

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs โดยใช้ของเสียจากการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชใช้แล้ว

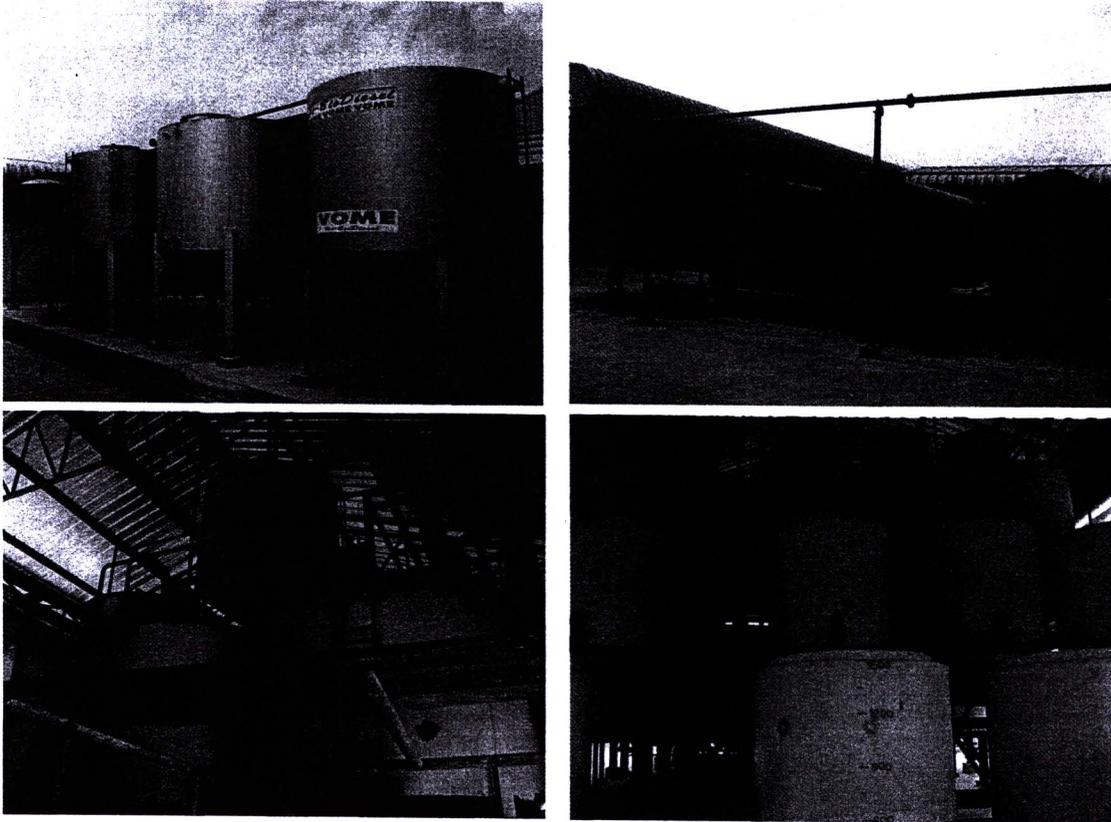
เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่ปนเปื้อนน้ำมันพืชที่ใช้แล้วจากอำเภอศรีประจันต์ จังหวัดสุพรรณบุรี และของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลซึ่งผลิตมาจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วจากบริษัท วิทย์คูปรี จำกัด มหาชน อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร ปัจจุบันโรงงานได้บำบัดของเสียอินทรีย์นี้โดยการกลั่นเพื่อให้เป็นกลีเซอรอลใส แล้วนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตสบู่ แสดงองค์ประกอบของกลีเซอรอลใสในตารางที่ 4.1 แสดงสถานที่การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลในรูปที่ 4.1 โดยของเสียอินทรีย์มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้มแสดงในรูปที่ 4.2 มาคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs โดยใช้อาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิต PHAs (Chanprateep และคณะ, 2008) ที่มีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนและเติม Nystatin ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ผลการทดลองพบจุลินทรีย์ทั้งหมด 20 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารนี้

นำจุลินทรีย์ทั้ง 20 สายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถในการผลิต PHAs เบื้องต้นโดยนำไปย้อมสีแกรม พบว่ามีแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่มองเห็นแกรนูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ไปย้อมด้วย Sudan Black B และ Nile Blue A ตามวิธีของ Jenkins และคณะ (1993) และ Song และคณะ (2008) ตามลำดับ เมื่อนำไปย้อมด้วย Sudan Black B จะแสดงเป็นจุดสีดำภายในเซลล์ และเมื่อนำไปย้อมด้วย Nile Blue A จะแสดงเป็นจุดสีส้มสะท้อนแสงภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ แสดงในรูปที่ 4.3 โดยให้แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์นั้นชื่อว่า ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4

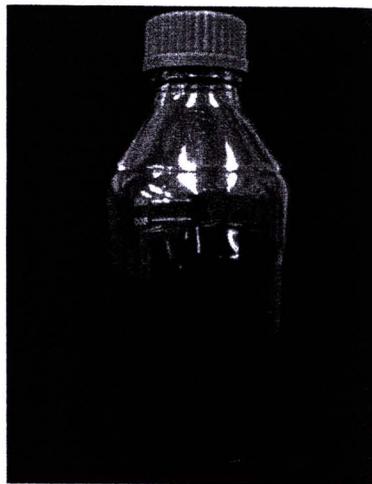
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของกลีเซอรอลใส

การวิเคราะห์	หน่วย	รายละเอียด	วิธีวิเคราะห์
1. ลักษณะปรากฏ	ใสไม่มีสี	ใสไม่มีสี	-
2. กลิ่น	-	Odourless	BS 5711: Part 9
3. ปริมาณกลีเซอรอล	%wt	99.5 %Min	A.O.C.S Ea 7-50
4. Specific Gravity	-	1.2606 Min	A.O.C.S Ea 7-50
5. สี (APHA)	-	10 Max	Lovibond
6. โลหะหนัก	ppm	5 Max	BS 5711: Part 15
7. ปริมาณน้ำ	%wt	0.5% Max	Karl Fisher
8. สารที่ก่อให้เกิดไฟ	%wt	0.01 Max	USP-30
9. สารหนู	ppm	1.5 Max	BS 5711: Part 10
10. ไดเอทิลีนไกลคอล (DEG)	%wt	0.1% Max	USP-30
11. ซัลเฟต	%wt	0.002% Max	USP-30
12. ปริมาณเหล็ก	ppm	10 Max	USP-31

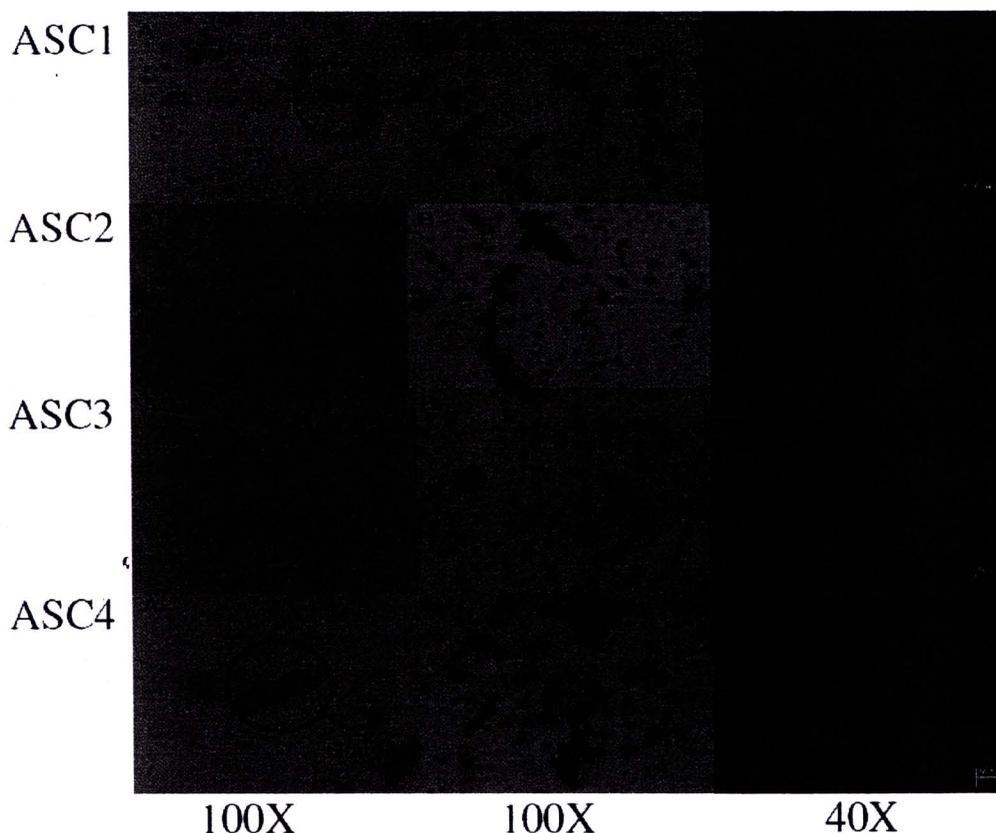
ที่มา: บริษัท วิทย์คอร์ป จำกัด มหาชน



รูปที่ 4.1 โรงงานการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วของบริษัทวิทย์คอร์ป จำกัด มหาชน



รูปที่ 4.2 ของเสียนทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตมาจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วของบริษัทวิทย์คอร์ป จำกัด มหาชน



รูปที่ 4.3 การสะสม PHAs ในแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยรูป (A) ย้อมแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (B) ย้อมด้วย Sudan Black B กำลังขยาย 100 เท่า (C) ย้อมด้วย Nile Blue A กำลังขยาย 40 เท่า

4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (Chanprateep และคณะ, 2008) พบว่าโคโลนีของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4 มีลักษณะดังแสดงในตารางที่

4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะของโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4

สายพันธุ์	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ASC1	มีลักษณะกลม ขนาดเล็ก สีขาวครีม ขอบเรียบ	เซลล์มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมลบ
ASC2	มีลักษณะกลม สีส้มอ่อน ขอบเรียบ	เซลล์มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมลบ
ASC3	มีลักษณะกลม ขนาดใหญ่ สีขาวครีม ขอบเรียบ	เซลล์มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมลบ
ASC4	มีขนาดใหญ่ แข็งย่น สีขาวครีม	เซลล์มีรูปร่างแท่งสั้น ติดสีแกรมบวก

4.2.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น (Physiological characteristic and Biochemical test)

เมื่อศึกษาลักษณะทางชีวเคมี เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่เรียโดยทดสอบเลี้ยงบนอาหารแข็ง MacConkey พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC3 ชนิดเดียวที่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโทสในอาหารได้ จึงมีโคโลนีสีชมพู และมีลักษณะเป็นเมือกเยิ้ม

พบว่าจากการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4 อ้างอิงตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology โดยพิจารณาจากการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3 ในเบื้องต้นคาดว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4 จัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter* sp. *Pseudomonas* sp. *Enterobacter* sp. และ *Bacillus* sp. ตามลำดับ



ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4

การทดสอบ	ASC1	ASC2	ASC3	ASC4
Motility	+	+	+	+
Oxidase	-	+	-	+
Catalase	+	+	+	+
Indole production	-	-	-	-
Methyl red	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	-	+	-
Citrate (Simmons)	+	+	+	+
TSI reaction	A/A	K/K	A/A	K/A
H ₂ S production (TSI)	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	+
Lysine deaminase	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+
Urease	-	-	+	+
Nitrate	+	+	+	-

หมายเหตุ: (+) สามารถใช้ได้ เจริญได้ หรือ เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ

(-) ไม่สามารถใช้ได้ ไม่เจริญ หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ

A/A สร้างกรดและก๊าซ

K/A สร้างเบสและก๊าซ

K/K ไม่หมักน้ำตาล

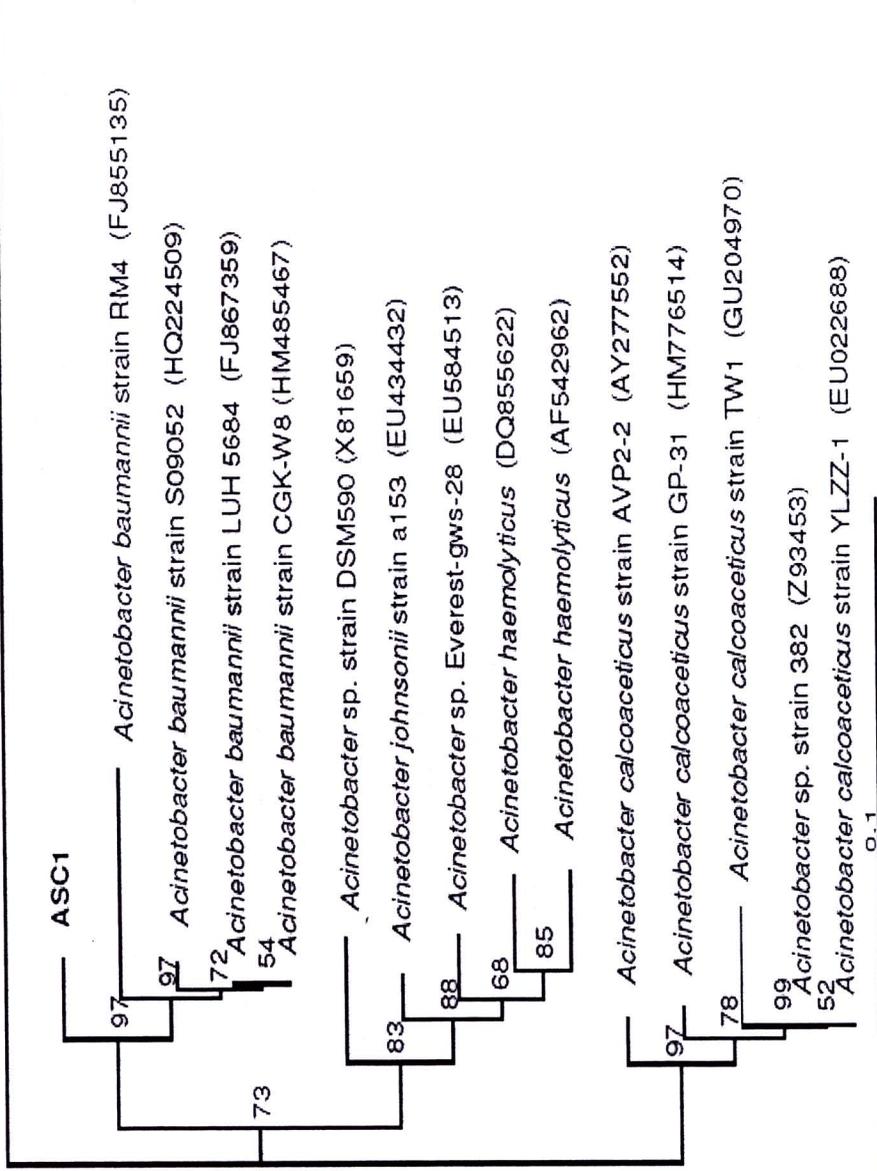
4.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA (16S rRNA)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ตามวิธีในข้อ 3.6.3 ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4 มีความยาว 1,536 1,465 1,453 และ 1,503 bp ตามลำดับ (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์แสดงในภาคผนวก ง) เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล

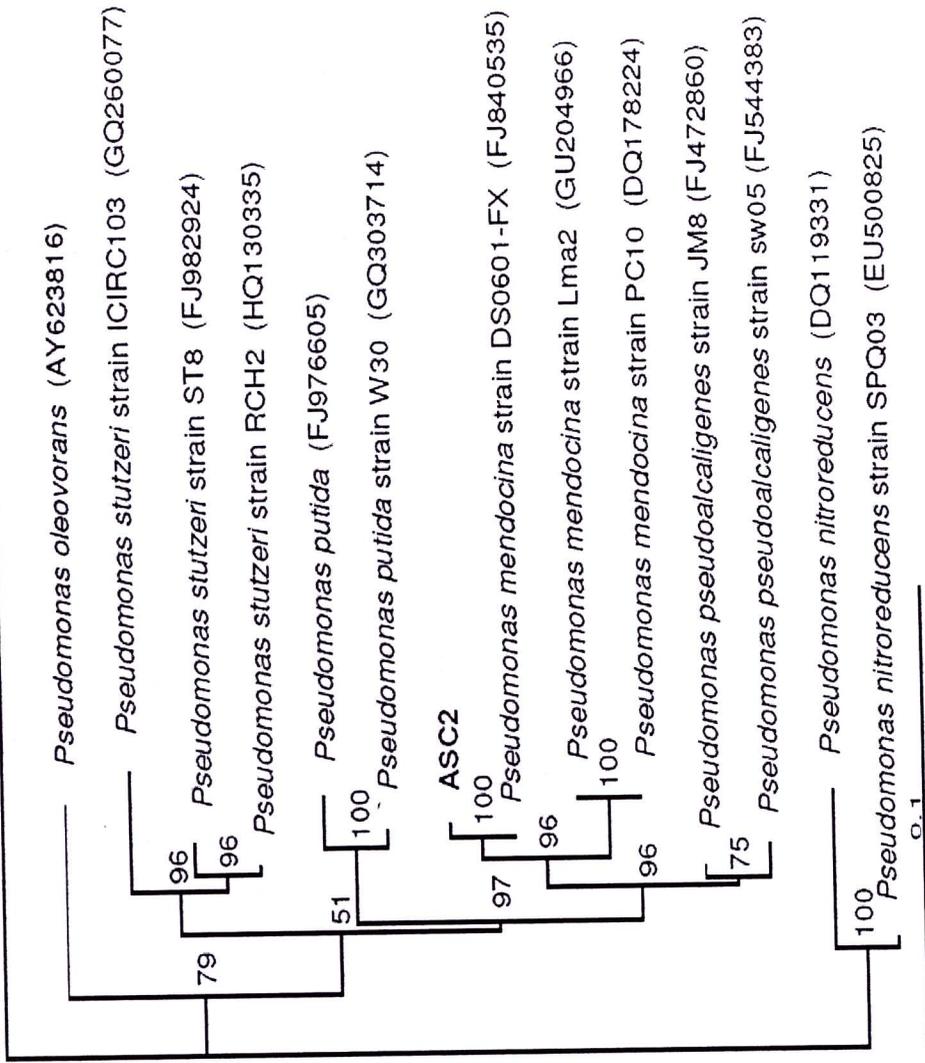
GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์ RM4 94.89 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียสายพันธุ์ ASC2 คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Pseudomonas mendocina* สายพันธุ์ DS0601-FX 99.18 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียสายพันธุ์ ASC3 คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Enterobacter* sp. สายพันธุ์ BSRA2 99.24 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC4 คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ IAM 12118T 98.40 เปอร์เซ็นต์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ไปเสนอใน Genbank เพื่อให้ได้ accession number จึงให้แบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4 ชื่อว่า *Acinetobacter* sp. ASC1 (GU227612) *Pseudomonas* sp. ASC2 (GU227613) *Enterobacter* sp. ASC3 (GU227614) และ *Bacillus* sp. ASC4 (GU227615) ตามลำดับ

4.2.4 ต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 และลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn) มาทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X และนำข้อมูลที่ผ่านการปรับแนวมาสร้างต้นไม้วิวัฒนาการด้วยโปรแกรม PHYLIP software package พบว่า *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 มีความใกล้เคียงกับ *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์ RM4 *Pseudomonas mendocina* สายพันธุ์ DS0601-FX *Enterobacter* sp. สายพันธุ์ BSRA2 และ *Bacillus subtilis* ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ถึงรูปที่ 4.7

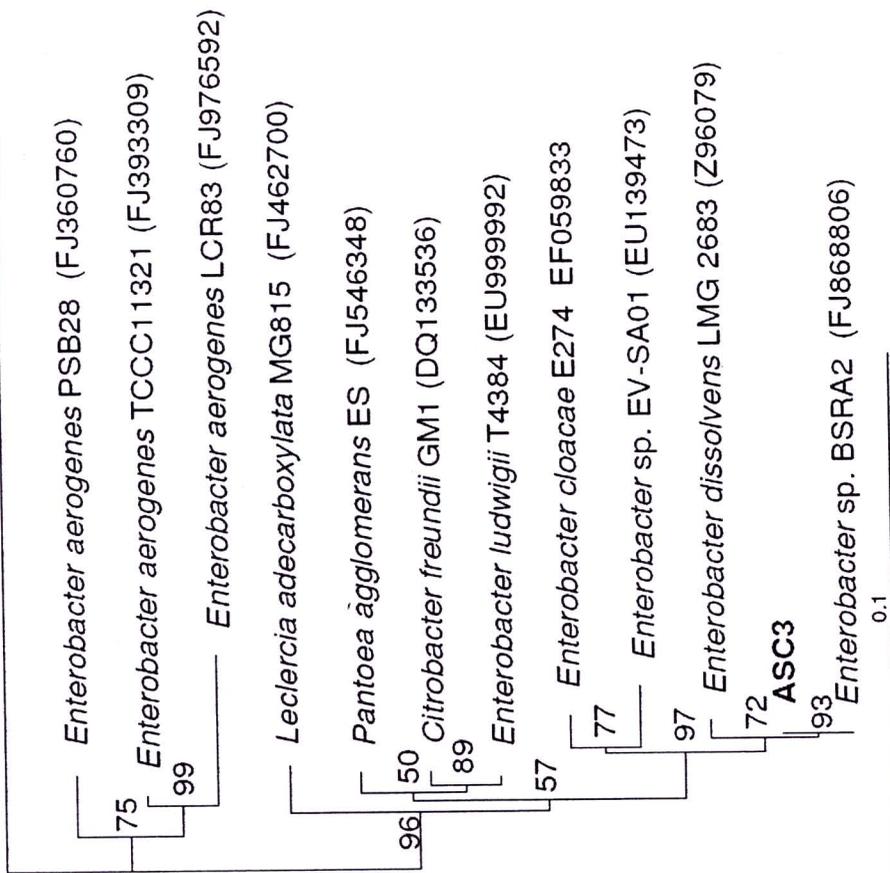


รูปที่ 4.4 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rRNA ของ *Acinetobacter* sp. ASC1 (GU227612) โดยให้ 16S rRNA ของ *Pseudomonas oleovorans* (AY623816) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงค่าที่เด้งซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap

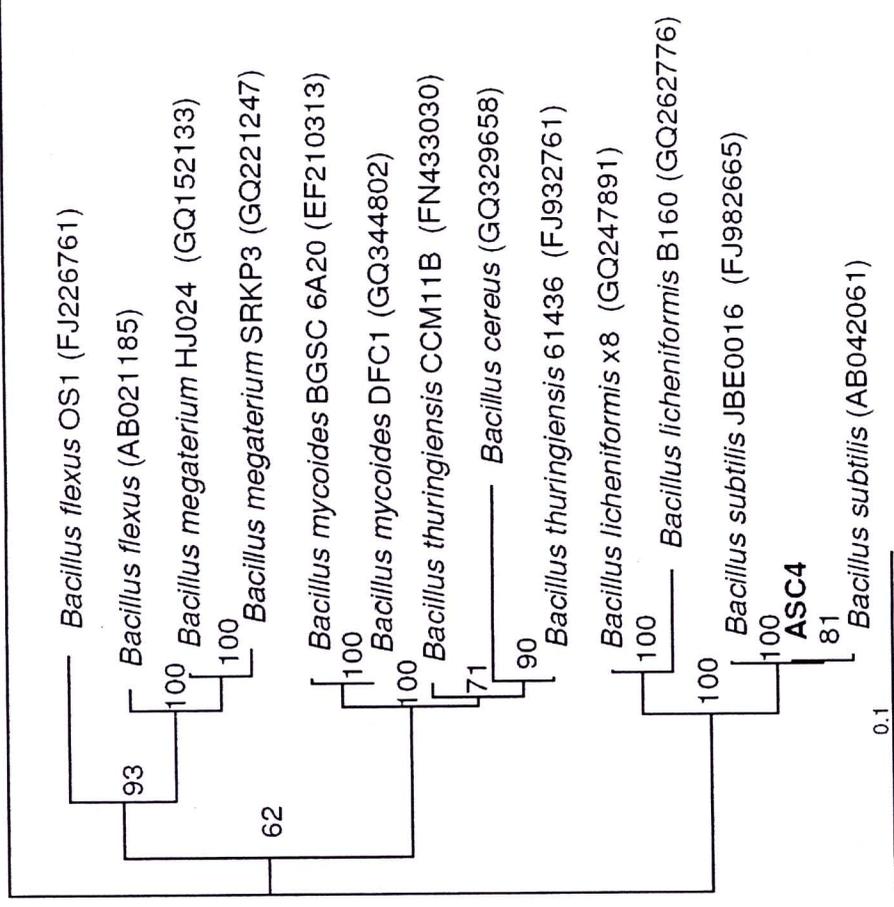


รูปที่ 4.5 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rRNA ของ *Pseudomonas* sp. ASC2 (GU227613) โดยใช้ 16S rRNA ของ *Cupriavidus necator* A-04 (EF988626) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงค่าการนับที่ใส่ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap

Pseudomonas oleovorans (AY623816)



รูปที่ 4.6 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rRNA ของ *Enterobacter* sp. ASC3 (GU227614) โดยใช้ 16S rRNA ของ *Pseudomonas oleovorans* (AY623816) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap



รูปที่ 4.7 ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. ASC4 (GU227615) โดยใช้ 16S rRNA ของ *Cupriavidus necator* A-04 (EF988626) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงค่าความน่าเชื่อถือ 100 ครั้ง ด้วย bootstrap

4.3 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากของเสียที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลในระดับขวดเขย่า

ศึกษาหาปริมาณของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHAs ของแบคทีเรียในระดับขวดเขย่าตามวิธีของ Chanprateep และคณะ (2008)

Acinetobacter sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 สามารถเจริญและผลิต PHAs ได้ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณคาร์บอนทั้งหมดในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลวิเคราะห์โดยเครื่อง TOC analyzer ตามข้อ 3.7.2 มีปริมาณคาร์บอนทั้งหมด 300.88 กรัมต่อลิตร

ศึกษาหาปริมาณของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHA ของแบคทีเรียในระดับขวดเขย่าตามข้อ 3.7.3.1 โดยแปรผันปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่เติมลงในอาหารเพื่อการผลิตดังนี้ 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนดังนี้ 4 20 80 และ 200 เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณของคาร์บอนในของเสียอินทรีย์ที่เหลืออยู่ด้วยเครื่อง TOC analyzer และปริมาณ PHA ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟีต่อไป

4.3.1 วิเคราะห์การเจริญเติบโตของ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 จากน้ำหนักเซลล์แห้ง

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตโดยมีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมงเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเลี้ยงในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 มีแนวโน้มการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่นๆ โดยดูจากปริมาณน้ำหนักชีวมวลสุทธิสูงสุดในแต่ละภาวะการทดลองแสดงในตารางที่ 4.4 น้ำหนักชีวมวลสุทธิในหน่วยกรัมต่อลิตรคำนวณได้โดยนำปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตรลบด้วยปริมาณ PHAs หน่วยกรัมต่อลิตร พบว่าในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อ

ลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 *Acinetobacter* sp. ASC1 มีการเจริญเติบโตดีที่สุดโดยมีน้ำหนักชีวมวลสุทธิเท่ากับ 23.57 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 12 จากการศึกษาคาดว่าปริมาณคาร์บอนและปริมาณไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่าในอาหารเพื่อการผลิตเมื่อมีไนโตรเจนในปริมาณที่มากขึ้นแบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อปริมาณของเสียอินทรีย์เพิ่มมากขึ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลับลดลงสาเหตุเนื่องมาจากในของเสียอินทรีย์มีปริมาณสารพิษจำนวนมากซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ตารางที่ 4.4 น้ำหนักชีวมวลสุทธิสูงสุดของ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เป็น 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 20 80 และ 200 ตามลำดับ

สภาวะ	น้ำหนักชีวมวลสุทธิสูงสุด (กรัมต่อลิตร)				
	ASC1	ASC2	ASC3	ASC4	
คาร์บอน 5 กรัมต่อลิตร C/N 200	10.79 (24 h)	10.24 (72 h)	10.84 (48 h)	8.68 (72 h)	
คาร์บอน 10 กรัมต่อลิตร	C/N 4	23.57 (12 h)	22.46 (12 h)	22.54 (24 h)	17.27 (24 h)
	C/N 20	13.69 (36 h)	12.15 (36 h)	15.10 (24 h)	10.77 (48 h)
	C/N 80	20.93 (60 h)	19.72 (36 h)	16.96 (60 h)	16.50 (72 h)
	C/N 200	8.51 (24 h)	10.78 (84 h)	9.80 (24 h)	17.80 (48 h)
คาร์บอน 20 กรัมต่อลิตร C/N 200	27.29 (24 h)	24.24 (12 h)	27.25 (24 h)	21.73 (36 h)	

4.3.2 วิเคราะห์ปริมาณ PHAs ของ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 ที่ผลิตได้โดยก๊าซโครมาโตกราฟี

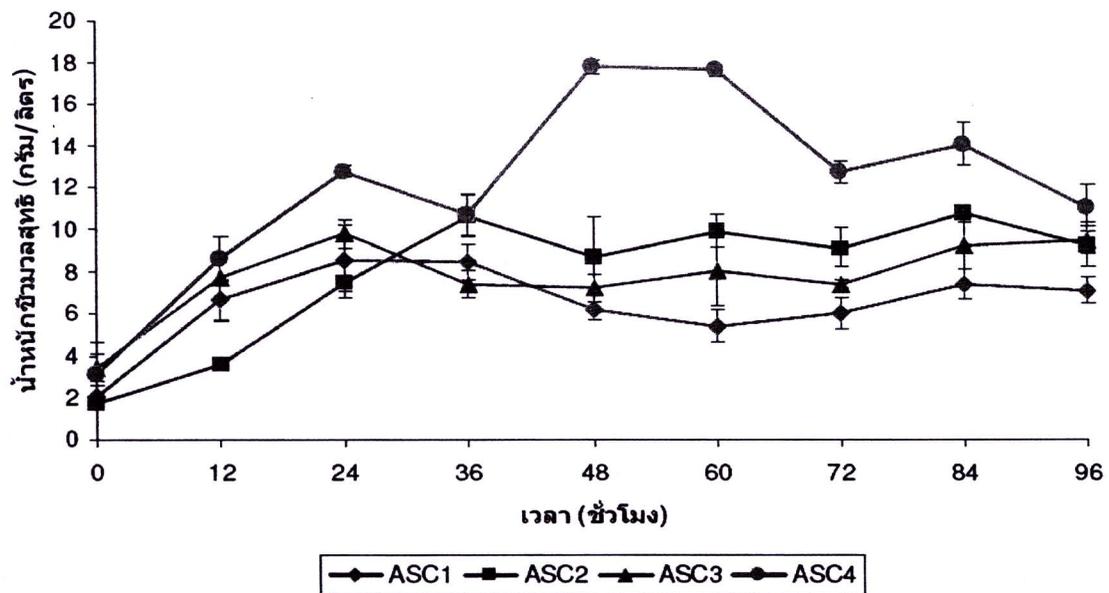
การผลิต PHAs ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตโดยมีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมงเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง นำเซลล์แห้งมาสกัดตามข้อ 3.8.1 พบว่าเมื่อเลี้ยงในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์มีการผลิต PHAs ปริมาณสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่นๆ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี โดยมีเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน ดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า *Pseudomonas* sp. ASC2 มีการผลิต PHAs ได้สูงสุดเท่ากับ 61.80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 36 จึงได้แสดงปริมาณน้ำหนักชีวมวลสุทธิ และปริมาณ PHAs ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 ซึ่งเป็นภาวะในการผลิต PHAs ที่เหมาะสมที่สุดดังแสดงในรูปที่ 4.8 และรูปที่ 4.9 ตามลำดับ

