



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การใช้ประโยชน์น้ำเสียโรงงานขนมเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตมอนอเมอร์พลาสติกชีวภาพโดยกากตะกอนจุลินทรีย์

Utilization of Confectionery Wastewater for Production of Bioplastic Monomer by Waste Activated Sludge

นามผู้วิจัย นางสาวปรารถนา วิชชุภณี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ปิยาภรณ์ สมสมักร, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จักรกฤษณ์ มหัจฉริยวงศ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้ประโยชน์น้ำเสียโรงงานขนมเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตมอนอเมอร์พลาสติกชีวภาพโดยกาก
ตะกอนจุลินทรีย์

Utilization of Confectionery Wastewater for Production of Bioplastic Monomer by Waste
Activated Sludge

โดย

นางสาวปรารถนา วิชชุมณี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรารภณา วิชชุณี 2555: การใช้ประโยชน์น้ำเสียโรงงานนมเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตมอโนเมอร์พลาสติกชีวภาพโดยกากตะกอนจุลินทรีย์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม) สาขาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ปิยาภรณ์ สมสมัคร, Ph.D. 108 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสม polyhydroxybutyrate (PHB) ในกากตะกอนจุลินทรีย์โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานนมที่มีอัตราส่วน COD:N 75 มาเป็นวัตถุดิบและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHB ได้ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสม PHB นี้ทำโดยการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ การปรับอัตราส่วน chemical oxygen demand:nitrogen (COD:N) และการใช้แหล่งคาร์บอนเสริมชนิดต่างๆ จากการทดลองพบว่า เมื่อทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นต่ำ (1000 mg/l) สามารถกระตุ้นให้จุลินทรีย์สะสม PHB ได้ดีที่สุดเท่ากับ 67.60 mg/g เซลล์แห้ง เมื่อเปรียบเทียบการสะสม PHB ที่อัตราส่วน COD:N ต่างๆ ในสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง การสะสม PHB เพิ่มขึ้นตามอัตราส่วน COD:N นอกจากนี้ที่สภาวะ COD:N 75-120 การสะสม PHB ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า น้ำเสียโรงงานนมมีปริมาณสารอินทรีย์และไนโตรเจนที่เหมาะสม สามารถสร้างสภาวะการเจริญที่ไม่สมดุลและกระตุ้นให้จุลินทรีย์สะสม PHB ได้ เมื่อการเจริญและสะสม PHB อยู่ภายใต้อิทธิพลของสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ อัตราส่วน COD:N น้อยกว่า 120 ไม่มีผลต่อการสะสม PHB ส่วนที่อัตราส่วน COD:N 120 สามารถกระตุ้นจุลินทรีย์ให้สะสม PHB สูงสุด 64.47 mg/g เซลล์แห้ง ในการศึกษาแหล่งคาร์บอนเสริมชนิดต่างๆ พบว่าน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมที่ดีที่สุด ส่วนการปรับ COD:N มากกว่า 120 ส่งผลให้การสะสม PHB ลดลง ทำการคัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHB โดยการจำกัดอากาศร่วมกับการอดอาหาร จากนั้นคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHB ได้จากกากตะกอนจุลินทรีย์ 4 ไอโซเลท และเมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้มาศึกษาในสภาวะการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ที่อัตราส่วน COD:N 120 และใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม พบว่า จุลินทรีย์ไอโซเลท 3 สามารถสะสม PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 189.45 mg/g เซลล์แห้ง

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Prathana Vichumane 2012: Utilization of Confectionery Wastewater for Production of Bioplastic Monomer by Waste Activated Sludge. Master of Science (Environmental Technology and Management), Major Field: Environmental Technology and Management, Department of Environmental Science. Thesis Advisor: Mrs. Piyapawn Somsamak, Ph.D. 108 pages.

This research investigated the conditions stimulating polyhydroxybutyrate (PHB) accumulation in waste activated sludge by using the confectionery wastewater with COD:N 75 as raw materials and screened for PHB accumulating organisms. The conditions examined were aerated: non-aerated cycle, chemical oxygen demand: nitrogen (COD:N) ratios and source of carbon supplement. The results showed that waste activated sludge incubated under 15:9 h aerated: non-aerated cycles with the initial biomass concentration of 1000 mg/L demonstrating the highest PHB accumulation at 67.60 mg/g dry weight. When the accumulation of PHB at various COD:N ratios was examined, PHB accumulation increased with higher COD:N ratios under aerated cycle 24 h. Moreover, at COD:N ratio 75-120 the accumulation of PHB was not different statistically. It suggests that the confectionery wastewater contains suitable amount organic carbon and nitrogen which can stimulate unbalanced growth conditions and enhanced PHB accumulation. While being incubated under aerated: non-aerated cycles, COD:N less than 120 did not affect the PHB accumulation. At COD:N 120, however; the highest PHB accumulation of 64.47 mg/g dry weight was obtained. COD:N ratios greater than 120 demonstrated inhibitory effects to PHB accumulation. When several compounds were tested as source of carbon supplement, sucrose supplement yielded highest PHB accumulation. Waste activated sludge were enriched and screened for PHB accumulating organisms. Then 4 bacterial isolates were selected. Upon incubated under aerated: non-aerated 15:9 h using confectionery wastewater supplemented with sucrose (COD:N 120), Isolate 3 gave the PHB accumulation of 189.45 mg/g dry weight.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับสมบูรณ์เล่มนี้ได้รับการอุปการะและช่วยเหลือจากผู้มีพระคุณหลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ปิยาภรณ์ สมสมักร ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย และคำแนะนำด้านต่างๆ เกี่ยวกับงานวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขรายงานฉบับสมบูรณ์จนกระทั่งเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณ บริษัท ชวนพัฒน์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสียเพื่อใช้ในการวิจัยนี้ด้วยดีเสมอมา

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหัศจรรย์ สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี รหัสโครงการ WII525S042 และความเห็นในรายงานผลการวิจัยเป็นของผู้รับทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อคุณแม่ และคณาจารย์ที่ได้อบรมสั่งสอนและให้คำแนะนำแก่ข้าพเจ้าตลอดมาขอขอบคุณรุ่นพี่และเพื่อนๆ ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ซึ่งไม่อาจกล่าวนามได้หมดในที่นี้ ที่คอยให้ความช่วยเหลือคำแนะนำและเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดีเสมอมา

ปรารธนา วิชชุณี

เมษายน 2555

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายและสัญลักษณ์ย่อ	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	33
สรุปและข้อเสนอแนะ	63
สรุป	63
ข้อเสนอแนะ	64
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	65
ภาคผนวก	71
ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์	72
ภาคผนวก ข ตารางแสดงผลการทดลอง	78
ภาคผนวก ค ภาพแสดงผลการทดลอง	96
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	108

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติทางกายภาพบางประการของ PHB	8
2	การสะสม PHB ในเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	13
3	ลักษณะของน้ำเสียที่ใช้ในการศึกษา	33
4	ปริมาณ PHB ที่ 72 ชั่วโมง ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง ให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 21:3 ชั่วโมง และ 15:9 ชั่วโมง ที่ ระดับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น (MLSS) ต่างๆ กัน	38
5	ปริมาณ PHB ที่ 96 ชั่วโมง ที่อัตราส่วน COD:N ต่างๆ ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง และให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	43
6	ปริมาณ PHB ที่ 96 ชั่วโมง ที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	48
7	ปริมาณ PHB ในวันที่ 35 ที่สภาวะการให้อาหารทุก 2 3 5 และ 7 วัน ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง และสภาวะการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	53
8	ปริมาณ PHB ที่ 72 ชั่วโมง ในไอโซเลท 1 2 3 และ 4 ที่อัตราส่วน COD:N 120 ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง และสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	60
9	การผลิต PHB จากกากตะกอนจุลินทรีย์ที่สภาวะต่างๆ	61
10	การผลิต PHB จากเชื้อบริสุทธิ์ที่สภาวะต่างๆ	62
ตารางผนวกที่		
ข1	คุณลักษณะและปริมาณ PHB ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกันร่วมกับสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง	79
ข2	คุณลักษณะและปริมาณ PHB ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกันร่วมกับสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 21:3 ชั่วโมง	80

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข3	คุณลักษณะและปริมาณ PHB ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกันร่วมกับสภาวะให้ อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	81
ข4	คุณลักษณะและปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N ต่างกันร่วมกับสภาวะให้ อากาศ 24 ชั่วโมง	82
ข5	คุณลักษณะและปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N ต่างกันร่วมกับสภาวะให้ อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	83
ข6	คุณลักษณะและปริมาณ PHB โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมต่างกันที่อัตราส่วน COD:N ต่างกันร่วมกับสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง	84
ข7	คุณลักษณะและปริมาณ PHB โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมต่างกันที่อัตราส่วน COD:N ต่างกันร่วมกับสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	87
ข8	ปริมาณ PHB ที่สภาวะการได้รับอาหารต่างกันร่วมกับสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง	90
ข9	ปริมาณ PHB ที่สภาวะการได้รับอาหารต่างกันร่วมกับสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	91
ข10	คุณลักษณะและปริมาณ PHB โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่อัตราส่วน COD:N 75 และ 120 ร่วมกับสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง	92
ข11	คุณลักษณะและปริมาณ PHB โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่อัตราส่วน COD:N 75 และ 120 ร่วมกับสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	94

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHA	6
2	ขั้นตอนการสังเคราะห์ PHB	11
3	ผลของสภาวะแวดล้อมต่อการสังเคราะห์ PHB	12
4	ค่า COD ของน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองที่สภาวะการให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	36
5	ค่า COD ของน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองที่สภาวะการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 21:3 ชั่วโมง	36
6	ค่า COD ของน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองที่สภาวะการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	37
7	PHB ที่ 72 ชั่วโมง ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง ให้อากาศสลับกับไม่ให้ อากาศ 21:3 ชั่วโมง และ 15:9 ชั่วโมง ที่ ระดับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น (MLSS) ต่างๆ กัน	37
8	ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N ต่างๆ ในสภาวะการให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	41
9	ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N ต่างๆ ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้ อากาศ 15:9 ชั่วโมง	41
10	ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N ต่างๆ ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	42
11	ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N ต่างๆ ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	42
12	ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ใน สภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	46
13	ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 150 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ใน สภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	46
14	ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 170 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ใน สภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	47
15	PHB ที่ 96 ชั่วโมง ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ที่แหล่ง คาร์บอนเสริมต่างกัน	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	COD ในการทดลองที่ได้รับอาหารทุก 2 วัน (a), 3 วัน (b), 5 วัน (c) และ 7 วัน (d) ที่สภาวะการให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	50
17	COD ในการทดลองที่ได้รับอาหารทุก 2 วัน (a), 3 วัน (b), 5 วัน (c) และ 7 วัน (d) ที่สภาวะการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	51
18	ปริมาณ PHB ที่สภาวะการให้อาหารทุก 2 3 5 และ 7 วัน ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	52
19	ปริมาณ PHB ที่สภาวะการให้อาหารทุก 2 3 5 และ 7 วัน ในสภาวะให้อากาศ สลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	52
20	เซลล์จุลินทรีย์ที่มี PHB โดยย้อมแบบ negative stain	54
21	การสะสม PHB ในเซลล์จุลินทรีย์	54
22	ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 75 ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	57
23	ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้ น้ำตาลทรายเป็นแหล่ง คาร์บอนเสริม ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	58
24	ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 75 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้ อากาศ 15:9 ชั่วโมง	58
25	ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้ น้ำตาลทรายเป็นแหล่ง คาร์บอนเสริม ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	59
26	PHB ที่ 72 ชั่วโมง ในไอโซเลท 1 2 3 และ 4 ที่อัตราส่วน COD:N 75 และ 120 ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	59
27	PHB ที่ 72 ชั่วโมง ในไอโซเลท 1 2 3 และ 4 ที่อัตราส่วน COD:N 75 และ 120 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	60
ภาพผนวกที่		
ค1	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ PHB กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร	97

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
ค2	ปริมาณ MLSS ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกัน	97
ค3	ปริมาณ MLSS ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 21:3 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกัน	98
ค4	ปริมาณ MLSS ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกัน	98
ค5	ปริมาณ MLSS ที่อัตราส่วน COD:N ต่างกัน ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	99
ค6	ปริมาณ MLSS ที่อัตราส่วน COD:N ต่างกัน ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	99
ค7	ปริมาณ MLSS ที่อัตราส่วน COD:N 120 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	100
ค8	ปริมาณ MLSS ที่อัตราส่วน COD:N 150 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	100
ค9	ปริมาณ MLSS ที่อัตราส่วน COD:N 170 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	101
ค10	ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	101
ค11	ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 150 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	102
ค12	ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 170 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	102
ค13	ปริมาณ MLSS ที่สภาวะได้รับอาหารทุก 2 3 5 และ 7 วัน ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	103
ค14	ปริมาณ MLSS ที่สภาวะได้รับอาหารทุก 2 3 5 และ 7 วัน ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	103
ค15	ปริมาณ MLSS ที่ อัตราส่วน COD:N 75 ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	104

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค16 ปริมาณ MLSS ที่ อัตราส่วน COD:N 75 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	104
ค17 ปริมาณ MLSS ที่ อัตราส่วน COD:N 75 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	105
ค18 ปริมาณ MLSS ที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	105
ค19 ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 75 ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	106
ค20 ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	106
ค21 ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 75 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง	107
ค22 ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง	107

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AS	=	Activated Sludge
BOD	=	Biological Oxygen Demand
COD:N	=	Chemical Oxygen Demand:Nitrogen
COD	=	Chemical Oxygen Demand
MLSS	=	Mixed Liquor Suspended Solids
TKN	=	Total Kjeldahl Nitrogen
PHA	=	Polyhydroxyalkanoate
PHB	=	Polyhydroxybutyrate

การใช้ประโยชน์น้ำเสียโรงงานขนมเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตมอนอเมอร์พลาสติกชีวภาพโดยกากตะกอนจุลินทรีย์

Utilization of Confectionery Wastewater for Production of Bioplastic Monomer by Waste Activated Sludge

คำนำ

การใช้พลาสติกเป็นปริมาณมากในปัจจุบันทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม เช่น พลาสติกตกค้างในสิ่งแวดล้อมเนื่องจากไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ นอกจากนี้แหล่งพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกเป็นทรัพยากรที่ไม่สามารถทดแทนได้ใหม่ การผลิตพลาสติกชีวภาพจากวัตถุดิบที่สามารถทดแทนได้ใหม่จึงเป็นทางเลือกสำหรับอนาคตเพื่อสังคมและสิ่งแวดล้อมที่ยั่งยืน แม้ว่าโพลิเมอร์ชีวภาพจะสามารถผลิตได้หลายวิธี แต่วิธีที่ได้รับความสนใจคือ โพลิเมอร์ชีวภาพที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ได้แก่ polyhydroxyalkanoates (PHAs) PHAs ที่ได้รับการศึกษามากที่สุดคือ polyhydroxybutyric acid (PHB) ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับพลาสติกจากเชื้อเพลิงฟอสซิลชนิดโพลิโพรไพลีน (polypropylene, PP) แต่ PHB สามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามพลาสติกจาก PHB ยังไม่สามารถแข่งขันกับพลาสติกจากเชื้อเพลิงฟอสซิลได้เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตสูง การลดต้นทุนการผลิตสามารถทำได้โดยการคัดเลือกและสร้างสภาวะช่วยให้จุลินทรีย์สามารถผลิต PHB ในปริมาณเพิ่มขึ้นจากสภาวะปกติการปรับปรุงกระบวนการหมักและการสกัด PHB ที่มีประสิทธิภาพ การใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก หรือของเสียที่ไม่มีมูลค่า เช่น น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นต้น มาเป็นสารอาหาร และการนำกากตะกอนจุลินทรีย์มาผลิต PHB ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการผลิต และยังเป็นการนำของเสียกลับมาใช้ใหม่ได้อีกด้วย

โครงการวิจัยนี้ ศึกษาการผลิต PHB จากกากตะกอนจุลินทรีย์ซึ่งไม่จำเป็นต้องอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อและใช้น้ำเสียจากโรงงานขนมซึ่งมีสารอินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำเสียสูงเป็นวัตถุดิบ โดยทำการกระตุ้นการสะสม PHB ให้ได้ผลผลิตในปริมาณที่สูงขึ้น โดยสร้างสภาวะการเจริญที่ไม่สมดุล และทำการคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณสูง ผลของงานวิจัยจะนำไปสู่

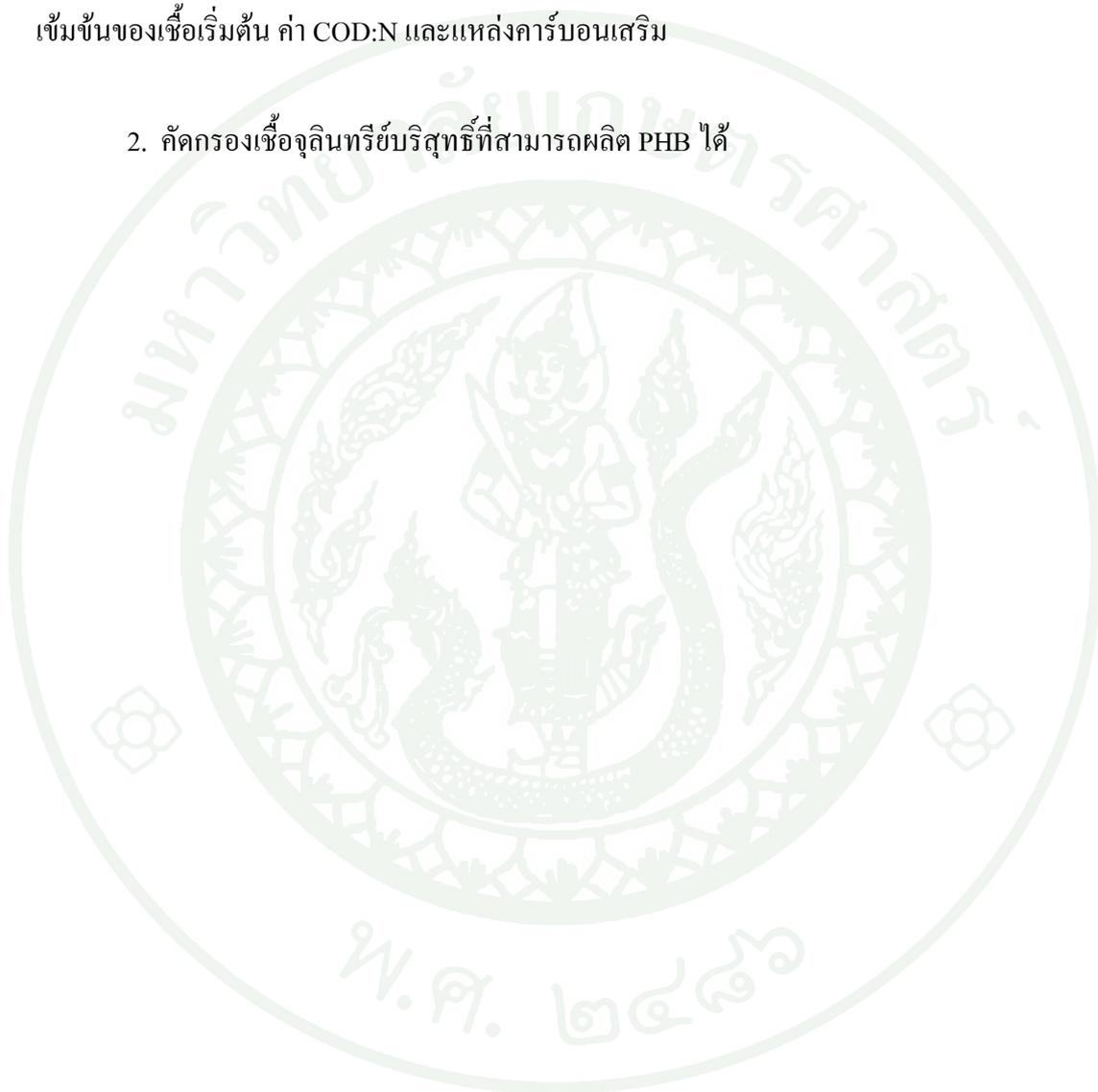
ความเป็นไปได้ที่จะใช้ประโยชน์ของความหลากหลายทางชีวภาพและการจัดการสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืนและครบวงจร โดยเลือกใช้วัตถุดิบราคาถูกโดยเฉพาะจากของเสียหรือน้ำเสียจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อลดต้นทุนในการผลิตพลาสติกชีวภาพ



วัตถุประสงค์

1. ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยบางประการในการกระตุ้นการผลิต PHB ในภาคตะกอน จุลินทรีย์ที่ใช้บำบัดโรงงานนมเป็นวัตถุประสงค์ได้แก่ การให้อากาศสลักับไม่ให้อากาศ ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น ค่า COD:N และแหล่งคาร์บอนเสริม

2. คัดกรองเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่สามารถผลิต PHB ได้



