ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247446

การผลิตผงซิไรกรอกซีนอลคาโนเซทโดยใช้ซอสสีนอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

นางสาวอัมพิกา เมืองวงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอุตสาหกรรม ภาควิชาอุตสาหกรรม
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

b00252412

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247446

การผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

นางสาวอัมทิกา เมืองวงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5072568423

PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES USING ORGANIC WASTES FROM BIODIESEL PRODUCTION PROCESS

Miss Amtiga Muangwong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

, Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล
โดย	นางสาวอัมทิกา เมืองวงษ์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนัญ ผลประไพ)

อัมทิกา เมืองวงษ์ : การผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES USING ORGANIC WASTES FROM BIODIESEL PRODUCTION PROCESS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป, 117 หน้า.

247446

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียจากดินปนเปื้อนน้ำมันพืชใช้แล้วเพื่อใช้ในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้ของเสียอินทรีย์ที่มาจากการผลิตไบโอดีเซลซึ่งผลิตมาจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีของเสียอินทรีย์ถูกทำให้อุดม แบคทีเรียบริสุทธิ์จำนวนสี่สายพันธุ์ได้รับการคัดเลือกจากการย้อมแกรนูล PHA. โดยการย้อมเปรียบเทียบด้วยวิธีการย้อมไนล์ บลู เอ และซูดาน แบล็ค บี ผลการวิเคราะห์ยีนบริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 มีความคล้ายคลึงกับ *Acinetobacter baumannii* RM4 94.89 เปอร์เซ็นต์ ตั้งชื่อเป็น *Acinetobacter* sp. ASC1 แบคทีเรียสายพันธุ์ ASC2 มีความคล้ายคลึงกับ *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX 99.18 เปอร์เซ็นต์ ตั้งชื่อเป็น *Pseudomonas* sp. ASC2 แบคทีเรียสายพันธุ์ ASC3 มีความคล้ายคลึงกับ *Enterobacter* sp. BSRA2 99.24 เปอร์เซ็นต์ ตั้งชื่อเป็น *Enterobacter* sp. ASC3 และแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC4 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* IAM 12118T 98.40 เปอร์เซ็นต์ ตั้งชื่อเป็น *Bacillus* sp. ASC4 ผลกระทบของปริมาณคาร์บอนอินทรีย์และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนได้รับการศึกษาในระดับขวดเขย่า ผลการวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตรกราฟฟีร่วมกับ ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, และ 2D-^{1}H-COSY แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้งสี่สายพันธุ์ผลิต PHAs ที่ประกอบด้วย 3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต (3-hydroxyoctanoate; 3HO) และ 3-ไฮดรอกซีเดคะโนเอต (3-hydroxydecanoate; 3HD) จากของเสียอินทรีย์ โดย *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ ASC2 มีการสะสม PHAs สูงสุด 61.80 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีองค์ประกอบเป็น 3HO 14.69 โมลเปอร์เซ็นต์ และ 3HD 85.31 โมลเปอร์เซ็นต์ และได้ชีวมวลสุทธิ 8.51 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักของ PHAs ผลิตโดย *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 เท่ากับ 1,222 525 752, และ 1,433 ดาลตัน ตามลำดับ

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....อัมทิกา เมืองวงษ์.....

สาขาวิชา....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม...ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....สุชาดา จันทร์ประทีป.....

ปีการศึกษา..2553.....

5072568423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: ORGANIC WASTE/ BIODIESEL INDUSTRY/ POLYHYDROXYALKANOATES

AMTIGA MUANGWONG : PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES USING ORGANIC WASTES FROM BIODIESEL PRODUCTION PROCESS.

THESIS ADVISOR : ASST.PROF. SUCHADA CHANPRATEEP, Ph.D.,117 pp.