ในการวิเคราะห์ปริมาณ PHAs ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีพบว่ามีเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ขึ้น 2 ช่วงเวลาแสดงว่า PHAs ที่แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ผลิตได้มี 2 ไมโนเมอร์ จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ PHAs แสดงผลในข้อ 4.7 พบว่าไมโนเมอร์ทั้งสองชนิดคือ 3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต (3HO) และ 3-ไฮดรอกซีเดคะโนเอต (3HD) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างกันและภาวะการเจริญเติบโตที่ต่างกันจะมีอัตราส่วนไมโนเมอร์ที่ต่างกัน ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 *Acinetobacter* sp. ASC1 ผลิต PHAs ได้สูงสุดเท่ากับ 54.62 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 36 มีอัตราส่วนของ 3HO 5.05 โมลเปอร์เซ็นต์ และ 3HD 94.95 โมลเปอร์เซ็นต์ แสดงในรูปที่ 4.10 *Pseudomonas* sp. ASC2 ผลิต PHAs ได้สูงสุดเท่ากับ 61.80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 36 มีอัตราส่วนของ 3HO 14.69 โมลเปอร์เซ็นต์ และ 3HD 85.31 โมลเปอร์เซ็นต์ แสดงในรูปที่ 4.11 *Enterobacter* sp. ASC3 ผลิต PHAs ได้สูงสุดเท่ากับ 47.15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 36 มีอัตราส่วนของ 3HO 1.94 โมลเปอร์เซ็นต์ และ 3HD 98.06 โมลเปอร์เซ็นต์ แสดงในรูปที่ 4.12 และ *Bacillus* sp. ASC4 ผลิต PHAs ได้สูงสุดเท่ากับ 47.42 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 60 มีอัตราส่วนของ 3HO 7.2 โมลเปอร์เซ็นต์ และ 3HD 92.8 โมลเปอร์เซ็นต์ แสดงในรูปที่ 4.13 ดังนั้นภาวะการผลิต PHAs ที่เหมาะสมนั้นจะต้องมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอและมีปริมาณไนโตรเจนที่จำกัดจึงจะผลิต PHAs ได้ในปริมาณมาก จากการทดลองเมื่อเพิ่มปริมาณของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

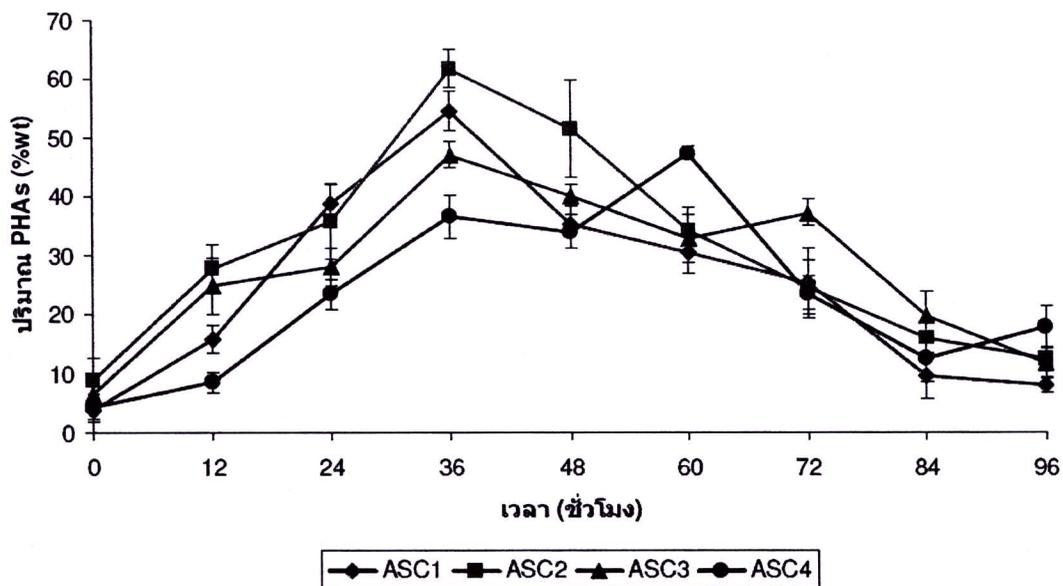
แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นขึ้นอยู่กับปริมาณของแหล่งไนโตรเจนด้วย เช่นเดียวกับปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลอาจเนื่องมาจากในของเสียอินทรีย์มีปริมาณสารเคมีที่เป็นพิษกับจุลินทรีย์ในปริมาณมากจึงทำให้การผลิต PHAs ลดลง

ตารางที่ 4.5 ปริมาณ PHAs สูงสุดของ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เป็น 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 20 80 และ 200 ตามลำดับ

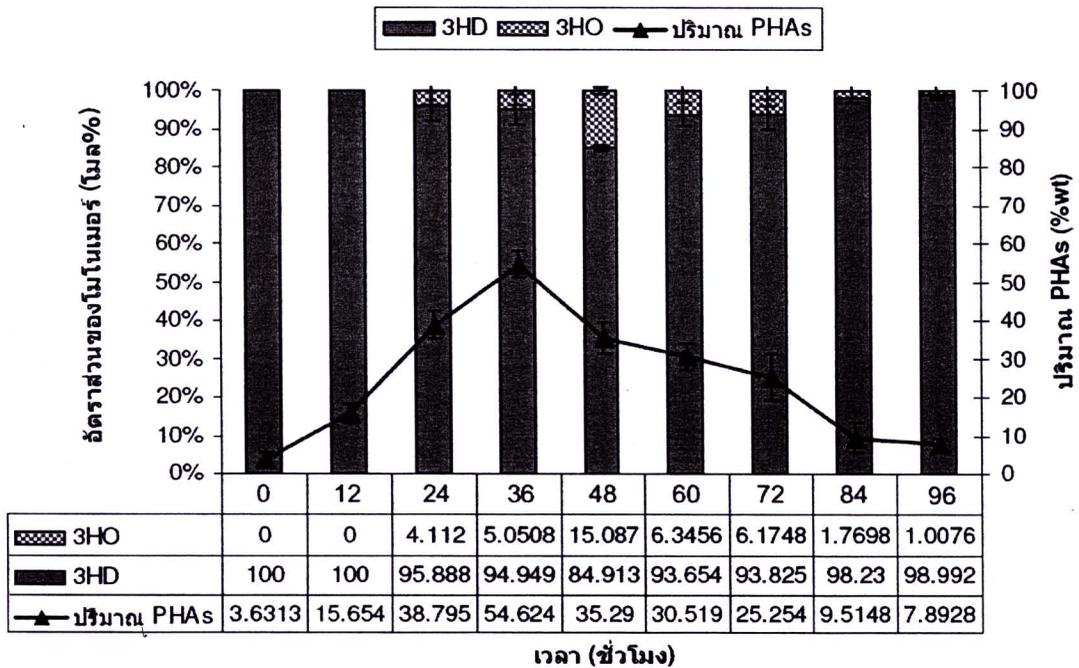
สภาวะ	ปริมาณ PHAs (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง)			
	ASC1	ASC2	ASC3	ASC4
คาร์บอน 5 กรัมต่อลิตร C/N 200	15.63 (36 h)	22.44 (72 h)	18.46 (84h)	33.49 (60h)
คาร์บอน 10 กรัมต่อลิตร				
C/N 4	30.21 (48 h)	27.72 (48 h)	33.01 (60 h)	32.42 (36 h)
C/N 20	25.41 (60h)	28.15 (48h)	33.73 (60 h)	33.94 (48h)
C/N 80	29.79 (36 h)	26.26 (48 h)	29.92 (48 h)	29.17 (36 h)
C/N 200	54.62 (36 h)	61.80 (36 h)	47.15 (36 h)	47.42 (60 h)
คาร์บอน 20 กรัมต่อลิตร				
C/N 200	23.37 (60h)	39.43 (24 h)	29.96 (60 h)	33.80 (48 h)



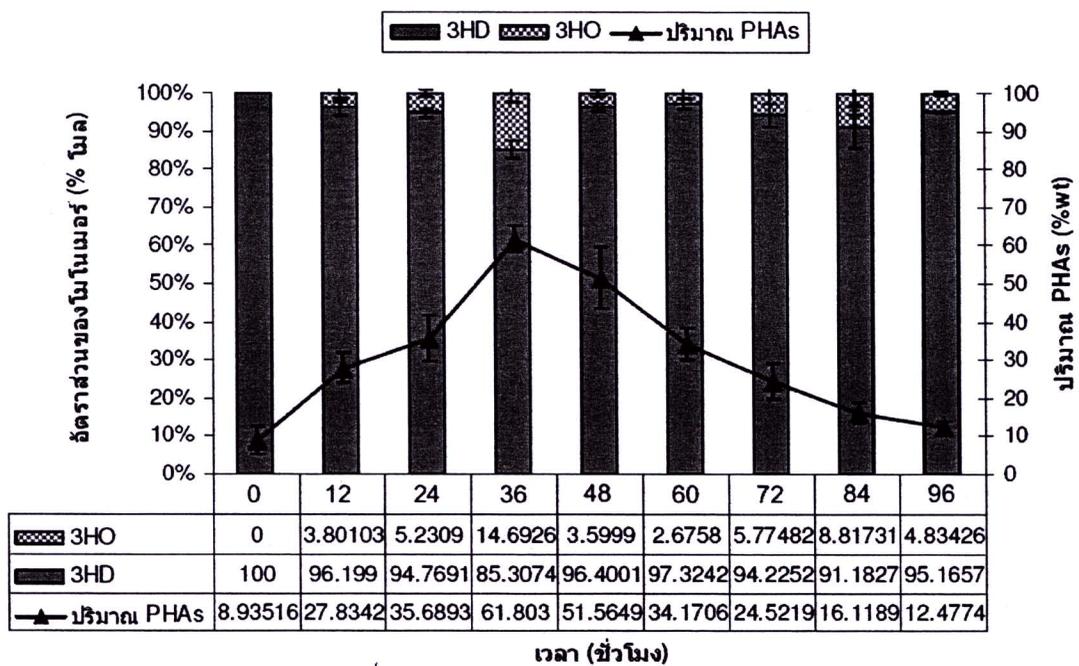
รูปที่ 4.8 ปริมาณน้ำหนักรวมของกรดไขมันสายสั้น (กรัมต่อลิตร) ของ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA ที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล 10 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200



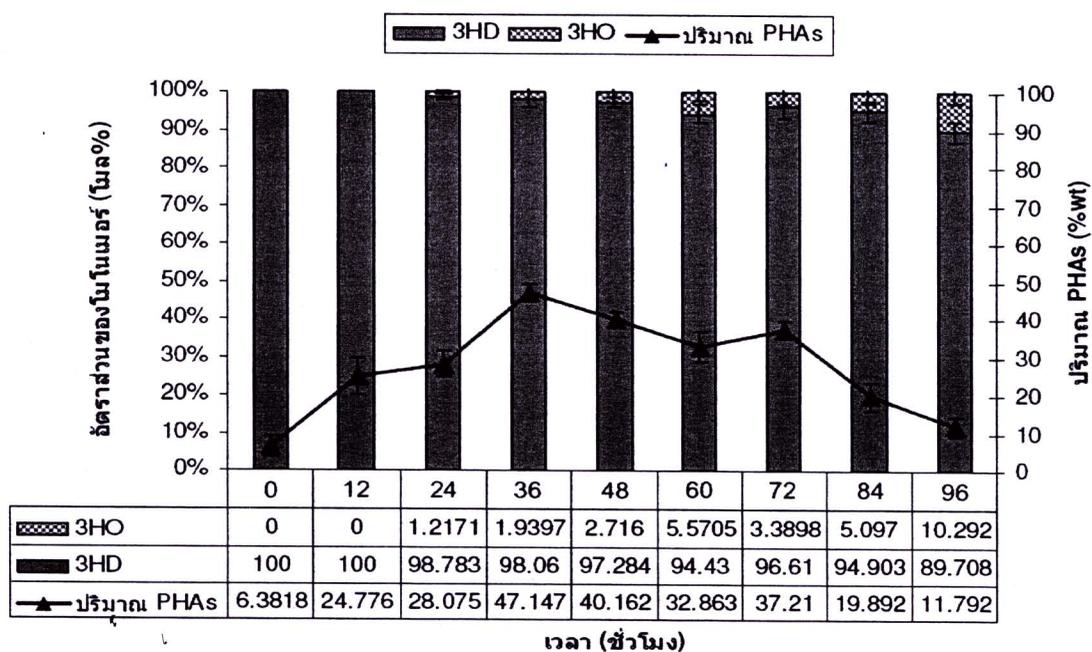
รูปที่ 4.9 ปริมาณ PHAs (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 ผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHAs ที่มีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล 10 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200



