รายงานการวิจัย เรื่อง

การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) จากน้ำมันใช้แล้ว โดยกระบวนหมักด้วยจุลินทรีย์

Production of biodegradable plastic (poly-B-hydroxylbutyrate) from waste cooking oil by biofermention technology

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์

ผู้ร่วมวิจัย ผศ.ดร.อดิศักดิ์ จตุรพิรีย์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนันสนุนจาก ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2561 ของสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร และได้รับการสนับสนุน จาก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

ชื่อโครงการ การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต) จากน้ำมันใช้แล้ว โดยกระบวนหมักด้วยจุลินทรีย์

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

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2561
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีที่เสร็จ พ.ศ. 2561
ประเภทการวิจัย การพัฒนาการทดลอง
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต (PHB) เป็นพอลิเอสเตอร์ที่สะสมไว้ภายในจุลินทรีย์หลากหลายชนิด วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อผลิต PHB จากน้ำมันใช้แล้วโดย *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 เพื่อลดต้นทุนการผลิต PHB น้ำมันที่ผ่านการใช้แล้วจากแหล่งต่างๆ ส่งผลต่อการผลิต PHB โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB คือ ใช้น้ำมันที่ใช้แล้วจากการทอดไก่ 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน การผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร และเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 แบบกะโดยใช้น้ำมันที่ใช้แล้วจากการทอดไก่เป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหาร mineral salt medium (MSM) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 120 รอบต่อนาที จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.89 กรัมต่อลิตร และ PHB content สูงสุดเท่ากับ 17.63% จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างของ PHB ที่ผลิตได้ด้วย FTIR พบว่ามีโครงสร้างคล้ายกับกับ PHB มาตรฐาน

คำสำคัญ : พลาสติกชีวภาพ พอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรต การผลิต น้ำมันใช้แล้ว

Research Title	Production of biodegradable plastic (poly-B-hydroxylbutyrate) from waste cooking oil by biofermention technology
Researcher	1. Assoc. Prof. Dr.Phimchanok Jaturapiree (Project Leader) Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University 2. Asst. Dr.Adisak Jaturapireee (Co-Researcher) Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University
Reaearch Grants	Fiscal Year 2018 Research and Development Institute, Silpakorn University
Year of completion	2018
Type of research	Experimental development
Subjects	Biotechnology

Abstract

Polyhydroxybytyrate (PHB) is reserved polyesters that accumulate as intracellular granules in various microorganisms. The aim of this study is to produce PHB from waste cooking oil by *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 in order to reduce PHB production cost. The waste cooking oil samples of various sources affected the production of PHB. The suitable conditions for the PHB production were 30 g/L of waste fried chicken oil as a carbon source and without ammonium sulfate as nitrogen sources. In a 3-L fermentation, a polyhydroxybutyrate (PHB) was produced from used waste fried chicken oil as the sole carbon source in a batch culture. *R. eutropha* NCIMB 11599 was grown in mineral salt medium (MSM) at 37 °C with a stirring speed of 120 rpm. The cell dry weight concentration of 0.89 g/L was obtained with the maximum PHB content of 17.63%. The structure of the PHB produced by *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 was also confirmed with standard PHB by FTIR.

Key words : Bioplstic, Poly-ß-hydroxybutyrate, Production, Waste cooking oil

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	**ก**
บทคัดย่อ	**ข**
Abstract	**ค**
สารบัญ	**ง**
สารบัญตาราง	**จ**
สารบัญรูปภาพ	**ฉ**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตในการศึกษา	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**3**
2.1 พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate ; PHB)	3
2.2 เชื้อจุลินทรีย์สำหรับผลิต PHB	4
2.3 การผลิต PHB	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการ	**9**
3.1 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของเชื้อ *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599	9
3.2 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์	9
3.3 การเตรียมกล้าเชื้อ	10
3.4 การศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate ; PHB)	10
3.5 การวิเคราะห์	13
3.6 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณ PHB	13
3.7 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมัก	14
3.8 การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ PHB ที่ผลิตได้	14

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลอง **15**

4.1 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของเชื้อ *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 15

4.2 การศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate ; PHB) 18

4.3 การตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ PHB ที่ผลิตได้ 24

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง **28**

เอกสารอ้างอิง **26**

ภาคผนวก **29**

ประวัติผู้วิจัย **36**

การเผยแพร่งานวิจัย **40**

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สรุปผลการศึกษาการผลิต PHB ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ 8
3.1 ชนิด ลักษณะและที่มาของน้ำมันพืชที่นำมาใช้ศึกษาเป็นแหล่งคาร์บอน 11
4.1 สรุปค่าจลนพลศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงแบบกะ 23

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างทั่วไปของ PHB 3
2.2 วิถีการสังเคราะห์ PHB และการย่อยสลายในแบคทีเรีย 4
4.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของ *R. eutropha* NCIMB 11599 ใน Nutrient broth (NB) 15
4.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของ *R. eutropha* NCIMB 11599 ใน Nutrient-rich (NR) 16
4.3 ลักษณะการเจริญเติบโตของ *R. eutropha* NCIMB 11599 ใน Nutrient agar (NA) 17
4.4 ลักษณะโคโลนีของ *R. eutropha* NCIMB 11599 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ กำลังขยาย 100X 17
4.5 ลักษณะการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ในขวดรูปชมพู่ 18
4.6 ผลของชนิดของน้ำมันพืชต่อการเจริญและผลิต PHB ของ *R. eutropha* NCIMB 11599 19
4.7 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันที่ใช้แล้วจากร้านไก่ทอดต่อการเจริญและผลิต PHB ของ *R. eutropha* NCIMB 11599 20
4.8 ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเจริญและผลิต PHB ของ *R. eutropha* NCIMB 11599 21
4.9 ลักษณะการหมักแบบกะ 22
4.10 ผลของการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบกะ 23
4.11 FTIR spectra ของ PHB ที่ผลิตจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วและ PHB ทางการค้า 24

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันความต้องการพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastic) มีเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ เนื่องจากการใช้พลาสติกสังเคราะห์ที่ทวีมากขึ้น แม้พลาสติกสังเคราะห์เป็นวัสดุที่สามารถนำไปใช้งานได้สะดวก และมีราคาไม่แพงนัก แต่พบว่ามีการทิ้งปริมาณในปริมาณทวีคูณ ประกอบกับการย่อยสลายที่ต้องอาศัยระยะเวลาที่ยาวนาน จึงก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหานี้ได้คือการหาวัสดุขึ้นมาใช้ใหม่ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์เหล่านี้

พอบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-β-hydroxybutyrate ; PHB) เป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ชนิดหนึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับเทอร์โมพลาสติก จึงสามารถนำมาทำเป็นฟิล์มห่อของ ไฟเบอร์ และนำมาหลอมเป็นภาชนะต่างๆได้ ซึ่ง PHB นั้นพบอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์หลายชนิด โดยจุลินทรีย์จะผลิต PHB ขึ้นในสภาวะที่ถูกจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส เป็นต้น

แต่อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดอย่างหนึ่งสำหรับการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม คือต้นทุนในการผลิต PHB ยังคงสูงเนื่องมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตนั้นมีราคาสูง ปัจจุบันจึงได้มีการวิจัยและพัฒนาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมพร้อมทั้งมีราคาถูก เพื่อลดต้นทุนในการผลิตและให้ปริมาณ PHB เพิ่มมากขึ้น ดังนี้คณะผู้วิจัยจึงได้สนใจศึกษาการผลิต PHB โดยใช้น้ำมันที่เหลือใช้ชนิดต่างๆ ซึ่งหาได้ง่ายและมีราคาถูก มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสำหรับการผลิต PHB โดยเชื้อ *Ralstonia eutropha* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง ที่มีการนำมาวิจัยค้นคว้าเพื่อใช้ผลิต PHB กันอย่างแพร่หลายโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดต้นทุนการผลิต PHB อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของน้ำมันที่เหลือใช้แล้วได้อีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดยใช้น้ำมันใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ในระดับฟลาสก์เขย่า
2. ขยายขนาดผลิต PHB โดยการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

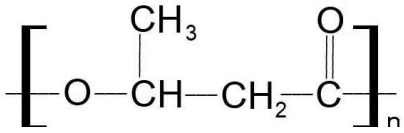
1.3 ขอบเขตในการศึกษา

1. ศึกษาและทดลองโดยเปรียบเทียบการใช้น้ำมันพืชใช้แล้วชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตและการผลิต PHB ในระดับฟลาสก์เขย่า
2. ศึกษาและทดลองโดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำมันพืชชนิดที่เหมาะสมในอาหารเริ่มต้นต่อการผลิต PHB ในระดับฟลาสก์เขย่า
3. ศึกษาและทดลองเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนค่าที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ในระดับฟลาสก์เขย่า
4. จากสภาวะที่เหมาะสมในระดับฟลาสก์เขย่า นำมาขยายขนาดผลิต PHB โดยการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 1 ลิตร

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate; PHB)