247446

The aims of this work were to screen newly isolated bacteria from soils contaminated with cooking oil for efficient production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste glycerol, a by product from biodiesel industry where the substrate was derived from used-cooking oil. The consortium of bacteria capable of growing in medium containing waste glycerol was enriched. Four axenic cultures were obtained based on comparative staining of PHAs granules using Nile blue A staining and Sudan Black B staining methods. The 16S rRNA gene analysis of these bacteria showed that the strain ASC1 exhibited 94.89% similarity to *Acinetobacter baumannii* RM4 and was named *Acinetobacter* sp. ASC1. The strain ASC2 exhibited 99.18% similarity to *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX and was named *Pseudomonas* sp. ASC2. The strain ASC3 exhibited 99.24% similarity of *Enterobacter* sp. BSRA2 and was named *Enterobacter* sp. ASC3. The strain ASC4 exhibited 98.40% similarity of *Bacillus subtilis* IAM 12118T and was named *Bacillus* sp. ASC4. Effect of total organic carbon and mole ratio of carbon to nitrogen were investigated in shake flask cultivation. The GC analysis, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, and 2D-^{1}H-COSY spectroscopy results were demonstrated that all isolated bacteria produced PHAs consisting of 3-hydroxyoctanoate (3HO) and 3-hydroxydecanoate (3HD) from crude waste glycerol. Among them, *Pseudomonas* sp. ASC2 accumulated the highest content of PHAs 61.80 %wt with 3HO 14.69 mol% and 3HD 85.31 mol% and the residual biomass of 8.51 g/L was obtained at 24 h. The M_w of produced PHAs obtained from *Acinetobacter* sp. ASC1, *Pseudomonas* sp. ASC2, *Enterobacter* sp. ASC3, and *Bacillus* sp. ASC4 were 1,222 525 752 and 1,433 Da.

Department : .....Microbiology.....Student's Signature...Amtiga Muangwong

Field of Study : .....Industrial Microbiology.....Advisor's Signature...Suchada Chanprateep

Academic Year : ..2010.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง จากหลายๆ ท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงสำหรับ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ แนวทาง ข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งได้เสียสละแรงกายแรงใจ และเวลาอันมีค่า ตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวัล ลือพร้อมชัย อาจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนัญ ผลประไพ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้ความสนใจ คำแนะนำต่างๆ ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิตสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สัญญาเลขที่ MRG-WI515S004) สำหรับเงินทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้ และ ดร.ภานุ พรรณรักษ์ ผู้จัดการ บริษัท วิทย์คอร์ป จำกัด มหาชน ที่ให้ความสนใจนานวิจัยนี้และให้ความอนุเคราะห์ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ และให้คำปรึกษาเป็นอย่างดีรวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีในทุกๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา รวมถึงสมาชิกห้องวิจัย 449 448 และ 407 ทุกคนที่คอยดูแลเอาใจใส่ ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ แลกเปลี่ยนความรู้ความคิดเห็น และคำแนะนำต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและบุคคลรอบข้างที่ได้มอบความรัก ความห่วงใย ความอบอุ่น และทุกสิ่งทุกอย่างแก่ผู้วิจัย รวมถึงกำลังใจที่ดีมากที่ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สามารถพ้นผ่านอุปสรรคต่างๆ และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฐ

บทที่

1. บทนำ..... 1

1.1 ประวัติความเป็นมา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

2. ปริทัศน์วรรณกรรม..... 4

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพลาสติก..... 4

2.2 ประเภทของพลาสติก..... 4

2.3 พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ..... 5

2.4 พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต..... 7

2.5 วิถีการสังเคราะห์ PHA..... 12

2.6 แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA..... 17

2.7 ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล..... 23

2.8 วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนการสังเคราะห์ PHA โดยการใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน..... 26