การตรวจเอกสาร

พลาสติกจัดเป็นวัสดุกลุ่มหลักๆ กลุ่มหนึ่งที่มีการบริโภคในปริมาณมหาศาล ทั้งนี้ก็เพราะว่า พลาสติกมีคุณสมบัติเชิงวัสดุที่ได้เปรียบหลายประการ ที่เหมาะจะนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ คุณสมบัติที่โดดเด่นที่สุดของพลาสติกคือ ความเหนียว ทนต่อแรงฉีกและแรงดึง มีน้ำหนักเบา และที่สำคัญมีราคาถูกกว่าวัสดุอื่นๆ จึงทำให้มีการเลือกใช้แทนวัสดุประเภทไม้ โลหะ และกระดาษ ส่งผลให้การบริโภคพลาสติกตลอดระยะเวลา 3-4 ทศวรรษที่ผ่านมามีอัตราเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตัวอย่างกลุ่มผลิตภัณฑ์จากพลาสติกที่พบว่ามีการใช้แพร่หลายที่สุดคือ ผลิตภัณฑ์กลุ่มบรรจุภัณฑ์ไม่ว่าจะเป็นถัง ก่อง ขวด ถูประเภทต่างๆ และแผ่นฟิล์มสำหรับห่อสิ่งของ และด้วยความที่พลาสติกเป็นวัสดุหาง่ายราคาถูก การบริโภคพลาสติกในปัจจุบันจึงเป็นไปอย่างฟุ่มเฟือยและขาดการเอาใจใส่ ผลที่ตามมาคือ ปัญหามลพิษที่ยากแก่การจัดการและบำบัด นอกจากนี้ปัญหาด้านมลภาวะแล้ว ประเด็นเรื่องความยั่งยืนเชิงวัสดุก็เป็นอีกปัญหาหนึ่ง เนื่องจากพลาสติกที่ใช้กันอย่างแพร่หลายนั้น ส่วนใหญ่ได้มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งนำมันดิบเป็นวัสดุป้อนและนำมันดิบเป็นวัสดุสิ้นเปลืองใช้แล้วหมดไป ทำให้เกิดการกังวลว่าอาจเกิดภาวะขาดแคลนพลาสติกในอนาคตได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีการริเริ่มแนวคิดค้นคว้าเพื่อพัฒนาพลาสติกทางเลือกใหม่ขึ้นมาทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน โดยพลาสติกทางเลือกดังกล่าวจะต้องมีคุณสมบัติเทียบได้กับพลาสติกจากปิโตรเคมี แต่ต้องสามารถย่อยสลายได้ง่ายกว่าโดยกระบวนการทางชีวภาพและสามารถผลิตได้จากวัสดุหมุนเวียน โดยเฉพาะชีวมวลประเภทต่างๆ ที่สามารถผลิตทดแทนได้อย่างพอเพียง ซึ่งเรียกพลาสติกชนิดนี้ว่า พลาสติกชีวภาพ หรือ bioplastic

พลาสติกชีวภาพ (bioplastic)

1. พลาสติกชีวภาพชนิดสลายตัวได้ทางชีวภาพ

เป็นพลาสติกที่สลายตัวได้ด้วยจุลินทรีย์ตามหลักการจะต้องเป็นพลาสติกที่สังเคราะห์ขึ้นจากพืช แต่ปัจจุบันบางชนิดยังมีความจำเป็นต้องผลิตจากปิโตรเลียม ซึ่งคาดว่าในอนาคตจะพัฒนาเปลี่ยนเป็นการผลิตจากพืชทั้งหมด โดยมีคุณสมบัติพิเศษสามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ ให้กลายเป็นปุ๋ยหมักกลับคืนสู่ดินเพื่อทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมี และยังเหมาะกับงานที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่สัมผัสอาหาร โดยสลายตัวไปพร้อมๆ กับเศษอาหารหรือขยะอินทรีย์ แทนการใช้พลาสติกธรรมดา

ทั่วไป ซึ่งเมื่อเปราะเปื้อนอาหารต้องนำไปเผาอย่างเดียวไม่คุ้มค่าที่จะนำไปรีไซเคิล จึงต้องทำลายด้วยการเผาทำให้เกิดก๊าซพิษในบรรยากาศและก๊าซเรือนกระจก

2. พลาสติกชีวภาพชนิดสลายตัวไม่ได้ทางชีวภาพ

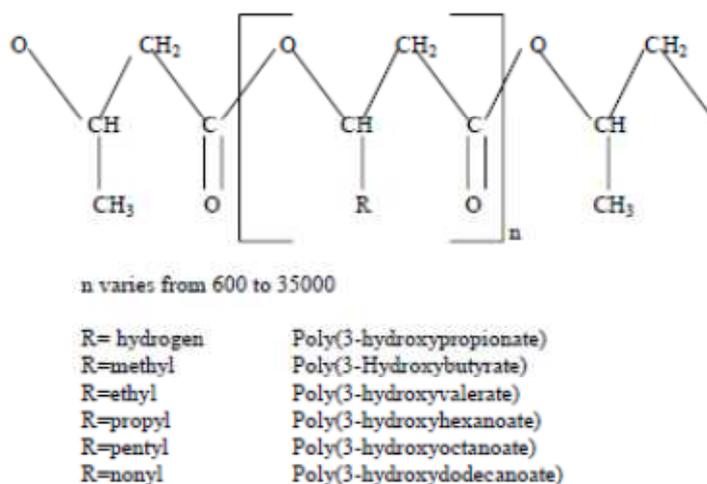
เป็นพลาสติกที่สังเคราะห์ขึ้นจากพืชเท่านั้นเช่น มันสำปะหลัง อ้อย ข้าวโพด เป็นต้น โดยมีคุณสมบัติเหมือนพลาสติกธรรมดาทั่วไปที่ได้จากปิโตรเลียมทุกประการ แต่สลายตัวไม่ได้ทางชีวภาพ คือไม่สลายตัวได้ด้วยจุลินทรีย์ ใช้พลังงานในการผลิตน้อยกว่าพลาสติกตัวเดียวกับที่ทำจากปิโตรเลียม จึงถือว่ามีคาร์บอนไดออกไซด์สู่บรรยากาศในจำนวนที่น้อยกว่า

ในปัจจุบันมีการพัฒนาพลาสติกชีวภาพขึ้นมาหลายชนิดด้วยกัน แต่ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงพลาสติกจากปิโตรเคมีมากที่สุด และมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมแล้วมีอยู่ 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ กรดโพลีแลคติก (polylactic acid: PLA) และ โพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates: PHAs) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำพลาสติกชีวภาพทั้งสองกลุ่มนี้มาเทียบคุณสมบัติเชิงวัสดุแล้วพบว่า กรดโพลีแลคติก มีคุณสมบัติความเป็นพลาสติกที่ค่อนข้างดีน้อยกว่า โดยเฉพาะการมีความเปราะและความกรอบสูงทำให้มีข้อจำกัดมากกว่าในการนำไปประยุกต์ใช้ แต่ในส่วนของ PHA นั้น พบว่ามีความเป็นพลาสติกที่ดีกว่า เหมาะกับการขึ้นรูปด้วยความร้อน และสามารถประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางมากกว่า โดยโพลิเมอร์ ชนิดนี้มีอนุพันธ์หลายชนิดด้วยกัน และที่สำคัญคือ PHA เป็น โพลิเมอร์กลุ่มเดียวที่ใช้กระบวนการสังเคราะห์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นในจุลินทรีย์ (พิฑูร, 2555)

โพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate, PHA)

PHA เป็นโพลิเมอร์เอสเทอร์ชนิดหนึ่งจัดอยู่ในกลุ่มไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งถูกสังเคราะห์และสะสมได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตประเภทโปรคาริโอต และยูคาริโอต ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ รา สาหร่าย และยีสต์ PHA ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ในภาวะที่มีการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือ ออกซิเจน และมีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ โดย PHA ที่สังเคราะห์ขึ้นจะถูกเก็บไว้ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ซึ่งจำนวนและขนาดของแกรนูลในแต่ละเซลล์ จะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น *Ralstonia eutropha* จะมีแกรนูล 8-13 แกรนูลต่อเซลล์ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแกรนูลเท่ากับ 0.2-

0.5 ไมครอน (Doi, 1987) PHA ประกอบด้วยหน่วยมอโนเมอร์หลายชนิดโดยพบมากกว่า 80 ชนิด ซึ่งทั้งหมดอยู่ในรูป D(-)-configuration เนื่องจากความจำเพาะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHA โดยมีองค์ประกอบของโครงสร้างอยู่ในรูปของกรดไขมัน R-(3)-hydroxy fatty acid หรือ R-β- hydroxy fatty acid โดยมีโครงสร้างทั่วไปดังภาพที่ 1 น้ำหนักโมเลกุลของ PHA จะอยู่ในช่วง 200,000-3,000,000 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะในการเจริญของเชื้อ



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHA

ที่มา: Khanna and Srivastava (2005)

องค์ประกอบของ PHA มีหน่วยย่อยของมอโนเมอร์ชนิดต่างๆ รวมกันเกิดเป็นสายโพลีเมอร์ยาวหรือสั้นขึ้นอยู่กับจำนวนมอโนเมอร์ที่มาต่อรวมกัน ได้แก่

- สายโซ่สั้น (short-chain-length PHAs) ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 3-5 อะตอมโดยตำแหน่งที่ถูกออกซิไดส์อาจจะไม่ใช่ตำแหน่งที่ 3 แต่อาจเป็นตำแหน่งอื่น เช่น 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต 4-ไฮดรอกซีวาเลอริก และ 5-ไฮดรอกซีวาเลอริก

- สายโซ่กลาง (medium-chain-length PHAs) ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 6-14 อะตอม โดยตำแหน่งที่มีมอโนเมอร์ถูกออกซิไดส์จะเป็นตำแหน่งที่ 3 ทั้งหมดยกเว้น 4-ไฮดรอกซีเฮกซานอเอต

- สายโซ่ยาว (long-chain-length PHAs) ประกอบด้วยคาร์บอนมากกว่า 14 อะตอมมอโนเมอร์ของ PHA นั้นมีอยู่ด้วยกันหลายแบบ ทั้งที่เป็นสายโซ่ตรง เป็นกิ่ง แบบอิมิตัว ไม่มีอิมิตัว และมีหมู่อะโรมาติกคาร์บอน

PHA สายโซ่สั้นจะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมีมากที่สุดขณะที่ PHA สายโซ่กลางจะมีคุณสมบัติเป็น elastomers นอกจากนี้ PHA ยังสามารถแบ่งได้ตามลักษณะการเชื่อมต่อกันของมอโนเมอร์ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ โฮโมโพลิเมอร์ เป็นโพลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน เช่น การเชื่อมต่อกันของกรดไขมันชนิดไฮดรอกซีซีบิวทิเรต (hydroxybutyrate, HB) โดยมีหมู่เมทิลมาต่อกับสายโพลิเมอร์หลักตรงตำแหน่ง β หรือตำแหน่งที่ 3 และมีมอโนเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์เกิดเป็นสารประกอบ poly- β -hydroxybutyrate หรือ PHB โดยมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีคล้ายกับโพลิเมอร์สังเคราะห์ คือ โพลิโพรพิลีนหรือโพลิเอทิลีน ซึ่งสามารถนำมาอัด ปั่น ให้เป็นเส้นใยเพื่อทำเป็นแผ่นฟิล์มได้ ขณะที่โคโพลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยมอโนเมอร์หลายชนิดมาต่อรวมกัน เช่น โพลิไฮดรอกซีซีบิวทิเรตโคไฮดรอกซีวาเลอริค (poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) ประกอบด้วยมอโนเมอร์ที่เป็นไฮดรอกซีซีบิวทิเรต และไฮดรอกซีวาเลอริค ซึ่งเป็นโคโพลิเมอร์ที่เกิดแบบสุ่มและมีโอกาสเกิดได้สูงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะไฮดรอกซีวาเลอริค เกิดได้ตั้งแต่ 0-95 เปอร์เซ็นต์ โมล ซึ่งจะช่วยปรับปรุงลักษณะทางกายภาพของพลาสติกชีวภาพได้ดีขึ้น โดยสัดส่วนของไฮดรอกซีวาเลอริคยิ่งสูงจะช่วยให้โคโพลิเมอร์มีความแข็งแรงมากขึ้น จุดหลอมเหลวลดลง มีความยืดหยุ่น และมีค่า elongation เพิ่มขึ้น ดังนั้น สามารถเพิ่มคุณภาพของโพลิเมอร์ได้โดยการควบคุมสัดส่วนของ 3-hydroxyvalerate ให้เหมาะสม (Khanna and Srivastava, 2005)

โพลิไฮดรอกซีซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, PHB)

PHB เป็นโพลิเมอร์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ประกอบด้วยหมู่คาร์บอนิล ออกซิเจน และหมู่เมทิล มีจุลินทรีย์มากกว่า 20 ชนิด ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ไว้ภายในเซลล์แบคทีเรียในลักษณะของแกรนูล เช่น *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Micrococcus*, *Rhizobium* เป็นต้น

การค้นพบและคุณสมบัติของ PHB

Marchessault (1996) รายงานว่า PHB ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1925 โดยนาย Lemoign ต่อมาในปี ค.ศ. 1958, Forsthe *et al.* พบว่าแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดสามารถสะสม PHB ได้ และในปีเดียวกันนี้ Williamson และ Wilkinson ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ PHB ในมวลชีวภาพโดยการสกัด PHB ออกจากเซลล์ด้วยสารละลายไฮโปคลอไรต์ซึ่งสารละลายนี้จะละลายองค์ประกอบของเซลล์ทั้งหมดยกเว้น PHB ความเข้มข้นของ PHB ประมาณได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ต่อมานักชีวเคมีได้ทำการศึกษาถึงลักษณะของเซลล์และวิธีวิเคราะห์ปริมาณ PHB รวมไปถึงกลไกการสังเคราะห์ การย่อยสลาย และหน้าที่ของ PHB ในกระบวนการเมแทบอลิซึม (Lafferty *et al.*, 1988)

PHB เป็นโพลีเมอร์ขนาดใหญ่ สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด และไม่ละลายในสารประกอบมีขี้ ความหนาแน่นของ PHB อยู่ระหว่าง 1.17-1.26 กรัมต่อลูกบาศก์ เซนติเมตร PHB ที่มีความหนาแน่นต่ำจะไม่มีรูปร่างที่แน่นอนแต่หากความหนาแน่นสูงจะสามารถตกผลึกได้ ส่วนจุดหลอมเหลวจะแปรผันระหว่าง 171-182 องศาเซลเซียส (Lafferty *et al.*, 1988) คุณสมบัติทางกายภาพบางประการแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของ PHB

material	tensile strength T_B (N cm^{-2})	extension to break B (%)	modulus M ($\text{N cm}^{-2} \times 10^{-3}$)
PHB	1500-2500	8	800-1000
polyethylene	800-3500	400-800	200-1400
polypropylene	2100-3700	150-400	1100-1300
polystyrene	4000-6500	3-5	3300
polyvinylchloride (hard)	4000-6000	10-50	2000-3000
plexiglass	7000-7600	4	3000
polyamide	5000-9000	50-200	1300-3000

ที่มา: Lafferty *et al.* (1988)

กระบวนการสังเคราะห์ PHA

1. กลไกการทำงานของเอนไซม์

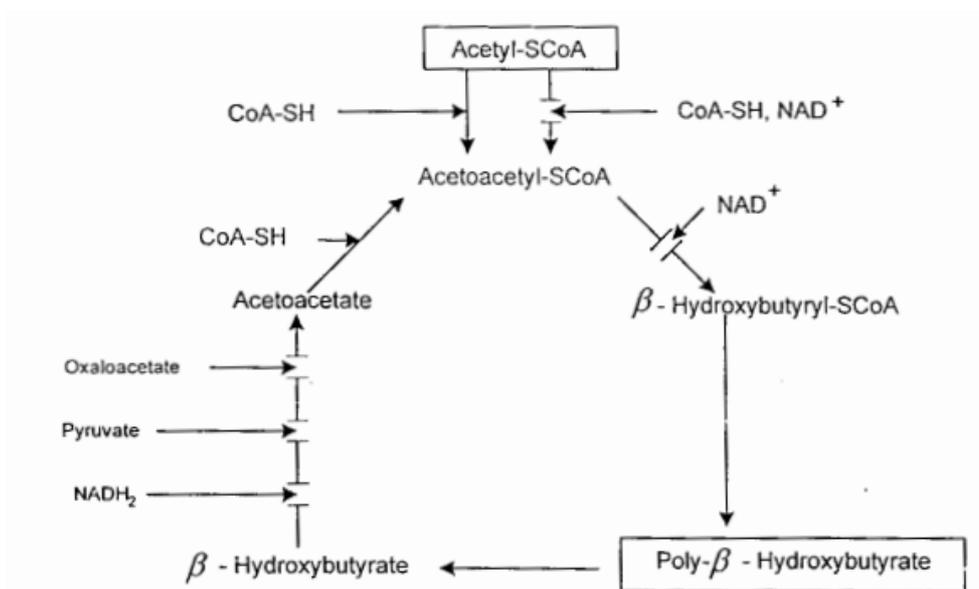
การสังเคราะห์ PHA ชนิดต่างๆ จะมีเอนไซม์ PHA synthase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอน ในการสะสม PHA ในเซลล์นั้นจะมีเอนไซม์อยู่รอบๆ พื้นผิวของ PHA แกรนูล นอกจากนี้ยังมีโปรตีน phasin และ specific regulator proteins ที่มีความสำคัญ เมื่อการสังเคราะห์ PHA เป็นอิสระจากแม่แบบ และเริ่มกระบวนการของเอนไซม์ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีความหลากหลาย และมีความสัมพันธ์กับการเกิดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีขึ้นมากกว่า 60 ชนิด ของเอนไซม์ PHA synthase จากการโคลนและศึกษาลำดับเบสของแบคทีเรีย และลำดับเบสของเอนไซม์ PHA synthase มีการบันทึกองค์ประกอบของหน่วยย่อยและความจำเพาะต่อสารอาหารของกลุ่มเอนไซม์ที่แตกต่างกัน 3 กลุ่ม ซึ่งมีผลในการรวมตัวกันของกรดอินทรีย์สายสั้น หรือสายกลาง

การควบคุมการผลิต PHA นั้นพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับ *phaCBA* cluster ซึ่งประกอบด้วย *phaA* *phaB* และ *phaC* โดย *phaA* เป็นส่วนที่ควบคุมสำหรับการผลิตเอนไซม์ 3-ketothiolase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลง acetyl-CoA ไปเป็น acetoacetyl-CoA สำหรับ *phaB* เป็นส่วนควบคุมการผลิตหรือสร้างเอนไซม์ NADPH-oxidoreductase ซึ่งทำให้การเปลี่ยนแปลง acetoacetyl-CoA ให้เป็น R-3-hydroxybutyryl-CoA และสำหรับ *phaC* เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ PHA polymerase โดยทำการสังเคราะห์โพลีเมอร์จาก R-3-hydroxybutyryl-CoA ส่วน *phaP* ทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของ PHA แกรนูล นั่นคือโปรตีน phasin ซึ่งเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ โดยมีการสะสมเมื่อเกิดกระบวนการสังเคราะห์ และมีหน้าที่ส่งเสริมการผลิตด้วยการเชื่อมกับแกรนูลเพื่อทำการควบคุมขนาด จำนวน และพื้นที่ผิวของสาร PHA การสังเคราะห์และการสะสม phasin เป็นกลไกที่เกิดขึ้นร่วมกับ *phaR* ซึ่งเป็น autoregulate repressor อย่างไรก็ตาม การควบคุมขนาด และจำนวนของสาร PHA ก็ยังขึ้นกับปริมาณของ *phaC* ที่มีอยู่ในเซลล์อีกด้วย และยังมี *phaZ* ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ depolymerase เพื่อใช้ปลดปล่อย R-3-hydroxybutyrate เมื่อมี PHB ไม่พอเพียงพบว่า *phaZ* จะทำการผลิตเอนไซม์ออกมาในรูปแบบที่ไม่สามารถก่อให้เกิดกิจกรรมได้ ซึ่งต้องอาศัยตัวกระตุ้น เช่น ทริปซิน เป็นตัวกระตุ้นทำให้มีข้อสังเกตว่า *phaZ* จะผลิตเอนไซม์ออกมาในรูปแบบของ proenzyme ในขณะที่เดียวกันการสลาย PHB แกรนูล จำเป็นต้องอาศัย proteolytic

enzyme ร่วมเช่นกัน มีการคาดการณ์ว่า depolymerase น่าจะทำงานร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ อีกหลายชนิด (Luengo *et al.*, 2003)

2. วิธีการสังเคราะห์ PHB

PHB ถูกสังเคราะห์จากเอนไซม์ 3 ชนิดและเกี่ยวข้องกับสารในวัฏจักรเครปป์ (Kreb' cycle) โดยเริ่มจาก acetyl-CoA เปลี่ยนเป็น acetoacetyl-CoA และ hydroxybutyryl-CoA ตามลำดับ โดยการทำงานของเอนไซม์ 3-ketothiolase acetoacetyl-CoA reductase จากนั้นจะเกิดกระบวนการ polymerization ของ hydroxybutyryl-CoA ไปเป็น PHB ด้วยเอนไซม์ poly (3-hydroxyalkanoate) synthase และ PHB ที่เกิดขึ้นสามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์ β -hydroxybutyrate dehydrogenase การที่ acetyl-CoA จะถูกออกซิไดส์ผ่านวัฏจักรเครปป์ หรือเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB ขึ้นอยู่กับปริมาณสารต่างๆ คือ เมื่อมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป และมีการจำกัดสารอาหารบางชนิด ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน ซัลเฟอร์ เป็นต้น ซึ่งจะไปยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADH ทำให้สัดส่วนของ $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$ มีค่าเพิ่มขึ้น และส่งผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ citrate synthetase ซึ่งเอนไซม์นี้มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาระหว่าง oxaloacetate, OAA และ acetyl-CoA ไปเป็น citrate และให้โคเอนไซม์เอออกมา เมื่อเอนไซม์นี้หยุดการทำงานปริมาณโคเอนไซม์เอจะลดลง ทำให้เอนไซม์ acetyl-CoA acetyltransferase สามารถทำงานได้ ซึ่งปกติจะถูกยับยั้งโดยโคเอนไซม์เอที่มากเกินไป ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยารวมตัวกันของ acetyl-CoA ไปเป็น acetoacetyl-CoA และเข้าสู่การสังเคราะห์ PHB โดยสารดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนให้เป็น hydroxybutyryl-CoA โดยการเร่งปฏิกิริยาของ NADPH/NADH-linked acetoacetyl-CoA reductase และเกิดปฏิกิริยา polymerization ไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB synthetase สำหรับการย่อยสลาย PHB ภายในเซลล์หรือที่เรียกว่าปฏิกิริยา depolymerization จะอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งถูกควบคุมโดยเอนไซม์ 3-hydroxybutyrate dehydrogenase เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งโดย NADH ดังนั้นเมื่อเกิดปฏิกิริยา polymerization ก็จะไม่เกิดปฏิกิริยา depolymerization เนื่องจากเมื่อมีปริมาณสารต่างๆ ที่เอื้อให้เกิดปฏิกิริยา polymerization หรือมี NADH ทำให้ไปยับยั้งปฏิกิริยา depolymerization แต่เมื่อไม่มี NADH ทำให้ไปยับยั้งปฏิกิริยา polymerization เช่นเดียวกัน (Byrom, 1987)