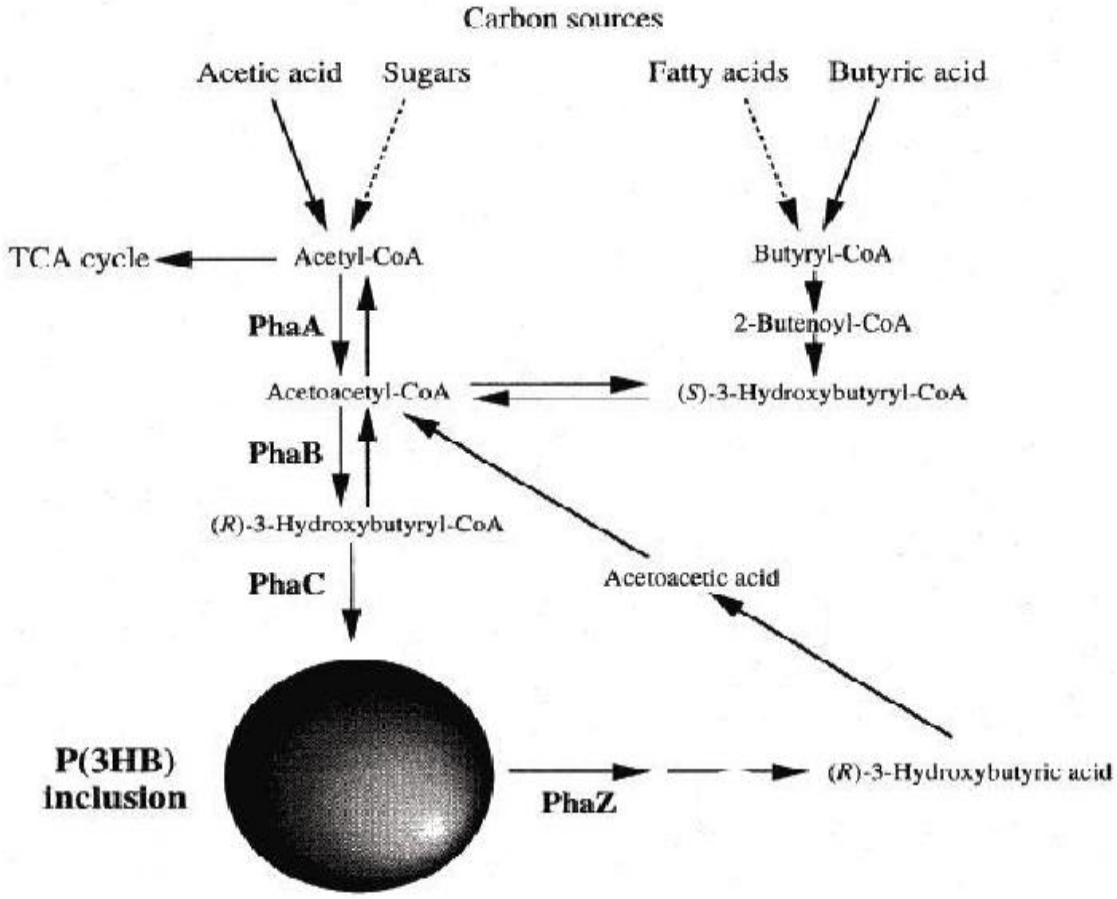
พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate; PHB) เป็นสารประกอบพอลิเอสเทอร์ในกลุ่มของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates; PHAs) เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น มีโครงสร้างทั่วไป ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทั่วไปของ PHB

PHB นั้นได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1926 จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* โดยมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีใกล้เคียงกับพอลิโพรพิลีน (polypropylene; PP) ซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์ ด้วยความที่มีคุณสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติกจึงสามารถนำมาอัด ปั่น ให้เป็นเส้นใยทำเป็นแผ่นฟิล์มได้ แต่มีข้อจำกัดคือเนื่องจากมีราคาสูงกว่าพลาสติกสังเคราะห์จึงยังไม่สามารถนำมาผลิตเป็นระดับอุตสาหกรรมในจำนวนมากได้

PHB สามารถสังเคราะห์ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของแบคทีเรีย วิถีการสังเคราะห์ PHB ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2.2 มีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางที่เข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) โดยเริ่มต้นจากอะซิติลโคเอนไซม์เอ เปลี่ยนเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ และไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ ด้วยการทำงานของเอนไซม์ β-ketothiolase (PhaA) และ acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) ตามลำดับ หลังจากนั้นเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชั่น ไฮดรอกซีบิวทิริล-โคเอนไซม์เอไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB synthase (PhaC) อย่างไรก็ตาม PHB ที่เกิดขึ้นสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลุ่ม PHA depolymerase



ภาพที่ 2.2 วิถีการสังเคราะห์ PHB และการย่อยสลายในแบคทีเรีย
ที่มา : Sudesh และคณะ, 2000

2.2 เชื้อจุลินทรีย์สำหรับผลิต PHB

จากหลายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิต PHB ได้ โดยจุลินทรียร์ที่สามารถนำมาใช้ผลิต PHB แบ่งเป็น 2 กลุ่ม (Lee, 2008) คือ

กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียที่ใช้สารอาหารในปริมาณจำกัด คือไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โปแตสเซียม ออกซิเจน หรือซัลเฟอร์ในการสังเคราะห์ PHB แต่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งอาหาร ได้แก่ *Ralstonia eutropha*, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans* เป็นต้น

กลุ่มที่ 2 จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องจำกัดปริมาณอาหารในการสังเคราะห์ PHB และสามารถเพิ่มปริมาณพอลิเมอร์ในระหว่างการเจริญเติบโต ได้แก่ *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandi* ที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์และรีคอมบิแนนต์เชื้อ *E. coli* ที่ได้รับยีนจาก *Ralstonia eutropha*

Ralstonia eutropha เป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง ที่มีการนำมาวิจัยค้นคว้าเพื่อใช้ผลิต PHB กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจาก *R. eutropha* สามารถสะสม PHB ไว้ในเซลล์ได้มากถึงปริมาณร้อยละ 80 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และสามารถเจริญเติบโตได้ดีในแหล่งคาร์บอนง่ายๆ เช่น กลูโคส เป็นต้น

แม้ว่าการผลิต PHB ในแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันและความเข้มข้นเท่ากัน แต่หากใช้สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็มีผลทำให้ปริมาณของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกัน

2.3 การผลิต PHB

ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้นับว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการผลิต PHB โดยพบว่าจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่แหล่งคาร์บอนต่างกัน มีผลทำให้ปริมาณของพอลิเมอร์ที่ได้ต่างกันด้วย การผลิต PHB จากเชื้อจุลินทรีย์นั้นโดยทั่วไป มักจะใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ฟรุกโตส กลีเซอรอล และอื่นๆ เช่น น้ำมันจากพืช ดังตัวอย่างงานวิจัยต่อไปนี้

Wannan และคณะ (1998) ได้ศึกษาการผลิต PHB จากเชื้อ *Pseudomonas stutzeri* 1317 โดยเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิด คือ กลูโคส และน้ำมันถั่วเหลือง ในการศึกษาการผลิต PHB โดยใช้กลูโคส ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น พบว่าเชื้อ *P. stutzeri* 1317 สามารถผลิต PHB ได้ 52 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.3 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เชื้อ *P. stutzeri* 1317 สามารถผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้นเป็น 63 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.7 กรัมต่อลิตร

Majid และคณะ (1998) ได้ศึกษาการผลิต PHB จากเชื้อ *Erwinia* sp. USMI-20 โดยเปรียบเทียบการผลิต PHB จากน้ำมันปาล์ม 3 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำมันปาล์มดิบ น้ำมันปาล์มโอลีน และน้ำมันปาล์มจากเมล็ดปาล์ม ทำการศึกษาในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตรที่มีปริมาณอาหาร 100 มิลลิลิตร กำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันปาล์มแต่ละชนิดเป็น 3 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นได้เลือกน้ำมันปาล์มโอลีนมาศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์แบบกะ ขนาด 10 ลิตร พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง เชื้อ *Erwinia* sp. USMI-20 สามารถผลิต PHB ได้ 46 wt% และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.6 กรัมต่อลิตร

Kahar และคณะ (2004) ได้ศึกษาการผลิต PHB โดย *Ralstonia eutropha* H16 และสายพันธุ์ PHB-4/pJRDEE32d13 โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน กำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันเป็น 20 กรัมต่อลิตร ทำการหมักเป็นแบบกะ ปริมาตรเริ่มต้น 5 ลิตรในถังปฏิกรณ์ขนาด 10 ลิตร หลังจาก 96 ชั่วโมง พบว่าการผลิต PHB โดยเชื้อสายพันธุ์ H16 ได้ปริมาณ PHB สูงสุด 76%

น้ำหนักเซลล์แห้ง 126 กรัมต่อลิตร และสำหรับการผลิต PHB ของสายพันธุ์ PHB-4/pJRDEE32d13 ได้ปริมาณ PHB สูงสุด 74% น้ำหนักเซลล์แห้ง 138 กรัมต่อลิตร

Bhubalan และคณะ (2007) ได้ใช้น้ำมันปาล์มจากเมล็ด เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต P(3HB-co-3HV-co-4HHx) จาก เชื้อ *Cupriavidus necator* PHB-4/pBBREE32d13 ใช้ Sodium propionate และ Sodium valerate เป็น 3HV-precursors งานวิจัยนี้พบว่า เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ปริมาณ P(3HB-co-3HV-co-4HHx) สูงสุด 79 wt% จากน้ำหนักเซลล์แห้ง 7.9 กรัมต่อลิตร

Urmila และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-4HB) จากเชื้อ *Cupriavidus necator* หรือ *R. eutropha* ATCC17699 โดยน้ำมันปาล์มจากเนื้อปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และมีการเติม 1,4-butanediol เป็น precursor ดำเนินการหมักในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ปริมาตรอาหาร 300 มิลลิลิตร เขย่าด้วยอัตรา 200 รอบต่อนาที ดำเนินการที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าที่เวลา 144 ชั่วโมง พบว่าให้ปริมาณ P(3HB-co-4HB) สูงที่สุด คือ 81 wt% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยผลผลิตที่ได้จะอยู่ในช่วงระหว่าง 70 – 81 wt% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Ng และคณะ (2010) ได้ศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์ของ PHB โดยใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน งานวิจัยนี้ได้ใช้เชื้อ *Cupriavidus necator* H16 ในการเพาะเลี้ยง ดำเนินการหมักแบบกึ่งกะ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าอัตรา 200 รอบต่อนาที พบว่ามีการสะสมของ PHB 87 wt% จากน้ำหนักเซลล์แห้ง 13.1 กรัมต่อลิตร

ปี 2011 Ng และคณะ ได้ใช้น้ำมันสบู่ดำร่วมกับ Sodium valerate เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับ *Cupriavidus necator* H16 พบว่าในกรณีของการใช้เพียงน้ำมันสบู่ดำอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและ PHA นั้นเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันสบู่ดำเพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 12.5 กรัมต่อลิตร และจะลดลงเมื่อเข้มข้นของน้ำมันสบู่ดำสูงกว่า 12.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHA ที่สะสมอยู่ในช่วง 78 – 84 wt% ในกรณีที่ใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับ Sodium valerate พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ Sodium valerate จะให้ปริมาณ PHA ทั้งหมดและน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง แต่ขณะเดียวกันสัดส่วนโมลของค์ประกอบ 3HV จะเพิ่มสูงขึ้น

Cuellar และคณะ (2011) ได้ศึกษาการผลิต PHB โดยใช้น้ำมันคาโนล่า (canola oil) เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตของ *Wautersia eutropha* ทำการหมักแบบ 3 ขั้นตอน โดย

ทุกขั้นตอนจะดำเนินการในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 5 ลิตรต่อนาที ควบคุม pH เท่ากับ 7 การหมักเริ่มต้นจากการเลี้ยงเชื้อแบบกะ เพื่อการปรับตัวของเชื้อจุลินทรีย์ กำหนดอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 14 ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ในขั้นตอนที่สอง จะเป็นการเลี้ยงแบบกึ่งกะ มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ โดยมีการป้อนสารละลายน้ำตาลฟรุกโตส 30 กรัมต่อลิตร และ แอมโมเนียมซัลเฟต 9.54 กรัมต่อลิตร อัตราการป้อน 0.9 ลิตรต่อชั่วโมง และในขั้นตอนที่สาม จะเป็นขั้นตอนการผลิต PHB โดยมีการเติมน้ำมันคาโนล่า ความเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนแทนฟรุกโตส ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดแหล่งไนโตรเจนในอาหาร (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนมากกว่า 120) จากงานวิจัยนี้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิต PHB ได้สูงถึง 92 %

Park และ Kim (2011) ได้ศึกษาการผลิต P(3HB) ในการเลี้ยงแบบกะ และกึ่งกะ และผลิต P(3HB-co-4HB) ในการเลี้ยงแบบกะโดยเชื้อ *Ralstonia eutropha* KCTC 2662 ใช้น้ำมันถั่วเหลือง และ γ-butyrolactone เป็นแหละคาร์บอน กรณีใช้น้ำมันถั่วเหลืองเพียงชนิดเดียวเป็นแหล่งคาร์บอนในการดำเนินการหมักแบบกะ ให้ปริมาณ P(3HB) สูงสุด 83 wt% น้ำหนักเซลล์แห้ง 32 กรัมต่อลิตร และในการดำเนินการหมักแบบกึ่งกะ ให้ปริมาณ P(3HB) สูงสุด 78 wt% น้ำหนักเซลล์แห้ง 32 กรัมต่อลิตร ในกรณีที่ใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการป้อน γ-butyrolactone พบว่าการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-4HB) ให้การสะสม PHA สูงสุด 0.50 กรัมของ PHA ต่อกรัมของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ และพบว่าสัดส่วนโมลของ 4HB สูงสุด 10 mol%

จุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แต่แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน มีผลทำให้ชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ที่ได้ต่างกันด้วย เช่น ในการใช้น้ำมันพืชต่างชนิดกัน ก็ให้ปริมาณ PHB ต่างกันด้วย ดังที่สรุปไว้ในตารางที่ 2.1

นอกจากนี้ ตามรายงานของ Science Daily (2012) ได้รายงานว่า มีการผลิต PHB จากน้ำมันใช้แล้วโดย เชื้อ *Ralstonis eutropha* H16 ซึ่งประสบผลสำเร็จ ได้ปริมาณ PHB เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 2.1 สรุปผลของการศึกษาการผลิต PHAs ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำมันพืชต่างๆ

แบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอน	PHA content	PHAs	References
Cupriavidus necator H16	Jatropha oil	72%	P(3HB)	Ng et al. (2010)
Cupriavidus necator H16	Palm olein	70%	P(3HB)	Lee at al. (2008)
	Crude palm oil	75%		
	Crude palm kernel oil	67%		
	Olive oil	80%		
	Sunflower oil	72%		
	Coconut oil	76%		
	Soybean oil	82%		
Cupriavidus necator H16	Palm kernel oil+Sodium propionate	90%	P(3HB-co-3HV)	Lee at al. (2008)
	Palm kernel oil	75%	P(3HB)	
Ralstonia eutropha PHB-4/pJRDEE32d13	Soybean oil	74%	P(3HB)และ P(3HB-co-3HHx)	Kahar et al. (2003)
Cupriavidus necator PHB-4/pBBREE32d13	Palm kernel oil	79%	P(3HB-co-3HHx)	Bhubalan et al. (2007)
Cupriavidus necator ATCC17699	Spent palm oil	81%	P(3HB-co-4HB)	Urmila et al. (2009)
Ralstonia eutropha KCTC 2662	Soybean oil	83%	P(3HB)	Park และ Kim (2011)
Wautersia eutropha	Canola oil	92%	P(3HB)	Cuellar et al. (2010)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการ

3.1 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของเชื้อ *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 ในอาหาร

3.1.1 ลักษณะในอาหารเหลว Nutrient broth (NB)

เขี่ยเชื้อลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะของเชื้อ

3.1.2 ลักษณะในอาหารเหลว Nutrient-rich medium (NR)

เขี่ยเชื้อลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ NR ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะของเชื้อ

3.1.3 ลักษณะในอาหารแข็ง Nutrient agar (NA)

ใช้ลูป (loop) จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการเขี่ยลงบน NA plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะของเชื้อ

3.2 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

3.2.1 การเก็บรักษาระยะสั้น

เขี่ยเชื้อลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ลูป (loop) จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทำการเขี่ยลงบน NA slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 การเก็บรักษาระยะยาว

เขี่ย Single colony จาก NA slant ลงในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดเชื้อ 450 ไมโครลิตร และ 80% กลีเซอรอล (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน micro centrifuge tube พันด้วยแผ่นพาราฟินที่ฝา นำเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อในหลอดทดลอง

เขี่ยเชื้อจาก NA Slant ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร Nutrient-rich medium (NR) อยู่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อในขวดรูปชมพู่

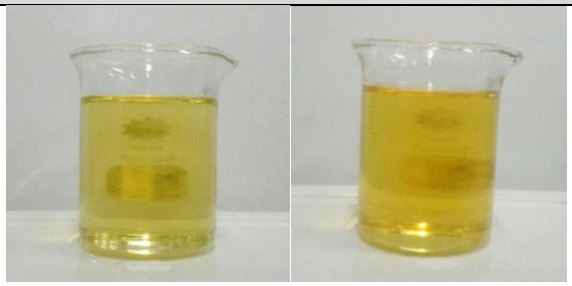
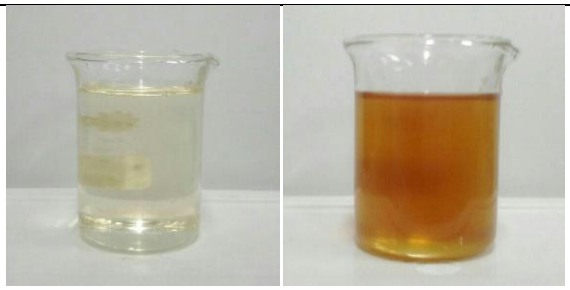
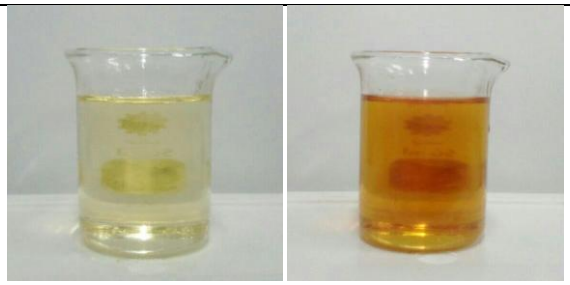
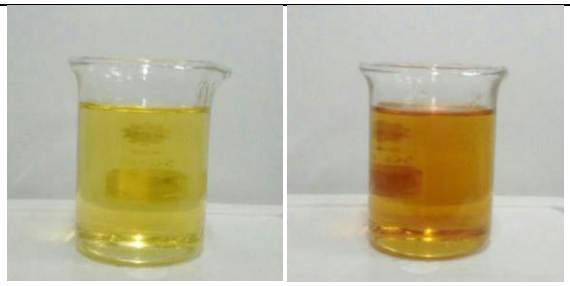
เทเชื้อที่ได้จากการเตรียมกล้าเชื้อในหลอดทดลองลงในขวดชมพู่ที่มีอาหาร Mineral salt medium (MSM) อยู่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 การศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate ; PHB)

3.4.1 ศึกษาผลของชนิดของน้ำมันพืชต่อการเจริญและผลิต PHB ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599

เจือจางกล้าเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3.2 ด้วย MSM ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเป็น 1.5 โดยใช้ MSM เป็น blank หลังจากนั้นถ่ายกล้าเชื้อที่เจือจางแล้ว 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆจำนวน 8 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอน ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.1 และใช้กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบ กำหนดค่าความเข้มข้นของน้ำมันพืชและกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อตอนเริ่มต้นเป็น 20 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าอัตรา 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์หาความหนาแน่นเซลล์, Residual biomass, ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและปริมาณ PHB

ตารางที่ 3.1 ชนิด ลักษณะและที่มาของน้ำมันพืชที่นำมาใช้ศึกษาเป็นแหล่งคาร์บอน

ชนิดของน้ำมันพืช	ลักษณะ	แหล่งที่มา
น้ำมันพืชที่นำมาใช้ทอดลูกชิ้น (น้ำมันจากเนื้อปาล์ม ตรา ลีลา)	 ก่อนใช้ (ซ้าย) หลังใช้ (ขวา)	**ร้านลูกชิ้นลุง** บริเวณตรงข้ามหอพักชยาทิพ ต.สนามจันทร์ อ.เมือง จ.นครปฐม
น้ำมันพืชที่นำมาใช้ทอดไก่ (น้ำมันจากเมล็ดในปาล์ม ตรา บัว)	 ก่อนใช้ (ซ้าย) หลังใช้ (ขวา)	**ร้านไก่ทอดราชาหาดใหญ่** บริเวณหน้าร้านสะดวกซื้อ 7-11 สาขายิงเป้า อ.เมือง จ.นครปฐม
น้ำมันพืชที่นำมาใช้ทอดลูกชิ้น (น้ำมันผสมหลายชนิด)	 ก่อนใช้ (ซ้าย) หลังใช้ (ขวา)	**ร้านขายลูกชิ้นทอด** บริเวณหน้าหอพักเรือนขวัญ ต.สนามจันทร์ อ.เมือง จ.นครปฐม
น้ำมันพืชที่นำมาใช้ทอดไก่ (น้ำมันจากเนื้อปาล์ม ตรา หยก)	 ก่อนใช้ (ซ้าย) หลังใช้ (ขวา)	**ร้านข้าวมันไก่ ป้าจ๋า สาขา 2** อ.เมือง จ.นครปฐม

3.4.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำมันพืชชนิดที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHB ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดจากการศึกษาในข้อ 3.4.1 จะถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเจือจางกล้าเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3.2 ด้วย MSM ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเป็น 1.5 โดยใช้ MSM เป็น blank หลังจากนั้นถ่ายกล้าเชื้อที่เจือจางแล้ว 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กำหนดค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในตอนเริ่มต้นเป็นค่าต่างๆ คือ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าอัตรา 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์หาความหนาแน่นเซลล์, Residual biomass, ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและปริมาณ PHB

