอัลคาโนเอต

ทำการเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลว pre-culture และเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวชนิด MSM ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักของชุดการทดลองทั้งหมดทุกๆ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

4. การศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไอดรอกซีอัลคาโนเอต

เติมเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวชนิด MSM ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จำนวน 5 ชุดการทดลอง ที่มีการปรับค่าพีเอชต่างๆ คือ 5, 6, 7, 8 และ 9 ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด จากข้อ 3 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักของชุดการทดลองทั้งหมดทุกๆ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

5. การศึกษาอัตราเร็วในการกวนที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

เติมเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวชนิด MSM ปริมาตร 150 มิลลิลิตร มีค่าพีเอชที่มีผลต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด จากข้อ 4 จำนวน 6 ชุดการทดลอง ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วต่างๆ คือ 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด จากข้อ 3 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักของชุดการทดลองทั้งหมดทุกๆ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

6. การศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MSM โดยปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) เท่ากับ 10, 15, 20, 25 และ 30 ที่มีค่าพีเอชซึ่งมีผลต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด จากข้อ 4 แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิซึ่งมีผลต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด จากข้อ 3 บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็วที่มีผลต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด จากข้อ 5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักของชุดการทดลองทั้งหมดทุกๆ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ส่วนที่ 4 การตรวจสอบชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

การตรวจสอบชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะทำการวิเคราะห์โดย GC-MS ดังนี้

นำตัวอย่างไประเหยแห้ง จากนั้นนำเซลล์แห้ง 10 มิลลิกรัม ละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสาร esterification fluid 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยกรดเบนโซอิก 0.025 กรัม เมทานอลปริมาตร 242 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริก เข้มข้นร้อยละ 95-98 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเก็บตัวอย่างที่เกิดจากการแยกชั้นโดยนำส่วนของคลอโรฟอร์มที่มี β-hydroxymethyl ester ละลายอยู่ นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรมิตรี (gas chromatography-mass spectrophotometry, GC-MS) สภาวะของแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatograph) จะควบคุมโดยใช้อุณหภูมินำเข้าที่ 250 องศาเซลเซียส กำหนดให้อุณหภูมิของ Oven เริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 70 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการเพิ่ม 5 องศาเซลเซียสต่อนาทีและอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นเป็น 115 องศาเซลเซียส มีอัตราการเพิ่ม 15 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 190 องศาเซลเซียส ในอัตราการเพิ่ม 25 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 250 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการเพิ่ม 10 องศาเซลเซียสต่อนาที กำหนดให้อุณหภูมิสุดท้าย (Post Run) คือ 250 องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 6 นาที คอลัมน์ที่ใช้คือ HP-5MS, ความยาวเท่ากับ 30 เมตร ความหนาเท่ากับ 0.25 ไมโครเมตรและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.25 มิลลิลิตร สภาวะของ Mass Spectrometer ควบคุมโดยใช้ ระบบ Electron Ionization: Acquisition mode; Sim mode ใช้ Detector ชนิด Electron multiplier detector กำหนดระบบ Solvent delay โดยใช้เวลา 4 นาที ในการวิเคราะห์กำหนดระบบการฉีดสารตัวอย่างแบบ Splitless ใช้ปริมาตรสารตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การวิจัยเรื่อง การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมโดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม 2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม และ 3) ศึกษาชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม ผู้วิจัยได้นำเสนอผลการวิจัยดังนี้

ส่วนที่ 1 การเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม

ส่วนที่ 2 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอก-ซีอัลคาโนเอต

ส่วนที่ 3 สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด

ส่วนที่ 4 ผลการตรวจสอบชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ส่วนที่ 1 การเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม

1. การแยกเชื้อที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำทิ้งโรงงานแหนม

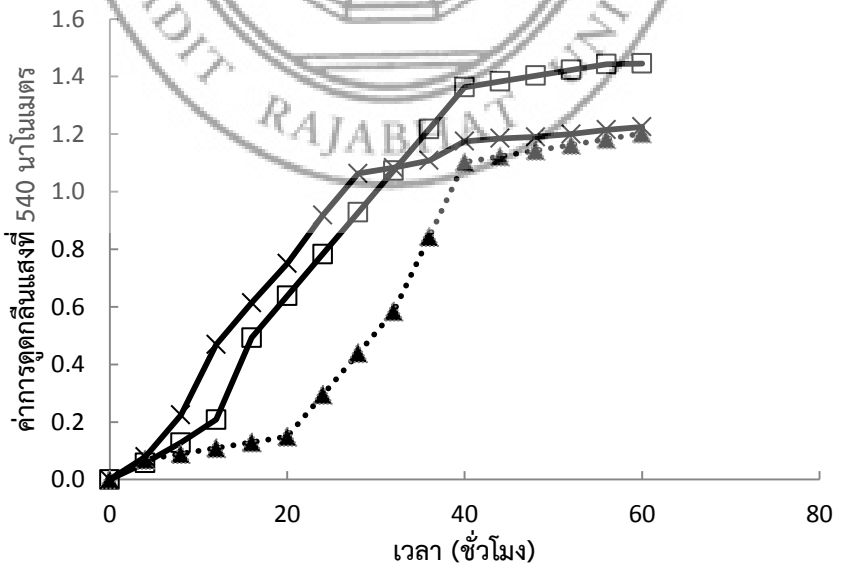
จากการศึกษาการแยกเชื้อที่สามารถผลิต PHA จากกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบบนอาหารแข็งสูตร *E2* พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 4 ไอโซเลท ที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายกันคือรูปร่างกลมมีสีขาวขุ่นและมีขอบหยัก โดยตั้งชื่อเป็น FMI-1, FMI-2, FMI-3 และ FMI-4 (ตาราง 4.1) เนื่องจากว่า FMI-1 เจริญเติบโตอยู่ใต้อาหารวุ้น ซึ่งอาจจะเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ ขณะที่ FMI-2, FMI-3 และ FMI-4 เจริญอยู่ที่ผิวด้านบนของอาหารวุ้น ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงศึกษากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์เพียง 3 ไอโซเลทดังกล่าวเท่านั้น จากการนำแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมาทดสอบการติดสี Sudan Black B เพื่อพิจารณาการผลิตพอลิเมอร์ภายในเซลล์ ซึ่ง Sudan Black B เป็นสีย้อมสารที่ไม่มีขั้ว ละลายในไขมันได้ ทำให้สามารถติดไขมันได้สูง จึงมีการใช้ Sudan Black B เพื่อย้อมทดสอบไตรกลีเซอไรด์ ลิพิด และไลโปโปรตีนบางตัว จากการทดลองพบว่าเชื้อ FMI-2, FMI-3 และ FMI-4 สามารถย้อมติดสี Sudan Black B แสดงว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทนี้ สามารถผลิตพอลิเมอร์กลุ่ม PHA ได้

ตาราง 4.1 ลักษณะโคโลนีต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร E2 ที่มีอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน

รหัส	ลักษณะของโคโลนี	รูปร่างโคโลนี	การย้อมติดสีแกรม	การย้อมติดสี Sudan Black B
FMI-2	ขาวขุ่น มีรอยหยัก	วงกลม	แกรมบวก	ผลบวก
FMI-3	ขาวขุ่น มีรอยหยัก	วงกลม	แกรมบวก	ผลบวก
FMI-4	ขาวขุ่น มีรอยหยัก	วงกลม	แกรมบวก	ผลบวก