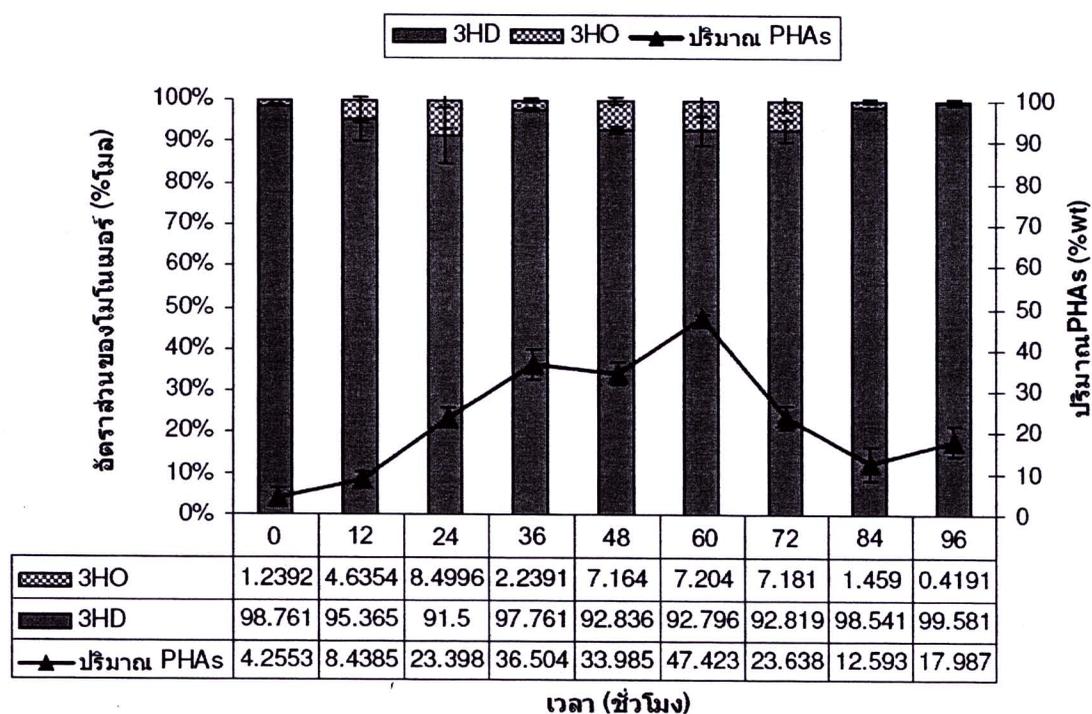
รูปที่ 4.10 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ *Acinetobacter* sp. ASC1 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200



รูปที่ 4.11 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ *Pseudomonas* sp. ASC2 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200



รูปที่ 4.12 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ *Enterobacter* sp. ASC3 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200



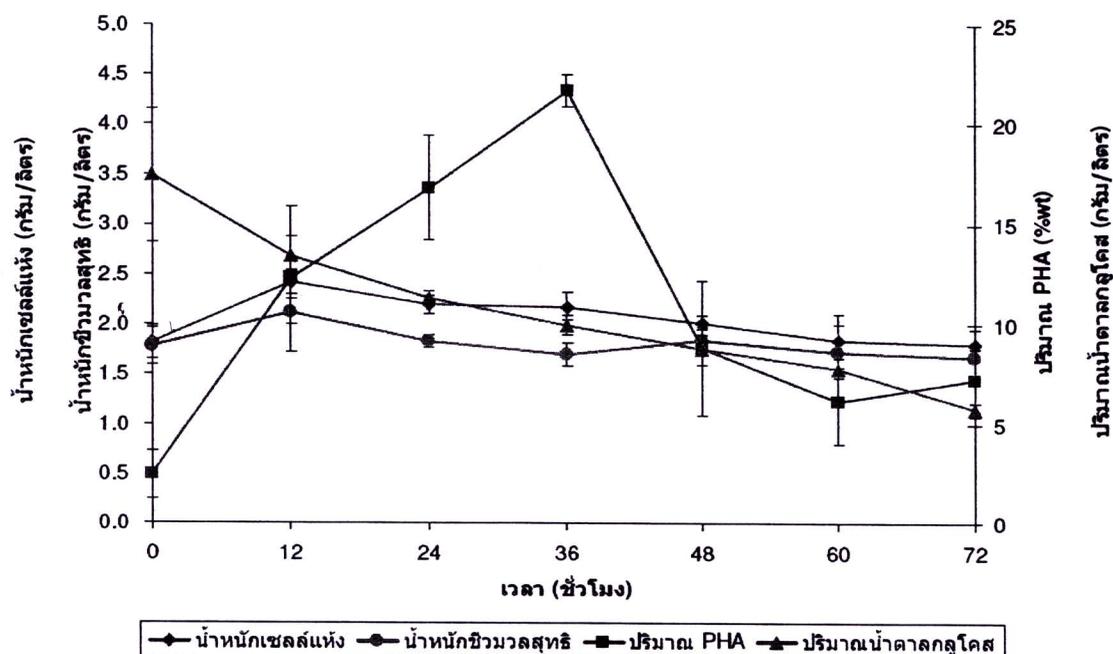
รูปที่ 4.13 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ *Bacillus* sp. ASC4 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200

4.4 ศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอน

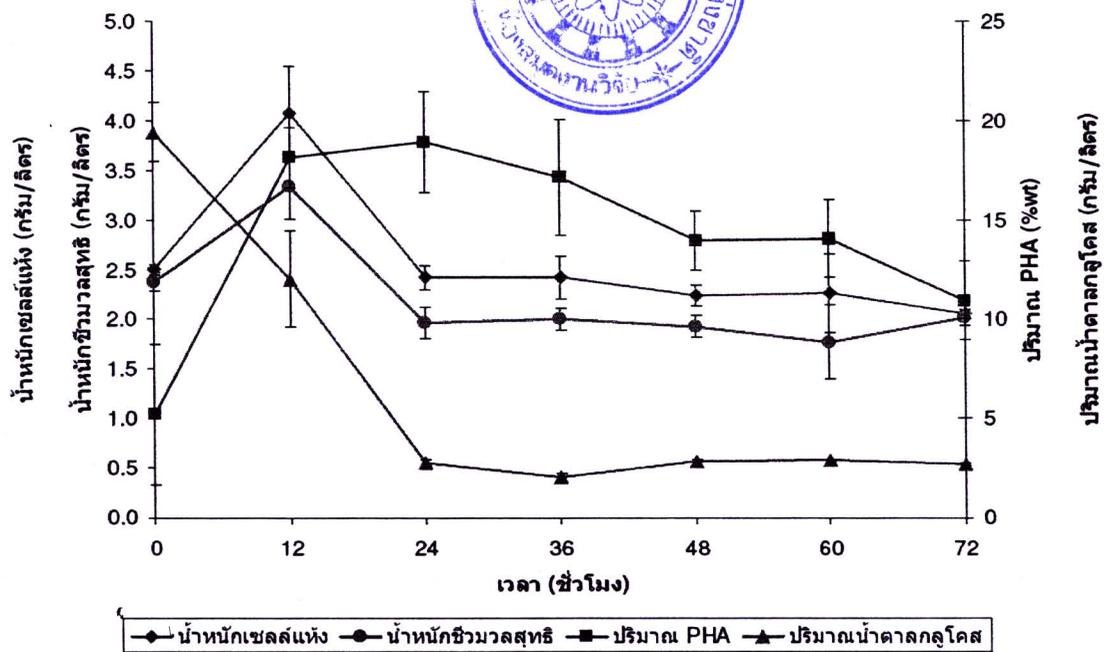
การผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าโดยมีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 เป็นภาวะที่มีการผลิต PHAs ดีที่สุด จึงนำภาวะนี้มาศึกษาต่อโดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยมีวัตถุประสงค์เบื้องต้นในการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ว่ามีคุณสมบัติในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นในการผลิต PHA ได้หรือไม่ ศึกษาความสามารถในการผลิต PHB เนื่องจากก่อนหน้านี้มีรายงานว่า *Pseudomonas* sp. (Haywood และคณะ, 1990) และ *Bacillus* sp. (Kulpreecha และคณะ, 2009) สามารถผลิต PHB ได้โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs ที่มีองค์ประกอบเป็นโมโนเมอร์อื่นนอกเหนือจาก 3HO และ 3HD โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง ส่วน *Pseudomonas* sp. ASC2 และ *Bacillus* sp. ASC4 มีการเจริญเติบโตและการผลิต PHAs ที่ดีกว่า *Acinetobacter* sp. ASC1 และ *Enterobacter* sp. ASC3 จึงศึกษาเฉพาะ *Pseudomonas* sp. ASC2 และ *Bacillus* sp. ASC4 เท่านั้น

นำ *Pseudomonas* sp. ASC2 และ *Bacillus* sp. ASC4 มาเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาทุกๆ 12 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณ PHAs ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟีตามข้อ 3.8.1 และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงตามวิธีของ Bernfeld (1995) ในการวิเคราะห์ปริมาณ PHAs ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟี พบว่าพอลิเมอร์ที่ได้เป็นโฮโมพอลิเมอร์ซึ่งคล้ายคลึงกับพอลิเมอร์ที่ได้จากการใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรียในการผลิต PHAs เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟีพบว่าเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของพอลิเมอร์ที่ได้จากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีหนึ่งช่วงเวลาที่ขึ้นช่วงเดียวกับพอลิเมอร์ที่ได้จากการใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน พอลิเมอร์นั้นคือ 3HD จากการวิเคราะห์พบว่า *Pseudomonas* sp. ASC2 มีน้ำหนักรวมเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.42 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 น้ำหนักชีวมวลสุทธิสูงสุดเท่ากับ 2.12 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 ปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 21.73 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรวมเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 36 และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 5.73 กรัมต่อลิตร แสดงใน