3.4.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเจริญและผลิต PHB ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599

เจือจางกล้าเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3.2 ด้วย MSM ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเป็น 1.5 โดยใช้ MSM เป็น blank หลังจากนั้นถ่ายกล้าเชื้อที่เจือจางแล้ว 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กำหนดชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนจากการศึกษาในข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 ตามลำดับ ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งในโตรเจน โดยกำหนดค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตตอนเริ่มต้นเป็น 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าอัตรา 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์หาความหนาแน่นเซลล์, Residual biomass, ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและปริมาณ PHB

3.4.4 ศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์แบบกะ

เจือจางกล้าเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3.2 ด้วย MSM ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเป็น 1.5 โดยใช้ MSM เป็น blank หลังจากนั้นถ่ายกล้าเชื้อที่เจือจางแล้ว 150 มิลลิลิตร (10 % w/w) ลงในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร ที่มี MSM ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร กำหนดให้ชนิดของแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษาไว้ในข้อ 3.4.1, 3.4.2 และ 3.4.3 ตามลำดับ ดำเนินการหมักแบบกะ อัตราเร็วใบพัดกวน 120 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาความหนาแน่นเซลล์, Residual biomass, ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตและปริมาณ PHB

3.5 การวิเคราะห์

3.5.1 การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเซลล์

เก็บตัวอย่างน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออก ละลายตะกอนเซลล์โดยเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรและเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดความหนาแน่นเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วเทียบหาปริมาณเซลล์โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

3.5.2 Residual Biomass

สามารถคำนวณหาปริมาณของ Residual biomass (R) ได้จากผลต่างระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง(X) กับปริมาณ PHB (P)

$$R = X - P$$

3.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตด้วยวิธี Phenol-Hypochlorite (Weatheburn, 1967)

1. นำส่วนใสที่เหลือจากการวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเซลล์มาวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตด้วยวิธี Phenol-Hypochlorite ดังนี้
2. ดูดสารละลาย Reagent A ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง
3. เติมส่วนใส 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. ดูดสารละลาย Reagent B ปริมาตร 2 มิลลิลิตรใส่ หลอดแล้วเขย่าให้เข้ากัน
5. ต้มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร

3.6 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณ PHB

3.6.1 วิธีการสกัด PHB (ปรับปรุงจาก ส่งศรี กุลปรีชา, 1995)

1. นำตัวอย่างน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
2. นำส่วนของตะกอนเซลล์ที่ได้มาล้างโดยการเติมเฮกเซน 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาล้างอีกครั้งด้วยการเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
3. นำตะกอนเซลล์มาเติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน
4. เติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร แล้วนำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็น

5. ดูดสารละลายในชั้นของคลอโรฟอร์มใส่หลอดที่มีขีดบอกปริมาตร จากนั้นระเหยคลอโรฟอร์มจนเหลือปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่ง PHB จะละลายอยู่ในคลอโรฟอร์ม เรียกส่วนนี้ว่า Stock PHB เก็บตัวอย่างส่วนนี้ไว้วิเคราะห์หาปริมาร PHB ต่อไป

3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณ PHB (ส่งศรี กุลปรีชา, 1995)

1. ดูด Stock PHB มา 1 มิลลิลิตร แล้วระเหยคลอโรฟอร์ม จนเหลือตะกอน PHB
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณ PHB โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

3.6.3 การหา PHB content (%)

PHB content คือสัดส่วนของปริมาณ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง สามารถหาได้จากสมการ

$$PHB\ content = \frac{PHB\ (g/L)}{cell\ (g/L)} \times 100$$

3.7 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมัก

การศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งกะโดยนำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ มา Plot graph เทียบกับเวลา โดยมีค่าความหนาแน่นของเซลล์ (X), residual biomass (R), PHB (P), Nitrogen (N) และน้ำมันพืช (S) จากนั้นศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำมันพืชเริ่มต้นที่มีผลต่อค่า μ_{max} และ Q_P เมื่อ

μ_{max}	$[h^{-1}]$	อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด
Q_P	[g/L·h]	อัตราการผลิตเชิงปริมาณของ PHB

3.8 การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ PHB ที่ผลิตได้

ทำการสกัด PHB ออกจากเซลล์และทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ PHB ที่ผลิตได้

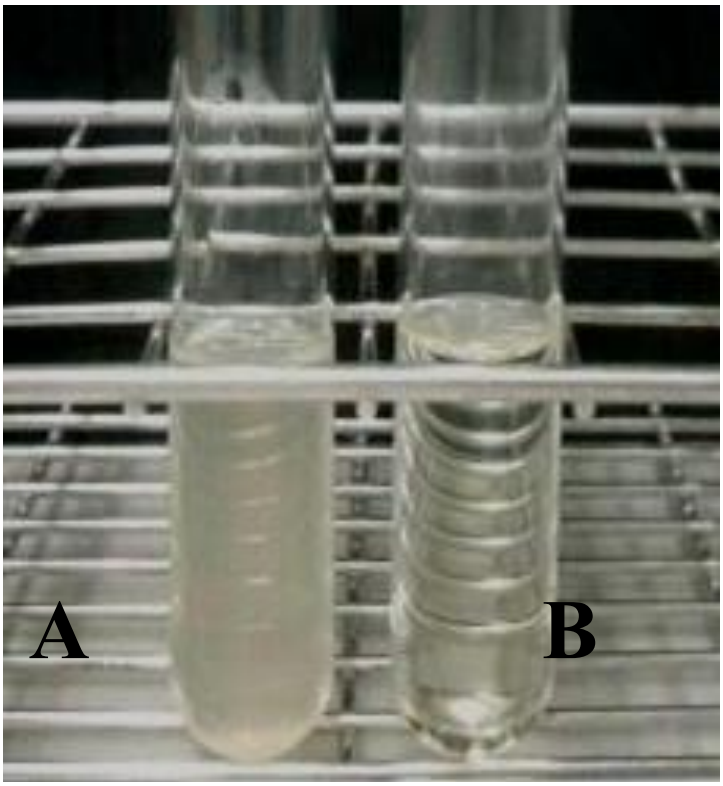
บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของเชื้อ *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 ในอาหาร

โดยสังเกตลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ *R. eutropha* NCIMB 11599 ดังนี้

4.1.1 ลักษณะในอาหารเหลว Nutrient broth (NB)

นำเชื้อจุลินทรีย์ *R. eutropha* NCIMB 11599 เพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไปครบ 24 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโต ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะอาหาร NB ที่มีสีขาวขุ่นขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับจากเดิมที่อาหารมีสีเหลืองอ่อนใส ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของ *R. eutropha* NCIMB 11599 ใน Nutrient broth (NB) เมื่อ A คือ การเจริญของ *R. eutropha* NCIMB 11599 และ B คือ Nutrient broth (NB)

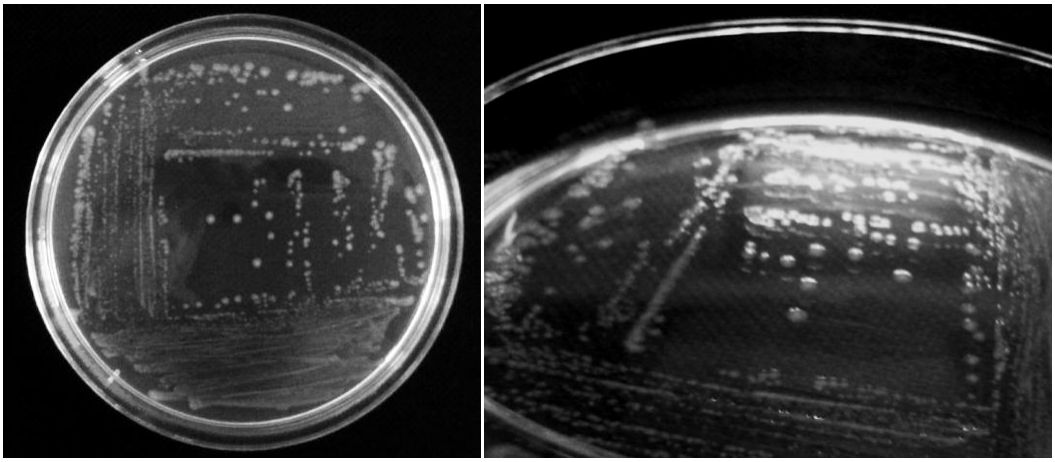
4.1.2 ลักษณะในอาหารเหลว Nutrient-rich broth (NR)

นำเชื้อจุลินทรีย์ *R. eutropha* NCIMB 11599 เพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนในอาหาร NR ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไปครบ 24 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโต ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะอาหาร NR ที่มีสีขาวขุ่นขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับจากเดิมที่อาหารมีสีเหลืองเข้มและใส ดังภาพที่ 4.2

ภาพที่ 4.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของ *R. eutropha* NCIMB 11599 ใน Nutrient-rich broth (NR) เมื่อ A คือ Nutrient-rich broth (NR) และ B คือ การเจริญของ *R. eutropha* NCIMB 11599

4.1.3 ลักษณะในอาหารแข็ง Nutrient agar (NA)

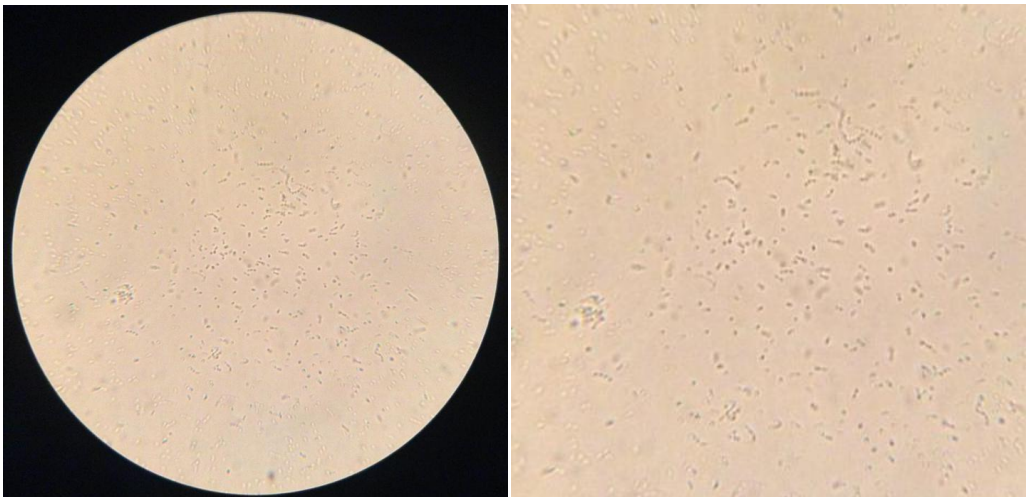
นำเชื้อจุลินทรีย์ *R. eutropha* NCIMB 11599 มา steak ลงบน NA plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โคโลนีมีลักษณะสีเหลืองอ่อนและใส ขอบเรียบ ผิวหน้าโคโลนีมีลักษณะนูนขึ้นเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของ *R. eutropha* NCIMB 11599 บน Nutrient agar (NA)