2.9 การนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์..... 27

2.10 การวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของ PHA..... 32

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง..... 39

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 39

บทที่ หน้า

3.2 เคมีภัณฑ์..... 41
3.3 จุลินทรีย์..... 42
3.4 การเก็บรักษาจุลินทรีย์..... 43
3.4.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น..... 43
3.4.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว..... 43
3.5 คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs โดยใช้ของเสียจากการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชใช้แล้ว..... 43
3.5.1 การเก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว..... 43
3.5.2 การเก็บตัวอย่างของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล.... 44
3.5.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs โดยใช้ของเสียที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล..... 44
3.5.4 การย้อมแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ด้วย Sudan Black B และ Nile Blue A ตามวิธีของ Jenkins และคณะ (1993) และ Song และคณะ (2008) ตามลำดับ..... 44
3.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทางอนุกรมวิธาน..... 45
3.6.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)..... 45
3.6.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา หรือการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น (Physiological characteristic and Biochemical test)..... 45
3.6.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA (16S rRNA)..... 46
3.6.4 ต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)..... 46
3.7 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากของเสียที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลในระดับขวดเขย่า..... 47
3.7.1 การเตรียมกล้าเชื้อ..... 47
3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล..... 47
3.7.3 การผลิตในระดับขวดเขย่า..... 47

บทที่ หน้า

3.7.3.1 ศึกษาหาปริมาณของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHAs ของแบคทีเรียในระดับขวดเขย่าตามวิธีของ Chanprateep และคณะ (2008).... 47
3.7.3.2 ศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล..... 48
3.7.3.3 วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง..... 48
3.7.3.4 วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนที่เหลือทั้งหมดในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล..... 48
3.7.3.5 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนตามวิธีของ Kempers (1974) 49
3.7.4 การผลิตในระดับถังหมัก..... 49
3.8 ศึกษาการผลิต PHAs โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล..... 49
3.8.1 ศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล 49
3.8.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Bernfeld (1995)..... 50
3.9 วิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของ PHAs ที่ผลิตได้..... 50
3.9.1 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตรกราฟี..... 50
3.9.2 การสกัด PHA จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์..... 51
3.9.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ด้วยเครื่อง NMR..... 52
3.10 ทดสอบสมบัติทางกายภาพของ PHAs..... 52
การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์ตามวิธีของ Abate และคณะ (1995)..... 52

4. ผลการทดลอง..... 53

บทที่ หน้า

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs โดยใช้ของเสียจากการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชใช้แล้ว..... 53
4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้..... 56
4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา..... 56
4.2.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น 57
4.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA (16S rRNA)..... 58
4.2.4 ต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)..... 59
4.3 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากของเสียที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลในระดับขวดเขย่า..... 64
4.3.1 วิเคราะห์การเจริญเติบโตของ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 จากน้ำหนักเซลล์แห้ง..... 64
4.3.2 วิเคราะห์ปริมาณ PHAs ของ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 ที่ผลิตได้โดยก๊าซโครมาโตรกราฟี..... 66
4.4 ศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอน..... 71
4.5 ศึกษาปริมาณคาร์บอนที่เหลือทั้งหมดในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ลดลง..... 73
4.6 การสกัด PHAs จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์..... 75
4.7 ศึกษาโครงสร้างของ PHAs โดย ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR และ 2D-^{1}H-COSY Spectroscopy..... 76
4.8 ทดสอบสมบัติทางกายภาพของ PHAs..... 83

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 85

รายการอ้างอิง..... 91

บทที่ หน้า

ภาคผนวก..... 104
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 105
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีเตรียมที่ใช้ในการทดลอง..... 107
ภาคผนวก ค โครมาโตแกรม..... 111
ภาคผนวก ง ลำดับนิวคลีโอไทด์..... 114
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 117

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHA (Chen, 2010b).....	14
2.2	วัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ในการผลิต PHA.....	18
2.3	การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ.....	19
2.4	การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีกรดไขมันผสมอยู่.....	21
2.5	บริษัทที่มีการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม.....	31
4.1	องค์ประกอบของกลีเซอรอลใส.....	54
4.2	ลักษณะของโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4.....	57
4.3	ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4..	58
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.....	65
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.....	67
4.6	ตำแหน่ง Chemical shift (ppm) ^{13}C-NMR ของ PHAs.....	82
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.....	84