รูปที่ 4.14 ส่วน *Bacillus* sp. ASC4 มีน้ำหนักรเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.08 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 ปริมาณน้ำหนักรชีวมวลสุทธิสูงสุดเท่ากับ 3.34 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 ปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 18.90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 24 และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 2.07 กรัมต่อลิตร แสดงในรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.14 ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำหนักรชีวมวลสุทธิ (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHA (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรเซลล์แห้ง) และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง (กรัมต่อลิตร) ของ *Pseudomonas* sp. ASC2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200

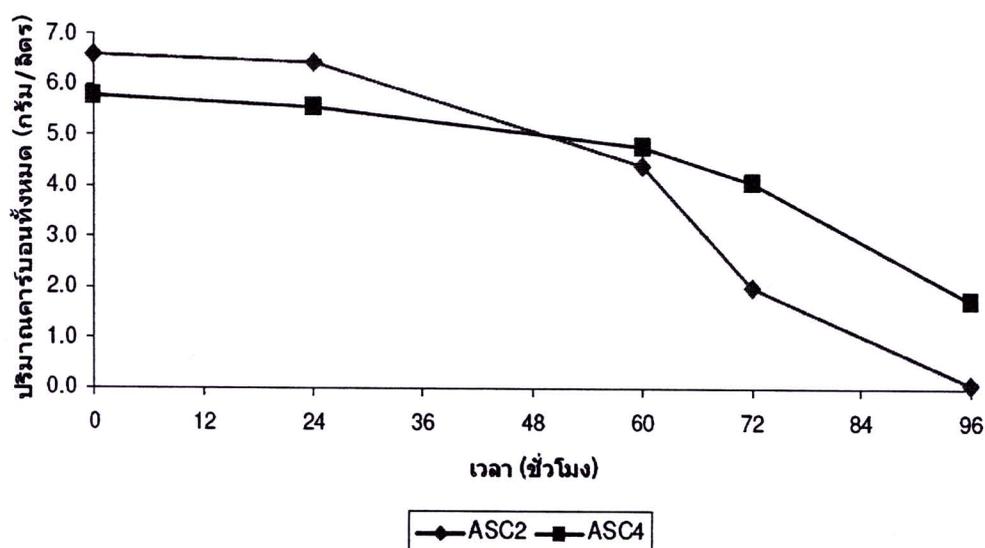


รูปที่ 4.15 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำหนักชีวมวลสุทธิ (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHA (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง (กรัมต่อลิตร) ของ *Bacillus* sp. ASC4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200

4.5 ศึกษาปริมาณคาร์บอนที่เหลือทั้งหมดในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ลดลง

ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันหรือไขมันจากสิ่งมีชีวิต ซึ่งรวมไปถึงน้ำมันที่ผ่านการใช้งานหรือน้ำมันเหลือทิ้งในครัวเรือนจะเกิดผลิตภัณฑ์ร่วมชนิดหนึ่งคือ กลีเซอรอล โดยกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นนี้จะมีปริมาณสิ่งเจือปน เช่น ตัวเร่งปฏิกิริยา แอลกอฮอล์ ไขมัน กรดไขมันอิสระ ความชื้น และสิ่งเจือปนอื่นๆ ที่มาจากน้ำมันค่อนข้างสูง จึงนำกลีเซอรอลซึ่งเป็นของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอนทั้งหมดด้วยเครื่อง TOC analyzer พบว่ามีปริมาณคาร์บอนทั้งหมดเท่ากับ 300.88 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้รายงานไปแล้วในข้อ 4.3 เมื่อนำของเสียอินทรีย์นี้ไปเป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาการผลิต PHAs ด้วย *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 ในข้อ 4.3 ภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต PHAs คือมีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 ในภาวะนี้ *Pseudomonas* sp. ASC2 และ *Bacillus* sp. ASC4 มีการเจริญเติบโตและการ

ผลิต PHAs ที่ดี จึงศึกษาการลดลงของปริมาณคาร์บอนในอาหารเพื่อการผลิตด้วยเครื่อง TOC analyzer เมื่อเลี้ยงด้วย *Pseudomonas* sp. ASC2 และ *Bacillus* sp. ASC4 เท่านั้น พบว่าปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เมื่อเลี้ยงด้วย *Pseudomonas* sp. ASC2 มีปริมาณคาร์บอนเริ่มต้นเท่ากับ 6.58 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงครบ 96 ชั่วโมงปริมาณคาร์บอนลดลงเหลือ 0.09 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงด้วย *Bacillus* sp. ASC4 มีปริมาณคาร์บอนเริ่มต้นเท่ากับ 5.78 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงครบ 96 ชั่วโมงปริมาณคาร์บอนลดลงเหลือ 1.73 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.16 ส่วนปริมาณไนโตรเจนในงานวิจัยนี้ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีของ Kempers (1974) ไม่สามารถวิเคราะห์ได้เพราะน้ำหมักที่เก็บตัวอย่างได้ในแต่ละชั่วโมงเมื่อนำเซลล์ของแบคทีเรียออกจากน้ำหมักด้วยการปั่นแยกเซลล์แล้วน้ำหมักก็ยังคงมีลักษณะขุ่นซึ่งเกิดจากน้ำมันเกิดการแตกตัวขณะอยู่ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิและเขว่วนลอยเป็นอิมัลชัน (emulsion)



รูปที่ 4.16 ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดในของเสียอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร) ในอาหารเพื่อการผลิต PHA ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 เมื่อเลี้ยงด้วย *Pseudomonas* sp. ASC2 และ *Bacillus* sp. ASC4

4.6 การสกัด PHAs จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์

นำ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 เลี้ยงในภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHAs โดยมีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตรเพื่อให้ได้เซลล์แบคทีเรียจำนวนมากเพื่อนำมาสกัด PHAs การสกัด PHAs ใช้วิธีของ Doi และคณะ (1995) โดยสกัดพอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีรายงานว่า การสกัดพอลิเมอร์จากเซลล์แห้งของแบคทีเรีย ด้วยคลอโรฟอร์มเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ (สุชาติ จันทรประทีป, 2539) จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์ม นำมาทำให้บริสุทธิ์อีกรอบ โดยละลายแผ่นฟิล์มที่ได้ในคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนเป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้ง นำมาตกตะกอนในเฮกเซนปริมาตร 4 เท่า ตามข้อ 3.9.2 แต่ในงานวิจัยนี้พอลิเมอร์ที่ได้จะมีลักษณะเป็นแว็กซ์แสดงในรูปที่ 4.17 เนื่องจากพอลิเมอร์ที่ได้จัดเป็น mcl-PHAs ซึ่งทราบได้จากโครงสร้างของพอลิเมอร์ และน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่วิเคราะห์ได้

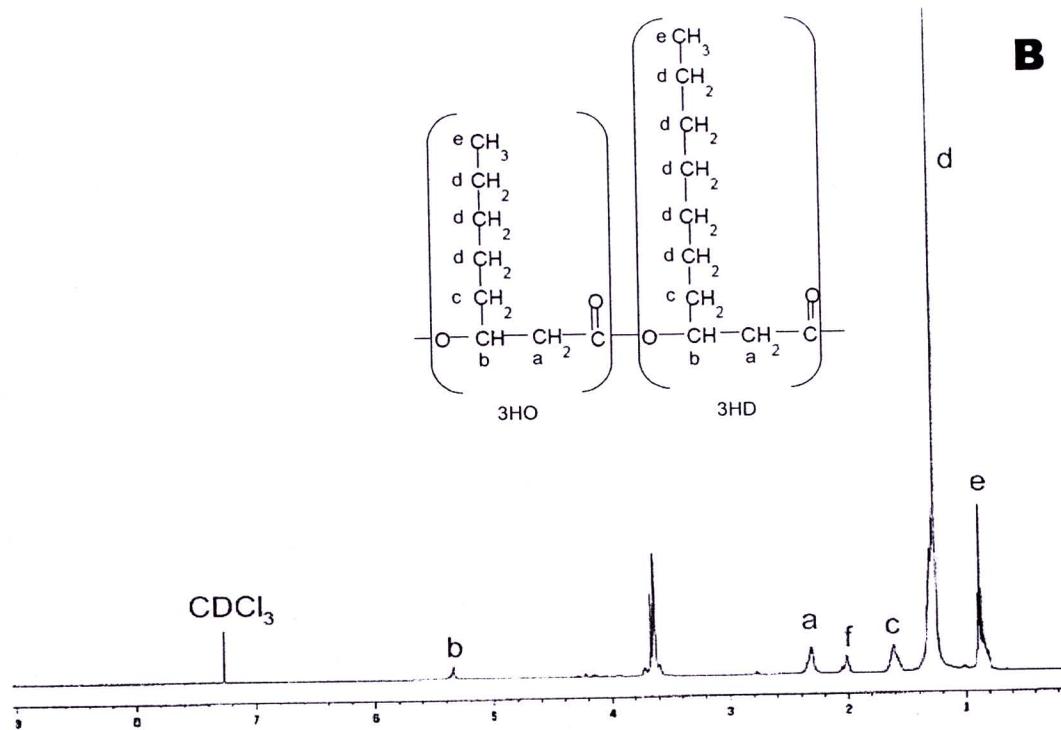
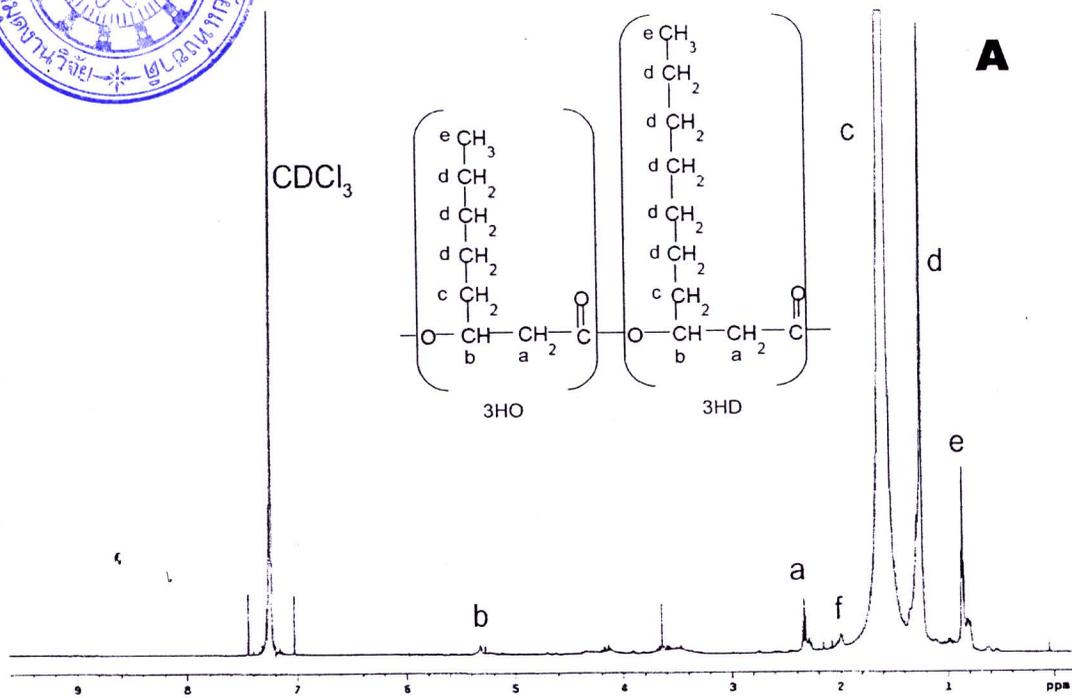
พอลิเมอร์ที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะนำไปศึกษาโครงสร้างของพอลิเมอร์และน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ต่อไปในข้อ 4.7 และ 4.8