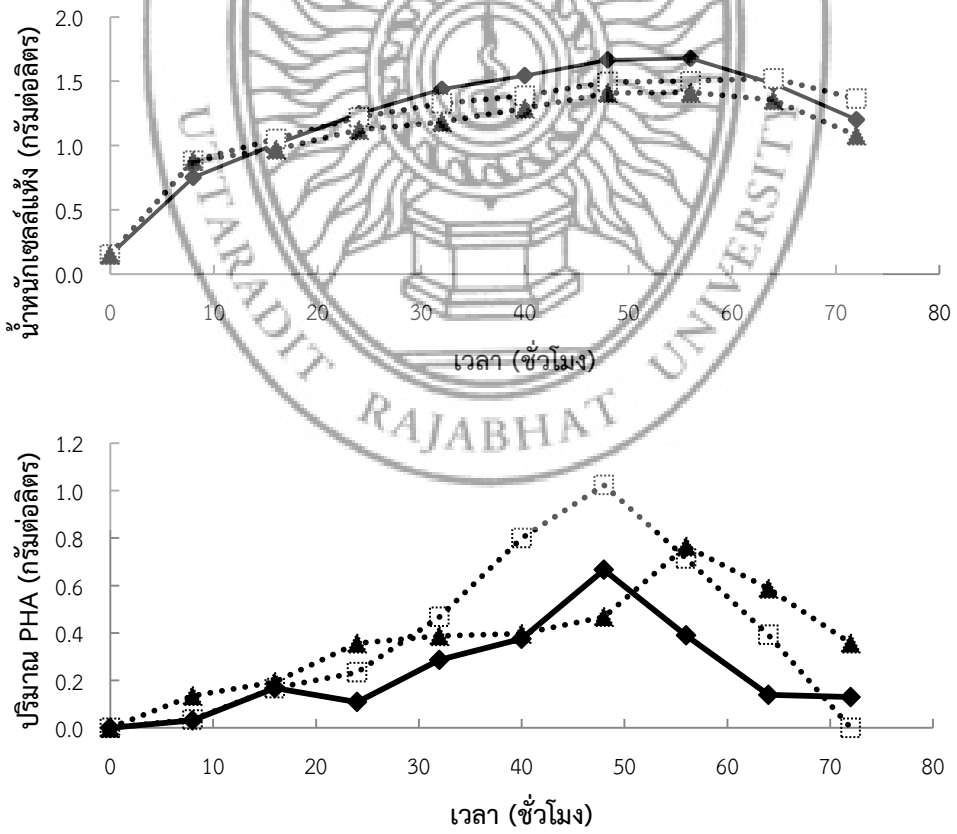
2. ลักษณะการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหารเหลวสังเคราะห์

ในการเตรียมเชื้อสำหรับเป็นเชื้อเริ่มต้นโดยเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย FMI-2, FMI-3 และ FMI-4 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยเพปโทน สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียซัลเฟต และ มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะที่มีการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการตรวจสอบการเจริญเติบโตโดยวัดความขุ่นของเซลล์ในน้ำเลี้ยงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร พบว่าแบคทีเรีย FMI-2 และ FMI-4 มีการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 40 การเจริญจะเริ่มคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 4.1 ในขณะที่แบคทีเรีย FMI-3 มีการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในช่วงเวลาตั้งแต่ 20 ชั่วโมงเป็นต้นไป จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 40 การเจริญจะเริ่มคงที่ ในชั่วโมงที่ 24 เป็นช่วงกลางของการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของเชื้อ FMI-2 และ FMI-4 ขณะที่ช่วงกลางของการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของเชื้อ FMI-3 อยู่ในชั่วโมงที่ 32 ดังนั้นจึงเลือกชั่วโมงที่ 24 เป็นช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเชื้อ FMI-2 และ FMI-4 และเลือกชั่วโมงที่ 32 เป็นช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเชื้อ FMI-3



ภาพที่ 4.1 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย FMI-2 (—□—) FMI-3 (—▲—) และ FMI-4 (—×—) ที่แยกได้

จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท คือ FMI-2, FMI-3 และ FMI-4 มาศึกษาการเจริญและการผลิต PHA ในอาหารเหลวชนิด nitrogen-free mineral salts medium (MSM) ซึ่งมีกลีเซอรอล 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอชให้เป็น 7 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยทำการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท เปรียบเทียบกัน โดยใช้ปริมาตรเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.2 จากกราฟผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ FMI-2 และ FMI-4 มีการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 52 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.71 และ 1.49 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ FMI-3 มีการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 64 (น้ำหนักเซลล์แห้ง 1.52 กรัมต่อลิตร) เมื่อเปรียบเทียบการผลิต PHA ของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่า เชื้อ FMI-3 ผลิต PHA ได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48-52 เท่ากับ 1.02-1.03 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ เชื้อ FMI-4 ผลิต PHA ได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 เท่ากับ 0.79 กรัมต่อลิตร และเชื้อ FMI-2 ผลิต PHA ได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 0.67 กรัมต่อลิตร ซึ่งสัดส่วนการผลิต PHA ต่อการเจริญที่ได้ของเชื้อ FMI-3, FMI-4 และ FMI-2 คิดเป็น 69.16, 56.86 และ 39.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปจึงเลือกศึกษาเฉพาะเชื้อ FMI-3 เนื่องจากสามารถผลิต PHA ได้สูงที่สุด

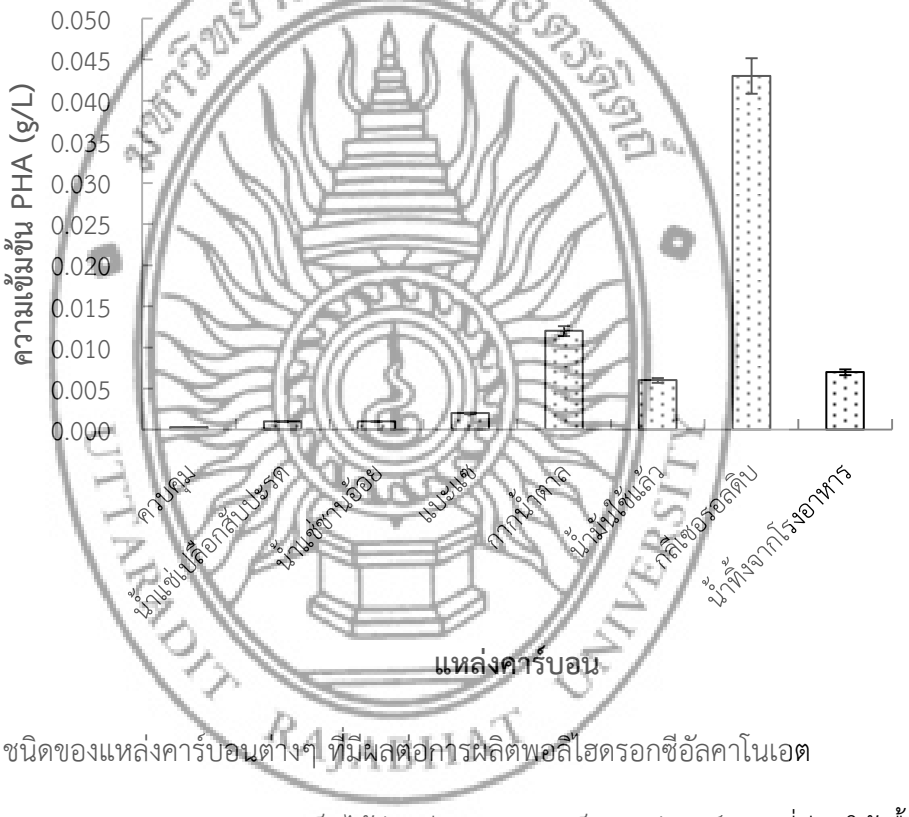


ภาพที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง และ ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ FMI-2 (—◆—), FMI-3 (···□···) และ FMI-4 (···▲···) ในอาหารเหลวชนิด nitrogen-free MSM

ส่วนที่ 2 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

1. แหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการทดลองศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ชนิดต่างๆ เช่น น้ำแช่เปลือกสับปะรด น้ำแช่ชานอ้อย แบะแซ กากน้ำตาล น้ำมันที่เหลือจากการทอดอาหาร กลีเซอรอลดิบ และ น้ำทิ้งจากโรงอาหาร เป็นต้น ต่อการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ FMI3 ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.3

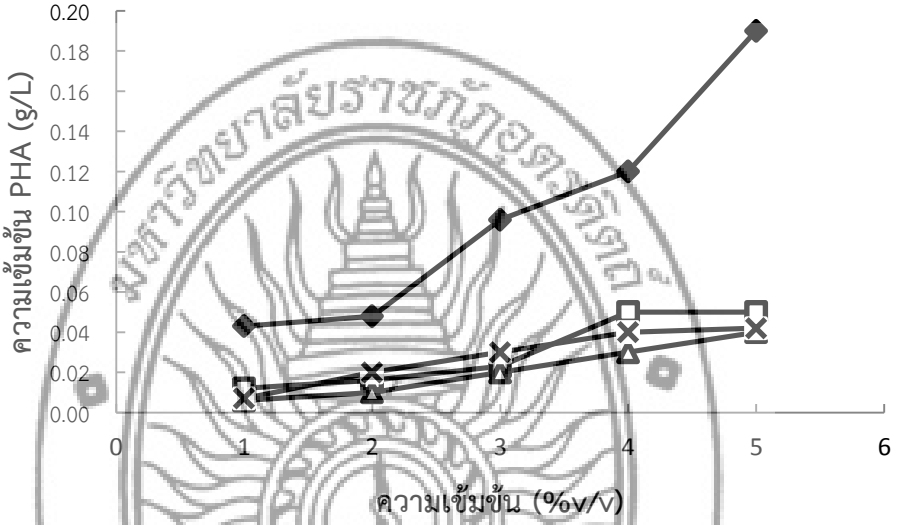


ภาพที่ 4.3 ชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากกราฟผลการทดลองจะเห็นได้ว่ากลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีผลให้เชื้อ FMI3 ผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด รองลงมาคือ กากน้ำตาล สำหรับน้ำมันใช้แล้วและน้ำทิ้งจากโรงอาหารให้ผลผลิตของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตใกล้เคียงกันแต่ได้ปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัล-คาโนเอตน้อยกว่าการใช้กากน้ำตาล สำหรับการเลี้ยงเชื้อ FMI-3 ในอาหารเหลวที่มีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น น้ำแช่เปลือกสับปะรด และ น้ำแช่ชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อนำมาใช้สร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยมาก ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงใช้เฉพาะของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

การศึกษาผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ FMI3 โดยเลือกแหล่งคาร์บอนเพียง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ (1-5% โดยปริมาตร) มาเติมลงใน

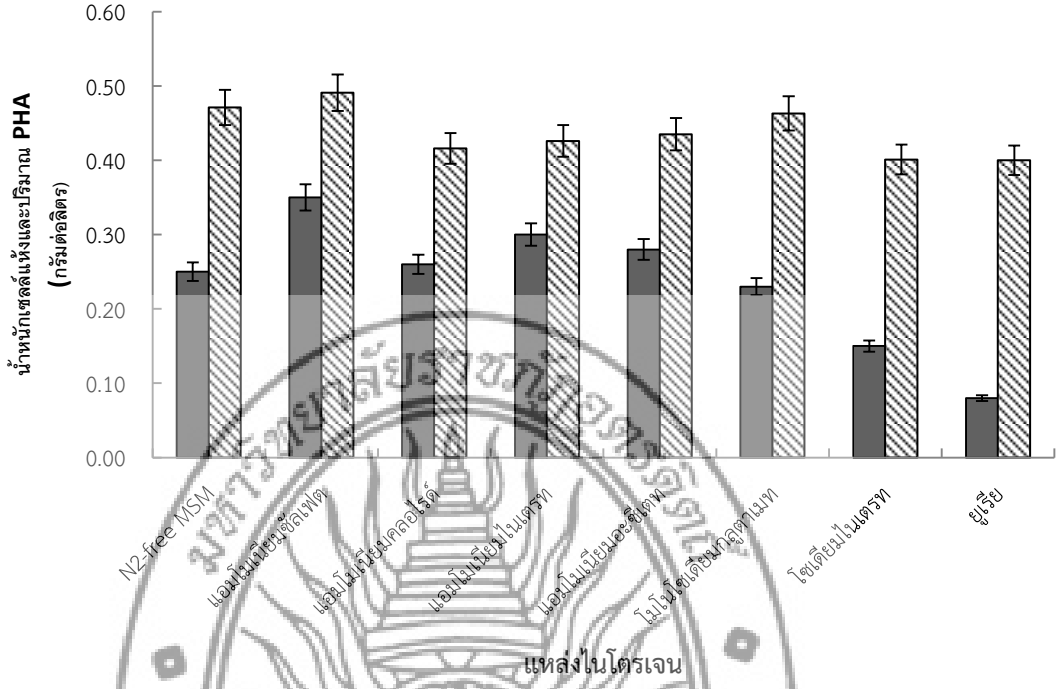
อาหารเหลว N_2-free MSM ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าปริมาณของกลีเซอรอลดิบที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ปริมาณของแหล่งคาร์บอนอื่นๆ เช่น กากน้ำตาล น้ำมันใช้แล้ว และ น้ำทิ้งจากโรงอาหาร ไม่มีผลไปทำให้ปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้กลีเซอรอลดิบเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร



ภาพที่ 4.4 ปริมาณของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ กลีเซอรอลดิบ (◆) กากน้ำตาล (□) น้ำมันใช้แล้ว (△) และ น้ำทิ้งจากโรงอาหาร (×) ที่มีต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

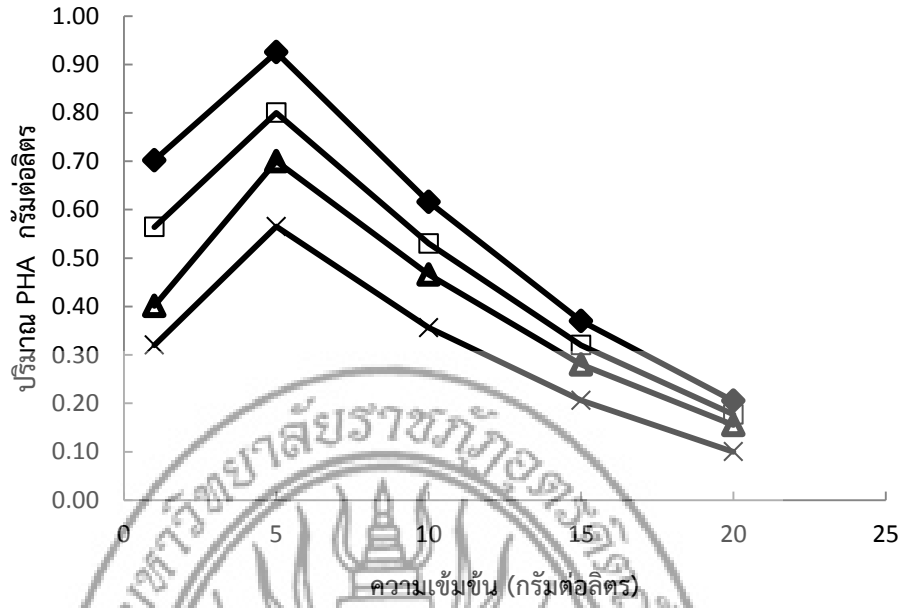
2. แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการทดลองเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ในปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ลงไปในอาหาร MSM ได้แก่ แอมโมเนียม ซัลเฟต โมโนโซเดียม กลูตาเมท โซเดียม ไนเตรท ยูเรีย แอมโมเนียม คลอไรด์ แอมโมเนียม ไนเตรท และ แอมโมเนียม อะซีเตท เป็นต้น เพื่อศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนดังกล่าวต่อการเจริญและสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ FMI3 เปรียบเทียบกับอาหารเหลวชนิด N_2–free MSM ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าการเติมแอมโมเนียม ซัลเฟต ลงไปในอาหาร MSM จะมีผลทำให้เชื้อมีการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว N_2–free MSM สำหรับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ ที่เติมลงไปไม่ทำให้เชื้อเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นแต่มีแหล่งไนโตรเจนสามชนิดที่เติมลงไปแล้วจะทำให้เชื้อสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมากกว่าอาหารชนิด N_2–free MSM คือ แอมโมเนียม ไนเตรท แอมโมเนียม อะซีเตท และ แอมโมเนียม คลอไรด์ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.5 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญ (▨) และการผลิตพอลิไฮดรอกซี-อัลคาโนเอต (■)

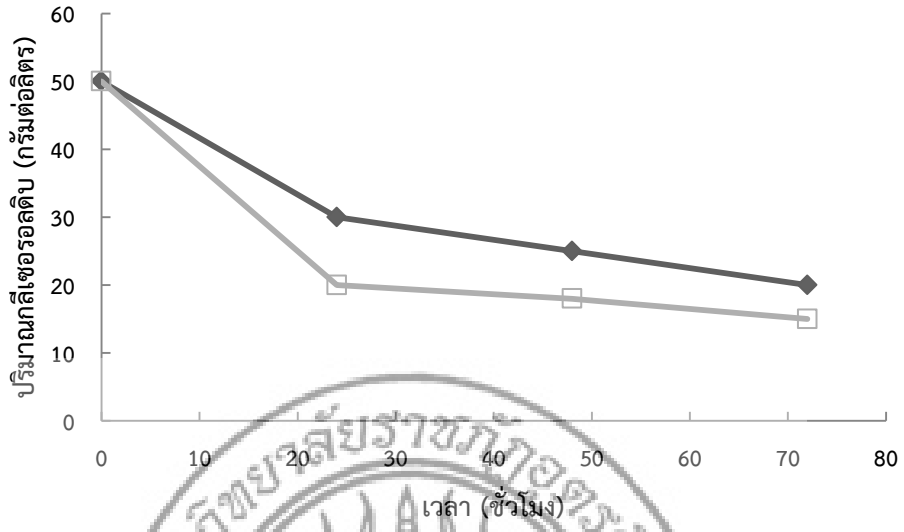
การศึกษาผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ FMI3 โดยเลือกแหล่งไนโตรเจนเพียง 4 ชนิด คือ แอมโมเนียม ซัลเฟต แอมโมเนียม ไนเตรท แอมโมเนียม อะซีเตท และ แอมโมเนียม คลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ (1, 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร) มาเติมลงในอาหารเหลว MSM ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.6 จากกราฟผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียม ซัลเฟตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปในอาหารเหลว MSM แล้วทำให้เชื้อ FMI-3 ผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด รองลงมาได้แก่ แอมโมเนียม ไนเตรท แอมโมเนียม อะซีเตท และ แอมโมเนียม คลอไรด์ ตามลำดับ และถ้าเพิ่มความเข้มข้น ของแหล่งไนโตรเจนทั้งสี่ชนิดพบว่าการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้อาหารเหลว MSM ที่ใช้แอมโมเนียม ซัลเฟตเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งของไนโตรเจน