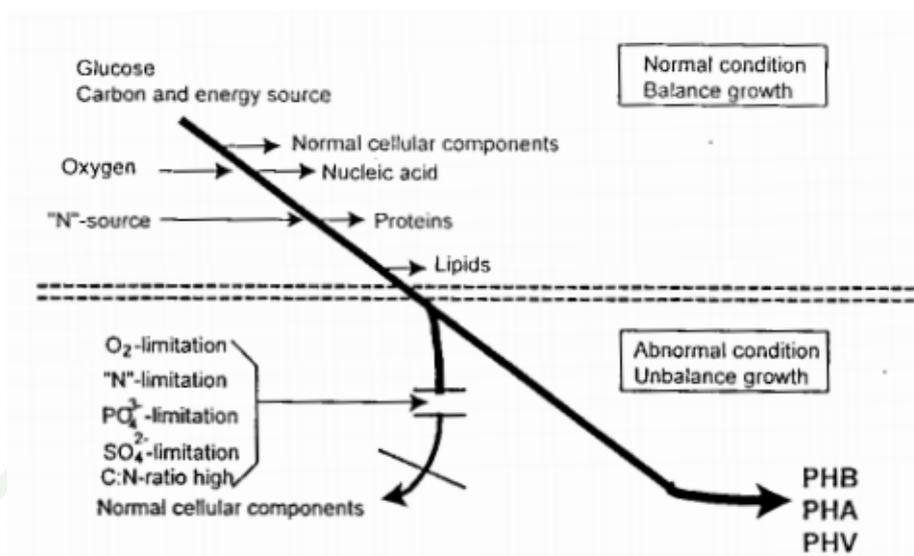


ภาพที่ 2 ขั้นตอนการสังเคราะห์ PHB

ที่มา: ดัดแปลงจาก Lafferty *et al.* (1988)

ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ PHB

การผลิตโพลิเมอร์โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพนั้นต้องคำนึงปัจจัยหลายประการที่จะส่งผลต่อชนิดและคุณสมบัติของโพลิเมอร์ที่ผลิตได้เนื่องจากมีกลไกการสังเคราะห์ที่ซับซ้อน ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ วิธีการเพาะเลี้ยง ปริมาณสารอาหารแร่ธาตุ ปริมาณออกซิเจน เป็นต้น (ภาพที่ 3) โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการสังเคราะห์ PHB มีดังนี้



ภาพที่ 3 ผลของสภาวะแวดล้อมต่อการสังเคราะห์ PHB

ที่มา: Lafferty *et al.* (1988)

1. ชนิดของจุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของโพลิเมอร์ที่ต้องการผลิต พบว่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันแต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์ในการผลิต PHA จะส่งผลให้โพลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันออกไปด้วย กล่าวคือ จุลินทรีย์บางสายพันธุ์อาจผลิตโพลิเมอร์ในรูปโฮโมโพลิเมอร์ ในขณะที่จุลินทรีย์อีกชนิดอาจผลิตในรูปโคโพลิเมอร์ เช่น เมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่ *A. eutrophus* R3 พบว่ามีการผลิตโพลิเมอร์ในรูปโคโพลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) แต่เมื่อมีการใช้แหล่งคาร์บอนเดียวกันเดิมให้แก่ *A. eutrophus* ATCC 17697 พบว่ามีการผลิต PHB ซึ่งเป็นโฮโมโพลิเมอร์ (Anderson and Wynn, 1995) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการผลิต PHB จากจุลินทรีย์หลายชนิด พบว่า จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตโพลิเมอร์ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2 และจุลินทรีย์ที่มีการวิจัยค้นคว้าเพื่อใช้ผลิต PHB กันอย่างกว้างขวาง คือ *A. eutrophus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ง่าย และสามารถสร้าง PHB ไว้ภายในเซลล์ได้มากถึงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่ง Grothe *et al.* (1999) รายงานว่าแบคทีเรีย *A. eutrophus* สามารถสะสม PHB ได้เมื่อถูกจำกัดสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ฟอสเฟต แต่มีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไปสำหรับการเจริญ โดยในระยะแรกที่มีสารอาหารที่มีความเข้มข้นสูงแบคทีเรีย

จะมีการเจริญและสร้างมวลเซลล์ จากนั้นในระยะที่สองแบคทีเรียจึงมีการสะสม PHB ขึ้นภายในเซลล์เมื่อสารอาหารเริ่มลดน้อยลง

นอกจากนี้การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์สามารถช่วยทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพได้มีคุณภาพดีและมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHB โดยการ overexpression ยีน *pha* ชนิดต่างๆ เช่น การทำ recombinant *E. coli* จากการตัดต่อยีน *phaC* ของ *Pseudomonas* sp. ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต mcl-PHA synthase เพื่อทำให้เกิดการสังเคราะห์ PHA ที่มีสายโซ่กลางขึ้นไป (Suriyamonkol et al., 2007)

ตารางที่ 2 การสะสม PHB ในเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHB ได้	ปริมาณการสะสม PHB (% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	96
<i>Azospirillum</i>	75
<i>Azotobacter</i>	73
<i>Baggiatoa</i>	57
<i>Leptothrix</i>	67
<i>Methylocystis</i>	70
<i>Pseudomonas</i>	67
<i>Rhizobium</i>	57
<i>Rhodobacter</i>	80

ที่มา: Lee (1996)

2. แหล่งคาร์บอน

ในธรรมชาติมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์ PHA ได้และใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน โดยสารตั้งต้นที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA ได้นั้นมีหลายประเภทขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ โดยสามารถจำแนกออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มคาร์โบไฮเดรต กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส
2. กลุ่มแอลกอฮอล์ เมทานอล กลีเซอรอล
3. กลุ่มอัลเคน เฮกเซน ถึง โดเดคเคน
4. กลุ่มกรดอินทรีย์ตั้งแต่กรดบิวทริกขึ้นไป

นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำเสียซึ่งเป็นวัตถุดิบได้หลายชนิด เช่น น้ำเสียโรงงานนม น้ำเสียโรงงานแป้ง น้ำเสียกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม เป็นต้น (Doi, 1987) จากงานวิจัยของ Wang *et al.* (2007) เมื่อศึกษาองค์ประกอบของโพลีเมอร์ของเชื้อผสมจากกากตะกอนที่เลี้ยงในน้ำเสียจากมอลท์ และของเสียจากถั่วเหลือง พบว่า องค์ประกอบของโพลีเมอร์ที่ได้มีสัดส่วน HB:HV เท่ากับ 90:10 และ 75:25 เปอร์เซ็นต์โมล ตามลำดับ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสและฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน จะได้โพลีเมอร์ที่มีองค์ประกอบของ HB:HV เท่ากับ 55:45 และ 20:80 เปอร์เซ็นต์โมล ตามลำดับ

3. แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เคซีน เปปโตน และยีสต์สกัด รวมถึงสามารถใช้ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ใน ไตรเจน เช่น แกลือแอมโมเนีย (NH_4^+) ต่างๆ จุลินทรีย์สามารถผลิต PHA ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอแต่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง Grothe *et al.* (1999) ทำการเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของ *A. lactus* ATCC 29714 โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท และยูเรีย และใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.4 g/l ให้ผลการผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 4.6 g/l และจากการศึกษาของ Kumar *et al.*, 2004 ศึกษาการผลิต PHB จากกากตะกอนจุลินทรีย์ในระบบ activated sludge จากโรงงานผลิตอาหาร โดยกำหนดอัตราส่วน C:N ที่ 24 96 120 144 และ 168 (mol/mol) พบว่าที่อัตราส่วน C:N เพิ่มขึ้นการสะสม PHB ต่อปริมาณเซลล์ก็เพิ่มขึ้นด้วย โดยที่อัตราส่วน C:N 144 มีการสะสม PHB สูงสุดเท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่ไม่ต้องจำกัดปริมาณสารอาหารในการสังเคราะห์ PHA และสามารถเพิ่มปริมาณโพลีเมอร์ในระหว่างการเติบโต ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ผ่านการตัดแต่งพันธุกรรมแล้ว

4. แหล่งฟอสฟอรัสและธาตุอาหารรอง

จุลินทรีย์จะสามารถผลิต PHA เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอ แต่มีปริมาณฟอสฟอรัสและธาตุอาหารรองค่อนข้างจำกัด Grothe *et al.*, 1999 ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่เติมธาตุอาหารรอง ต่อการเจริญและการผลิต PHB ของเชื้อ *A. latus* เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การเติมธาตุอาหารรอง ได้แก่ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $NiSO_4$, $CaCl_2$, H_3BO_3 , Na_2MoO_4 , $CoCl_2$, $MnCl_2$ และ Ammonium Fe (III) citrate มีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์สูงขึ้นเท่ากับ 6.8 g/l และปริมาณการผลิต PHB สูงขึ้นเท่ากับ 3.2 g/l

5. พีเอช

พีเอชเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต PHA พบว่า หากต้องการผลิต PHA ควรทำการควบคุมพีเอชไม่ให้ต่ำกว่า 7 ในสภาวะที่พีเอชต่ำจะขาดความสมดุลระหว่างปริมาณไอออนของไฮโดรเจนและไฮดรอกไซด์ส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหารและเซลล์ไม่สามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ (Fleit, 1995) จากการศึกษาของ ศิริวรรณ (2552) พบว่า การปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 จุลินทรีย์ให้ผลผลิต PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 41.8 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าในการทดลองที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 และ 8 ที่ให้ผลผลิต PHA เท่ากับ 39.1 และ 40.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการรายงานของ Kasemsap and Wantawin (2007) ศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิต PHA ในกากตะกอนจุลินทรีย์ 2 กลุ่ม คือ RP5 และ RP15 ที่สภาวะไร้อากาศและใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณโพลีฟอสเฟตภายในเซลล์เท่ากับ 2 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปริมาณไกลโคเจนภายในเซลล์เท่ากับ 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6 มีการสลายโพลีฟอสเฟตและไกลโคเจนซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์น้อยที่สุด ส่งผลให้มีการสะสม PHA สูงสุดเท่ากับ 17 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อพีเอชสูงขึ้นการสะสม PHA จะน้อยลง และยังพบว่า ที่พีเอชสูงจะมีการใช้พลังงานจากการสลายไกลโคเจนมากขึ้น ส่งผลให้สัดส่วนโพลีเมอร์ชนิด HV สูงขึ้นด้วย

6. อุณหภูมิ

โสภา (2547) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHA ในกากตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสีย โดยกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองได้แก่ 10 20 และ 30 องศาเซลเซียส

ร่วมกับการจำกัดธาตุอาหาร พบว่า ชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 10 20 และ 30 องศาเซลเซียส ร่วมการจำกัดไนโตรเจนสามารถผลิต PHA ได้ เท่ากับ 38 40 และ 32 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และการจำกัดฟอสฟอรัสให้ผลการผลิต PHA เท่ากับ 52 45 และ 47 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และเมื่อจำกัดทั้งฟอสฟอรัสและไนโตรเจนให้ผลการผลิต PHA เท่ากับ 45 43 และ 33 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิต่ำส่งผลต่อการผลิต PHA ในทางตรงกันข้ามการศึกษาของ Wu *et al.* (2001) พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. JIMa5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสร่วมกับการมีปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ สามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 25-35 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

การสกัด PHB ให้บริสุทธิ์ (Griffin, 1994)

ขั้นตอนทั่วไปในการสกัด PHB ให้บริสุทธิ์ คือการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก จากนั้นนำไปย่อยเพื่อให้ผนังเซลล์แตกออกแล้วแยก PHB ออกจากกากของเซลล์ ในการสกัด PHA ให้บริสุทธิ์มีความสำคัญต่อการผลิต PHB เนื่องจากจะมีผลต่อความบริสุทธิ์และการย่อยสลายของโพลีเมอร์ การแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยปกติจะใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ส่วนการย่อยผนังเซลล์ให้แตกเพื่อแยก PHB ออกจากเซลล์นั้นทำได้ 3 วิธีดังนี้

1. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)

PHB จะถูกสกัดออกจากเซลล์ด้วยการละลายเซลล์ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด ได้แก่ คลอโรฟอร์ม เมทิลีนคลอไรด์ 1,1,2-ไตรคลอโรเอเทน หรือ โพรพิลีนคาร์บอนเนต จากนั้นกรองแยกกากเซลล์ออกแล้ว จึงทำให้การตกตะกอน PHB ด้วยการทำให้สารละลายเย็นตัวลงอย่างช้าๆ หรือเติมเมทานอล เอทานอล ไดเอทิลอีเทอร์หรือเฮกเซน หากต้องการให้ PHB ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยนำ PHB ที่สกัดได้ไปละลายในคลอโรฟอร์ม แล้วจึงตกตะกอนด้วยเฮกเซน หรือ ไดเอทิลอีเทอร์อีกครั้ง นอกจากนี้ยังพบว่า สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของ PHB ได้ โดยการล้างเซลล์ด้วยเมทานอล หรืออะซิโตน ก่อนที่จะสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อเพิ่มความสามารถในการเลือกผ่านของเซลล์เมมเบรน ล้างไขมัน และย่อยสลายโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ ออกก่อน PHB ที่สกัดได้จากวิธีนี้จะมีสีขาว น้ำหนักโมเลกุลสูง และมีความบริสุทธิ์สูงแต่วิธีนี้ต้องใช้ตัวทำละลายในปริมาณที่มากในการสกัด PHB

2. การย่อยด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite digestion)

ทำการสกัด PHB โดยนำเซลล์ไปบ่มในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็นระยะเวลา 30-60 นาที เพื่อย่อยผนังเซลล์และสารประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่ PHB จากนั้นทำให้ PHB บริสุทธิ์โดยการล้างด้วยไดเอทิลอีเทอร์ หรือเมทานอลเพื่อแยกไขมันออก แต่การใช้สารที่มีความเป็นด่างสูงจะไปย่อยสลายสายโพลีเมอร์ และทำให้น้ำหนักโมเลกุลเปลี่ยนแปลงด้วย

3. การย่อยด้วยเอนไซม์เฉพาะ (selective enzymatic digestion)

วิธีนี้จะใช้ความร้อนเพื่อช่วยในการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์และเอนไซม์ จากนั้นนำไปล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวเพื่อละลายเศษชีวมวลออกจาก PHB แต่วิธีนี้จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์น้อย ถ้าต้องการเพิ่มความบริสุทธิ์ของสารผลิตภัณฑ์ต้องใช้วิธีนี้ร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย

การใช้ประโยชน์ PHB

เนื่องจาก PHB เป็นกลุ่มโพลีเอสเตอร์จึงมีสมบัติทางกายภาพในวงกว้างตั้งแต่พลาสติกที่มีความแข็งและเปราะ จนถึงพลาสติกที่สามารถยืดหยุ่นได้ดี ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย โดยเริ่มแรก PHB ถูกนำมาใช้งานทางการแพทย์อันเนื่องมาจากคุณสมบัติทางชีวภาพที่โดดเด่น คือ ความสามารถในการเข้ากันได้กับระบบชีวภาพ (biocompatible) ความสามารถถูกดูดซึม (bioresorbable) ในกระบวนการชีวภาพ ในร่างกาย และยังสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ อย่างไรก็ตาม PHB มีราคาแพงซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ใช้กันทั่วไปด้านการแพทย์ PHB ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์และเกษตรในรูปแบบเช่นเดียวกับการประยุกต์ใช้ polylactic acid (PLA) เช่น ไหมเย็บแผล ตัวเย็บแผล วัสดุปิดแผล ผ้าก๊อช อุปกรณ์ฝังในร่างกาย อุปกรณ์สำหรับยึดกระดูก วัสดุสำหรับนำพาหรือปลดปล่อยตัวยา ซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้านการเกษตร ถูกนำมาใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยสารฆ่าแมลง สารฆ่าวัชพืช หรือปุ๋ยตามช่วงเวลาที่กำหนด ในด้านบรรจุภัณฑ์ สามารถนำมาผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ถุงพลาสติก ก่องโฟม ฟิล์มสำหรับหีบห่อ เม็ดโฟมกันกระแทก สารเคลือบภาชนะกระดาษ หรือแม้กระทั่งในรูปแบบเส้นใยและแผ่นผ้าชนิด non-woven เช่น ผ้าอนามัย ผ้าอ้อมสำเร็จรูป เสื้อผ้า

และเครื่องนึ่งห่ม เส้นใยสำหรับบรรจุในเครื่องนอน ทางด้านอิเล็กทรอนิกส์และการสื่อสาร ถูกนำมาใช้ประดิษฐ์เป็นชิ้นส่วนประกอบในโทรศัพท์เคลื่อนที่ ชิ้นส่วนประกอบในคอมพิวเตอร์ แผ่นซีดี และหรืออื่นๆ เช่น สารยึดติด สารเคลือบผิว สารยึดประสานสำหรับผงโลหะและเซรามิก นอกจากนี้ PHB ยังเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีพิเศษ (specialty chemicals) เช่น solvent และ coalescing solvent polyurethane intermediate รวมถึง surfactant และ dispersant precursor อีกด้วย

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic) ถูกเรียกว่าพลาสติกชีวภาพเป็นพลาสติกที่ถูกออกแบบมาให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีภายใต้สภาวะแวดล้อมที่กำหนดไว้โดยเฉพาะ จึงทำให้สมบัติต่างๆ ของพลาสติกลดลงภายในช่วงเวลาหนึ่ง โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีดังกล่าวต้องเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ในธรรมชาติเท่านั้น สามารถวัดได้โดยวิธีการทดสอบมาตรฐาน ซึ่งวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือก๊าซมีเทนที่เกิดขึ้น

ประเภทการย่อยสลายของพลาสติกย่อยสลายได้

จะแบ่งประเภทของการย่อยสลายออกเป็น 5 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. การย่อยสลายได้โดยแสง (photodegradation) การย่อยสลายโดยแสงมักเกิดจากการเติมสารเติมแต่งที่มีความไวต่อแสงลงในพลาสติกหรือสังเคราะห์โคโพลิเมอร์ให้มีหมู่ฟังก์ชันหรือพันธะเคมีที่ไม่แข็งแรง แตกหักง่ายภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต เช่น หมู่คีโตนอยู่ในโครงสร้างเมื่อสารหรือหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวสัมผัสกับรังสีอัลตราไวโอเลต จะเกิดการแตกของพันธะกลายเป็นอนุมูลอิสระ ซึ่งไม่เสถียรจึงเข้าทำปฏิกิริยาต่ออย่างรวดเร็วที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่โพลิเมอร์ ทำให้เกิดการขาดของสายโซ่ แต่การย่อยสลายนี้จะไม่เกิดขึ้นภายในบ่อฝังกลบขยะ กองคอมโพสท์ หรือสภาวะแวดล้อมอื่นที่มีมืด หรือแม้กระทั่งชิ้นพลาสติกที่มีการพิมพ์ด้วยหมึกที่หนาмаกบนพื้นผิว เนื่องจากพลาสติกจะไม่ได้สัมผัสกับรังสีอัลตราไวโอเลตโดยตรง

2. การย่อยสลายทางกล (mechanical degradation) โดยการให้แรงกระทำแก่ชิ้นพลาสติก ทำให้ชิ้นส่วนพลาสติกแตกออกเป็นชิ้น ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้โดยทั่วไปในการทำให้พลาสติกแตกเป็นชิ้นเล็กๆ

3. การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative degradation) เป็นปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนลงในโมเลกุลของโพลีเมอร์ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติอย่างช้าๆ โดยมีออกซิเจน ความร้อน และรังสีอัลตราไวโอเล็ตหรือแรงทางกลเป็นปัจจัยสำคัญ เกิดเป็นสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide, ROOH) ในพลาสติกที่ไม่มีการเติมสารเติมแต่งที่ทำหน้าที่เพิ่มความเสถียร แสงและความร้อนจะทำให้ ROOH แตกตัวกลายเป็นอนุมูลอิสระ $RO\cdot$ และ $OH\cdot$ ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยาต่อที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่โพลีเมอร์ ทำให้เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลอย่างรวดเร็ว แต่ด้วยเทคโนโลยีการผลิตที่ได้รับการวิจัยและพัฒนาขึ้นในปัจจุบันทำให้โพลีเอทิลีนเกิดการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนได้เร็วขึ้นภายในช่วงเวลาที่กำหนด โดยการเติมสารเติมแต่งที่เป็นเกลือของโลหะทรานซิชัน ซึ่งทำหน้าที่เป็นคะตะลิสต์เร่งการแตกตัวของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระ ทำให้สายโซ่โพลีเมอร์เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลรวดเร็วยิ่งขึ้น

4. การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolytic degradation) การย่อยสลายของโพลีเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์ เช่น แป้ง โพลีเอสเทอร์ โพลีเอโนไฮดรอกไซด์ โพลีคาร์บอนเนต และโพลียูรีเทน ผ่านปฏิกิริยาทำให้เกิดการแตกหักของสายโซ่โพลีเมอร์ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทที่ใช้คะตะลิสต์ และไม่ใช้คะตะลิสต์ ซึ่งประเภทแรกยังแบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือ แบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายนอกโมเลกุลของโพลีเมอร์เร่งให้เกิดการย่อยสลาย และแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของโพลีเมอร์เองในการเร่งให้เกิดการย่อยสลาย โดยคะตะลิสต์จากภายนอกมี 2 ชนิด คือ คะตะลิสต์ที่เป็นเอนไซม์ต่างๆ เช่น depolymerase lipase esterase และ glycohydrolase ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางชีวภาพ และคะตะลิสต์ที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น โลหะแอลคาไลด์ เบส และกรด ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมธรรมชาติ ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางเคมี สำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของโพลีเมอร์นั้นใช้หมู่คาร์บอกซิลของหมู่เอสเทอร์หรือเอไมด์บริเวณปลายของสายโซ่โพลีเมอร์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

5. การย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) การย่อยสลายของโพลีเมอร์จากการทำงานของจุลินทรีย์โดยทั่วไปมีกระบวนการ 2 ขั้นตอน เนื่องจากขนาดของสายโพลีเมอร์ยังมีขนาดใหญ่และไม่ละลายน้ำ ในขั้นตอนแรกของการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นภายนอกเซลล์โดยการปลดปล่อยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ซึ่งเกิดได้ทั้งแบบใช้ endo-enzyme หรือ เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะภายในสายโซ่โพลีเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบ และแบบ exo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะทีละหน่วยจากหน่วยซ้ำที่เล็กที่สุดที่อยู่ด้านปลายของสายโซ่โพลีเมอร์ เมื่อโพลีเมอร์แตกตัวจนมีขนาดเล็กพอจะแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ และเกิดการย่อยสลายต่อในขั้นตอนที่ 2 ได้ผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย คือ พลังงาน และสารประกอบขนาดเล็กที่เสถียรในธรรมชาติ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซมีเทน น้ำ เกลือ แร่ธาตุต่างๆ และมวลชีวภาพ (โสภณ, 2550)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Chua *et al.* (2003) ศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการสะสม PHA ของจุลินทรีย์ ได้แก่ ความเข้มข้นของอะซิเตดในน้ำเสียเข้า ค่าพีเอช และ sludge retention time (SRT) ในการผลิต PHA โดยกากตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน จากการทดลองพบว่า กากตะกอนจุลินทรีย์ที่คุ้นเคยกับน้ำเสียชุมชนมีการเติมอะซิเตด 1000 mgC/l สามารถสะสม PHA ได้สูงสุด 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนกากตะกอนจุลินทรีย์ที่คุ้นเคยกับน้ำเสียชุมชนที่ไม่ได้เติมอะซิเตดสามารถสะสม PHA ได้เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และยังพบว่า อายุตะกอนจุลินทรีย์ที่สั้น (3 วัน) จะให้ผลการสะสม PHA ได้ดีกว่าอายุสลัดจ์ที่นาน (10 วัน) ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพีเอชจะไม่ค่อยมีผลต่อการสะสม PHA โดยพีเอช 7-8 ยังให้การสะสมโพลีเมอร์ที่ไม่ต่างกัน แต่สำหรับการทดลองในระบบ batch พีเอชมีผลกระทบอย่างมากต่อการสะสมโพลีเมอร์ โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการสะสม PHA ในระบบ batch คือพีเอช 8-9

Kumar *et al.* (2004) ศึกษาการผลิต PHB ในกากตะกอนจุลินทรีย์จากระบบ activated sludge ของโรงงานผลิตอาหาร มีความเข้มข้นของตะกอนเริ่มต้นเท่ากับ 3150 mg/l โดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 500-3000 mg/l ที่อัตราส่วน C:N ที่ 24 96 120 144 และ 168 (mol/mol) ผลการทดลองพบว่า เมื่ออัตราส่วน C:N เพิ่มขึ้นการสะสมของ PHB ต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นด้วย โดยชุดทดลองที่มีอัตราส่วน C:N 144 มีการสะสม PHB สูงสุดเท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ของมวลเซลล์ (w/w)

Khardenavis *et al.* (2005) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB โดยกากตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสีย พบว่า การใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ diammonium hydrogen phosphate เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อัตราส่วน C:N 50 ที่ 96 ชั่วโมง สามารถผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 65.84 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

Lemos *et al.* (2006) ศึกษาการสังเคราะห์ PHA ในกากตะกอนจุลินทรีย์จากระบบ sequencing batch reactor (SBR) เปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนอะซิเตดและโพรพิโอเนตในอาหารสังเคราะห์ พบว่า การใช้อะซิเตดเป็นแหล่งคาร์บอนให้การสะสมโฮโมโพลีเมอร์ชนิด HB และเมื่อใช้โพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนให้โคโพลีเมอร์ชนิด HB HV และ

hydroxymethylvalerate (HMV) และการใช้อะซิเตตเป็นสารอาหารจะให้ผลผลิต PHA สูงกว่าการใช้โพรพิโอเนต

Chien *et al.* (2007) ทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *Vibrio* spp. 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ M11 M14 M20 และ M31 ที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเลเพื่อผลิต PHB โดยทำการเลี้ยงในอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน และที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าสายพันธุ์ M11 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้โซเดียมอะซิเตตเข้มข้นสูงถึง 7.8 g/l เป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถผลิต PHB ได้สูงสุด 30.4 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน สายพันธุ์ M 14 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้ซูโครสที่ความเข้มข้น 12.3 mg/l เป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถผลิต PHB ได้สูงสุด 45.5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สายพันธุ์ M 20 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 15.5 mg/l เป็นแหล่งคาร์บอน และผลิต PHB ได้สูงสุด 42.8 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และสายพันธุ์ M 31 สามารถเจริญได้ดีเมื่อใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 14.5 mg/l เป็นแหล่งคาร์บอน และผลิต PHB ได้สูงสุด 24.0 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Kasemsap and Wantawin (2007) ศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิต PHA ในกากตะกอนจุลินทรีย์ 2 กลุ่ม คือ RP5 และ RP15 ที่สภาวะไร้อากาศและใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณโพสเฟตภายในเซลล์เท่ากับ 2 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปริมาณไกลโคเจนภายในเซลล์เท่ากับ 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6 มีการสลายโพสเฟตและไกลโคเจนซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์น้อยที่สุด ส่งผลให้มีการสะสม PHA สูงสุดเท่ากับ 17 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อพีเอชสูงขึ้นการสะสม PHA จะน้อยลง และยังพบว่า ที่พีเอชสูงขึ้นจะมีการใช้พลังงานจากการสลายไกลโคเจนมากขึ้น ส่งผลให้สัดส่วนโพลีเมอร์ชนิด HV สูงขึ้นด้วย

Khardenavis *et al.* (2007) ทำการศึกษาโดยนำกากตะกอนจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรม 3 โรงงาน พบว่า การใช้ di-ammonium hydrogen phosphate ในน้ำเสียบางชนิดทำให้ผลผลิต PHB ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่เติม และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมบางแห่งสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต PHB ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า การสะสม PHB จะสูงขึ้นเมื่อมีสารตั้งต้นที่มีองค์ประกอบของคาร์บอนที่มากขึ้นด้วย การใช้ประโยชน์จากกากตะกอนจุลินทรีย์ นอกจากจะช่วยลดต้นทุนในการกำจัดตะกอนแล้ว การผลิต PHB ในกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียในโรงงานยังช่วยลดต้นทุนในการผลิต PHB

Wang *et al.* (2007) ศึกษาผลของอัตราส่วน C:N ที่ 20 40 60 80 100 120 และ 140 (mol/mol) เมื่อใช้กากตะกอนจุลินทรีย์จากระบบ SBR และใช้บิวทิเรตและวาสิเลตเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นกรดเริ่มต้น 1 g/l พบว่า อัตราส่วน C:N ที่ 100 ให้ปริมาณการผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ต่อเซลล์ และยังพบว่าองค์ประกอบของโพลีเมอร์ของเชื้อผสมจากกากตะกอนที่เลี้ยงในของเสียจากมอลต์ (malt waste) และของเสียจากถั่วเหลือง (soya waste) พบว่า องค์ประกอบของโพลีเมอร์ที่ได้มีสัดส่วน HB:HV เท่ากับ 90:10 และ 75:25 เปอร์เซ็นต์ต่อโมล ตามลำดับ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน จะได้โพลีเมอร์ที่มีองค์ประกอบของ HB:HV เท่ากับ 55:45 และ 20:80 เปอร์เซ็นต์ต่อโมล ตามลำดับ

Bengtsson *et al.* (2008) การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำเสียจากโรงงานกระดาษ ในการผลิต PHA โดยใช้กระบวนการหมักเปลี่ยนน้ำเสียให้กลายเป็นสารอินทรีย์และเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต PHA โดยกำหนดสภาวะขาดแคลนอาหารและสภาวะอาหารมากเกินไปเพื่อกระตุ้นการสะสม PHA ในเซลล์พบว่า น้ำเสียที่ผ่านการหมักจะเปลี่ยนสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำไปเป็นกรดอินทรีย์ (อะซิเตต โพรพิโอเนต บิวทิเรต และวาสิเรต) ซึ่งมีผลต่อการสัดส่วนชนิดของ PHA ซึ่งประกอบด้วย PHB 31-47 เปอร์เซ็นต์โมล และ PHV 53-60 เปอร์เซ็นต์โมล และมีการสะสม PHA สูงสุดเท่ากับ 48 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Cai *et al.* (2009) ศึกษาน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชนที่ผ่านการหมักให้เกิดสารอินทรีย์ระเหยง่าย (VFAs) เป็นแหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์ PHA โดยใช้กากตะกอนจุลินทรีย์ พบว่า ที่พีเอช 11 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และที่เวลาการหมัก 7 วัน มีปริมาณสารอินทรีย์ระเหยง่าย 258.65 mg TOC/gVSS และพบว่าการใช้กรดอะซิติกที่เกิดได้จากการหมักให้ผลการสะสม PHA สูงสุดเท่ากับ 56.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้ยังพบว่า ในสภาวะที่มีฟอสฟอรัสและมีแอมโมเนียตกค้างจากการหมักยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิต PHA สามารถกำจัดได้โดยกระบวนการ struvite precipitation

Khardenavis *et al.* (2009) ศึกษาการผลิต PHB ในกากตะกอนจุลินทรีย์ โดยใช้ น้ำเสียจากระบวนการผลิตเอทานอล เป็นแหล่งอาหารในการผลิต PHB เพื่อลดต้นทุนในการผลิต โดยกำหนดอัตราส่วน C:N ที่แตกต่างกัน พบว่า ในน้ำเสียที่ผ่านการขจัดโปรตีนร่วมกับการเติมไนโตรเจนเสริม ที่อัตราส่วน C:N 29 พบการสะสม PHB 28 เปอร์เซ็นต์

Wen *et al.* (2010) ศึกษาผลของการจำกัดฟอสฟอรัสและไนโตรเจนต่อการสะสม PHA ในกากตะกอนจุลินทรีย์ที่ได้จากโรงงานกลั่นเบียร์ โดยกำหนดให้มีค่า C:P เท่ากับ 100 160 250 500 750 และ C:N เท่ากับ 20 60 100 125 และ 180 ในการจำกัดปริมาณฟอสฟอรัสและไนโตรเจน พบว่ามีการสะสม PHA สูงขึ้น 95 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยมีการสะสม PHA 1.61 mg PHA /mg ของสารอินทรีย์ที่ใช้ไป โดยพบว่าที่ C:N 125 มีการสะสมสูงสุด และยังพบว่ากากตะกอนจุลินทรีย์ให้ผลผลิต PHB มากกว่า PHV ภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด โดยเฉพาะสภาวะที่มีฟอสฟอรัสจำกัดจะทำให้การผลิต PHB เพิ่มขึ้น

Liu *et al.* (2011) ศึกษาการใช้กากตะกอนจุลินทรีย์ที่เหลือทิ้งมาทำการกระตุ้นการผลิต PHB โดยทำการเลี้ยงในระบบ SBR กำหนดสภาวะการให้อาหาร สภาวะการให้อากาศ ความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตต และค่าพีเอชเริ่มต้น ในการสะสม PHB ในระบบ activated sludge โดยจากการทดลองพบการสะสม PHB สูงสุดเท่ากับ 67 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ค่า 0.740 gCOD/gCOD ในสภาวะที่มีโซเดียมอะซิเตต 6 g/l ที่พีเอชเท่ากับ 7 ในสภาวะให้อากาศไม่ต่อเนื่อง

โสภา (2547) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHA ในกากตะกอนจุลินทรีย์โดยใช้น้ำเสียอุตสาหกรรมลูกกวาด อุณหภูมิที่ใช้ทดลองได้แก่ 10 20 และ 30 องศาเซลเซียส โดยแต่ละอุณหภูมิได้ทำการทดลองกับการจำกัดธาตุอาหาร 3 แบบ คือ จำกัดเฉพาะไนโตรเจน จำกัดเฉพาะฟอสฟอรัส และจำกัดทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยใช้รูปแบบการเดินระบบแบบสองขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ผลิต PHA และขั้นตอนการจำกัดธาตุอาหารเพื่อกระตุ้นการผลิต PHA ให้มากขึ้น จากการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิต่ำส่งผลให้การผลิต PHA เพิ่มขึ้น การจำกัดธาตุอาหารทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสให้ผลผลิต PHA ดีกว่าจำกัดธาตุอาหารแบบอื่น โดยชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส กับการจำกัดธาตุอาหารเฉพาะไนโตรเจน ค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุด เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าความเข้มข้นของ PHA ในระบบ คือ 2830 mg/l ในการทดลองการจำกัดธาตุอาหารเฉพาะฟอสฟอรัส ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 52 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเข้มข้นของ PHA ในระบบ คือ 1491 mg/l สำหรับการทดลองจำกัดธาตุอาหารทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสผลผลิต PHA ในการทดลองที่ 10 และ 20 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกัน โดยค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของ PHA เท่ากับ 2133 mg/l

ศิริวรรณ (2552) ศึกษาการเติมโพर्फิโรนและวาเลอิก ในน้ำเสียโรงงานปลาทูน่า กระป๋องโดยใช้จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในการผลิต PHA พบว่า การใช้กรดวาเลอิกให้ปริมาณ PHA สูงกว่าการใช้โพर्फิโรน นอกจากนี้ ยังได้เปรียบเทียบการใช้วาเลอิก ความเข้มข้น 0-180 mM พบว่าที่ความเข้มข้น 60 mM จะให้ปริมาณ PHA สูงสุดเท่ากับ 45.2 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 140 และ 180 mM จะให้ปริมาณเซลล์ที่น้อยกว่าและให้ความเข้มข้นของ PHA น้อยด้วย

ขวัญใจ และคณะ (2554) ศึกษาการนำแบคทีเรีย *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 0.8 kGy ร่วมกับการได้รับ 2-aminoanthracene (2AA) มาเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสำหรับผลิต PHB ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อ TISTR 1403/gamma-2AA สามารถผลิต PHB ได้คิดเป็น 59.2 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ ฟรุกโตส ซูโครส ซูโครสทางการค้า มอลโทเด็กซ์ทรินทางการค้า แป้งมันสำปะหลัง และกากมันสำปะหลังไฮโดรไลส พบว่า เมื่อใช้น้ำตาลแร่ธรรมชาติ (ซูโครสทางการค้า) เชื้อ *A. lactus* TISTR 1403/gamma-2AA ผลิต PHB ได้สูง เท่ากับ 2.77 g/l เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0.8 g/l) สำหรับการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังไฮโดรไลสสามารถผลิต PHB ได้ใกล้เคียงกับกลูโคส และเมื่อปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของกากมันสำปะหลังไฮโดรไลส 30-70 เปอร์เซ็นต์ (V/V) พบว่า การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังไฮโดรไลส 50 เปอร์เซ็นต์ ผลิต PHB ได้สูงสุด (1.08 g/l) และเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมอะซิเตต และยูเรีย ร่วมกับการใช้กากมันสำปะหลังไฮโดรไลสร้อยละ 50 พบว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อ *A. lactus* TISTR 1403/gamma-2AA สามารถเจริญพร้อมทั้งผลิตมวลเซลล์ และ PHB ได้ปริมาณเท่ากับ 5.25 และ 2.08 g/l ตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ
 - 1.1 เครื่อง UV/Vis spectrophotometer
 - 1.2 เครื่องให้อากาศ
 - 1.3 ตู้อบ
 - 1.4 กล้องจุลทรรศน์
2. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
 - 2.1 บีกเกอร์
 - 2.2 ปีเปต
 - 2.3 หลอดทดลอง
 - 2.4 ขวดรูปชมพู่
 - 2.5 บิวเรต
 - 2.6 ขวดปรับปริมาตร
 - 2.7 ชุดเครื่องแก้วสำหรับไตเตรท
 - 2.8 ชุดกรอง
3. วัสดุและสารเคมี
 - 3.1 ตะกอนจุลินทรีย์จากบริษัท ชวนพัฒนา จำกัด
 - 3.2 น้ำเสียจากบริษัท ชวนพัฒนา จำกัด
 - 3.3 สารละลายมาตรฐาน PHB
 - 3.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ PHB
 - 3.4.1 sulfuric acid (H_2SO_4)
 - 3.4.2 clorox
 - 3.4.3 acetone (C_3H_6O)
 - 3.4.4 chloroform ($CHCl_3$)
 - 3.4.5 ethanol (C_2H_6O)

3.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ COD

3.5.1 sulfuric acid (H_2SO_4)

3.5.2 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

3.5.3 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

3.5.4 ferroin

3.6 สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสี Sudan Black B

3.6.1 สีย้อม Sudan Black B ($\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}$)

3.6.2 สีย้อม Safranin O ($\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{ClN}_4$)

3.6.3 xylene ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)_2$)

3.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.7.1 nutrient agar

3.7.2 nutrient broth

วิธีการ

1. การเตรียมการทดลอง

1.1 เก็บตะกอนจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างกากตะกอนจุลินทรีย์จากบริเวณถังตกตะกอนและน้ำเสียจากระบบ activated sludge โรงงานขนมน นำมายังห้องปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์ อาคารที ญาณสุคนธ์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ (mixed liquor suspended solid: MLSS) และปริมาณ PHB เริ่มต้น ตามวิธีดัดแปลงจาก Law and Slepecky (1960)

1.2 วิเคราะห์ลักษณะสมบัติของน้ำเสียตามพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

COD, BOD, TKN, pH, Nitrate-N และ Phosphate-P โดยวิธีตาม Standard methods (APHA, WWA, WEF, 2001)

2. ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการสะสม PHB ในกากตะกอนจุลินทรีย์

2.1 ผลของการให้อากาศสลักับไม่ให้อากาศต่อการสะสม PHB ของกากตะกอนจุลินทรีย์

นำกากตะกอนจุลินทรีย์ที่ได้ มาทำการเลี้ยงแบบ batch ปริมาตรเริ่มต้น 1000 ml โดยกำหนดความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น (MLSS) 1000 3000 และ 6000 mg/l กระตุ้นจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHB โดยกำหนดสภาวะการให้อากาศ 3 สภาวะได้แก่ 1) สภาวะการให้อากาศตลอดเวลา (24:0) 2) สภาวะการให้อากาศ 21 ชั่วโมง สลักับไม่ให้อากาศ 3 ชั่วโมง (21:3) และ 3) สภาวะการให้อากาศ 15 ชั่วโมง สลักับไม่ให้อากาศ 9 ชั่วโมง (15:9) ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ค่า COD MLSS และปริมาณ PHB ตามวิธีของ Law and Slepecky (1960)

2.2 ผลของอัตราส่วน COD:N ต่อการสะสม PHB

นำกากตะกอนจุลินทรีย์ที่ได้ มาทำการเลี้ยงแบบ batch โดยกำหนดความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น 1000 mg/l ปรับอัตราส่วน COD:N ในน้ำเสียจาก COD:N เริ่มต้น 75 เป็น 25 และ 50 โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นแหล่งไนโตรเจนเสริมและ COD:N เท่ากับ 100 และ 120 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ทำการทดลองในสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง และให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อ 2.1

2.3 ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนเสริมต่างๆ ต่อการสะสม PHB ที่อัตราส่วน COD:N ต่างๆ

นำกากตะกอนจุลินทรีย์ที่ได้ มาทำการเลี้ยงแบบ batch โดยกำหนดความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น 1000 mg/l ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนเสริมชนิดต่างๆ ที่ส่งผลต่อการสะสม PHB ในกากตะกอนจุลินทรีย์ แปรผันอัตราส่วน COD:N ในน้ำเสียเป็น 120, 150 และ 170 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมต่างๆ ได้แก่ กากน้ำตาล น้ำตาลทราย อะซิเตด และโพรพิโอเนต เปรียบเทียบกับน้ำเสียที่ไม่ได้ปรับค่า COD:N ทำการทดลองในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อ 2.1

3. คัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHB ได้

3.1 สร้างสภาวะการเจริญที่ไม่สมดุลเพื่อกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่สะสม PHB

นำกากตะกอนจุลินทรีย์ที่ได้ มาทำการเลี้ยงแบบ batch โดยกำหนดความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น 1000 mg/l ในสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง และสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ทำการเติมอาหารแบบ fed-batch โดยกำหนดให้จุลินทรีย์ได้รับอาหาร(น้ำเสีย) 4 รูปแบบคือ รับน้ำเสีย 2 3 5 และ 7 วัน เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างครั้งแรกเมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่สาม แล้วเลี้ยงต่อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHB ได้ จากนั้นเปลี่ยนใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหารอีกครั้ง เลี้ยงเป็น