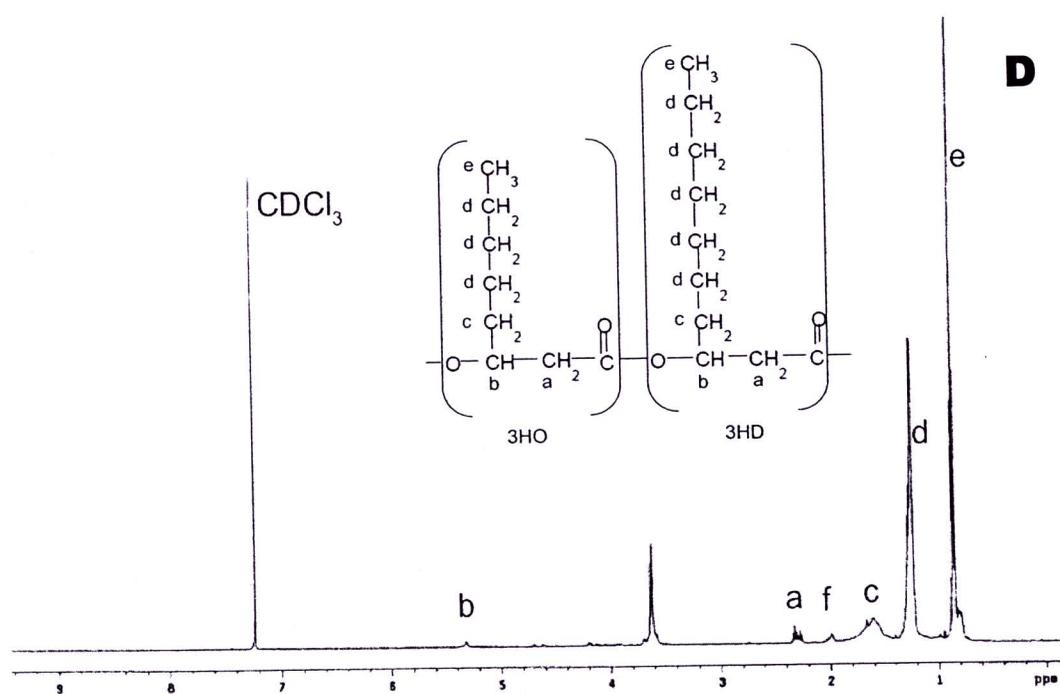
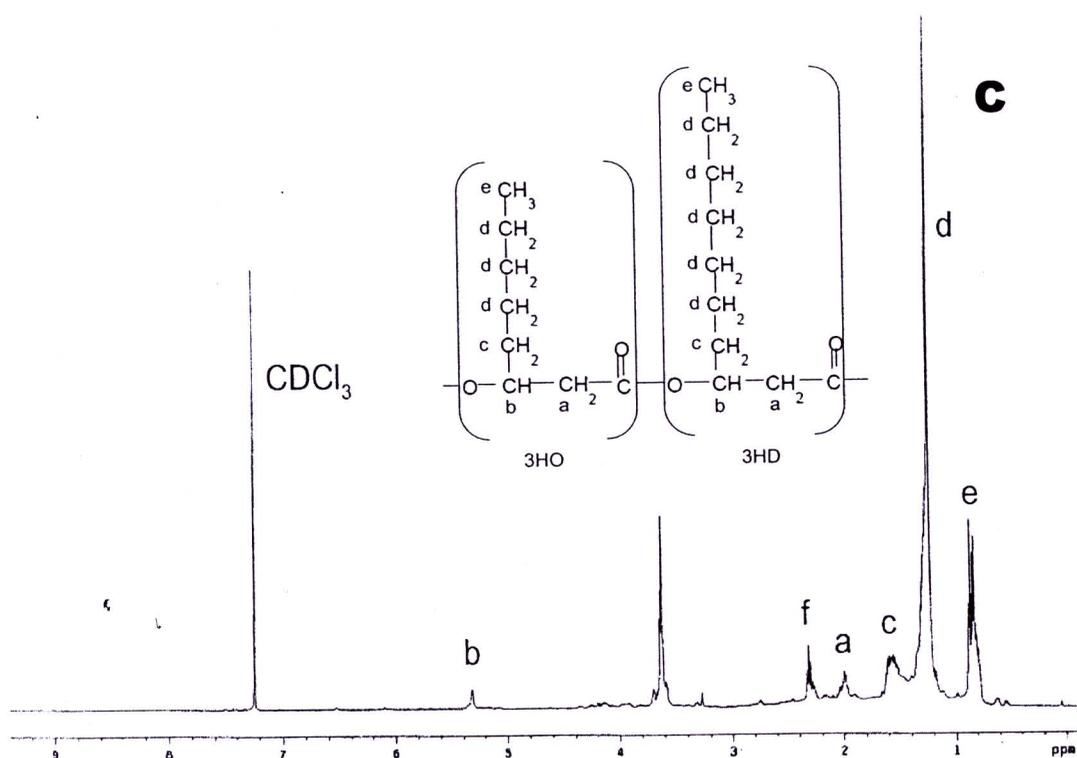
รูปที่ 4.17 ลักษณะของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จาก *Pseudomonas* sp. ASC2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHAs ที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200

4.7 ศึกษาโครงสร้างของ PHAs โดย $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ และ $2\text{D-}^1\text{H-COSY}$ spectroscopy

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากของเสียที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลในระดับขวดเขย่าจากข้อ 4.3 โดยมีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs คือมีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 เมื่อนำ PHAs ที่ผลิตได้จาก *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 ในภาวะการเลี้ยงดังกล่าวมาวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ spectra ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มมิกเวเคิลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีตามวิธีในข้อ 3.9.3 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.18 วิเคราะห์ $2\text{D-}^1\text{H-COSY}$ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.19 และ $^{13}\text{C-NMR}$ spectra ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มมิกเวเคิลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ได้ผลแสดงในรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.18 สเปกตรัมของ PHAs ที่ผลิตจาก *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 จาก $^1\text{H-NMR}$ ความถี่ 500 MHz ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A; ASC1 B; ASC2 C; ASC3 และ D; ASC4)

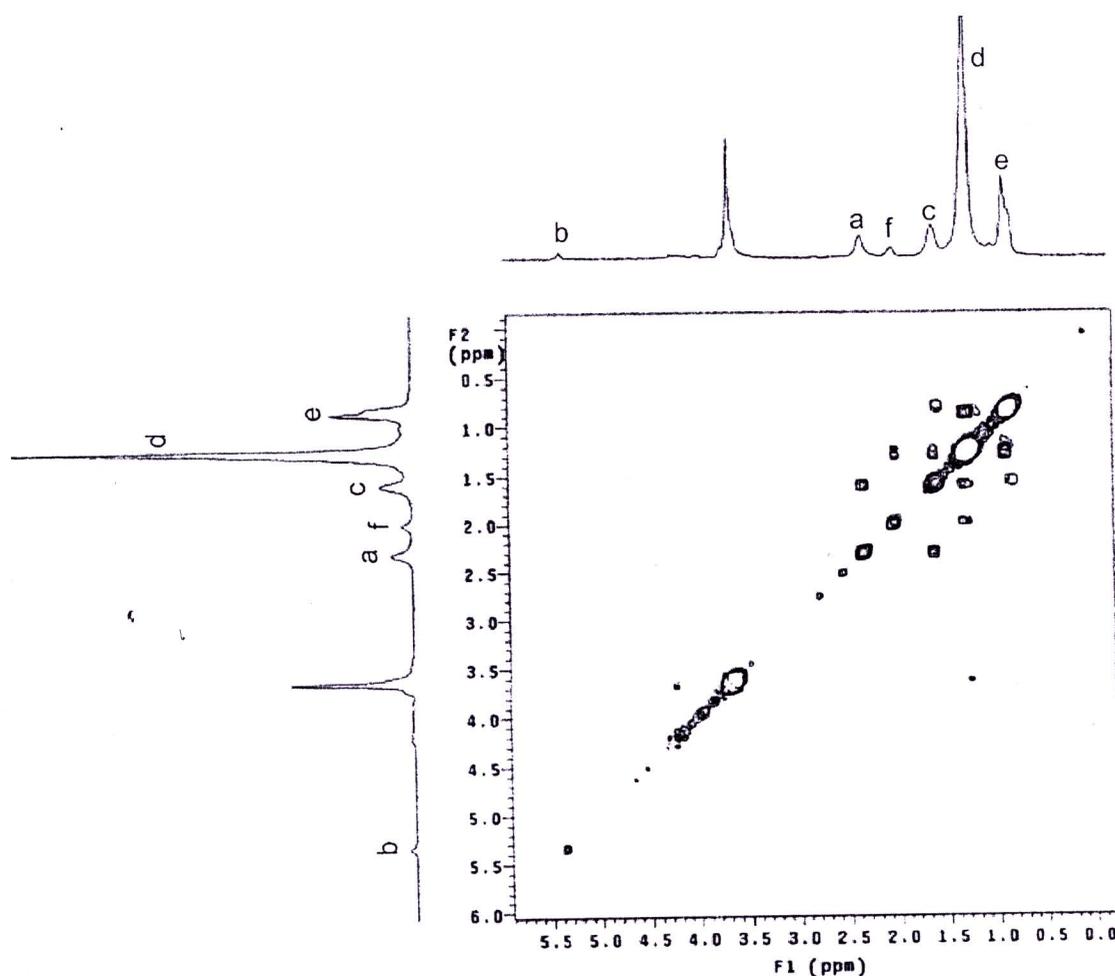


รูปที่ 4.18 (ต่อ) สเปกตรัมของ PHAs ที่ผลิตจาก *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 จาก ¹H-NMR ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A; ASC1 B; ASC2 C; ASC3 และ D; ASC4)