4.1.4 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เชื้อจุลินทรีย์ *R. eutropha* NCIMB 11599 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์มีลักษณะรูปร่างกลมใส ไม่มีสี



ภาพที่ 4.4 ลักษณะของ *R. eutropha* NCIMB 11599 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X

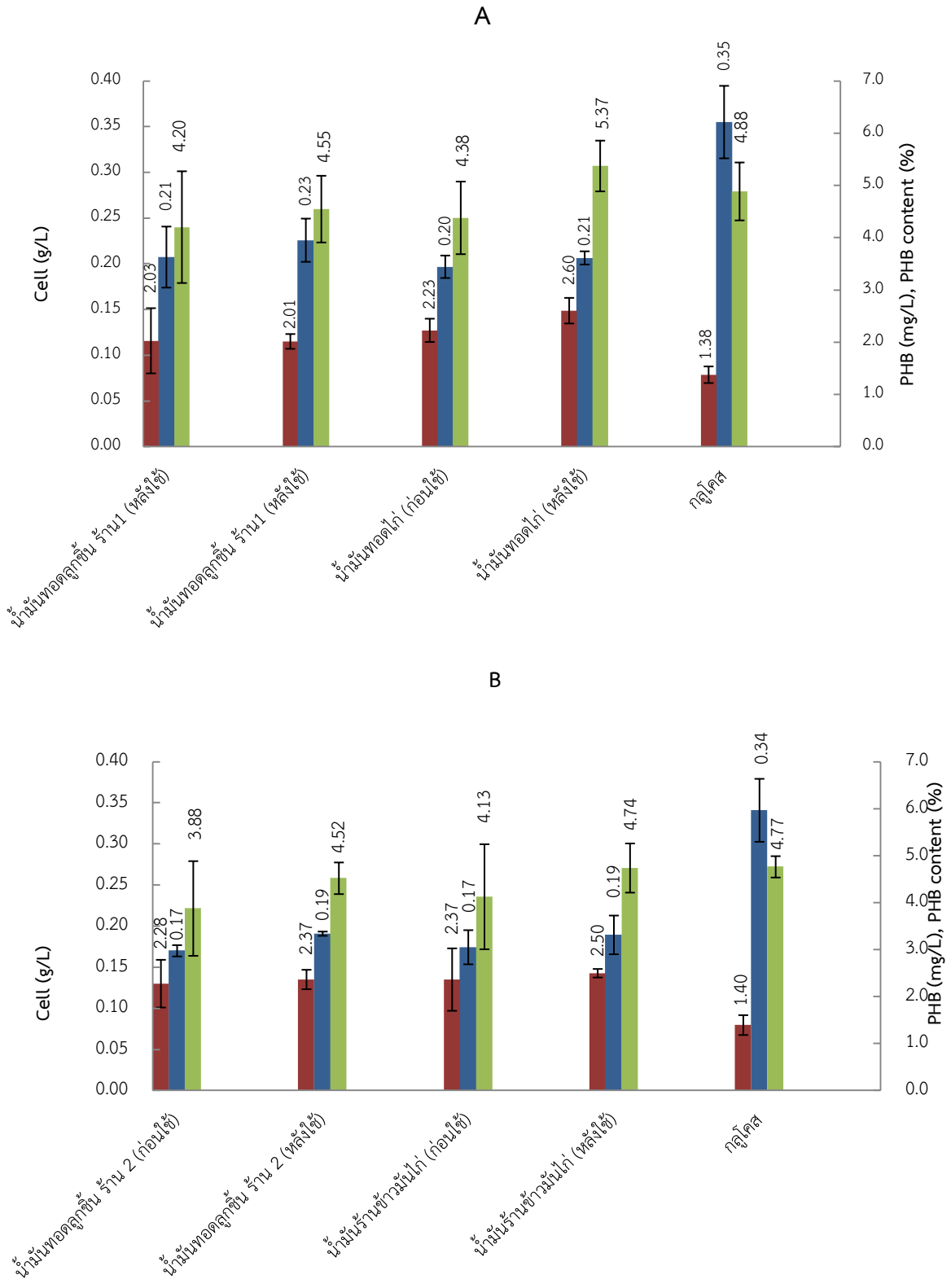
4.2 การศึกษาการผลิตพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate ; PHB)

4.2.1 ศึกษาผลของชนิดของน้ำมันพืชต่อการเจริญและผลิต PHB ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. eutropha* NCIMB 11599 ในขวดรูปชมพู่ (ภาพที่ 4.5) ที่มี MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าอัตรา 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ (ตารางที่ 3.1) เป็นแหล่งคาร์บอน

ภาพที่ 4.5 ลักษณะการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ในขวดรูปชมพู่

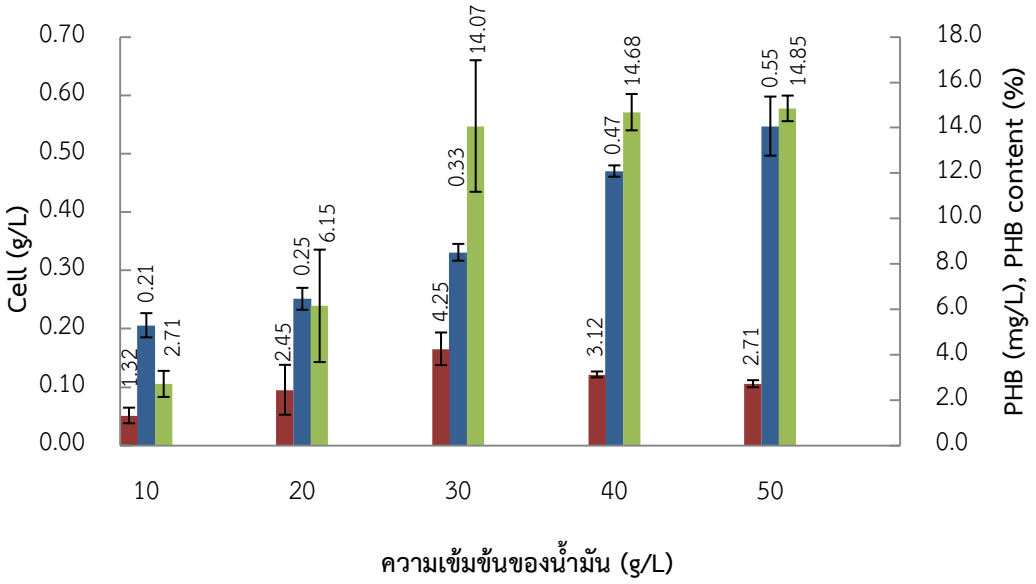
เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำมันพืชกับกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและผลิต PHB ของเชื้อ *R. eutropha* NCIMB 11599 ดังแสดงไว้ในภาพที่ 4.6 พบว่า ในกลูโคสนั้นเซลล์จะเจริญได้ดีกว่าน้ำมันพืช คือ ให้ปริมาณเซลล์ 0.34 - 0.35 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นให้ปริมาณเซลล์ที่น้อยกว่าคืออยู่ในช่วง 0.17 – 0.23 กรัมต่อลิตร แต่ในน้ำมันพืชนั้นพบว่าให้ปริมาณ PHB content ที่สูงกว่ากลูโคส โดยในน้ำมันพืชที่ใช้แล้วจากร้านไก่ทอดนั้นให้ PHB content มากที่สุด คือ 2.60 % หรือปริมาณ PHB 5.37 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าในน้ำมันพืชชนิดอื่นๆ ที่นำมาศึกษาเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจากผลการทดลองจึงได้เลือกน้ำมันพืชที่ใช้แล้วจากร้านไก่ทอดเป็นแหล่งคาร์บอนที่จะนำมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป



ภาพที่ 4.6 ผลของชนิดของน้ำมันพืชต่อการเจริญและผลิต PHB ของเชื้อ *R. eutropha* NCIMB 11599 เมื่อ ■ คือความเข้มข้นของเซลล์ (กรัม/ลิตร), ■ คือความเข้มข้นของ PHB (มิลลิกรัม/ลิตร) และ ■ คือ PHB content (%)

4.2.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำมันพืชชนิดที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHB ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599