ระยะเวลา 3 สัปดาห์ และทำการเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์และวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อ 2.1

3.2 คัดเลือกเชื้อที่สามารถสะสม PHB ได้จากกากตะกอนจุลินทรีย์

นำกากตะกอนจุลินทรีย์ที่ผ่านการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนมาทำการคัดกรองเชื้อโดยเทคนิค spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สุ่มเลือกโคโลนี นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ มา streak ลงบนอาหาร nutrient agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะทางด้านกายภาพแตกต่างกันมาเกลี่ยในสไลด์ร้อให้แห้ง นำมาผ่านเปลวไฟ แล้วย้อมสีด้วย Sudan Black B ทิ้งไว้ 5-10 นาทีล้างน้ำไหลผ่าน หยด xylene และหยด Safranin ทิ้งไว้ 5-10 นาที ล้างน้ำไหลผ่าน ร้อให้แห้ง นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast ส่วนไขมันในเซลล์ติดสีดำของ Sudan Black B ส่วนเซลล์จุลินทรีย์จะไม่ติดสี จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่ติดสีย้อม Sudan Black B มาเลี้ยงในสภาวะการเจริญที่ไม่สมดุลเพื่อการผลิต PHB

3.3 ศึกษาการสะสม PHB ในเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถแยกได้จากกากตะกอนจุลินทรีย์

3.3.1 เตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บจากขั้นตอน 3.2 มีปริมาตร 1 ml ถ่ายลงใน nutrient broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 100 ml จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปิเปตจุลินทรีย์ 10 ml ลงในอาหาร nutrient broth ปริมาตร 300 ml ทำซ้ำจนกว่าจะได้ปริมาณเชื้อที่ต้อง จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวหัวเชื้อจุลินทรีย์โดยถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนติฟิวส์ในสภาวะปลอดเชื้อ ทำการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วล้างจุลินทรีย์ด้วยน้ำเกลือ (0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโดยปริมาตรของโซเดียมคลอไรด์) เพื่อล้างอาหาร nutrient broth ออกจากจุลินทรีย์ แล้วกระจายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อที่ได้ลงในระบบ

3.3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในระบบ

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ปริมาตร 100 ml เลี้ยงในระบบ โดยใช้น้ำเสียปริมาตร 900 ml และปรับอัตราส่วน COD:N เท่ากับ 120 โดยใช้น้ำตาลทราย 2.5 g ทำการทดลองในสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมงและให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อ 2.1

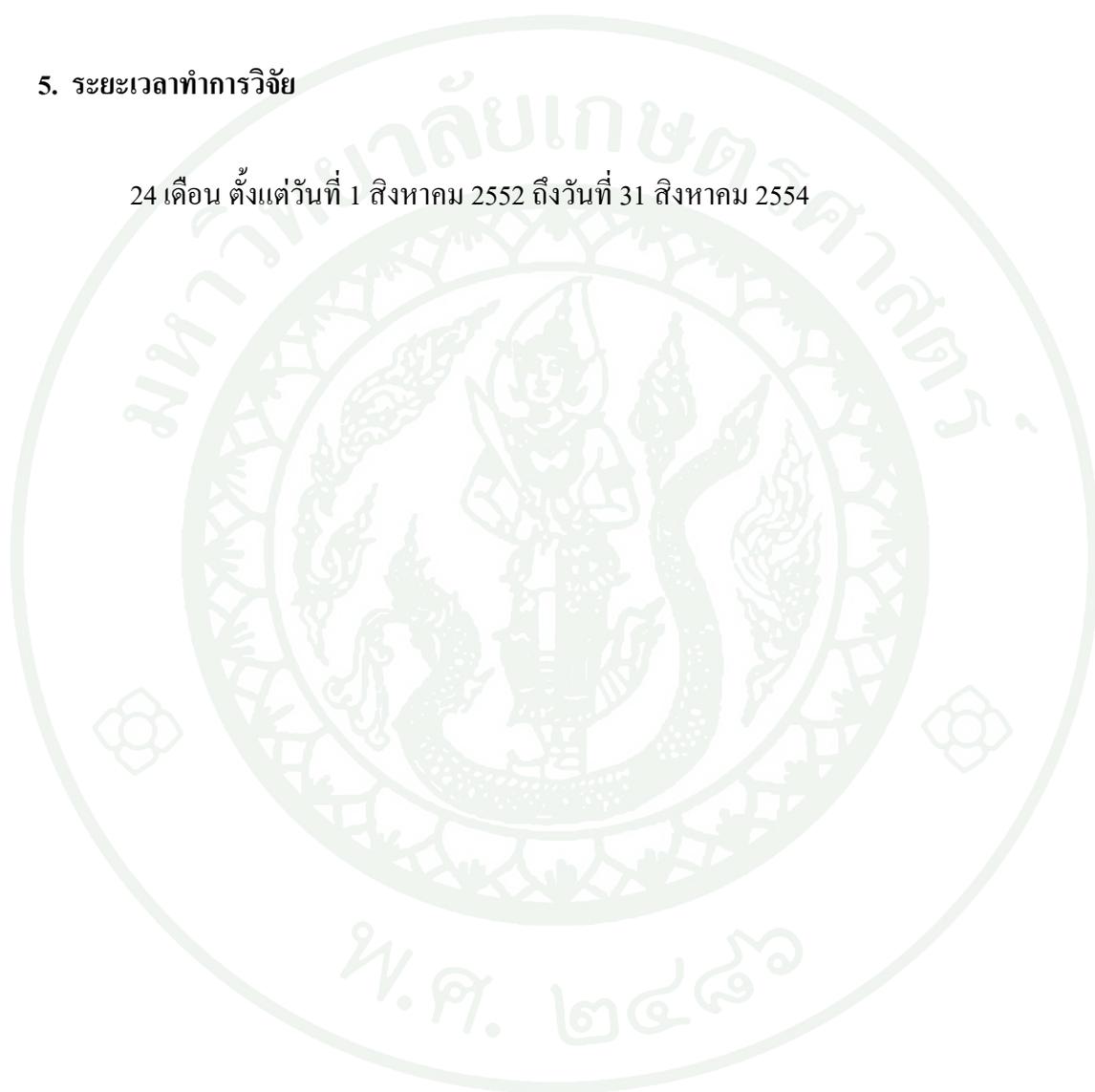


4. สถานที่ทำการวิจัย

อาคารทวิ ญาณสุคนธ์ และอาคารสุขประชา วาจานนท์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. ระยะเวลาทำการวิจัย

24 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม 2552 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2554



ผลและวิจารณ์

การทดลองนี้ศึกษาการผลิต PHB ของจุลินทรีย์ในภาคตะกอนระบบบำบัดน้ำเสีย activated sludge จากโรงงานขนมและใช้น้ำเสียจากโรงงานเดียวกันเป็นแหล่งอาหาร โดยทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB ของจุลินทรีย์ ได้แก่ การให้อากาศสลักกับไม่ให้อากาศ ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น อัตราส่วน COD:N และชนิดของแหล่งคาร์บอนเสริม

น้ำเสียที่ใช้ในการศึกษามีลักษณะสมบัติดังตารางที่ 3 โดยน้ำเสียจากโรงงานขนมมีสารอินทรีย์ปนเปื้อนสูง จะเห็นได้จากค่า COD และ BOD ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดปริมาณสารอินทรีย์ มีค่าอยู่ในช่วง 5240-7000 mg/l และ 3300 mg/l ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าน้ำเสียโรงงานขนมมีสารอินทรีย์คาร์บอนเพียงพอที่จะใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้ในน้ำเสียยังประกอบไปด้วยธาตุอาหารพวกไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในปริมาณน้อย คือมีสารอินทรีย์ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส 70 mg/l และ 33 mg/l ตามลำดับ โดยมีค่าอัตราส่วนระหว่างซีโอดีต่อไนโตรเจนต่อฟอสฟอรัส (COD:N:P) เท่ากับ 75:1:0.5 ซึ่งน้ำเสียมีอัตราส่วน COD:N ใกล้เคียงกับการศึกษาของสิริลักษณ์ (2551) ซึ่งใช้น้ำเสียในการผลิต PHA มาจากโรงงานน้ำตาล ซึ่งมีค่า COD อยู่ในช่วง 500-2000 mg/l ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเท่ากับ 10-20 mg/l และ 4-10 mg/l ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วน COD:N:P เท่ากับ 50:1:0.4 และนอกจากนี้รัชชัย (2550) ได้ศึกษาการผลิต PHA จาก *Ralstonia eutropha* และใช้น้ำหมักจากเส้นใยปาล์มเป็นแหล่งอาหาร โดยน้ำหมักมีค่า TOC 2655 mg/l ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเท่ากับ 34 mg/l และ 270 mg/l พบว่าสามารถสะสม PHA ได้สูงกว่าชุดทดลองที่มีการเพิ่มแหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในน้ำหมัก จะเห็นได้ว่าน้ำเสียที่มีธาตุอาหารน้อย แต่มีปริมาณคาร์บอนที่มากพอมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสะสม PHB และน้ำเสียจากโรงงานขนมที่นำมาใช้ในการทดลองนี้มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3-5 จึงต้องมีการปรับพีเอชเท่ากับ 7 เนื่องจากพีเอชเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต PHA จากการศึกษาของศิริวรรณ (2552) พบว่าการปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และ 6 จะทำให้มีการผลิต PHA ได้น้อยมาก ขณะที่การปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 และ 8 จะทำให้มีการสะสม PHA ได้มากขึ้น

ตารางที่ 3 ลักษณะของน้ำเสียที่ใช้ในการศึกษา

COD	BOD	NH ₃	TKN	Total- P	pH
5240-7000 mg/l	3300 mg/l	31-36 mg/l	50-70 mg/l	33 mg/l	3-5

1. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสะสม PHB ของจุลินทรีย์ในภาคตะกอน

1.1 ผลของการให้อากาศสลักับไม่ให้อากาศที่เหมาะสมต่อการสะสม PHB ของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ทำการเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์แบบ batch โดยใช้ น้ำเสียจาก โรงงานขนมเป็นแหล่งอาหารและกำหนดความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น (MLSS) 1000 mg/l 3000 mg/l และ 6000 mg/l กำหนดสภาวะให้อากาศสลักับการไม่ให้อากาศ 21:3 ชั่วโมง และ 15:9 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสภาวะควบคุมที่ให้อากาศตลอดเวลา (24:0)

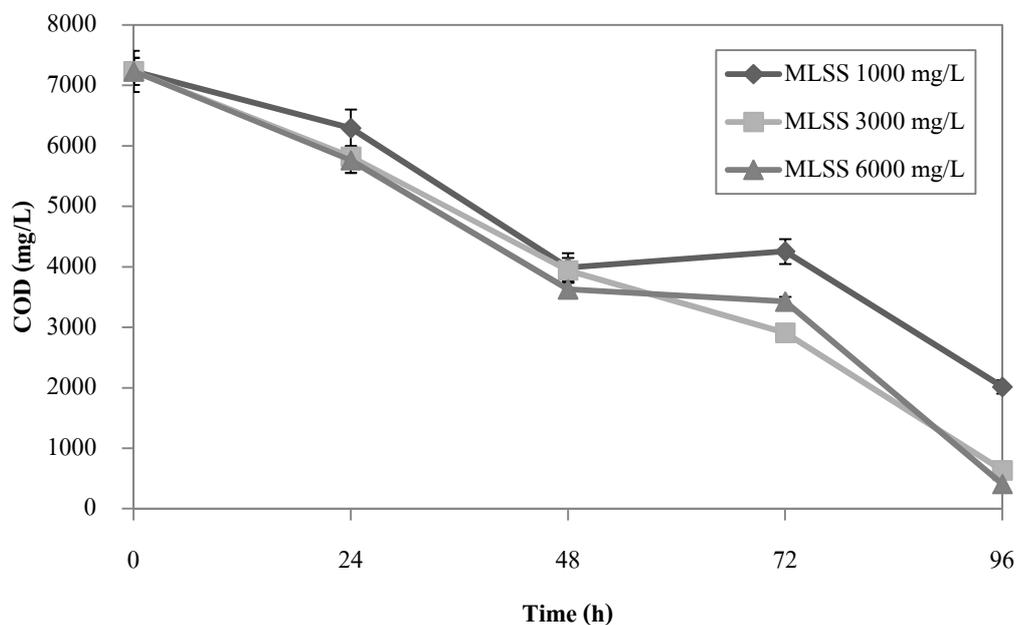
เมื่อวิเคราะห์ค่า COD ในระยะต่างๆของการทดลอง พบว่า เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะการให้อากาศสลักับไม่ให้อากาศร่วมกับการแปรผันความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น การใช้สารอินทรีย์มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นทั้งสามระดับ โดยค่า COD ลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยชั่วโมงที่ 48 ค่า COD ลดลงจากประมาณ 7000 mg/l เหลือประมาณ 3000-4000 mg/l และที่ ชั่วโมงที่ 96 ค่า COD ลดลงเหลือประมาณ 500-2000 mg/l แสดงดังภาพที่ 4-6 การลดลงของค่า COD นั้นอาจเกิดจากจุลินทรีย์นำสารอินทรีย์ในน้ำเสียไปใช้ในการเจริญหรือนำไปเก็บสะสมไว้ในเซลล์ในรูปของ PHB

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสะสม PHB ของตะกอนจุลินทรีย์ในชุดการทดลองต่างๆ พบว่าสภาวะการเจริญที่ไม่สมดุลโดยให้อากาศสลักับการไม่ให้อากาศสามารถกระตุ้นการสะสม PHB ในเซลล์จุลินทรีย์ได้สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ได้รับอากาศตลอดเวลา นอกจากนี้ สภาวะการที่ไม่ได้รับอากาศนานขึ้นจะส่งผลให้การสะสม PHB เพิ่มขึ้นด้วยแสดงดังภาพที่ 7 โดยสภาวะการได้รับอากาศตลอดเวลามีการสะสม PHB ต่ำที่สุด ที่ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นทั้ง 3 ระดับ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นสภาวะการเจริญที่สมดุลจุลินทรีย์จึงทำการย่อยสลายสารอินทรีย์เพื่อการเจริญมากกว่าการเก็บสะสมไว้ในเซลล์ (ปีรธา, 2546) ส่วนจุลินทรีย์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะการเจริญที่ไม่สมดุลซึ่งในที่นี้ได้แก่ การให้อากาศสลักับไม่ให้อากาศ จะกระตุ้นการสะสม PHB ในเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มขึ้น โดยที่สภาวะให้อากาศสลักับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น 1000 mg/l มีการสะสม PHB สูงสุด โดยเพิ่มขึ้นจาก 6.45 mg/g เซลล์แห้ง เมื่อเริ่มต้นการทดลองเป็น 67.60 mg/g เซลล์แห้ง เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง รองลงมาได้แก่ ที่สภาวะให้อากาศสลักับไม่ให้อากาศ 21:3 ชั่วโมง มีการสะสม PHB 11.10 mg/g เซลล์แห้ง เมื่อ

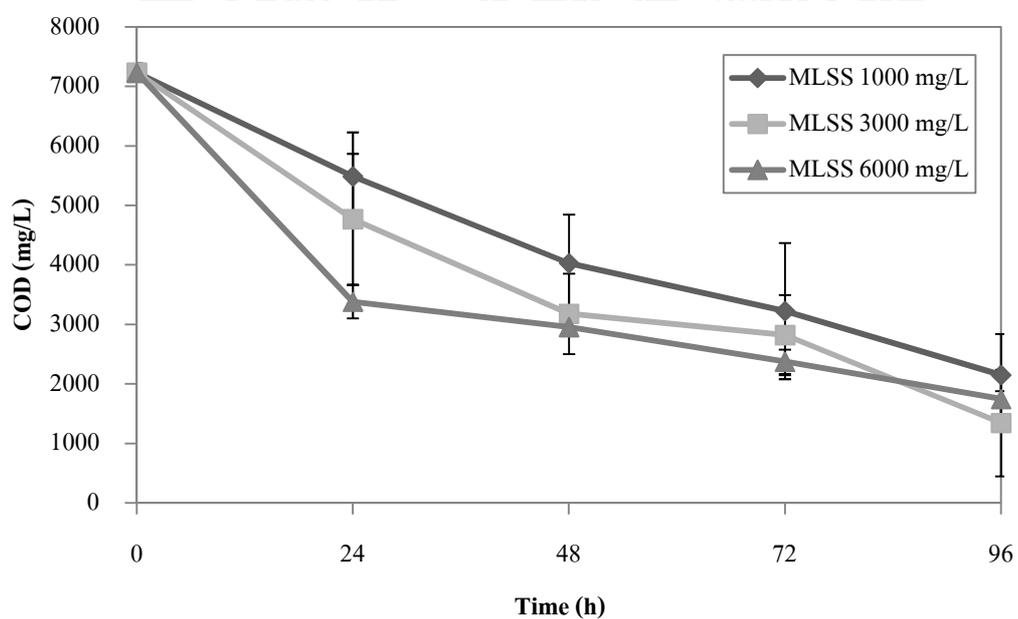
เวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง และมีค่าน้อยที่สุดที่สภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง เท่ากับ 6.45 mg/g เซลล์แห้ง เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกัน ส่งผลต่อปริมาณการสะสม PHB อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยชุดการทดลองที่กำหนดความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น 1000 mg/l ปริมาณการสะสม PHB แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น 3000 และ 6000 mg/l ปริมาณการสะสม PHB ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่สภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง และให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 21:3 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกัน ปริมาณการสะสม PHB ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

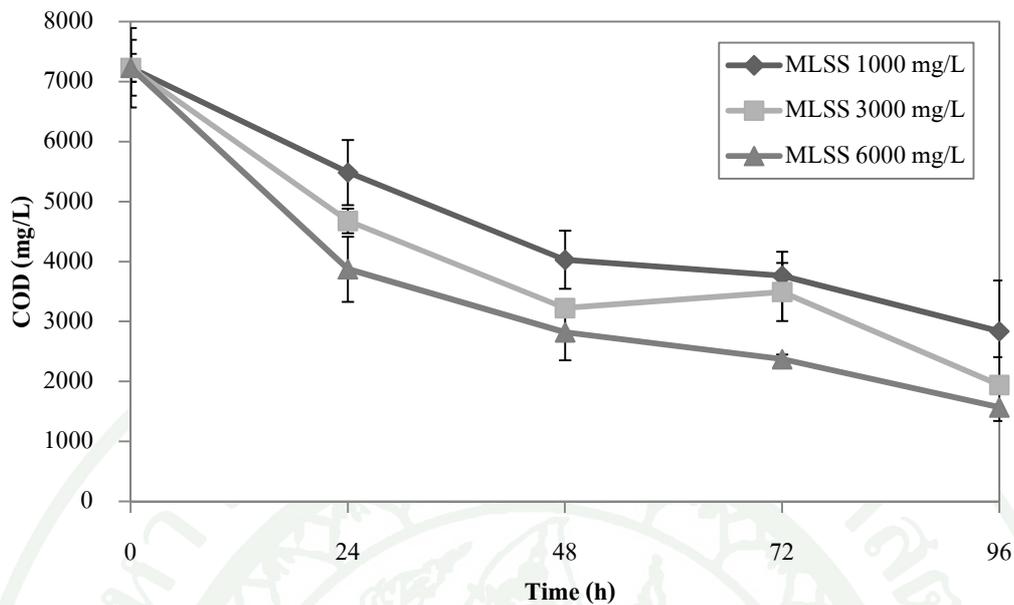
ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Satoh *et al.* (1998) เกี่ยวกับตะกอนจุลินทรีย์ในระบบ activated sludge 2 แบบ คือ anaerobic-aerobic และ microanaerobic-aerobic โดยกำหนดสภาวะ การให้ออกซิเจน และการจำกัดออกซิเจน พบว่าตะกอนจากระบบ anaerobic-aerobic ในสภาวะให้ออกซิเจนมีการสังเคราะห์ PHA 20 เปอร์เซ็นต์ และในสภาวะที่มีออกซิเจนพบการสังเคราะห์ PHA 33 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้ออกซิเจนมากขึ้นกลับไม่พบการสะสม PHA ที่มากขึ้น ส่วนตะกอนจากระบบ microanaerobic-aerobic สามารถสังเคราะห์ PHA ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดได้ถึง 62 เปอร์เซ็นต์ Kim (2000) ศึกษาผลของปริมาณอากาศต่อการผลิต PHB เมื่อเลี้ยงเชื้อ recombinant *E. coli* จากหางนม โดยกำหนดให้การกวนที่ต่ำกว่า 1000 rpm เป็นสภาวะจำกัดออกซิเจนและการกวนที่ 1400 rpm ขึ้นไปเป็นสภาวะไม่จำกัดออกซิเจน พบว่าที่การกวน 500 rpm ให้ค่าการสะสม PHB สูงสุดเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการจำกัดออกซิเจนส่งผลให้อัตราการผลิต PHB สูงกว่าไม่จำกัดออกซิเจน William and Olga (1989) เสนอว่า ปริมาณออกซิเจนจำกัดอาจส่งผลให้การทำงานของ TCA cycle ช้าลง เป็นผลให้ NADH มีปริมาณสูงขึ้น NADH จึงไปยับยั้งเอนไซม์ citrate synthase และ isocitrate dehydrogenase ทำให้ acetyl-CoA ไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็น acetoacetyl-CoA เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHA ส่งผลให้สามารถสังเคราะห์ PHA ได้มากขึ้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น 1000 mg/l เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทดลองนี้ จึงนำสภาวะดังกล่าวไปใช้ในการทดลองต่อไป