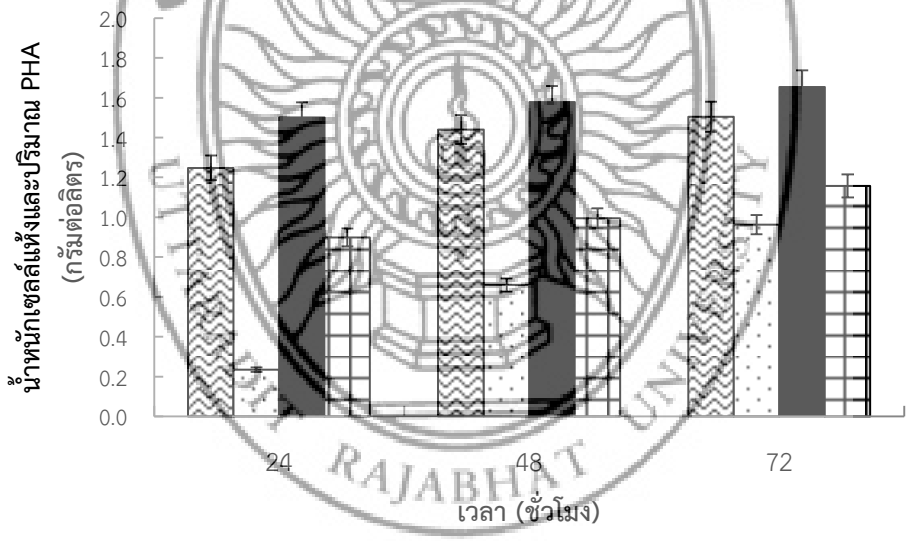
ภาพที่ 4.6 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ แอมโมเนียม ซัลเฟต (◆) แอมโมเนียม ไนเตรท (□) แอมโมเนียม อะซีเตท (△) และ แอมโมเนียม คลอไรด์ (×) ที่มีต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

ส่วนที่ 3 สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด

จากการทดลองขั้นต้นทำให้ทราบว่ากลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยปริมาณที่เหมาะสม คือ 50 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ แอนโมเนียม ซัลเฟต เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ผู้วิจัยได้ทดลองเปรียบเทียบผลของการเลี้ยงเชื้อ FMI-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 สูตร คือ สูตร N_2-free MSM และ สูตร MSM ที่มีกลีเซอรอลดิบเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนพียงชนิดเดียว แล้วทำการตรวจสอบปริมาณกลีเซอรอลดิบที่ใช้ไป น้ำหนักของเซลล์แห้งและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ FMI-3 ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.7 และ 4.8 ตามลำดับ จากกราฟผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณของกลีเซอรอลดิบในอาหารสูตร MSM ซึ่งมีแอมโมเนียม ซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนลดลงมากกว่าในอาหารสูตร N_2-free MSM ซึ่งไม่มีแหล่งไนโตรเจน โดยที่เวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณกลีเซอรอลดิบเหลืออยู่น้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ FMI-3 ที่เลี้ยงในอาหาร MSM มีปริมาณสูงกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร N_2-free MSM ที่ช่วงเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในทำนองเดียวกันกับปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร MSM มีปริมาณสูงกว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร N_2-free MSM



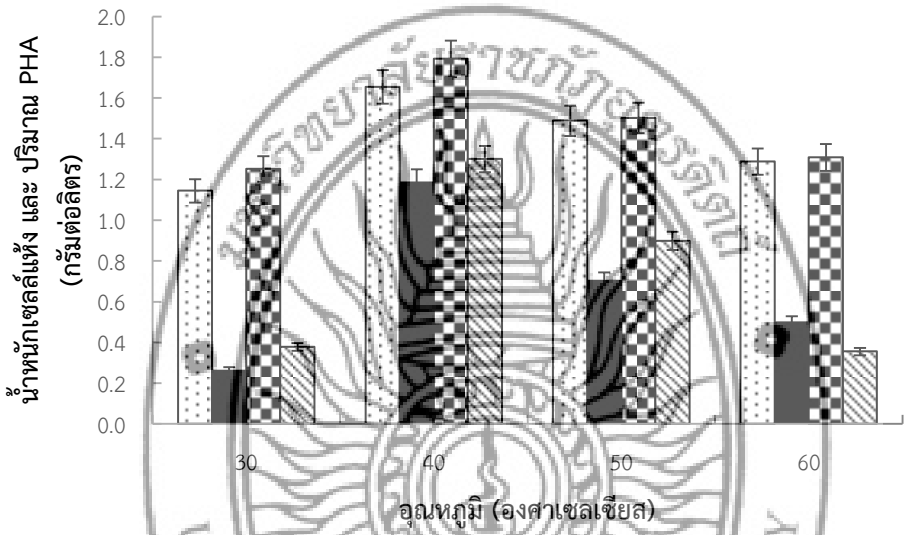
ภาพที่ 4.7 ปริมาณของกลีเซอรอลดิบทั้งหมดในการเลี้ยงเชื้อ FMI-3 ในอาหารเหลวสูตร N_2-free MSM (◆) และ MSM (❑)



ภาพที่ 4.8 น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร N_2-free MSM (▨ และ MSM (■) ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สังเคราะห์จากเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร N_2-free MSM (▩) และ MSM (❑)

จากการศึกษาอุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ที่มีผลต่อน้ำหนักของเซลล์แห้งและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ FMI-3 ที่เลี้ยงใน pre-culture และอาหารสูตร MSM ที่มีแหล่งคาร์บอนคือกลีเซอรอลดิบเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.9 จากกราฟผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจาก 30 องศาเซลเซียส ถึง 40 องศาเซลเซียส น้ำหนักเซลล์

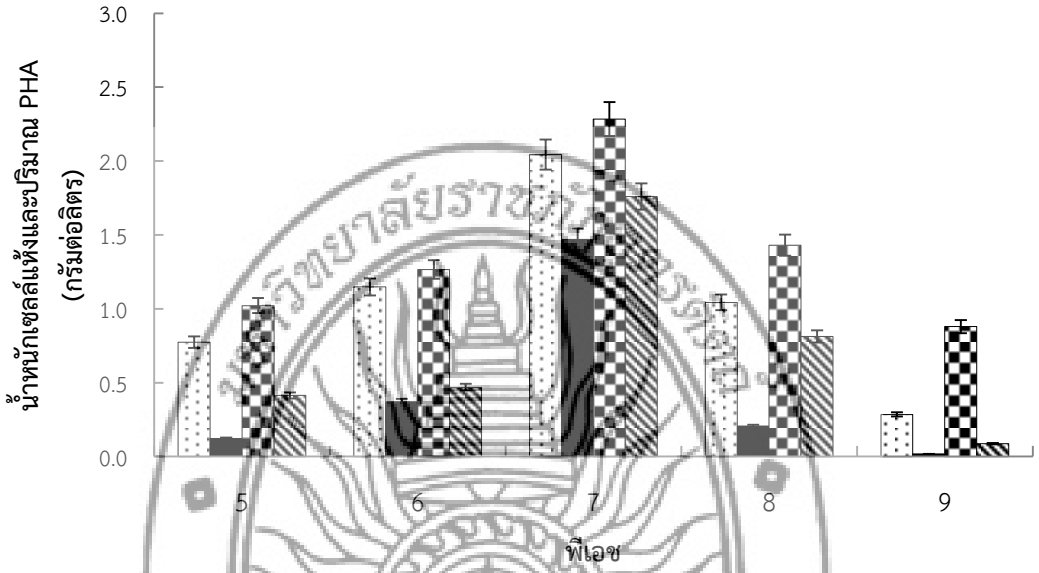
แห้งและปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ได้จากการหมักมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจาก 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะลดลงตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 1.792 และ 1.3000 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นร้อยละผลผลิตของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้เท่ากับ 72.54 ที่เวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง ในการทดลองต่อไปทำการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ( ) และ 72 ชั่วโมง ( ) ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สังเคราะห์ในเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ( ) และ 72 ชั่วโมง ( ) เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิต่างๆ