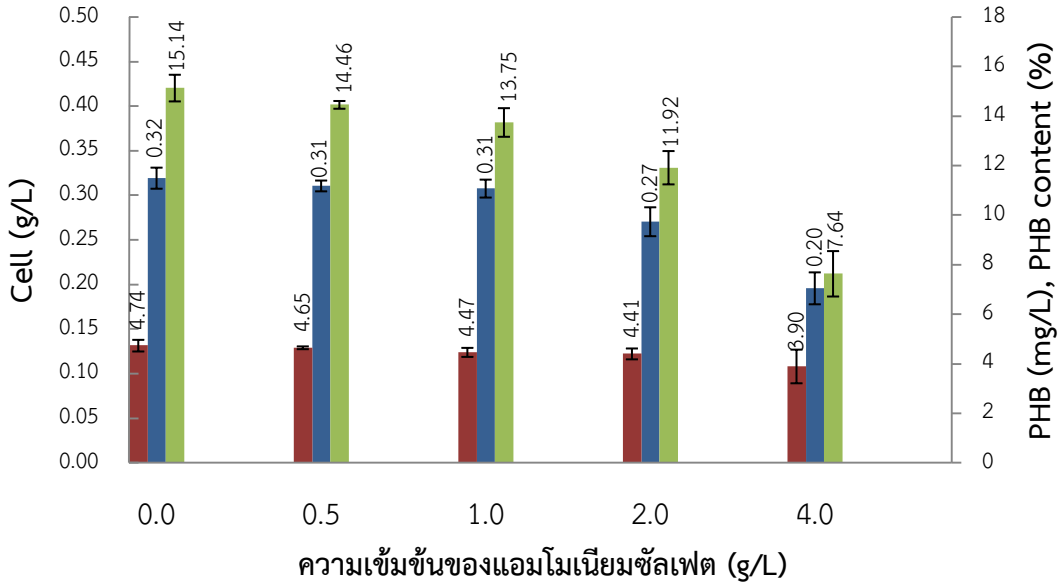
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. eutropha* NCIMB 11599 ในขวดรูปชมพู่ (ภาพที่ 4.5) ที่มี MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าอัตรา 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยใช้น้ำมันพืชจากร้านไก่ทอดเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นต่างกันคือ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองได้แสดงไว้ดังภาพที่ 4.7 พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันพืชนั้นมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *R. eutropha* NCIMB 11599 คือ เมื่อความเข้มข้นของน้ำมันพืชสูงขึ้นจะให้ปริมาณเซลล์ของ *R. eutropha* NCIMB 11599 มากขึ้นตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นของน้ำมันพืช 50 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณเซลล์ 0.054 กรัมต่อลิตร ขณะที่ PHB content จะค่อยๆเพิ่มขึ้นจากความเข้มข้นของน้ำมัน 10 กรัมต่อลิตร และให้ PHB content สูงสุด 4.25 % ที่ความเข้มข้นของน้ำมันพืช 30 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณ PHB 14.07 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้น PHB content จะลดลง ดังนั้นจากผลการทดลองจึงได้เลือกค่าความเข้มข้นของน้ำมันพืชที่ใช้แล้วจากร้านไก่ทอดที่ 30 กรัมต่อลิตรเป็นค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่จะนำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันพืชที่ใช้แล้วจากร้านไก่ทอด ต่อการเจริญและผลิต PHB ของเชื้อ *R. eutropha* NCIMB 11599 เมื่อ ■ คือความเข้มข้นของเซลล์ (กรัม/ลิตร), ■ คือความเข้มข้นของ PHB (มิลลิกรัม/ลิตร) และ ■ คือ PHB content (%)

4.2.3 ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเจริญและผลิต PHB ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. eutropha* NCIMB 11599 ในขวดรูปชมพู่ (ภาพที่ 4.5) ที่มี MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าอัตรา 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ใช้น้ำมันพืชจากร้านไก่ทอดเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร โดยกำหนดความเข้มข้นของแอมเนียมซัลเฟตใน MSM เป็นค่าความเข้มข้นที่ต่างกันคือ 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 กรัมต่อลิตร เนื่องจากไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการสะสม PHB ภายในเซลล์ ผลการทดลองได้แสดงไว้ดังภาพที่ 4.8 จากผลการทดลองนี้ พบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตแปรผกผันกับการเจริญเติบโตของเซลล์ คือ เมื่อความเข้มของแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มขึ้น ปริมาณเซลล์ที่ผลิตได้ก็จะลดลง โดยเซลล์จะเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์ 0.32 กรัมต่อลิตร ขณะที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณเซลล์ 0.31, 0.31, 0.27 และ 0.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0 กรัมต่อลิตร ยังให้ปริมาณ PHB และ PHB content สูงที่สุดคือ 15.14 กรัมต่อลิตร และ 4.74% ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตสูงขึ้น PHB content ที่ได้ก็จะลดลง คือที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เป็น 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 ให้ PHB content เป็น 4.65, 4.47, 4.41 และ 3.90 % ตามลำดับ



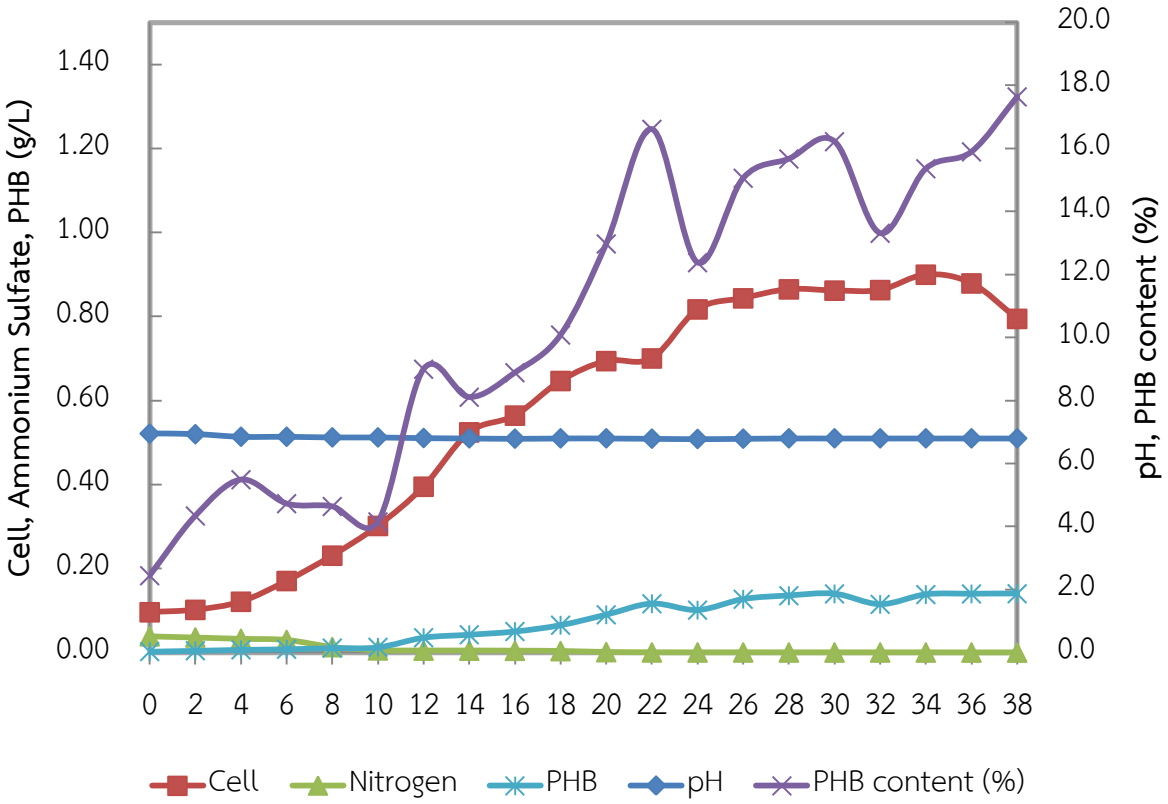
ภาพที่ 4.8 ผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเจริญและผลิต PHB ของเชื้อ *R. eutropha* NCIMB 11599 เมื่อ ■ คือความเข้มข้นของเซลล์ (กรัม/ลิตร), ■ คือความเข้มข้นของ PHB (มิลลิกรัม/ลิตร) และ ■ คือ PHB content (%)

4.2.4 ศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์แบบกะ

ถ่ายกล้าเชื้อจุลินทรีย์ *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่ถูกเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ NR และขยายให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นโดยถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ที่มี MSM ลงในถังปฏิกรณ์ขนาด 3.0 ลิตร ที่มี MSM อยู่ 1.5 ลิตร ดำเนินการหมักแบบกะ (ภาพที่ 4.9) ลักษณะของน้ำหมักจะมีสีเหลืองขุ่น ซึ่งจากเดิมจะมีลักษณะสีเหลืองใส

ภาพที่ 4.9 ลักษณะการหมักแบบกะ

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *R. eutropha* NCIMB 11599 เพื่อผลิต PHB ในถังหมักแบบกะ ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันพืชที่ใช้แล้วจากการทอดไก่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0 กรัมต่อลิตร โดยถ่ายกล้าเชื้อที่ถูกเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ NR และขยายให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นโดยถ่ายลงใน MSM ในขวดรูปชมพู่ และเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 3 ลิตร ที่มีอาหาร MSM อยู่ 1.5 ลิตร ดำเนินการหมักแบบกะ เป็นเวลา 38 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 ผลจากการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบกะ

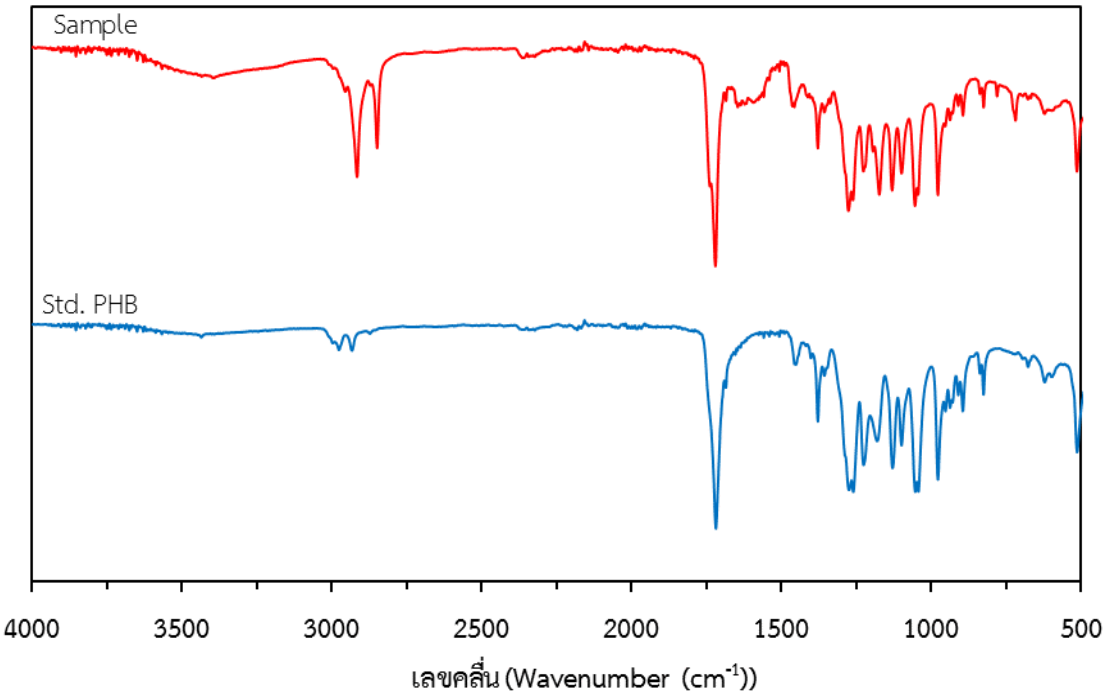
จากภาพที่ 4.10 จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ในถังปฏิกรณ์แบบกะ ปริมาณ PHB สามารถผลิตได้เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป โดยสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงสุด 0.14 กรัมต่อลิตร หรือได้ PHB content สูงสุด 17.63% นับได้ว่ายังได้ปริมาณ PHB ที่น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Dee Hoo Park และ Beom Soo Kim (2011) ที่ได้ศึกษาการผลิต PHB ในการเลี้ยงแบบกะโดยเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน และใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าได้ปริมาณ PHB content สูงสุดถึง 83 % ค่าจลนพลศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงแบบกะ สรุปได้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 สรุปค่าจลนพลศาสตร์ของการเพาะเลี้ยงแบบกะ