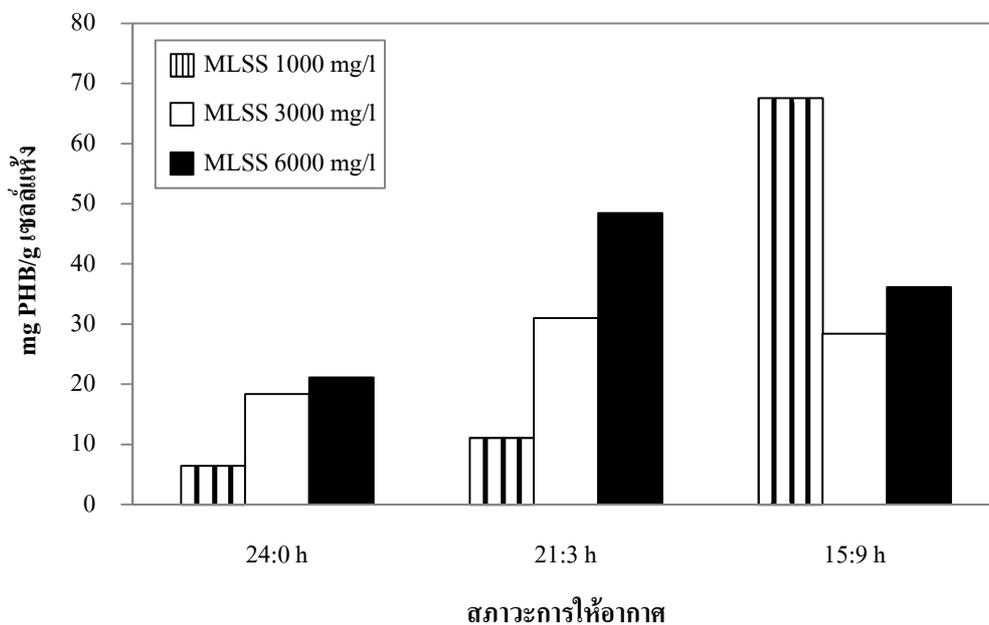
ภาพที่ 4 ค่า COD ของน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองที่สภาวะการให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



ภาพที่ 5 ค่า COD ของน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองที่สภาวะการให้อากาศสลับไม่ได้รับอากาศ 21:3 ชั่วโมง



ภาพที่ 6 ค่า COD ของน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองที่สภาวะการให้อากาศสลับไม่ได้รับอากาศ 15:9 ชั่วโมง



ภาพที่ 7 PHB ที่ 72 ชั่วโมง ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง ให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 21:3 ชั่วโมง และให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ที่ ระดับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น (MLSS) ต่างๆ กัน

ตารางที่ 4 ปริมาณ PHB ที่ 72 ชั่วโมง ในสภาวะให้อากาศต่างกัน ที่ระดับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น (MLSS) ต่างกัน

สภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ	MLSS (mg/l)	ค่าเฉลี่ย PHB (mg/l)
24:0	1000	6.46 ⁿ
	3000	18.37 ⁿ
	6000	21.12 ⁿ
21:3	1000	11.16 ⁿ
	3000	31.28 ⁿ
	6000	48.47 ⁿ
15:9	1000	67.60 ^a
	3000	39.48 ⁿ
	6000	28.39 ⁿ

หมายเหตุ ตัวอักษร a แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ n คือค่าเฉลี่ยแต่ละค่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

1.2 ศึกษาอัตราส่วน COD:N ที่เหมาะสมต่อการสะสม PHB

น้ำเสียจากโรงงานขนมมีอัตราส่วน COD:N เริ่มต้น เท่ากับ 75 ในการศึกษาได้แปรผันอัตราส่วนเป็น 25-120 โดย COD:N 25 และ 50 ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นแหล่งไนโตรเจนเสริมและ COD:N 100 และ 120 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม นำน้ำเสียดังกล่าวมาเลี้ยงตะกอนจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น 1000 mg/l โดยกำหนดสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

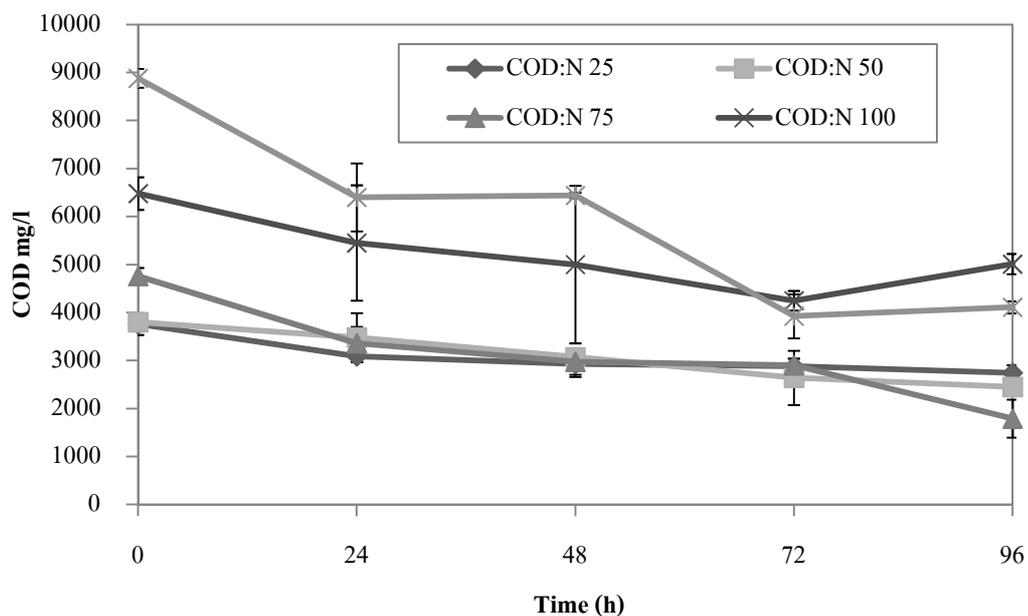
เมื่อเวลาผ่านไป พบว่า COD ในน้ำเสียมีค่าลดลง โดยที่อัตราส่วน COD:N 25 50 และ 75 มีแนวโน้มความเข้มข้นของ COD คล้ายคลึงกันในสภาวะการให้อากาศทั้งสองแบบ โดย COD:N เริ่มต้น จะอยู่ในช่วง 3800-4760 mg/l และลดลงเป็น 1790-2740 mg/l และที่ COD:N 100 อยู่ในช่วง 6480-6540 mg/l และลดลงเป็น 3840-5010 mg/l ส่วน COD:N 120 อยู่ในช่วง 7920-8880 mg/l และลดลงเป็น 4080 -4110 mg/l ในเวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 8-9)

เมื่อเปรียบเทียบการสะสม PHB ที่อัตราส่วน COD:N ต่างกัน ในสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง พบว่าที่อัตราส่วน COD:N 75 100 และ 120 พบค่าการผลิต PHB ใกล้เคียงกัน เท่ากับ 45.09 46.82 และ 48.47 mg/g เซลล์แห้ง ตามลำดับ ในเวลา 96 ชั่วโมง รองลงมาได้แก่ COD:N 50 ผลิตได้ 35.89 mg/g เซลล์แห้ง และ COD:N 25 ผลิตได้น้อยที่สุดที่ 27.81 mg/g เซลล์แห้ง (ภาพที่ 10) จากตารางที่ 5 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่า ที่อัตราส่วน COD:N 75 100 และ 120 ค่าการผลิต PHB ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่ให้ผลการผลิต PHB แตกต่างจาก COD:N 25 และ 50 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอแต่มีปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างจำกัดสูงจะกระตุ้นให้จุลินทรีย์สะสม PHB ได้มากขึ้น นอกจากนี้น้ำเสียโรงงานขนมมีค่า COD:N อยู่ในช่วงที่สามารถกระตุ้นการสะสม PHB ได้

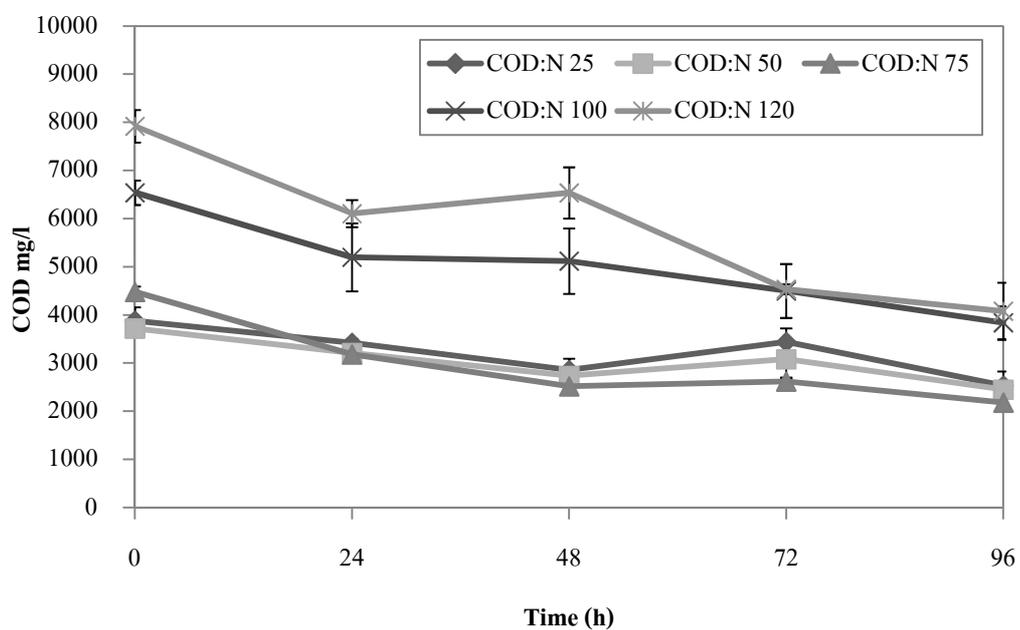
ที่สภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง อิทธิพลของอัตราส่วน COD:N ต่อการสะสม PHB ในภาคตะกอนจุลินทรีย์จะแตกต่างจากสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง ที่มีอัตราส่วน COD:N เป็นปัจจัยแต่เพียงอย่างเดียว จากภาพที่ 11 จะเห็นได้ว่าการสะสม PHB ในสภาวะที่อัตราส่วน COD:N 25 ถึง 100 มีค่าใกล้เคียงกันคือ 38.53 mg/g เซลล์แห้ง ถึง 45.00 mg/g เซลล์แห้ง เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนที่ COD:N 120 มีค่าสูงสุดถึง 64.47 mg/g เซลล์แห้ง ปริมาณการสะสม PHB แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) เมื่อพิจารณาการสะสม PHB ในสภาวะ COD:N 25 ซึ่งเป็นสภาวะที่มีไนโตรเจนเพียงพอ ภายใต้สภาวะการให้อากาศทั้งสองรูปแบบ จะแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของสภาวะการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ที่ทำให้มีการสะสม PHB 38.53 mg/g เซลล์แห้ง (ภาพที่ 11) เปรียบเทียบกับ 27.81 mg/g เซลล์แห้ง ในสภาวะให้อากาศตลอดเวลา (ภาพที่ 10) เนื่องจากการสะสม PHB ภายใต้สภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ที่ COD:N 50 ถึง 100 มีค่าใกล้เคียงกัน การสะสม PHB ที่ COD:N 25 จึงเห็นได้ว่าการสะสม PHB อยู่ภายใต้อิทธิพลของสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ มากกว่าที่อัตราส่วน COD:N ใดๆก็ตาม การที่มีการสะสม PHB สูงสุดที่ COD:N 120 แสดงให้เห็นว่า อัตราส่วน COD:N จะมีอิทธิพลต่อการสะสม PHB ชัดเจนมากขึ้นภายใต้สภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ที่ค่า COD:N ระดับนี้ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการสะสม PHB ที่อัตราส่วน COD:N มากกว่า 120 ในการทดลองต่อไป

ผลการทดลองนี้มีความคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Kumar *et al.* (2004) ที่พบว่าการสะสม PHB จากกลุ่มจุลินทรีย์ระบบตะกอนเร่งโรงงานผลิตอาหารโดยกำหนดอัตราส่วน C:N ที่ 24 96 120 144 และ 168 (mol/mol) ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า เมื่ออัตราส่วน C:N เพิ่มขึ้นการสะสม PHB ต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น จุดที่มีอัตราส่วนระหว่าง C:N 144 มีการสะสม PHB สูงสุดเท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาของ Wen *et al.* (2010) พบว่าผลของการจำกัดธาตุอาหารมีผลต่อการสะสม PHA ในกากตะกอนพบว่าเมื่อมีการจำกัดปริมาณธาตุอาหารพบการสะสม PHA สูงขึ้น 59 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งในสภาวะที่มีคาร์บอนมากเกินไปที่ C:N 125 มีการสะสม PHA สูงสุดในการทดลองนี้

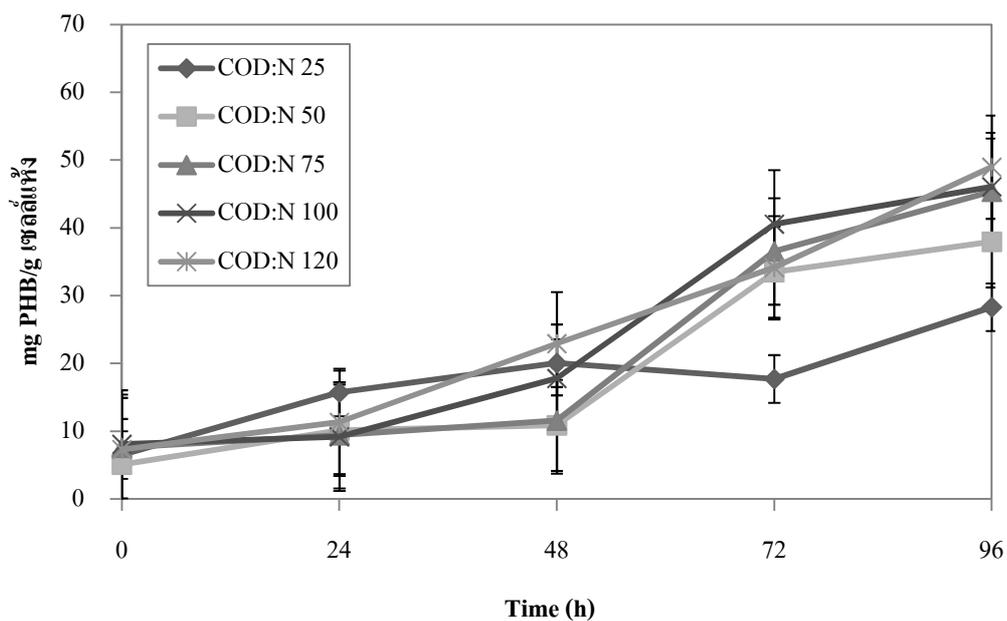




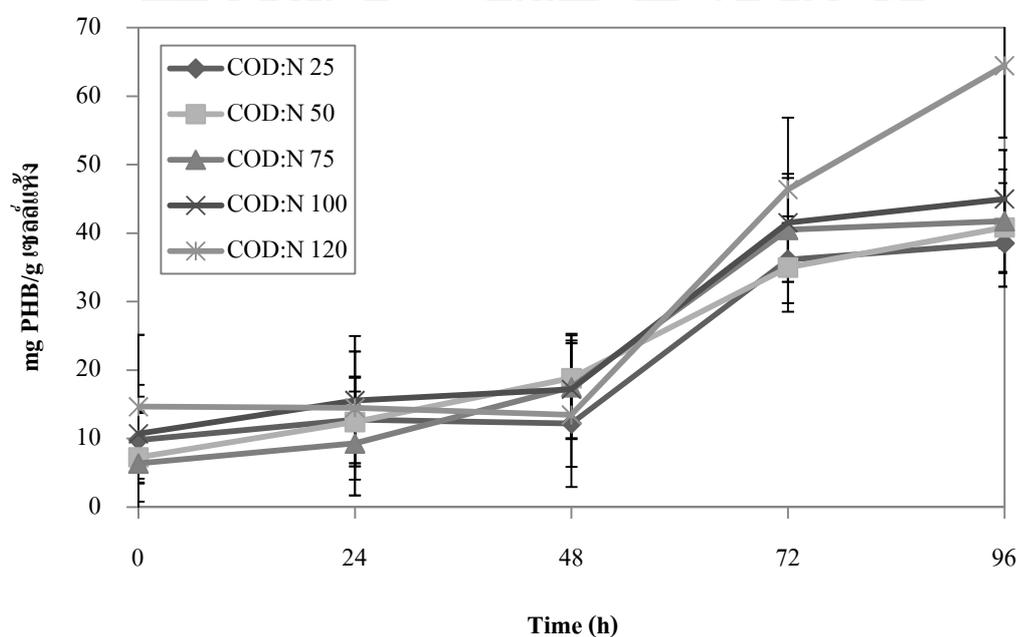
ภาพที่ 8 ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N ต่างๆ ในสภาวะการให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N ต่างๆ ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



ภาพที่ 10 ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N ต่างๆ ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



ภาพที่ 11 ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N ต่างๆ ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 ปริมาณ PHB ที่ 96 ชั่วโมง ที่อัตราส่วน COD:N ต่างๆ ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง และสภาวะการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

สภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ	COD:N (mg/l)	ค่าเฉลี่ย PHB (mg/l)
24:0	25	27.81 ^a
	50	35.89 ^a
	75	45.09 ^b
	100	46.82 ^b
	120	48.47 ^b
15:9	25	38.53 ⁿ
	50	40.84 ⁿ
	75	41.75 ⁿ
	100	45.00 ⁿ
	120	64.47 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกัน (a และ b) แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ n คือค่าเฉลี่ย แต่ละค่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.3 ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนเสริมต่างๆ ต่อการสะสม PHB ที่อัตราส่วน COD:N ต่างๆ ร่วมกับการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ

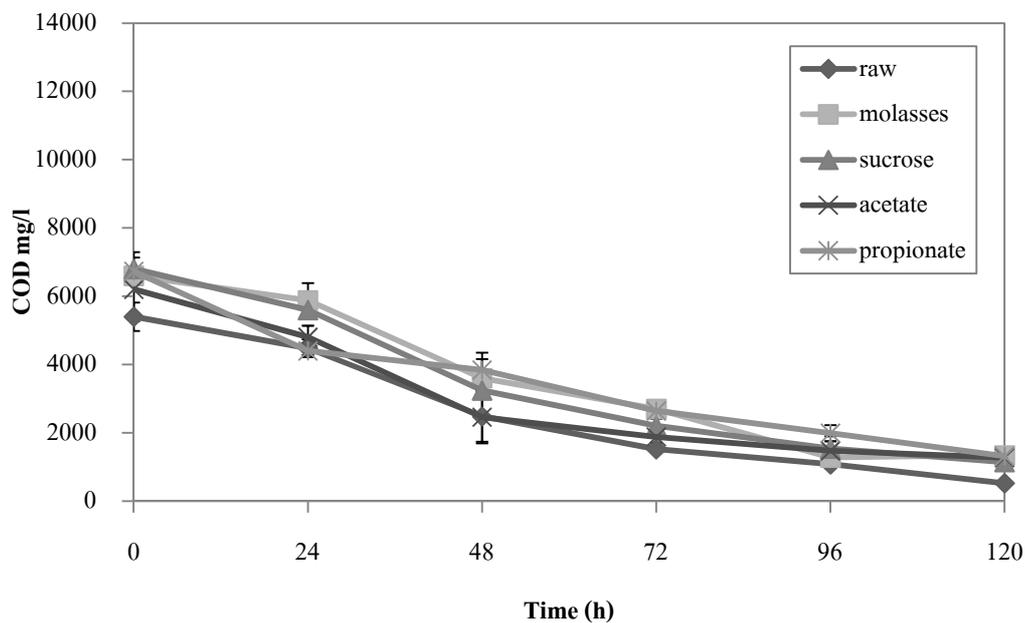
จากการทดลองที่ 1.2 พบว่าเมื่อกำหนดอัตราส่วน COD:N ต่างๆ ในน้ำเสีย อัตราส่วน COD:N 120 ให้ผลการสะสม PHB สูงสุดภายใต้สภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง จากนั้นนำสภาวะนี้มาศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนเสริมชนิดต่างๆ ที่ส่งผลต่อการสะสม PHB ในกากตะกอนจุลินทรีย์ โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมปรับอัตราส่วน COD:N ได้แก่ กากน้ำตาล น้ำตาลทราย อะซิเตด และ โพรพิโอเนต น้ำเสียที่ใช้ในการทดลองมีอัตราส่วน COD:N 80 และแปรผันอัตราส่วน COD:N 120 150 และ 170 ร่วมกับการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

เมื่อเวลาผ่านไปพบว่า COD ในน้ำเสียที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนเสริมต่างชนิดกัน มีแนวโน้มความเข้มข้นของ COD ลดลงคล้ายคลึงกัน ที่อัตราส่วน COD:N 120 ค่า COD จะอยู่ในช่วง 6200-6730 mg/l และลดลงเป็น 520-1310 mg/l ในเวลา 120 ชั่วโมง ดังภาพที่ 12 ส่วนที่อัตราส่วน COD:N 150 ค่า COD จะอยู่ในช่วง 10400-11200 mg/l และลดลงเป็น 1380-3560 mg/l ในเวลา 120 ชั่วโมง ดังภาพที่ 13 และที่อัตราส่วน COD:N 170 ค่า COD จะอยู่ในช่วง 11340-12240 mg/l และลดลงเป็น 2960-4320 mg/l ในเวลา 120 ชั่วโมง ดังภาพที่ 14 การลดลงของค่า COD แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนเสริมที่นำมาใช้ในการทดลองได้ทุกชนิด