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพที่ผลิตมาจาก PHA ภายในระยะเวลา 45 วัน.....	7
2.2	(A) ภาพถ่ายแกรนูลที่มีการสะสม PHA ของ *Cupriavidus necator* DSM 545 โดยเลี้ยงในถังหมักแบบต่อเนื่องที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) กำลังขยาย 150,000 เท่า (Koller และคณะ, 2010) (B) ภาพตัดแกรนูลที่มีการสะสม PHA ของ *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 โดยมีน้ำมันเมล็ดป่อ (linseed oil) เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน TEM (Bassas และคณะ, 2007).....	8
2.3	แกรนูลของแบคทีเรียที่ย้อมด้วย (A) Sudan Black B และ (B) Nile Blue A (López-Cortés และคณะ, 2008).....	8
2.4	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHA.....	10
2.5	วิถีการสังเคราะห์ PHA ตัวเลขแสดงเอนไซม์ (หรือยีน) ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์แสดงในตารางที่ 2.1 (Chen, 2010b).....	13
2.6	กระบวนการเมแทบอลิซึมของการชีวสังเคราะห์ mcl-PHA.....	16
2.7	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน.....	24
2.8	ขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซล และการนำกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้มาใช้เป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ในการผลิต PHA รวมทั้งการนำของเสียที่เป็นไขมันมาผลิต PHA โดยตรง(Koller และคณะ, 2010).....	24
2.9	วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนการสังเคราะห์ PHA โดยการใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน.....	27
2.10	การนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ (Chen, 2010b).....	29
2.11	องค์ประกอบของเครื่อง Gas chromatography.....	32
2.12	องค์ประกอบของเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี.....	36
2.13	กลไกการทำงานของ Gel permeation chromatography.....	37
2.14	องค์ประกอบของเครื่องเจลเพอร์มิเอชันโครมาโตรกราฟี.....	38

รูปที่		หน้า
4.1	โรงงานการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วของบริษัทวิทย์คอร์ป จำกัด มหาชน.....	55
4.2	ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตมาจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วของ บริษัทวิทย์คอร์ป จำกัด มหาชน.....	55
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.....	56
4.4	ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rRNA ของ *Acinetobacter* sp. ASC1 (GU227612) โดยใช้ 16S rRNA ของ *Pseudomonas oleovorans* (AY623816) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap.....	60
4.5	ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rRNA ของ *Pseudomonas* sp. ASC2 (GU227613) โดยใช้ 16S rRNA ของ *Cupriavidus necator* A-04 (EF988626) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap.....	61
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.....	62
4.7	ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. ASC4 (GU227615) โดยใช้ 16S rRNA ของ *Cupriavidus necator* A-04 (EF988626) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap.....	63

รูปที่ หน้า

4.8 ปริมาณน้ำหนักชีวมวลสุทธิ (กรัมต่อลิตร) ของ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA ที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล 10 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200..... 68

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..... 68

4.10 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ *Acinetobacter* sp. ASC1 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200..... 69

4.11 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ *Pseudomonas* sp. ASC2 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200..... 69

4.12 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ *Enterobacter* sp. ASC3 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200..... 70

4.13 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ *Bacillus* sp. ASC4 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200..... 70

4.14 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำหนักชีวมวลสุทธิ (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHA (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง (กรัมต่อลิตร) ของ *Pseudomonas* sp. ASC2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200..... 72

รูปที่ หน้า

4.15 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำหนักชีวมวลสุทธิ (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHA (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง (กรัมต่อลิตร) ของ *Bacillus* sp. ASC4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200..... 73

4.16 ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดในของเสียอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร) ในอาหารเพื่อการผลิต PHA ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 เมื่อเลี้ยงด้วย *Pseudomonas* sp. ASC2 และ *Bacillus* sp. ASC4..... 74

4.17 ลักษณะของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จาก *Pseudomonas* sp. ASC2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHAs ที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200..... 75

4.18 สเปกตรัมของ PHAs ที่ผลิตจาก *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 จาก ^{1}H-NMR ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A; ASC1 B; ASC2 C; ASC3 และ D; ASC4)..... 77

4.19 สเปกตรัมของ PHAs ที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. ASC2 จาก 2D-^{1}H–COSY ความถี่ 400 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส..... 80

4.20 สเปกตรัมของ PHAs ที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. ASC2 จาก ^{13}C-NMR ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส..... 81

4.21 โครงสร้างของ PHAs ที่ผลิตได้จาก *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4..... 83