จากรูปที่ 4.18 (A) (B) (C) และ (D) พบว่ามีตำแหน่ง δ (chemical shift) ที่ขึ้นในแต่ละตำแหน่งตรงกันแต่มีสัดส่วนโมโนเมอร์ที่ต่างกัน จากการศึกษาในข้อ 4.3.1.2 พบว่า *Pseudomonas* sp. ASC2 มีการผลิต PHAs เท่ากับ 61.80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสูงสุดในภาวะที่มีคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 จึงได้ศึกษา PHAs ที่ได้จาก *Pseudomonas* sp. ASC2 อย่างละเอียด จากรูปที่ 4.18 (B) พบว่ามี 6 สัญญาณที่ชัดเจนในช่วง δ เท่ากับ 0.845 – 5.356 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของ anomeric proton โดยให้ชื่อตำแหน่งเป็น a b c d e และ f ที่ตำแหน่ง δ เท่ากับ 0.880 ppm (a) แสดงสัญญาณที่ชัดเจนซึ่งเป็นสัญญาณโปรตอนจากหมู่เมทิล (CH_3) ของ PHAs ส่วนที่ตำแหน่ง δ เท่ากับ 1.255 (d) 1.616 (c) 2.015 (f) และ 2.302 ppm (a) แสดงสัญญาณโปรตอนจากหมู่เอทิล ($-\text{CH}_2$) ที่ตำแหน่ง δ เท่ากับ 5.342 ppm (b) แสดงสัญญาณโปรตอนจากหมู่ asymmetric carbons (CH) และที่ตำแหน่ง δ เท่ากับ 7.235 ppm แสดงสัญญาณที่หนาแน่นของโปรตอนจาก CDCl_3 ซึ่งเป็นตัวทำละลายพอลิเมอร์ของ PHAs (Haywood และคณะ, 1990)

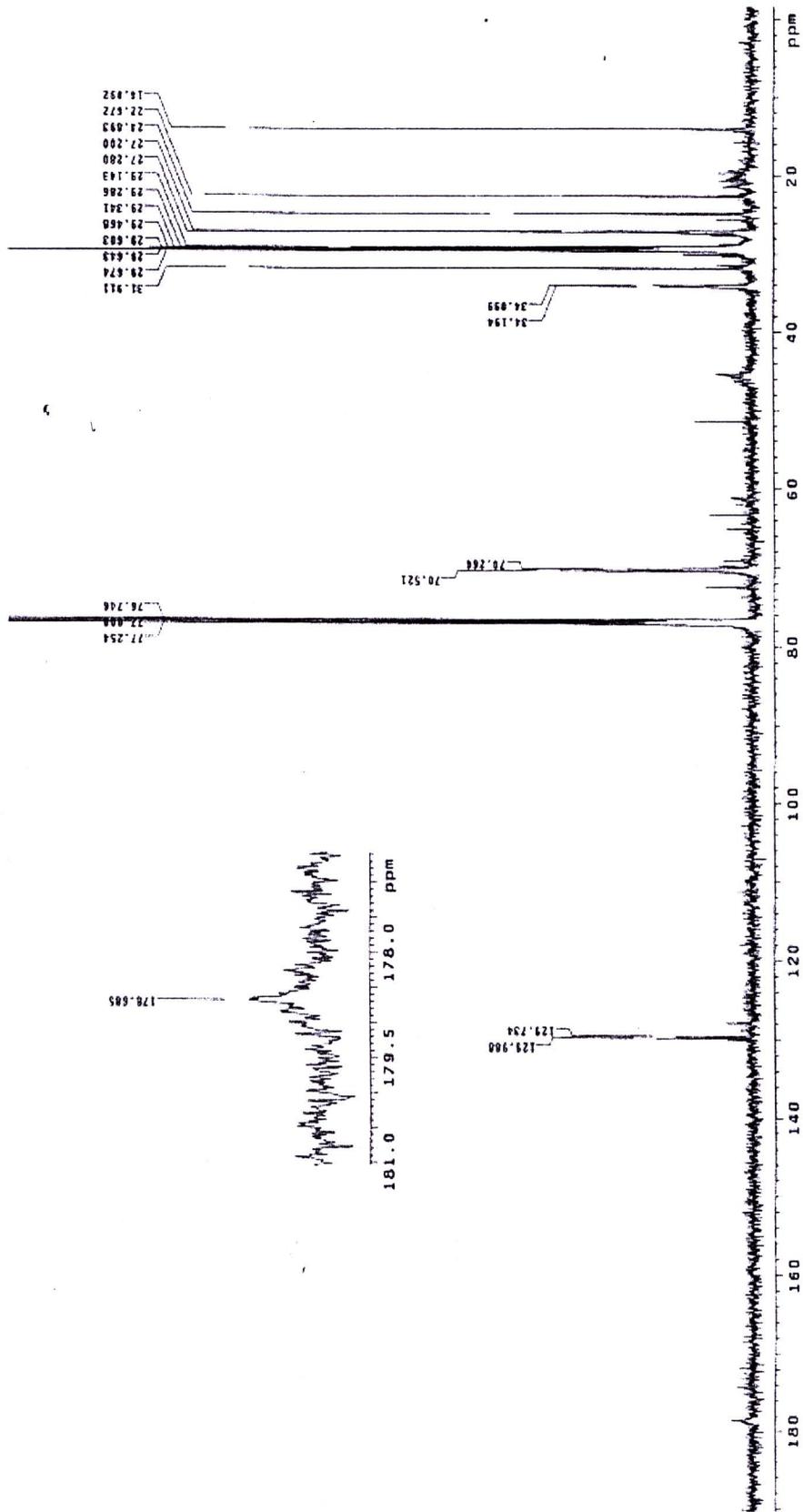
จากรูป 4.18 (A) - (D) สัญญาณในช่วง δ เท่ากับ 3.592-3.724 ppm สันนิษฐานว่า อาจแสดงสัญญาณโปรตอนของโมโนเมอร์ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ หรือแสดงสัญญาณโปรตอนของสารที่ปนเปื้อนที่ปนมากับพอลิเมอร์ที่ได้ ทำการยืนยันโดยการวิเคราะห์ด้วย 2D- ^1H -COSY ต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 4.19

จากรูปที่ 4.19 แสดง 2D- ^1H -COSY ของ PHAs ที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. ASC2 พบว่าในตำแหน่ง e มีการเชื่อมต่อกับตำแหน่ง e d และ c ในตำแหน่ง d มีการเชื่อมต่อกับตำแหน่ง e, d, c และ f ในตำแหน่ง c มีการเชื่อมต่อกับตำแหน่ง e d c และ a ในตำแหน่ง f มีการเชื่อมต่อกับตำแหน่ง d และ f ในตำแหน่ง a มีการเชื่อมต่อกับตำแหน่ง c และ a และในตำแหน่ง b มีการเชื่อมต่อกับตำแหน่ง c a และ b โดยทั้งหมดนี้เป็นการยืนยันว่าตำแหน่ง b (CH) มีการเชื่อมต่อกับหมู่เอทิล ($-\text{CH}_2$) ในตำแหน่ง c และ a ตามรูปที่ 4.21 ตำแหน่ง c เชื่อมต่อกับหมู่เอทิลในตำแหน่ง d ต่อไป และสุดท้ายตำแหน่ง d ไปเชื่อมต่อกับหมู่เมทิล (CH_3) ในตำแหน่ง e

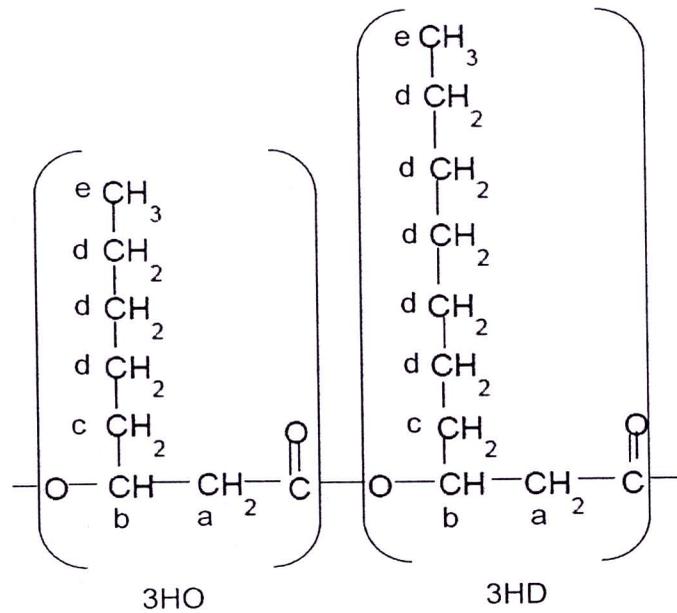


รูปที่ 4.19 สเปกตรัมของ PHAs ที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. ASC2 จาก 2D-¹H-COSY ความถี่ 400 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

จากการวิเคราะห์ด้วย 2D-¹H-COSY สามารถสรุปได้ว่าสัญญาณโปรตอนในช่วง δ เท่ากับ 3.592-3.724 ppm ในรูป 4.18 (A) - (D) เป็นสัญญาณโปรตอนของสารปนเปื้อนที่ปนมากับพอลิเมอร์ เนื่องจาก PHAs ยังไม่มีความบริสุทธิ์พอ โดยสารที่ปนเปื้อนนั้นไม่ได้เป็นองค์ประกอบของ PHAs ทราบได้จาก 2D-¹H-COSY (รูปที่ 4.19) เพราะตำแหน่งในช่วงนี้ไม่ได้ correlation กับตำแหน่งโปรตอนของ PHAs



รูปที่ 4.20 สเปกตรัมของ PHAs ที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. ASC2 จาก $^{13}\text{C-NMR}$ ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.21 โครงสร้างของ PHAs ที่ผลิตได้จาก *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4

4.8 ทดสอบสมบัติทางกายภาพของ PHAs

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์ตามวิธีของ Abate และคณะ (1995) โดยละลายพอลิเมอร์ในคลอโรฟอร์มชนิดเกรด HPLC เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้คอลัมน์ Water Styragel HT 6E มีตัวพาเป็นคลอโรฟอร์ม อัตราการชะที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพอลิสไตรีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 96,400 ถึง 456 ตาลตัน แสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (Molecular weight ; M_w) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (Number-average molecular weight ; M_n) และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (Polydispersity index ; M_w/M_n) ของพอลิเมอร์ที่ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 ผลิตได้ในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ค่า M_w M_n M_w/M_n ของพอลิเมอร์ที่ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 ผลิตได้

แบคทีเรียสายพันธุ์	M_w (Da)	M_n (Da)	M_w/M_n
<i>Acinetobacter</i> sp. ASC1	1,222	710	1.72
<i>Pseudomonas</i> sp. ASC2	525	397	1.32
<i>Enterobacter</i> sp. ASC3	752	559	1.35
<i>Bacillus</i> sp. ASC4	1,433	680	2.11

ในปี 1998 He และคณะ ได้มีการศึกษาการผลิต PHAs โดยใช้ไขมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ 1317 สามารถผลิต mcl-PHAs ได้ โดยมี M_w อยู่ในช่วง 188-244 ดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับผลการวิจัยที่ได้ และในปี 2007 Hazer และ Steinbüchel ได้รายงานว่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของ mcl-PHAs มีค่าอยู่ในช่วง 1.3-2.6 ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากงานวิจัยนี้

M_w ของ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 เท่ากับ 1,222 525 752 และ 1,433 ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งมี M_w ต่ำทำให้พอลิเมอร์ที่ได้มีลักษณะเป็นแวกซ์ ไม่สามารถขึ้นรูปได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Song และคณะ (2008) ได้นำน้ำมันพืชที่ใช้แล้วมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHAs โดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ DR2 พบว่า PHAs ที่ผลิตได้เป็น mcl-PHAs พอลิเมอร์ที่ได้มีลักษณะเป็นแวกซ์เช่นกัน