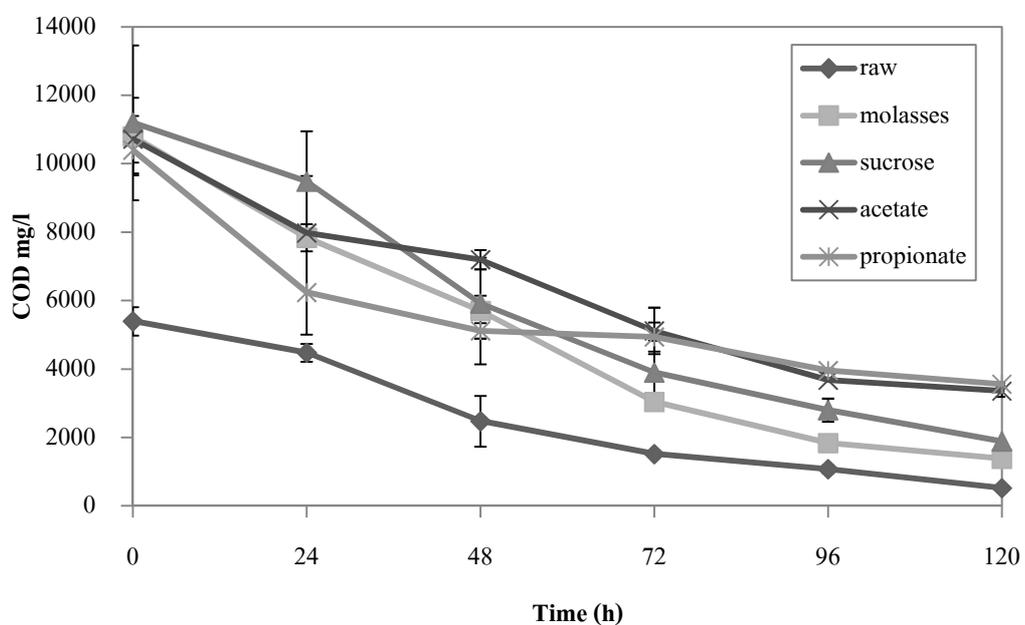
เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ PHB ที่สะสมในเซลล์จุลินทรีย์ที่เจริญภายใต้สภาวะต่างๆ พบว่า การเพิ่ม COD:N จาก 120 เป็น 150 และ 170 ส่งผลให้การสะสม PHB ลดลงในทุกชุดการทดลอง ดังภาพที่ 15 นอกจากนี้ การสะสม PHB ภายใต้สภาวะคาร์บอนสูงดังกล่าวยังมีการสะสม PHB ต่ำกว่าสภาวะควบคุม ซึ่งใช้น้ำเสียดิบ ซึ่งมีค่า COD:N 80 คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Wang *et al.* (2007) ศึกษาผลของอัตราส่วน C:N ที่ 20 40 60 80 100 120 และ 140 (mol/mol) โดยใช้บิวทิเรตและวาเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นกรดเริ่มต้น 1 g/l พบว่า อัตราส่วน C:N 100 ให้ปริมาณการผลิต PHA สูงสุดเท่ากับ 0.106 g/g COD และที่อัตราส่วน C:N 120 และ 140 ให้ผลการผลิต PHA ที่ลดลง เท่ากับ 0.102 และ 0.098 g/g COD ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนเสริมชนิดต่างๆ ต่อการสะสม PHB พบว่า น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมที่ดีที่สุด โดยการปรับ COD:N เป็น 120 โดยใช้น้ำตาลทรายสามารถกระตุ้นกากตะกอนจุลินทรีย์ให้สะสม PHB ได้ 83.79 mg/g เซลล์แห้ง (ภาพที่ 15) รองลงมาได้แก่ กากน้ำตาล ในขณะที่การใช้โพรพิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมมีการสะสม PHB ต่ำสุด โดยมีการสะสมต่ำกว่าสภาวะควบคุมที่

ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า การใช้แหล่งคาร์บอนเสริมด้วยกากน้ำตาล อะซิเตด และซูดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเสริม พบว่าให้ผลการสะสม PHB ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้กากน้ำตาลทรายและ โพรพิโอเนต เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมให้ผลการสะสม PHB แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

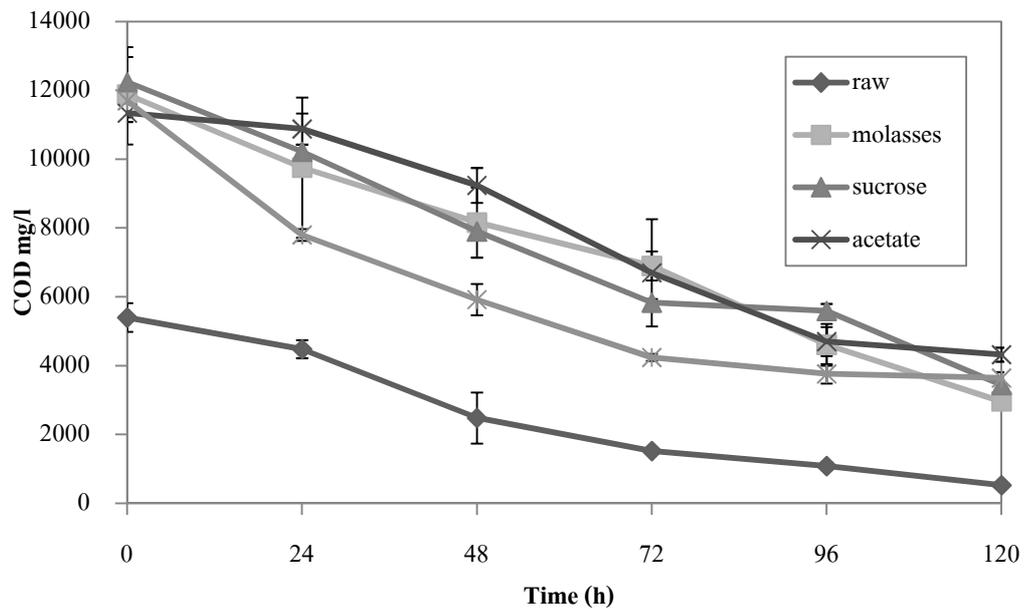
การกำหนดอัตราส่วน COD:N ร่วมกับการใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม สามารถกระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิต PHB ได้เพิ่มขึ้น คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Wang and Lee (1997) ซึ่งพบว่า เมื่อทำการเลี้ยงจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัดและมีการให้น้ำตาลทรายเป็น แหล่งคาร์บอนทำให้การผลิต PHB ในเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มขึ้น และคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ ขวัญใจ (2554) ที่ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต PHB ของแบคทีเรีย *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 โดยใช้ฟรุกโตส ซูโครส (lab. Grade) ซูโครสทางการค้า มอลโทเด็กซ์ทรินทางการค้า ไฮโดรไลเซทของแป้งมันสำปะหลัง และไฮโดรไลเซทของกากมันสำปะหลัง พบว่า การใช้ซูโครสทางการค้า มีการผลิต PHB ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และงานวิจัยของ Chien *et al.* (2007) ได้ศึกษาผลการใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตะกอนในทะเล ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ M11 M14 M20 และ M31 พบว่าสายพันธุ์ M11 และ M14 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุด เท่ากับ 30.40 และ 45.50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้น้ำตาลทรายเป็น แหล่งคาร์บอน คล้ายคลึงกับการทดลองของ วันกุลส (2553) ซึ่งศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนซึ่งเป็น น้ำตาลที่มีผลต่อการเจริญและสังเคราะห์ PHB พบว่า *Bacillus megaterium* P-12 สามารถเจริญและ สังเคราะห์ PHB ได้ดีที่สุดในน้ำตาลทราย โดยมีปริมาณการผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 56.46 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และยังมีรายงานว่าในธรรมชาติแบคทีเรีย *A. lactus* สามารถ เจริญเติบโตและใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB ได้ดีกว่าการใช้แหล่งคาร์บอน ชนิดอื่น (Wang and Lee, 1997)



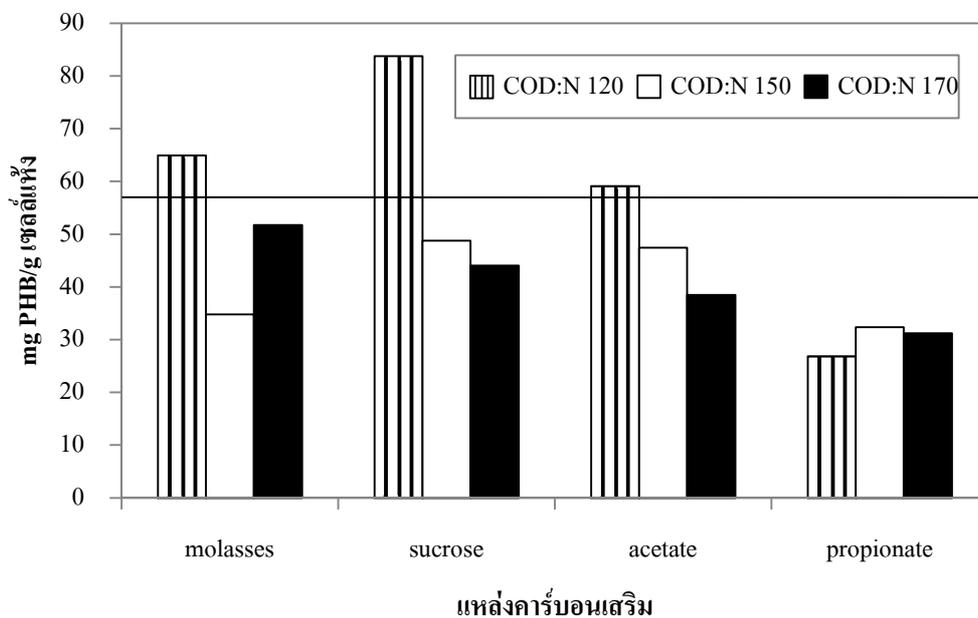
ภาพที่ 12 ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ในสถานะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ชุตควบคุมได้แก่น้ำเสียดิบมีค่า COD:N 80



ภาพที่ 13 ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 150 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ในสถานะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ชุตควบคุมได้แก่น้ำเสียดิบมีค่า COD:N 80



ภาพที่ 14 ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 170 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน และชุดควบคุมได้แก่น้ำเสียดิบมีค่า COD:N 80 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



ภาพที่ 15 PHB ที่ 96 ชั่วโมง ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ที่แหล่งคาร์บอนเสริมต่างกัน (เส้นสีดำแสดงค่า PHB ในสภาวะที่ใช้น้ำเสียดิบ COD:N 80)

ตารางที่ 6 ปริมาณ PHB ที่ 96 ชั่วโมง ที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

สภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ	C-source (mg/l)	ค่าเฉลี่ย PHB (mg/l)
15:9	raw	58.41 ⁿ
	molasses	64.97 ⁿ
	sucrose	83.79 ^a
	acetate	59.63 ⁿ
	propionate	43.03 ^b

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกัน (a และ b) แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ n คือค่าเฉลี่ยแต่ละค่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

2. คัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHB ได้

2.1 สร้างสภาวะการเจริญที่ไม่สมดุลเพื่อกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่สะสม PHB

เลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะการเจริญที่ไม่สมดุลคือ การให้อาหารร่วมกับการอดอาหาร โดยใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหารให้เติมน้ำเสียทุก 2 3 5 หรือ 7 วัน เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ ในสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง และสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้กลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHB อดส่วนกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถสะสม PHB ได้จะตายลง และทำการเก็บตัวอย่างครั้งแรกเมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่สาม แล้วเลี้ยงต่อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHB ได้ จากนั้นเปลี่ยนใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหารอีกครั้ง เลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ และทำการเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์

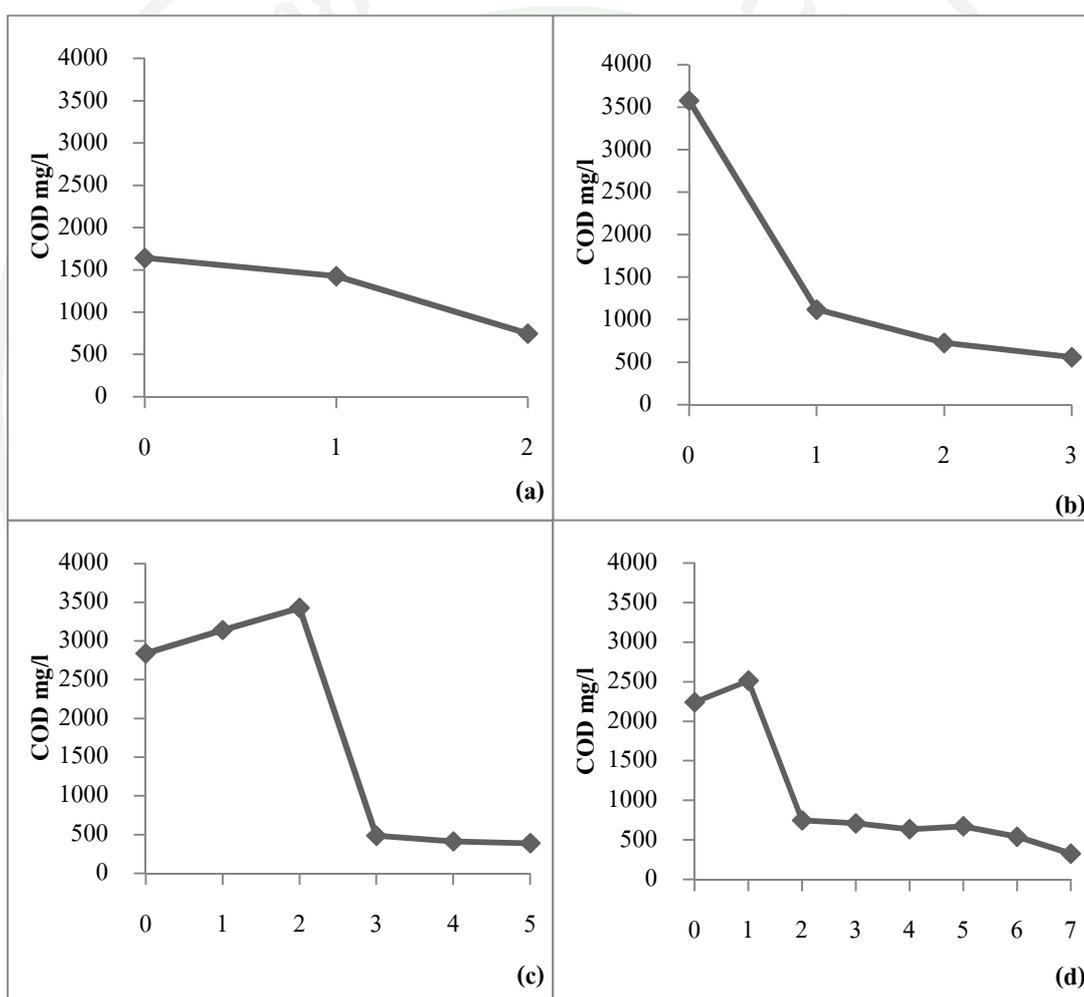
เมื่อเวลาผ่านไปพบว่า COD ในน้ำเสียมีค่าลดลง โดยในสภาวะการให้อาหารทุก 2 และ 3 วัน มีแนวโน้มความเข้มข้นของ COD ลดลงคล้ายคลึงกัน ภายใต้สภาวะการให้อากาศทั้งสองแบบ โดยพบว่า ที่สภาวะการให้อาหารทุก 2 วัน ค่า COD เริ่มต้นอยู่ในช่วง 1643-2017 mg/l และลดลงเป็น 747-1120 mg/l (ภาพที่ 16-17 (a)) และที่สภาวะการให้อาหารทุก 3 วัน ค่า COD เริ่มต้นอยู่ในช่วง 3579-4874 mg/l และลดลงเป็น 560-952 mg/l (ภาพที่ 16-17 (b)) จะเห็นได้จากค่า COD ว่า

ยังคงมีสารอินทรีย์เหลืออยู่ในระบบ ส่วนสภาวะการให้อาหารทุก 5 และ 7 วัน เป็นระบบขาดแคลนอาหาร ค่า COD จึงลดลงจนเกือบหมด โดยที่สภาวะการให้อาหารทุก 5 มีค่า COD เริ่มต้นอยู่ในช่วง 2689-2839 mg/l และลดลงเป็น 283-388 mg/l (ภาพที่ 16-17 (c)) และในสภาวะการให้อาหารทุก 7 วัน ค่า COD ก็ลดลงเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 16-17 (d))

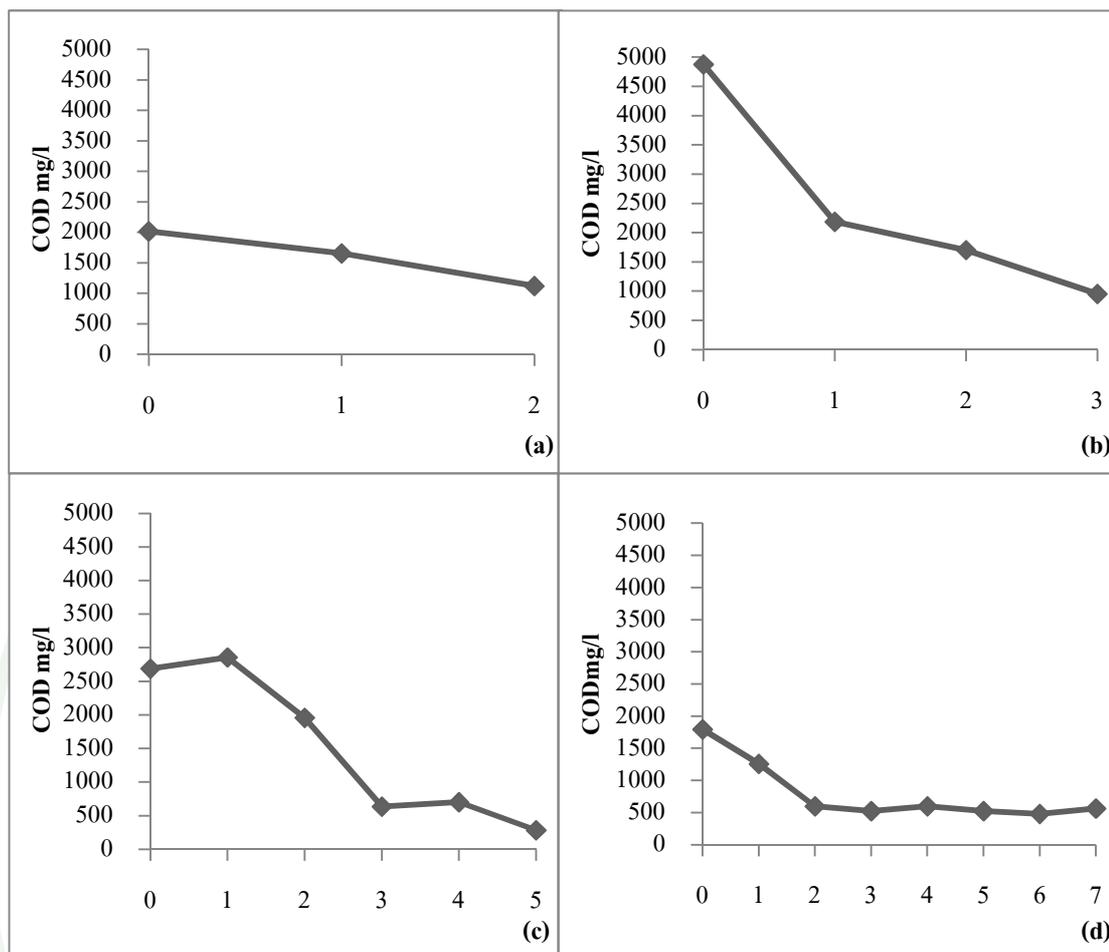
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ PHB ที่สะสมในเซลล์ตลอดระยะเวลาการทดลองพบว่า การกำหนดปัจจัยทางด้านการให้อากาศร่วมกับการให้อาหารสลับกับอดอาหาร มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการสะสม PHB มากกว่าสภาวะให้อาหารสลับกับอดอาหารเพียงอย่างเดียว พบว่า ในสภาวะการให้อากาศ 24 ชั่วโมง ที่สภาวะการให้อาหารทุก 2 3 5 และ 7 วัน ในวันที่ 35 พบการสะสม PHB เท่ากับ 15.97 11.21 22.33 และ 4.88 mg/g เซลล์แห้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 18) และในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ในวันที่ 35 พบการสะสม PHB เท่ากับ 31.94 15.02 64.73 และ 5.92 mg/g เซลล์แห้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 19) และจากตารางที่ 7 พบว่าที่สภาวะการให้อาหารสลับกับอดอาหารทุก 2 3 5 และ 7 วัน ทั้งสภาวะการให้อากาศทั้ง 2 แบบ ปริมาณการสะสม PHB ในทุกชุดการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในภาพรวมสภาวะการให้อาหารทุก 5 วัน เป็นสภาวะที่กระตุ้นการสะสม PHB มากที่สุด แสดงว่าเป็นสภาวะขาดแคลนอาหารอย่างแท้จริง จึงสามารถกระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิต PHB ได้มากที่สุด และส่วนสภาวะให้อาหารทุก 7 วัน เป็นสภาวะที่ขาดแคลนอาหารเช่นกันแต่เนื่องจากมีระยะเวลาการอดอาหารนานจุลินทรีย์จึงอาจใช้ PHB ที่สะสมไว้ในเซลล์เพื่อการอยู่รอด ส่วนการให้อาหารทุก 2 และ 3 วัน ระบบยังคงมีอาหารเพียงพอแก่การเจริญ จุลินทรีย์จึงสะสม PHB ไว้ในเซลล์เพียงเล็กน้อย ซึ่งคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Bengtsson *et al.* (2008) ศึกษาการใช้น้ำเสียจากโรงงานกระดาษในการผลิต PHA โดยสร้างสภาวะการให้อาหารและอดอาหารเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสะสม PHA พบว่า ในสภาวะอดอาหารสามารถให้จุลินทรีย์สะสม PHA ได้สูงถึง 43-48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในสภาวะที่มีอาหารมากพอจุลินทรีย์จะสะสม PHA ได้เพียง 32 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่มีอาหารจำกัดจะสามารถกระตุ้นให้จุลินทรีย์สะสม PHA เพิ่มขึ้นได้