Cell (g/L)	PHB (g/L)	%PHB content	μ_{max} (h^{-1})	Q_P (g/L·h)
0.89	0.14	17.63	0.171	0.004

4.3 การตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ PHB ที่ผลิตได้

การทดลองนี้ตรวจสอบ PHB ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *R. eutropha* NCIMB 11599 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันพืชที่ใช้แล้วจากการทอดไก่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0 กรัมต่อลิตร เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีเปรียบเทียบกับ PHB ทางการค้าด้วยเครื่อง FTIR (รูปที่ 4.11) พบว่า FTIR spectra ของ PHB มีพีคเกิดขึ้นบริเวณ 3392 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงกลุ่มของ OH-hydroxyl ของ alcohol ที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเมอร์ PHB และพีคที่ 2973-2974 และ 2930-2931 cm^{-1} เป็นผลมาจาก stretching sp_3 ของ CH_3 และ CH_2 ตามลำดับ นอกจากนี้พีคบริเวณ 1722-1726 cm^{-1} แสดงให้เห็นว่ามี ester carbonyl group อยู่ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของคนอื่น เช่น OH (3200–3500 cm^{-1}) (Wang et al.,2011), OH (3435 cm^{-1}) (Alarfaj ei al., 2015) ในขณะที่ Lopez-Cortes et al. (2010) รายงานว่า OH extension ของ PHB จาก canola oil คือ 3444 cm^{-1} และ 3449 cm^{-1} ตามลำดับ และ 1731 cm^{-1} แสดงถึง C=O (Carbonyl) และCOO (ester) groups (Alarfaj ei al., 2015)



รูปที่ 4.11 FTIR spectra ของ PHB ที่ผลิตจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วและ PHB ทางการค้า

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองศึกษาการใช้น้ำมันพืชที่ใช้แล้วมาเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่เชื้อจุลินทรีย์ *R. eutropha* NCIMB 11599 ในการผลิต PHB พบว่าน้ำมันพืชที่ใช้แล้วสามารถผลิต PHB ได้ โดยน้ำมันพืชที่ใช้แล้วจากร้านไก่ทอดราชาหาดใหญ่นั้นให้ปริมาณ PHB และ PHB content คือ 5.37 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 2.60 % ตามลำดับ ทั้งนี้จากข้อมูลผลการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบน้ำมันพืชจากแหล่งเดียวกันทั้งก่อนใช้และที่ใช้แล้ว พบว่าน้ำมันพืชที่ใช้แล้วมีแนวโน้มที่จะสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณที่สูงกว่าน้ำมันพืชก่อนใช้ อาจเนื่องมาจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วนั้นได้ผ่านการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซึ่งน้ำมันแตกตัวเป็นกรดไขมันอิสระ จุลินทรีย์จึงสามารถนำไปใช้ได้ง่ายยิ่งขึ้น จึงเป็นที่น่าสนใจว่าสามารถนี่จะนำน้ำมันพืชที่ใช้แล้วมาพัฒนาเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิต PHB ให้มีปริมาณมากขึ้นต่อไปได้

เมื่อนำน้ำมันพืชชนิดนี้มาใช้ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิต PHB พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 30 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (แหล่งไนโตรเจน) ที่เหมาะสมคือ 0 กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์แบบกะ พบว่า ให้ปริมาณ PHB content สูงสุด 17.63%

ข้อเสนอแนะ

1. ควรพัฒนาหรือปรับปรุงการผลิตเพื่อเพิ่ม PHB content และควรศึกษาคำนวณความคุ้มทุน
2. ขยายขนาดถังหมักในระดับ 50 ลิตร เพื่อศึกษาการผลิต PHB ในระดับที่ใกล้เคียงกับต้นแบบมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

ส่งศรี กุลปรีชา. “การผลิตโพลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้โดยธรรมชาติจากจุลินทรีย์” รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2538.

Akiyama M., Tsuge T., and Doi Y.. “Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation.” **Polymer Degradation and Stability**, 80 (2003): 183–194.

Alarfaj AA, Arshad M, Sholkamy EN, and Munusamy MA. Extraction and Characterization of Polyhydroxybutyrates (PHB) from *Bacillus thuringiensis* KSADL127 Isolated from Mangrove Environments of Saudi Arabia. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** 58 (2015) : 781-788.

Alias Z., and Tan I.K.P.. “Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique.” **Bioresource Technology**, 96 (2005): 1229–1234.

Bhubalan K., Lee WH., Loo CY.,Yamamoto T., Tsuge T., Doi Y., and Sudesh K.. “Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors.” **Polymer Degradation and Stability**, 93 (2008): 17-23.

Cuellar M.R.L., Flores J.A., Rodríguez J.N.G., and F.P. Guevara.. “Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source.” **International Journal of Biological Macromolecules**, 48 (2011): 74–80.

He W., Tian W., Zhang G., Chen GQ., and Zhang Z.. “Production of novel polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil.” **FEMS Microbiology Letters**, 169 (1998): 45-49.

Jogdand S.N.. “Welcome to the Eco-Friendly Plastic (online).” Availablehttp://www.biotechnosupportindia.com/new (2012, Apirl).

Kahar P., Tsuge T., Taguchi K., and Doi Y.. “High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain.” **Polymer Degradation and Stability**, 83 (2004): 79–86.

Lee WH., Loo CY., Nomura C.T., and Sudesh K.. “Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors.” **Bioresource Technology**, 99 (2008): 6844–6851.

Lopez-Cortes A., Rodríguez-Fernández O., Latisnere-Barragán H., Mejía-Ruíz H.,González-Gutiérrez G., and Lomelí-Ortega C., 2010. Characterization ofpolyhydroxyalkanoate and the phaC gene of Paracoccus seriniphilus E71 strainisolated from a polluted marine microbial mat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26 (2010): 109–118.

Majid M.I.A., Akmal D.H., Few L.L., Agustien A., Toh M.S., Samian M.R., Najimudin N., and Azizan M.N.. “Production of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) by *Erwinia* sp. USMI-20.” **International Journal of Biological Macromolecules**, 25 (1999): 95–104.

Ng KS., Ooi WY., Goh LK., Shenbagarathai R., and Sudesh K.. “Evaluation of jatropha oil to produce poly(3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* H16.” **Polymer Degradation and Stability**, 95 (2010): 1365-1369.

Ng KS., Wong YM., Tsuge T., and Sudesh K.. “Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) copolymers using jatropha oil as the main carbon source.” **Process Biochemistry**, 46 (2011): 1572–1578.

Park, D.H. and Kim B.S.. “ Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha* from soybean oil.” **New Biotechnology** 28, 6 (October 2011): 719-724.

Patwardhan P.R., and Srivastava A.K.. “Model-based fed-batch cultivation of *R. eutropha* for enhanced biopolymer production.” **Biochemical Engineering Journal**, 20 (2004): 21–28.

Rao U., Sridhar R., and Sehgal P.K.. “Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil.” **Biochemical Engineering Journal**, 49 (2010): 13–20.

Sudesh K., Abe H., and Doi Y.. “Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates biological polyesters.” **Progress Polymer Science**,25 (2000): 1503-1555.

Wang Y., Weng Y., and Wang, X., Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. **Polymer Testing,** 30 (2011): 372–380.

Wong YM., Brigham C.J., Rha C., Sinskey A.J., and Sudesh K.. “Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing high 3-hydroxyhexanoate monomer fraction from crude palm kernel oil by recombinant *Cupriavidus necator*.” **Bioresource Technology**, 121 (2012): 320–327.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารเคมี

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารเคมี

1. Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร

2. Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

3. Nutrient-rich medium (NR)

Meat extract	10	กรัมต่อลิตร
Peptone	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	2	กรัมต่อลิตร

4. Mineral salt medium (MSM)

$(NH_4)_2SO_4$	1	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.5	กรัมต่อลิตร
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	9	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
Trace element solution	1	มิลลิลิตรต่อลิตร

โดย Trace element solution ประกอบด้วย

H_3BO_3	0.3	กรัมต่อลิตร
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
$MnSO_4 \cdot 4–5H_2O$	0.03	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.03	กรัมต่อลิตร
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0.02	กรัมต่อลิตร
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร

5. การเตรียม Phenol plus nitroprusside (Reagent A)

ชั่งฟีนอล 5 กรัม และโซเดียมไนโตรพลัสไซด์ (sodium nitroprusside) 25 มิลลิกรัม ต่อสารละลาย 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา หลังจากเตรียมแล้วเก็บไว้ใช้ได้ไม่เกิน 4 เดือน

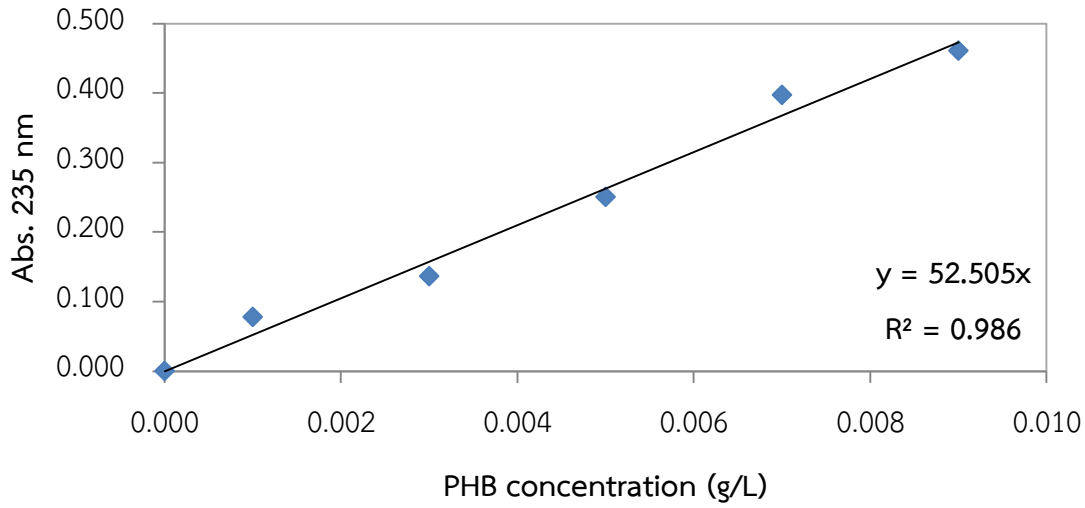
6. การเตรียม Alkaline hypochorite (Reagent B)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.5 กรัม และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) 4.2 มิลลิลิตร ในสารละลาย 500 มิลลิลิตร ไว้ในขวดสีชา หลังจากเตรียมแล้วเก็บไว้ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน

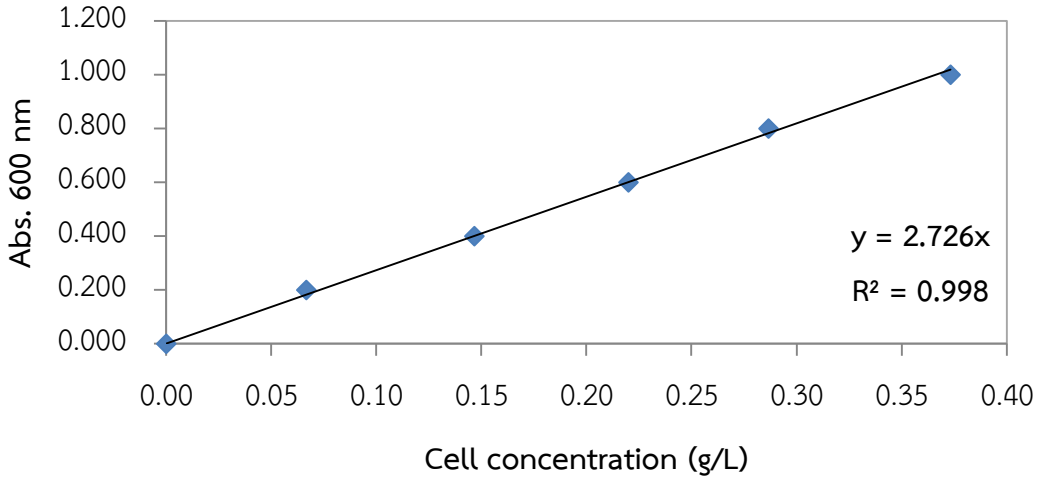
ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐาน

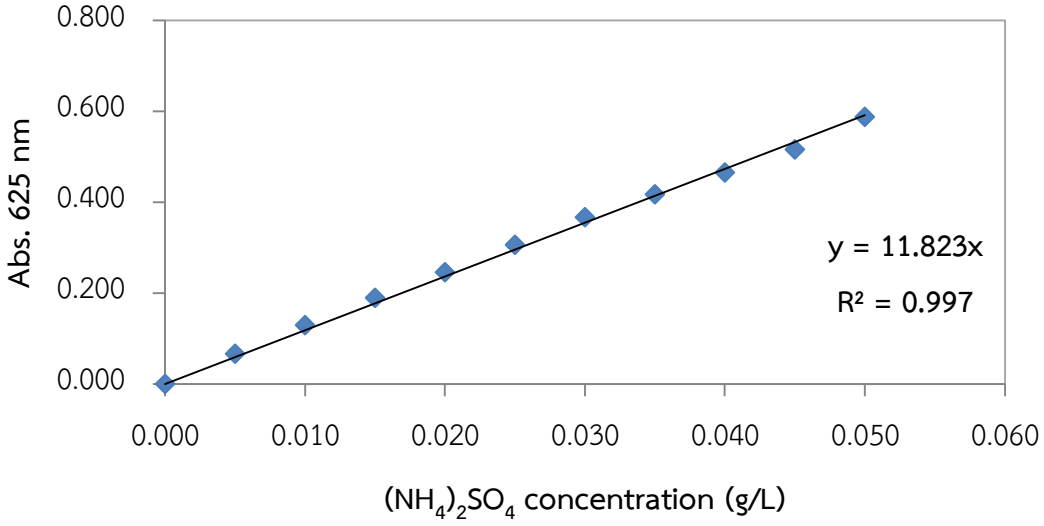
1. กราฟมาตรฐาน PHB (PHB standard curve)



2. กราฟมาตรฐานเซลล์ (Cell standard curve)



3. กราฟมาตรฐานแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate standard curve)



ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย) นางพิมพ์ชนก จตุรพิรีย์
   (ภาษาอังกฤษ) Mrs Phimchanok Jaturapiree
2. วัน เดือน ปีเกิด 2 ตุลาคม 2518
3. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3 7109 00036 31 0
4. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
5. สถานที่ทำงาน

   ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
   มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
   โทรศัพท์ 0-3421-9360, 089-1204518 โทรสาร 0-3421-9360
   e-mail phimchanok@hotmail.com
6. ประวัติการศึกษา

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

   - ระดับปริญญาโท

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

     ชื่อเรื่อง “Development of a process for the hydrolysis of the milk sugar lactose employing novel extremophilic enzymes”
     ปีที่ดำเนินการ 2547-2549
8. ความเชี่ยวชาญ Biochemical Engineering, Fermentation Process , Enzyme Technology

9. ประสบการณ์งานวิจัย

- **Phimchanok Nakkharat** and Dietmar Haltrich, (2006) Purification and characterisation of an intracellular enzyme with beta-glycosidase and beta-galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. Journal of Biotechnology. 123: 304-313.
- **Phimchanok Nakkharat** and Dietmar Haltrich, (2006) Lactose hydrolysis and formation of galactooligosaccharides by a novel immobilized beta-galactosidase from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 129-132: 215-225.
- **Phimchanok Nakkharat**, Montarop Yamabhai, Klaus D. Kulbe and Dietmar Haltrich, (2006) Formation of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis by a novel beta-galactosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. Biotechnology Journal. 1: 633-638.
- **Phimchanok Nakkharat** and Dietmar Haltrich (2007) Beta-Galactosidase from *Talaromyces thermophilus* immobilized on to Eupergit C for production of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis in batch and packed-bed reactor. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23: 759-764.
- **Phimchanok Nakkharat,** Arkom Tesnum, Arkira Maethawarakorn Dietmar Haltrich and Chirakarn Muangnapoh. (2008) Characterization of a Crude Thermostable beta-galactosidase by the Bacterium PD1 Isolated from the Pong Dueat Hot Spring. Kasert Journal (Nat. Sci.) 42: 264-268.
- Somyos Osiriphun and **Phimchanok Jaturapiree**. (2009) Isolation and characterization of beta-galactosidase from the thermophile B1.2. As. J. Food Ag-Ind. 135-143.
- Chantawongvuti, R., J. Veerajetbodithat, **P. Jaturapiree** and C. Muangnapoh (2010) Immobilization of Lactobacillus salivarius ATCC 11741 on Loofa Sponge Coated with Chitosan for Lactic Acid Fermentation. J. Microbiol. Biotechnol. 20(1), 110–116.
- Witsanu Srila, Budsaraporn Ngampanya and **Phimchanok Jaturapiree.** (2011) Cloning of Beta-Galactosidase Gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892 and Expression in *Escherichia coli*. Thai Journal of Agricultural Science. 44 (5): 471-476.
- **Phimchanok Jaturapiree**, Suganya Phuengjayaeam, Porntip Seangsawang, Witsanu Srila and Chirakarn Muangnapoh. (2012) Isolation and Production of Novel Beta-galactosidase

from a Newly Isolated, Moderate Thermophile, *Bacillus* sp. Strain B1.1 Journal of Food Science and Engineering 2: 395-402.

- Sathita Phol-in, Donlaya Kamkalong, Adisak Jaturapiree and **Phimchanok Jaturapiree**. (2012) Poly (3-hydroxybutyrate) production from glycerol by marine microorganisms. KKU Research Journal. 17(4): 573-579.
- ชุติมา วันเพ็ญ, บุษราภรณ์ งามปัญญา, สุวัฒนา พฤกษะศรี, พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์ และ ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ. (2556) ผลของการพรีทรีตเม้นต์ด้วยอัลตร้าซาวด์ต่อการสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน. วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. 36(2): 249-258.
- Ratthadaporn Phathipchotikun, Phakphimol Piwpan, Adisak Jaturapiree and **Phimchanok Jaturapiree**. (2014) Polyhydroxybutyrate(PHB) production by *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 from low-cost substrate as carbon source. KKU Research Journal. 19 (Supplement Issue): 53-59.
- Hemmaratchirakul, J., **Jaturapiree, P.**, Prueksasri, S. and Wichienchot, S. (2015). "Production of galactooligosaccharide by β-galactosidase from *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* BFP32." *International Food Research Journal.* 22(6): 2550-2557.
- Kaenpanao, P., Piwpan, P. and **Jaturapiree, P.** (2016). "Prebiotic Fructooligosaccharide Production from Yeast Strain ML1." *International Food Research Journal.* 23(1): 425-428.
- Piyarat Nuwan, Phakphimol Piwpan, Adisak Jaturapiree and **Phimchanok Jaturapiree.** (2016). Production of dextran by Leuconostoc mesenteroides TISTR 053 in fed batch fermentation. KKU Res.j.. 22(1): 366-375.
- Phakphimol Piwpan, Adisak Jaturapiree and **Phimchanok Jaturapiree**. (2016). Isolation and production of polyhydroxybutyrate (PHB) from isolated strain Bacillus sp. using crude glycerol as a carbon source. KKU Res.j.. 22(1): 376-384.
- Ngampanya, B., Keayarsa, S., **Jaturapiree, P**., Prakobpran, P. and Wichienchot, S. (2016). Characterization of transfructosylating activity enzyme from tubers of tropical Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for production of fructooligosaccharides. International Food Research Journal 23(5): 1965-1972.
- Wichienchot, S., Hemmaratchirakul, J., **Jaturapiree, P.** and Pruksasri, S. (2016). Evaluating prebiotic property of galactooligosaccharide produced by *Lactobacillus pentosus* var. *plantarum* BFP32 in fecal batch culture. International Food Research Journal 23(5): 2241-2248.

- Wichienchot, S., Prakobpran, P., Ngampanya, B. and **Jaturapiree, P.** (2017). Production, purification and fecal fermentation of fructooligosaccharide by FTase from Jerusalem artichoke. International Food Research Journal 24(1): 134-141.

การเผยแพร่งานวิจัย

Punnasit Chaem, Phakphimol Piwpan, Adisak Jaturapiree and **Phimchanok Jaturapiree**. PRODUCTION OF POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) FROM USED VEGETABLE OIL BY *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599. The 41st Congress on Science and Technology of Thailand (STT41) *"Gateway to ASEAN with Science and Technology"* November 6 - 8, 2015. Venue: Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand. (Oral presentation).