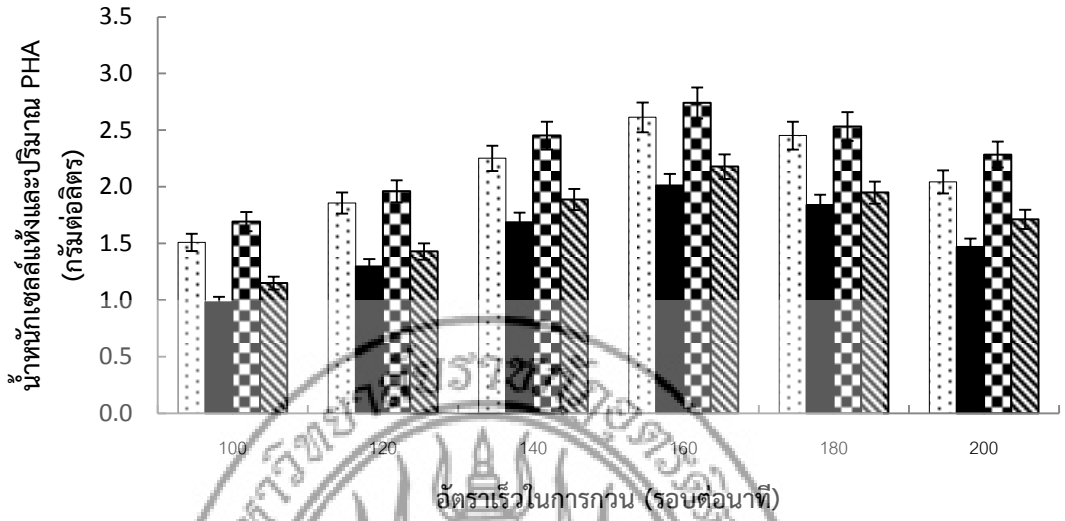
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของอาหารเหลว pre-culture และอาหาร MSM ที่มีกลีเซอรอลดิบเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียม ซัลเฟตเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งและไนโตรเจนตามลำดับ หมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วติดตามการเจริญเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ FMI-3 โดยการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.10 จากกราฟผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 5 ถึง 7 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ เมื่อพีเอชมากกว่า 7 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะลดลงตามลำดับ โดยที่พีเอช 9 ทั้งน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตมีค่าน้อยที่สุด พบว่าที่พีเอช 7 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 2.284 และ 1.76 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลาการ

หมัก 72 ชั่วโมง และคิดเป็นร้อยละผลผลิตของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต เท่ากับ 77.06 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะปรับค่าความเป็นกรดเบสของอาหาร MSM ให้เท่ากับ 7



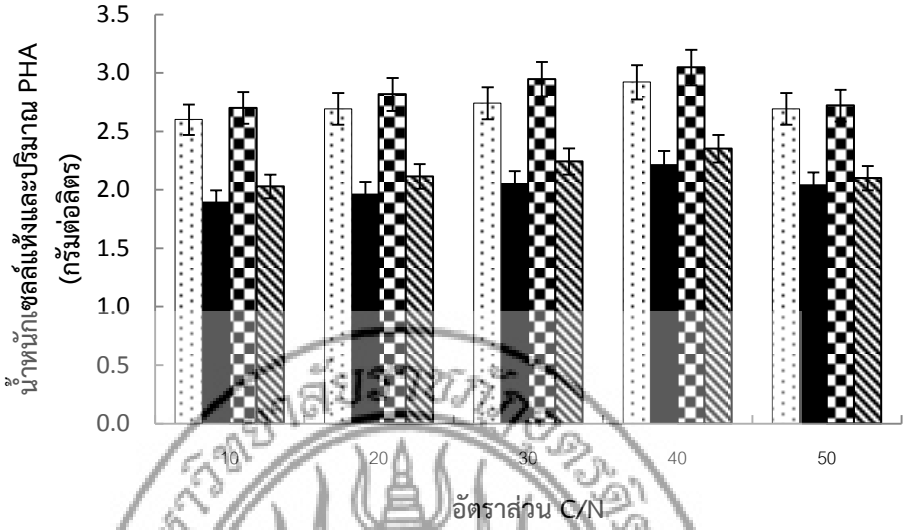
ภาพที่ 4.10 น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ( ) และ 72 ชั่วโมง ( ) ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สังเคราะห์ในเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ( ) และ 72 ชั่วโมง ( ) ที่ได้จากการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชต่างๆ

จากการศึกษาอัตราการกวนของเครื่องเขย่าด้วยความเร็วต่างๆ คือ 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 รอบต่อนาที ในการเตรียมเชื้อเริ่มต้น และการหมักในอาหาร MSM ที่มีกลีเซอรอลดิบเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียม ซัลเฟตเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งและไนโตรเจนตามลำดับ ที่พีเอช 7 หมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วติดตามการเจริญเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ FMI-3 ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.11 จากกราฟผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่ออัตราเร็วในการกวนเพิ่มมากขึ้นจาก 100 รอบต่อนาที ถึง 160 รอบต่อนาที น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจะเพิ่มสูงขึ้น ตามลำดับ โดยเชื้อ FMI-3 จะเจริญเติบโตและสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุดเท่ากับ 2.74 และ 2.1782 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่อัตราการกวนเท่ากับ 160 รอบต่อนาที เมื่อเพิ่มอัตราการกวนมากขึ้นจนถึง 180 และ 200 รอบต่อนาที พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตลดลงตามลำดับ



ภาพที่ 4.11 น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ( ) และ 72 ชั่วโมง ( ) ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สังเคราะห์ในเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ( ) และ 72 ชั่วโมง ( ) ที่เลี้ยงในเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบต่างๆ

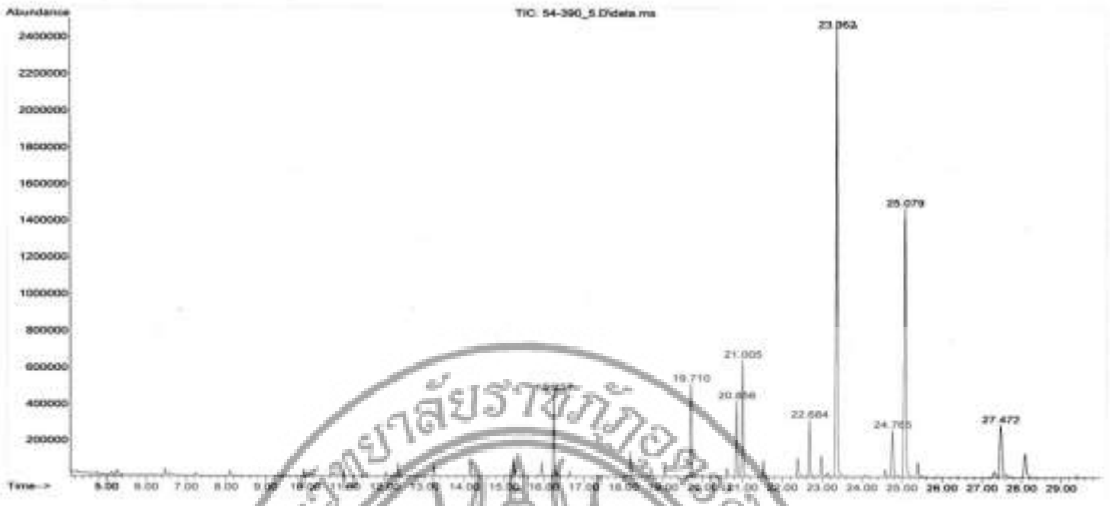
จากการเลี้ยงเชื้อ FMI-3 ในอาหาร MSM ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียม ซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10, 20, 30, 40 และ 50 ตามลำดับ ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 7 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.12 จากกราฟผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่ออัตราส่วน C/N เพิ่มขึ้น น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ได้จากการหมักเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ โดยที่อัตราส่วน C/N เท่ากับ 40 จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 3.046 และ 2.351 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่ออัตราส่วน C/N มากกว่า 40 น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จะลดลงเพียงเล็กน้อย



ภาพที่ 4.12 น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ( ) และ 72 ชั่วโมง ( ) ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สังเคราะห์ในเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ( ) และ 72 ชั่วโมง ( ) ที่เลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีอัตราส่วน C/N ต่างๆ

ส่วนที่ 3 ผลการตรวจสอบชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

จากการเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดเซลล์ของเชื้อ FMI-3 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MSM ที่ใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียม ซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับอัตราส่วนของ C/N ให้เท่ากับ 40 เมื่อทดสอบด้วยเครื่อง GC-MS พบโครมาโตแกรมที่ให้องค์ประกอบของเมทิลเอสเทอร์เด่น 3 ชนิด ที่ retention time เท่ากับ 16.257 นาที 19.709 นาที และ 23.362 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.13 เมื่อตรวจค่ามวลสเปคตรัม (Mass spectra) ของโครมาโตแกรมที่สกัดได้เทียบกับ Library search NIS08 ผลการเปรียบเทียบชนิดของเมทิลเอสเทอร์แสดงในตาราง 4.2 จากข้อมูลการเปรียบเทียบพบว่าเชื้อ FMI-3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MSM ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตพอลิเมอร์ชนิด 3-ไฮดรอกซีโดเดคาโนอิกแอซิดได้สูงสุด (35%) รองลงมาคือ 3-ไฮดรอกซีเดคาโนอิกแอซิด (7%) และ 3-ไฮดรอกซีออกทาโนอิกแอซิด (5%) ตามลำดับ



ภาพที่ 4.13 โครมาโตแกรมของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สกัดได้จากเซลล์ FMI-3 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MSM ที่ใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราส่วน C/N เท่ากับ 40

ตาราง 4.2 เมทิลเอสเทอร์ของพอลิเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ FMI-3 ในอาหารเหลว MSM

Retention time (นาที)	M^+	m/e ของ fragment ที่สำคัญ	ชนิดเมทิลเอสเทอร์ที่เทียบเคียงได้
16.257	141	31,39,41,43,56,61,71,74,103	3-ไฮดรอกซีออกทาโนอิกแอซิด
19.709	201	42,55,57,59,61,69,71,74,103	3-ไฮดรอกซีเดคาโนอิกแอซิด
23.362	229	55,61,71,74,103	3-ไฮดรอกซีโดเดคาโนอิกแอซิด

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม 2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโน-เอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม และ 3) ศึกษาชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม ผู้วิจัยได้ทำการเก็บน้ำเสียจากโรงงานแหนมแห่งหนึ่งในจังหวัดอุตรดิตถ์ เพื่อนำมาคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ ด้วยการย้อมสีด้วย Sudan Black B พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้จำนวน 3 ชนิด จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่าเชื้อรหัส FMI-3 มีการเจริญเติบโตและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงสุด จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมอย่างละ 7 ชนิด พบว่าการใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้เชื้อรหัส FMI-3 มีการเจริญเติบโตและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ดีที่สุด จากนั้นทำการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของกลีเซอรอลดิบและไนโตรเจน สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อรหัส FMI-3 และศึกษาชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งผลการวิจัยทั้งหมดสรุปและอภิปรายผลได้ดังนี้

สรุป

1. **การเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม**

การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำเสียของโรงงานแหนมจะพบเชื้อจำนวนมากแต่มีเพียง 3 ชนิดเท่านั้นที่สามารถสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ ซึ่งกำหนดรหัสเป็น FMI-2, FMI-3 และ FMI-4 โดยเชื้อ FMI-3 สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้ดีที่สุดในอาหารเหลวชนิด N_2-free MSM ได้ปริมาณเท่ากับ 1.0233 กรัม/ลิตร ที่เวลาของการหมัก 48 ชั่วโมง

2. **แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอก-ซีอัลคาโนเอต**

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ FMI-3 ให้เจริญเติบโตและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัล-คาโนเอตได้สูงสุด คือ กลีเซอรอลดิบความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโน-เอตสูงสุดเท่ากับ 0.19 กรัมต่อลิตร ที่เวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ FMI-3 ให้เจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโน-เอตได้สูงสุด คือ แอมโมเนียม ซัลเฟตเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูง สุดเท่ากับ 0.925 กรัมต่อลิตร ที่เวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง

3. สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุด

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อ FMI-3 สรุปได้ดังนี้

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการหมักกลีเซอรอลดิบ คือ สูตร MSM ที่มีแอมโมเนียม ซัลเฟต เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส พีเอช เท่ากับ 7 เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 3.046 และ 2.351 กรัมต่อ ลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละผลผลิตของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเท่ากับ 77.18

4. ชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ผลิตได้

จากการตรวจสอบชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สังเคราะห์ได้จาก การหมักกลีเซอรอลดิบในอาหาร MSM ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้อัตราส่วน ของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 พบว่าเชื้อรหัส FMI-3 สามารถผลิตพอลิเมอร์ชนิด 3-ไฮดรอกซี-โดเดคาโนอิกแอซิดได้สูงสุด (35%) รองลงมาคือ 3-ไฮดรอกซีเดคาโนอิกแอซิด (7%) และ 3-ไฮดรอก-ซีออกทาโนอิกแอซิด (5%) ตามลำดับ

อภิปรายผลการวิจัย

การวิจัยเรื่องการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกาตรและผลพลอยได้ จากโรงงานอุตสาหกรรมโดยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานแหนม ผู้วิจัยได้อภิปรายผลไว้ดังนี้

1. เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำทิ้งที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีอัล-คาโนเอตได้ จำนวน 3 ชนิด (รหัส FMI-2, FMI-3 และ FMI-4) มีลักษณะโคโลนี รูปร่างโคโลนี และการ ย้อมติดสีแกรมเหมือนกัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด nitrogen-free MSM ซึ่งมีน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อรหัส FMI-3 มีการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ในช่วงการหมักที่ 40-60 ชั่วโมง โดยในชั่วโมงที่ 48 จะให้ปริมาณของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 1.0233 กรัมต่อ ลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.4092 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

เท่ากับ 72.61 ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยเชื้อแบคทีเรียที่กล่าวว่าเชื้อแบคทีเรียมีการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตไว้มากที่สุดในช่วงที่เชื้อเข้าสู่ช่วงการเจริญเติบโตที่คงที่ เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringiensis* R1 ในอาหารเหลว N_2-free MSM ที่ใช้กลีเซอรอล 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกัน พบว่าเชื้อ *B. thuringiensis* R1 จะเข้าสู่ช่วงการเจริญเติบโตที่คงที่ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งถึงก่อนเชื้อรหัส FMI-3 ซึ่งให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.90 กรัมต่อลิตร และสะสม PHB ไว้ในเซลล์ได้ 1.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการเจริญเติบโตและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อที่แยกได้รหัส FMI-3 (Rohini, Phadnis and Rawal, 2006)

2. จากการใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น น้ำแช่เปลือกสับปะรด และน้ำแช่ชานอ้อย ตลอดจนแหล่งคาร์บอนจากผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น กากน้ำตาล น้ำมันใช้แล้ว กลีเซอรอลดิบ และน้ำทิ้งจากโรงอาหาร รวมถึงแบะแซ พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส FMI-3 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในกลุ่มของผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมได้ดีที่สุดโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลีเซอรอลดิบ รองลงมาคือกากน้ำตาล ส่วนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเชื้อ FMI-3 ไม่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนได้ ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่าการใช้น้ำเพียงอย่างเดียวแช่เปลือกสับปะรดหรือชานอ้อยไม่สามารถทำให้น้ำตาลละลายออกมาได้ ซึ่งถ้าจะใช้เปลือกสับปะรดและชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียควรจะเพิ่มขั้นตอนการย่อยเซลลูโลสในเปลือกสับปะรดและชานอ้อยให้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อนเพื่อเชื้อแบคทีเรียจะได้สามารถนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Pandey et al., 2009) อย่างไรก็ตามการใช้แบะแซซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 80 เชื้อแบคทีเรียรหัส FMI-3 นำไปสร้างเป็นพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้น้อยมาก ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าเชื้อ FMI-3 ชอบน้ำตาลที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเช่นกลีเซอรอลมากกว่าน้ำตาลกลูโคส และทั้งกลีเซอรอลดิบและกากน้ำตาลเป็นสารผลิตภัณฑ์ข้างเคียงจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลและกระบวนการตกผลึกน้ำตาลทรายตามลำดับ ซึ่งในสารทั้งสองมีองค์ประกอบของสารประกอบไนโตรเจนและกรดไขมันซึ่งเชื้อแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้จากดินเลนแถบชายฝั่ง คือ *Vibrio spp.* จำนวน 4 สายพันธุ์รหัส M11, M14, M20 และ M31 พบว่ากลีเซอรอลจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Chien et al., 2007)

จากการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ลงไปในอาหาร MSM ได้แก่ แอมโมเนียม ซัลเฟต โมโนโซเดียมกลูตาเมท โซเดียม ไนเตรท ยูเรีย แอมโมเนียม คลอไรด์ แอมโมเนียม ไนเตรท และแอมโมเนียม อะซีเตท เป็นต้น พบว่าแอมโมเนียม ซัลเฟตที่ใช้ทำให้เซลล์รหัส FMI-3 เจริญเติบโตและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงกว่าการเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมไนโตรเจน รวมถึงแหล่งไนโตรเจนอื่นๆด้วย ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่าเชื้อแบคทีเรียยังคงต้องการแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตเมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่แล้วปริมาณของไนโตรเจนลดลงเซลล์จะเปลี่ยนกลีเซอรอลดิบ

ไปเป็นอะซีทิลโคเอ เพื่อนำไปสังเคราะห์เป็นอะซิโตอะซิติลโคเอและสังเคราะห์เป็น 3-ไฮดรอกซี-เอซิลโคเอ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Kim *et al*., 2007)

3. จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตของเชื้อรหัส FMI-3 ในอาหารเหลวชนิด MSM ที่มีกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียม ซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักคือ 40 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 7 เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสูงสุดเท่ากับ 3.046 และ 2.351 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละผลผลิตของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเท่ากับ 77.18

อุณหภูมิที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตคือ 35 องศาเซลเซียส สำหรับค่าพีเอชที่ได้สอดคล้องกับ การศึกษาที่ผ่านมาว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตคือพีเอช 7 (Babruwad *et al*., 2015) สำหรับการศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมจะให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของคูมาร์และคณะที่พบว่าเมื่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจะทำให้การสะสมของพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น (Kumar *et al*., 2004)

การศึกษาความเร็วในการเขย่าของเครื่องเขย่าซึ่งเทียบเคียงได้กับปริมาณออกซิเจนซึ่งมีผลต่อการหมัก ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที จะทำให้เชื้อแบคทีเรียรหัส FMI-3 ผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตได้สูงกว่าการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าถ้าการหมักทำในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัด จะทำให้การนำอะซิติลโคเอเข้าสู่วัฏจักรเครบส์เพื่อไปสร้างพลังงานเกิดได้น้อยลง จะทำให้มีอะซิติลโคเอเหลือพอที่จะไปสร้างอะซีโตอะซีติลโคเอและสารตั้งต้น 3-ไฮดรอกซีเอซิลโคเอต่อไป (Luengo *et al*., 2003)

4. จากการตรวจสอบชนิดและองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สังเคราะห์ได้จากการหมักกลีเซอรอลดิบในอาหาร MSM ที่มีแอมโมเนียม ซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 พบว่าเชื้อรหัส FMI-3 สามารถผลิตพอลิเมอร์ชนิด 3-ไฮดรอกซี-โดเดคาโนอิกแอซิดได้สูงสุด 3-ไฮดรอกซีเดคาโนอิกแอซิด และ 3-ไฮดรอกซีออกทาโนอิกแอซิด ซึ่งจัดเป็นพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตชนิดสายโซ่กลาง จากผลการทดลองอาจอธิบายได้ว่าเชื้อรหัส FMI-3 สามารถสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตชนิดสายโซ่กลางได้โดยไม่ขึ้นกับชนิดของคาร์บอน แต่จะถูกสร้างจากอะซีติลโคเอผ่านกระบวนการสร้างกรดไขมัน (Steinbuchel and Hein, 2001)

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

งานวิจัยนี้เป็นประโยชน์ต่อการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งหน่วยงาน หรือองค์กรที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพลาสติกทางชีวภาพสามารถนำกระบวนการที่ได้จากงานวิจัยไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้

2. ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

ควรมีการศึกษาแหล่งของเชื้อแบคทีเรียทางธรรมชาติอื่น ๆ ที่สามารถผลิตสารที่ใช้ทดแทนพลาสติก เช่น พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต หรือ พอลิแลคติก ในปริมาณสูง เพื่อลดต้นทุนในการผลิตพลาสติกชีวภาพ

มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ UTTARADIT RAJABHAT UNIVERSITY

บรรณานุกรม

ปิยะรัตน์ บุญแสวง. (2552). ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากจุลินทรีย์. ว.วิทย. มข. 37, 256-267

สาธิตา ผลอินทร์. (2554). การคัดแยกและการผลิต พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรตโดยจุลินทรีย์จากทะเล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปากร. เอกสารอัดสำเนา.

เฉลิมราช วันทวิน และ อรรนพ ฤทธิปัญญาวงศ์. (2545). การสังเคราะห์พีเอชเอในเซลล์จุลินทรีย์จากระบบปฏิกรณ์สลับเป็นกะโดยใช้สารอาหารอะซิเตตและกลูโคส. วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ปีที่ 25 ฉบับที่ 4 หน้า 323-334.

พรทิพพา พิญญาพงษ์ อัมพวัน ไมตรัตน์ เพ็ญศิริ ศรีบุรี กชกร ลาภมาก และ นิกร แสงสุวรรณ. (2555). รายงานการวิจัยเรื่องการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำทิ้งที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ. เอกสารอัดสำเนา.

โสภา ชินเวชกิจวานิชย์. (2547). อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตพีเอชเอเชื้อผสมโดยน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. เอกสารอัดสำเนา.

ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล. (2552). วิถีชีวสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในแบคทีเรีย. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 37, 244-255.

Aldor, I.S. and Keasling, J.D. (2003). Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. Curr Opin Biotechnol. 14, 475-483.

Alias, Z. and Tan, I.K. (2005). Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. Bioresour Technol. 96, 1129-1234.

Anderson. A.J. and E.A. Dawes, E.A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol Rev. 54, 450-472.

Anderson, A.J. and Wynn, J.P. (1995). Microbial polyhydroxyalkanoates, polysaccharides and lipids. In Basic Biotechnology. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 325-333.

Ashby, R.D. (2005). Synthesis of short-/medium-chain-length poly (hydroxyl-alkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. Biomacromolecules. 6, 2106-2112.

Babruwad, P.R., Prabhu, S.U., Upadhyaya, K.P. and Hungund, B.S. (2015). Production and

characterization of thermostable polyhydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PW 3A. J. Biochem Tech. 6, 990-995.

Berger, E., Ramsay, J.A., Ramsay, C. and Chavarie, C. (1989). PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. Biotechnol Technol. 3, 227-232.

Bormann, E.J. and Roth, M. (1999). The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates. Biotechnol Lett. 21, 1059-1063.

Braunegg, G., Lefebvre, G. and Genser, K.F. (1998). Polyalkanoates, biopolyester from renewable resources: Physiological and Engineering Aspects. J. Biotechnol. 65, 127-161.

Burdon, K.L. (1946). Fatty materials in bacteria and fungi revealed by staining dried fixed slide preparation. J. Bacterio. 52, 665-668.

Cavalheiro, J.M.B.T., de Almeida, M.C.M.D., Grandfils, C. and da Fonseca, M.M.R. (2009). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. Process Biochem. 44, 509-515.

Chaijamrus, S. and Udpuay, N. (2008). Production and characterization of polyhydroxybutyrate from molasses and corn steep liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748. Agric Eng Int: CIGR journal. 10, 1-12.

Chen, G.Q. and Page, W.J. (1997). Production of poly-b-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in a two-stage fermentation process. Biotechnol Tech. 11, 347-350.

Chen, G.Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. Chem Soc Rev. 38, 2434-2446.

Chua, A.S.M., Takabatake, H., Satoh, H. and Mino, T. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. Water Res. 37, 3602-3611.

Costa, S.,Lepine, F., Milot, S., Deziel, E., Nitschke, M. and Contiero, J. (2009). Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. J Ind Microbiol Biot. 36, 1063-1072.

Cromwick, A.M., Foglia, T. and Lenz, R.W. (1996). The microbial production of poly(hydroxyalkanoates) from tallow. Appl Microbiol Biot. 46 : 464-469.

Doi, Y. (1990). Microbial polyester. New York: VCH. P. 156.

Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K. (1986). Nuclear magnetic resonance studies on poly(β-hydroxybutyrate) and a copolymer of β-hydroxybutyrate and β-hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16. Macromol. 19, 2860-2864.

Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K. (1987). Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from ^{13}C-lebeled acetate and propionate. Macromol. 20: 2988-2991.

Du, G., Si, Y. and Yu, J. (2001). Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acids on synthesis of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Ralstonia eutropha*. Biotechniol. Lett. 23, 1613-1617.

Fernandez, D., Rodriguez, E., Bassas, M., Vinas, M., Solanas, A.M., Llorens, J., Marques, A.M. and Manresa, A. (2005). Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. Biochem Eng J. 26 : 159-167.

Fukui, T., Yokomizo, S., Kobayashi, G. and Doi, Y. (1999). Co-expression of polyhydroxy-alkanoate synthase and ®-enoyl-CoA hydratase genes of *Aeromonas caviae* establishes copolyester biosynthesis pathway in *Escherichia coli.* FEMS Microbio. Lett. 170, 69-75.

Gironi, F. and Piemonte, V. (2011). Bioplastics and petroleum-based plastics: Strengths and weaknesses. Energy sources, Part A: Recovery, utilization, and environmental effects. 33, 1949-1959.

Grothe, E., Young, M.M. and Chisti, Y. (1999). Fermentation optimization for the production of poly(β-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. Enzyme Microb. Tech. 25, 132-141.

Haba, E., Vidal-Mas, J., Bassas, M., Espuny, M.J., Llorens, J. and Manresa, A. (2007). Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): Effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition. Biochem Eng J. 35, 99-106.

Haywood, A.C. (1958). Poly-β-hydroxybutyrate inclusion in the classification of aerobic gram negative bacteria. Proc. Soc. Gen. Microbioa., 56, 2-3.

Haywood, G.W., Anderson, A.J. and Dawes, E.A. (1989). A survey of the accumulation of

novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. Biotechnol Lett. 11, 471-476.

Huijberts, G.N.M., Eggink, G., De Waard, P., Huisman, G.W. and Witholt, B. (1992). *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. Appl Environ Microb. 58, 536-544.

Holmes, P.A. and Lim, G.B. (1990). Separation process. U.S. Patent 4910145.

Huijberts, G.N.M., Eggink, G., de Waard, P., Huisman, G.W. and Witholt, B. (1992). *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-Hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. Appl Environ Microbiol. 58, 536-544.

Jung, Y.M., Park, J.S. and Lee, Y.H. (2000). Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned phb CAB genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. Enzyme. Microb. Technol. 26, 201-208.

Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K. and Doi, Y. (2004). High yield production of polyhydroxy-alkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. Polym Degrad Stabil. 83, 79-86.

Kasemsap, C. and Wantawin, C. (2007). Batch production of polyhydroxyalkanoate by low polyphosphate content activated sludge at varying pH. Bioresource. Technol. 98, 1020-1027.

Khanna, S. and Srivastava, A.K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxy-alkanoates. Process Biochem. 40, 607-619.

Kim, D.Y., Kim, H.W., Chung, M.G. and Rhee, Y.H. (2007). Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. J. Microbiol. 45, 87-97.

Kumar, M.S., Mudliar, S.N., Reddy, K.M.K. and Chakrabarti, T. (2004). Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant. Bioresource Technol. 95, 327-330.

Lee, S.Y. (1996). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Biotechnol. Bioeng. 49, 1-14.

Lee, S. and Yu, J. (1997). Production of biodegradable thermoplastics from municipal sludge by a two-stage bioprocess. Resour Conserv Recy. 19, 151-164.

Lemos, P.C., Serafim, L.S. and Reis, M.A. (2006). Synthesis of polyhydroxy- alkanoates from

different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. J Biotechnol. 122, 226-238.

Luengo, J.M., Garcia, B., Sandoval, A., Noharro, G. and Olivera, E.R. (2003). Bioplastic from microorganisms. Curr. Opin Microbiol. 6, 256-260.

Liu, H-Y., VanderGheynst, J.S., Darby, J.L., Thompson, D.E., Green, P.G. and Loge, F.J. (2011). Factorial experimental designs for enhancement of concurrent poly(hydroxyalkanoate) production and brewery wastewater treatment. Water Environ Res. 83, 36-43.

Luli, G.W. and Strohl, W.R. (1990). Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. Appl Environ Microbiol. 56, 1004-1011.

Numata, K., Abe, H. and Iwata, T. (2009). Biodegradability of poly (hydroxyalkanoate) materials. Materials. 2, 1104-1126.

Ojumu, T.V., Yu, J. and Solomon, B.O. (2004). Production of polyhydroxy- alkanoates a bacterial biodegradable polymer. Afr. J. Biotechnol. 3, 18-24.

Pandey, A., Ramadas, N.V., Sudheer, K.S. and Carlos, R.S. (2009). Polyhydroxy-butyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. Braz. Arch. Biol. Technol. 52, 17-23.

Page, W.J. (1992). Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. FEMS Microbiol Rev. 103, 149-157.

Page, W.J. and Manchak, J. (1995). The role of β-oxidation of short-chain alkanoates in polyhydroxyalkanoate copolymer synthesis in Azotobacter vinelandii UWD. Can J Microbiol. 41, 106–114.

Pisco, A.R., Bengtsson, S., Werker, A., Reis, M.A.M., Lemos, P.C. (2009). Community structure evolution and enrichment of glycogen-accumulating organisms producing polyhydroxyalkanoates from fermented molasses. Appl Environ Microb. 75, 4676-4686.

Punrattanasin, W. (2001). The utilization of activated sludge polyhydroxy -alkanoates for the production of biodegradable plastics. Ph.D. Dissertation. Virginia Polytechnic Institute and State University. Photocopy.

Ramadas, N.V., Singh, S.K., Soccol, C.R. and Pandey, A. (2009). Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. Braz. Arch. Biol. Technol. 52, 17-23.

Reddy, C.S.K., Ghai, R. and Rashmi, K.V.C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresour. Technol. 87, 137-146.

Rehm, B.H. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. Biochem J. 376, 15–33.

Rohini, D., Phadnis, S. and Rawal, S.K. (2006). Synthesis and characterization of poly-β-hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1. IJBT. 5, 276-283.

Satoh, H., Iwamoto, Y., Mino, T. and Matsuo, T. (1998). Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. Water Sci. Technol. 38, 103-109.

Senior, P.J., Beech, G.A., Ritchie, G.A.F. and Dawes, E.A. (1972). The role of oxygen limitation in the formation of poly-β-hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. Biochem. J. 128, 1193-1201.

Shimizu, H., Tamura, S., Ishihara, Y., Shioya, S. and Suga, K. (1994). Control of molecular weight distribution and mole fraction in poly (D (-)-3-hydroxyalkanoates) (PHA) production by *Alcaligenes eutrophus*. In: *Biodegradable Plastics and Polymers,* Doi, Y. and Fukuda, K. (eds.), Elsevier Science B.V., New York, 365-372.

Shimamura, E., Kasuya, K., Kobayashi, G., Shiotani, T., Shima, Y. and Doi, Y. (1994). Physical properties and biodegradability of microbial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-hexanoate). MACROMOLECULES. 27, 878-880.

Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Foglia, T.A. and Marmer, W.N. (2006). Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). Appl Microbiol Biot. 71 : 783-789.

Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Hotchkiss, Jr. A.T. and Foglia, T.A. (2006a). Biosynthesis of medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) from soy molasses. Biotechnol Lett. 28 : 157-162.

Steinbuchel, A. and Hein, S. (2001). Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganism. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 71, 81-123.

Steinbuchel, A. and Pieper, U. (1992). Production of a copolymer of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of

Alcaligenes eutrophus. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 1-6.

Steinbuchel, A., Hustede, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A. and Valentin, H. (1992). Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. FEMS Microbiol Lett. 103, 217-230.

Steinbuchel, A. and Wiese, S. (1992). A *Pseudomonas* strain accumulating polyesters of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 691-697.

Sudesh, H., Abe, H. and Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxy alkanoates : biological polyesters. Prog. In Polym. Sci. 25, 1503-1555.

Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. and Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants-A review. Biotechnol. Adv. 25, 148-175.

Suzuki, T., Yamane, T. and Shimizu, S. (1986). Mass production of poly-β-hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23, 322-329.

Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K.P., Chen, G.Q. (2001). Production of poly-3-hydroxy butyrate by *Bacillus sp.* JMa5 cultivated in molasses media. Int J Gen Mol Microbiol. 80, 111-118.

Yamane, T. (1996). Yield of poly-D(-)-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. Biotechnol. Bioeng. 41, 165-170.

Yu, J. (2001). Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. J. Biotechnol. 86, 105-112.

RAJABHAT UNIVERSITY