การทดลองก่อนหน้านี้เป็นการสร้างสภาวะกระตุ้นจุลินทรีย์ให้สะสม PHB เพิ่มมากขึ้นจากสภาวะปกติ แต่การทดลองนี้เป็นการสร้างสภาวะการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศร่วมกับการให้อาหารสลับกับอดอาหารเพื่อคัดกรองจุลินทรีย์ในระบบให้เหลือแต่จุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิต PHB ส่วนจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่สามารถผลิต PHB ได้ จะไม่สามารถทนต่อสภาวะนี้ได้และตายลง ทำให้สัดส่วนจุลินทรีย์ที่สะสม PHB ในประชากรเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณ PHB ที่สะสมในเซลล์

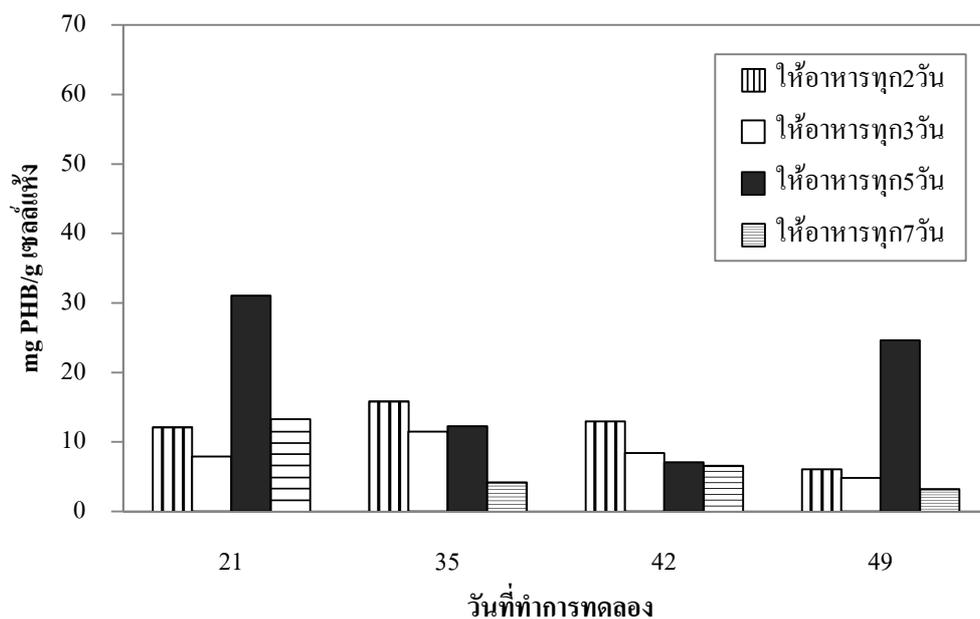
ได้ในการทดลองนี้มีปริมาณน้อยกว่าที่คาดการณ์ไว้ อาจเนื่องจากว่า วิธีการหาปริมาณความเข้มข้น เชื้อจุลินทรีย์ในรูป MLSS นั้น ไม่สามารถบอกได้ว่า สิ่งที่วัดได้นั้นเป็นน้ำหนักของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตหรือเป็นซากจุลินทรีย์ที่ตายไป อาจส่งผลให้ปริมาณ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ไม่เพิ่มขึ้นอย่างที่ควรจะเป็น และจุลินทรีย์ในระบบอาจใช้สารอินทรีย์ในน้ำเสียผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น โคโพลีเมอร์ตัวอื่น หรือไบโอฟิล์ม นอกเหนือจากการผลิต PHB จึงทำให้ปริมาณ PHB ที่ได้้น้อยกว่าที่ควรจะเป็น



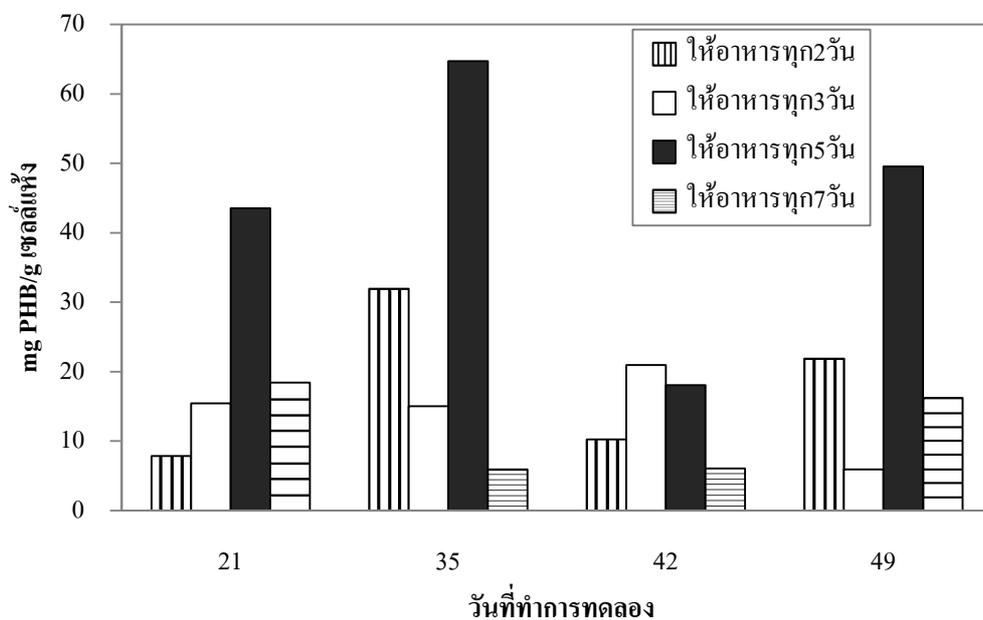
ภาพที่ 16 COD ในการทดลองที่ได้รับอาหารทุก 2 วัน (a), 3 วัน (b), 5 วัน (c) และ 7 วัน (d) ที่สภาวะการให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



ภาพที่ 17 COD ในการทดลองที่ได้รับอาหารทุก 2 วัน (a), 3 วัน (b), 5 วัน (c) และ 7 วัน (d) ที่สภาวะการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



ภาพที่ 18 ปริมาณ PHB ที่สภาวะการให้อาหารทุก 2 3 5 และ 7 วัน ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



ภาพที่ 19 ปริมาณ PHB ที่สภาวะการให้อาหารทุก 2 3 5 และ 7 วัน ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

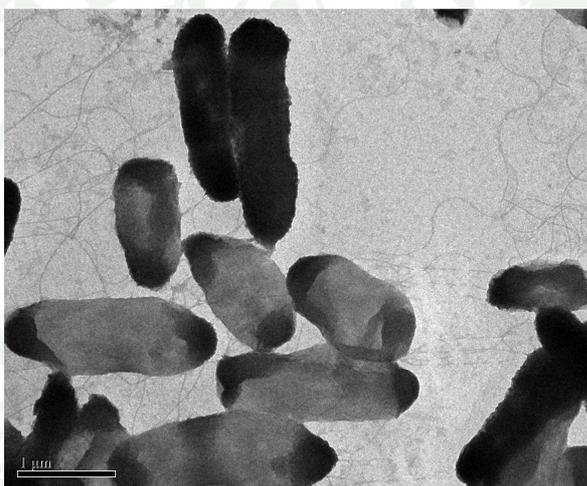
ตารางที่ 7 ปริมาณ PHB ในวันที่ 35 ที่สภาวะการให้อาหารทุก 2 3 5 และ 7 วัน ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง และสภาวะการให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

สภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ	ให้อาหารสลับกับอดอาหาร (mg/l)	ค่าเฉลี่ย PHB (mg/l)
24:0	ทุก 2 วัน	15.97 ^a
	ทุก 3 วัน	11.21 ^b
	ทุก 5 วัน	22.33 ^c
	ทุก 7 วัน	4.88 ^d
15:9	ทุก 2 วัน	31.94 ^a
	ทุก 3 วัน	15.02 ^b
	ทุก 5 วัน	64.73 ^c
	ทุก 7 วัน	5.92 ^d

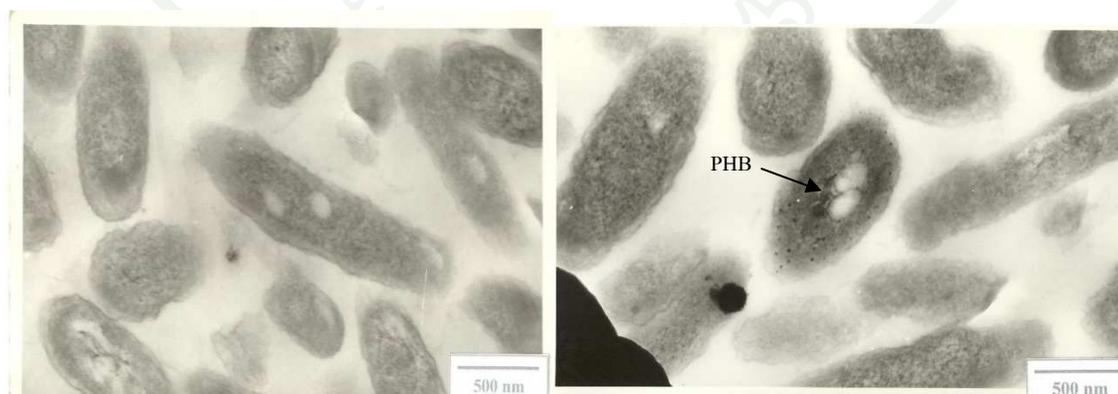
หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกัน a b c และ d แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

2.2 ศึกษาการสะสม PHB ในเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกากตะกอนจุลินทรีย์

นำกากตะกอนที่ผ่านการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่สะสม PHB จากการทดลองที่ 2.1 มาคัดเลือกโดยนำกากตะกอนจุลินทรีย์มาเกลี่ยลงบนอาหาร nutrient agar ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ จากนั้นนำมาย้อมด้วย Sudan Black B เพื่อดูโพลีเมอร์ภายในเซลล์ ซึ่ง Sudan Black B เป็นสีที่สามารถย้อมสารที่ไม่มีขั้ว ทำให้สามารถย้อมติดไขมันได้ จึงใช้ Sudan Black B เพื่อย้อมทดสอบไตรกลีเซอไรด์ ลิพิด และไลโปโปรตีน เมื่อนำมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเชื้อที่มีโพลีเมอร์อยู่ภายในเซลล์ 4 ไอโซเลท และนำเชื้อที่ได้มาดูโพลีเมอร์ภายในเซลล์ด้วย transmission electron microscope (TEM) อีกครั้ง พบว่าจุลินทรีย์มีลักษณะเซลล์โป่งพองและมีโพลีเมอร์ภายในเซลล์ ดังภาพที่ 20-21



ภาพที่ 20 เซลล์จุลินทรีย์ที่มี PHB โดยย้อมแบบ negative stain



ภาพที่ 21 การสะสม PHB ในเซลล์จุลินทรีย์

เมื่อทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHB ได้จากกากตะกอนจุลินทรีย์ 4 ไอโซเลท จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้มาศึกษาในสภาวะการให้อากาศ 24 ชั่วโมง และให้อากาศสลั้กับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง โดยใช้ น้ำเสียที่มีอัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้ น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม เปรียบเทียบกับน้ำเสียที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนใดๆ (COD:N 75)

เมื่อวิเคราะห์ค่า COD ในน้ำเสียที่ระยะเวลาต่างๆ มีค่าลดลงคล้ายคลึงกันทั้ง 4 ไอโซเลท โดยพบว่า ที่อัตราส่วน COD:N 75 ทั้งในสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมงและสภาวะให้อากาศสลั้กับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ค่า COD เริ่มต้น อยู่ในช่วง 4180-4920 mg/l ลดลงเป็น 980-1370 mg/l ดังภาพที่ 22-23 และที่อัตราส่วน COD:N 120 ทั้งในสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมงและสภาวะให้อากาศสลั้กับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ค่า COD เริ่มต้น อยู่ในช่วง 7030-8690 mg/l ลดลงเป็น 1740-2630 mg/l ดังภาพที่ 24-25 ดังนั้นการลดลงของค่า COD อาจเนื่องมาจากเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเสียเพื่อใช้ในการเจริญและเก็บสะสมในรูปของ PHB

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสะสม PHB ของเชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 4 ไอโซเลท ที่แยกได้จากกากตะกอนจุลินทรีย์ พบว่า การให้อากาศสลั้กับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นการสะสม PHB ในเซลล์จุลินทรีย์ได้สูงกว่าสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง โดยในสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง ในไอโซเลท 3 ที่อัตราส่วน COD:N 75 จุลินทรีย์สามารถสะสม PHB ได้เท่ากับ 120.40 mg/g เซลล์แห้ง และที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้ น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม สามารถสะสม PHB ได้เท่ากับ 165.87 mg /g เซลล์แห้ง ดังภาพที่ 26 ส่วนในสภาวะให้อากาศสลั้กับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ในไอโซเลท 3 ที่อัตราส่วน COD:N 75 สามารถสะสม PHB ได้เท่ากับ 164.30 mg /g เซลล์แห้ง และที่อัตราส่วน COD:N 120 ผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 189.45 mg /g เซลล์แห้ง ดังภาพที่ 27

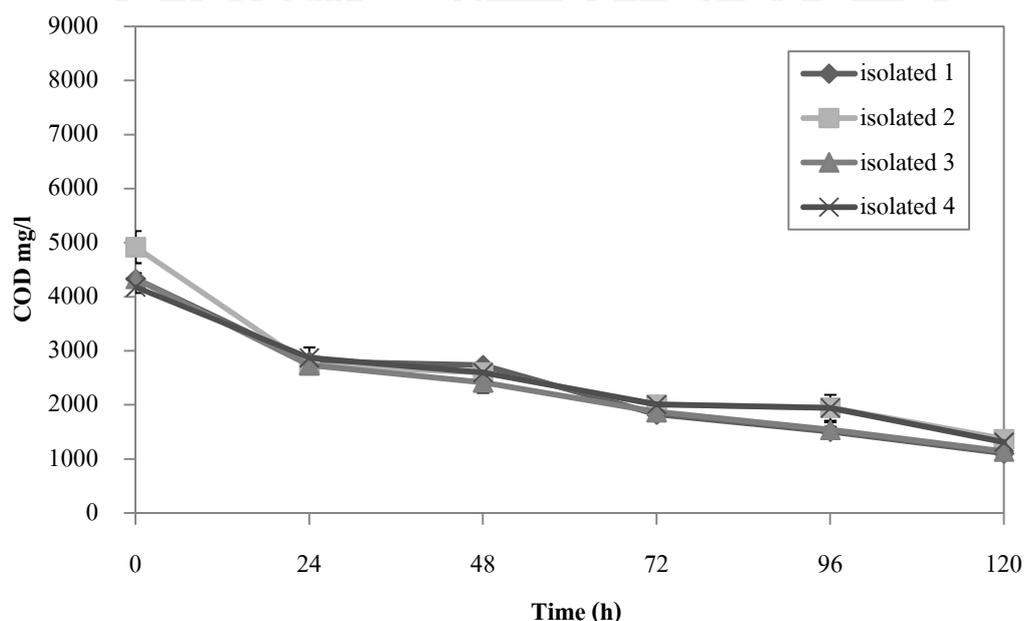
จากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าเชื้อแต่ละไอโซเลทส่งผลต่อปริมาณการสะสม PHB อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยชุดการทดลองที่สภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมงที่ COD:N 120 เชื้อ ไอโซเลทที่ 1 และ 2 ให้ผลการสะสม PHB ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ ไอโซเลทที่ 3 และ 4 ให้ผลการสะสม PHB ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนที่สภาวะให้อากาศสลั้กับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมงที่ COD:N 120 เชื้อแต่ละไอโซเลทให้ผลการสะสม PHB แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกากตะกอนจุลินทรีย์มีการสะสม PHB ดีกว่าในเชื้อผสม ซึ่งจากการทดลองที่ 1.3 ในสภาวะกระตุ้นเดียวกัน เชื้อผสมสามารถสะสม PHB ได้เพียง 83.79 mg /g เซลล์แห้ง และมีการศึกษาการผลิต PHB จากเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกากตะกอนเช่นเดียวกันโดยการทดลองของ Law *et al.*, 2001 ได้ทำการคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์จากกากตะกอนจุลินทรีย์ในระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน พบเชื้อที่ผลิตพลาสติกชีวภาพได้ทั้งหมด 2 ไอโซเลท คือ HF-1 และ HF-2 และยังพบว่าเชื้อทั้ง 2 สามารถใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารและใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพได้ โดยพบการสะสม PHB เท่ากับ 19.22 และ 10.18 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

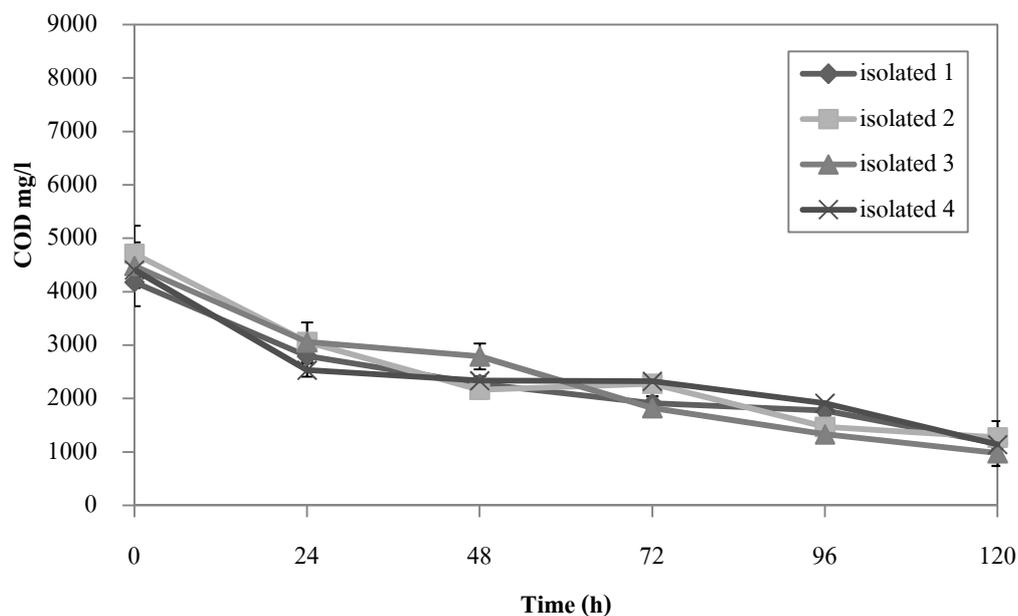
ในการทดลองที่ใช้เชื้อบริสุทธิ์ในการผลิต PHB พบปริมาณการสะสม PHB ในเซลล์จุลินทรีย์ไม่มากนัก อาจเนื่องจากว่า ระบบที่ทำการทดลองไม่ได้อยู่ในสภาวะที่ปลอดเชื้อ น้ำเสียที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีอยู่ในน้ำเสีย และเกิดการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมจึงทำให้จุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถสะสม PHB ได้นั้นไม่สามารถใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหาร ได้อย่างเต็มที่ จากการศึกษาของ Sangkharak (2007) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* สายพันธุ์ N20 ในน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์มจากระบบบำบัดแบบไร้อากาศ โดยเปรียบเทียบการฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อน้ำเสีย พบว่า น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิต PHA ได้ดีกว่าน้ำเสียที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรใช้น้ำเสียที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อลดความแปรปรวนจากสิ่งแวดล้อม และวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ PHB นั้นสามารถวิเคราะห์โพลีเมอร์ได้เพียงชนิดเดียวคือ PHB ไม่สามารถตรวจพบโคโพลีเมอร์ชนิดอื่นได้ จึงทำให้โพลีเมอร์ที่ตรวจพบได้นั้นอาจน้อยกว่าที่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้จริง ควรมีการวิเคราะห์โพลีเมอร์ตัวอื่นด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การวิเคราะห์ด้วย Gas chromatography เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อที่แยกจากกากตะกอนจุลินทรีย์นั้นอาจมีประสิทธิภาพในการผลิต PHB น้อยกว่าที่ตั้งสมมุติฐานไว้ อาจเนื่องมาจากวิธีการคัดเลือกที่ไม่เฉพาะเจาะจงมากนัก ควรกำหนดปัจจัยเสริมอื่นๆ เช่น การกำหนดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์กลุ่มที่สะสม PHB ได้ เพื่อให้จุลินทรีย์กลุ่มนั้นเด่นชัดและกระตุ้นให้มีการสะสม PHB มากขึ้นด้วย

ปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีคุณสมบัติเด่นในการผลิตหรือการใช้วัสดุอื่นๆ เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน รวมไปถึงการศึกษาระยะยาวของยีนที่สำคัญในการสังเคราะห์ PHB ในเซลล์แบคทีเรีย หรือการนำยีนที่สำคัญไปใส่ในจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น *E. coli* เพื่อให้จุลินทรีย์ชนิดนั้นสามารถสร้าง PHB ได้ นอกจากคุณสมบัติของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่ง

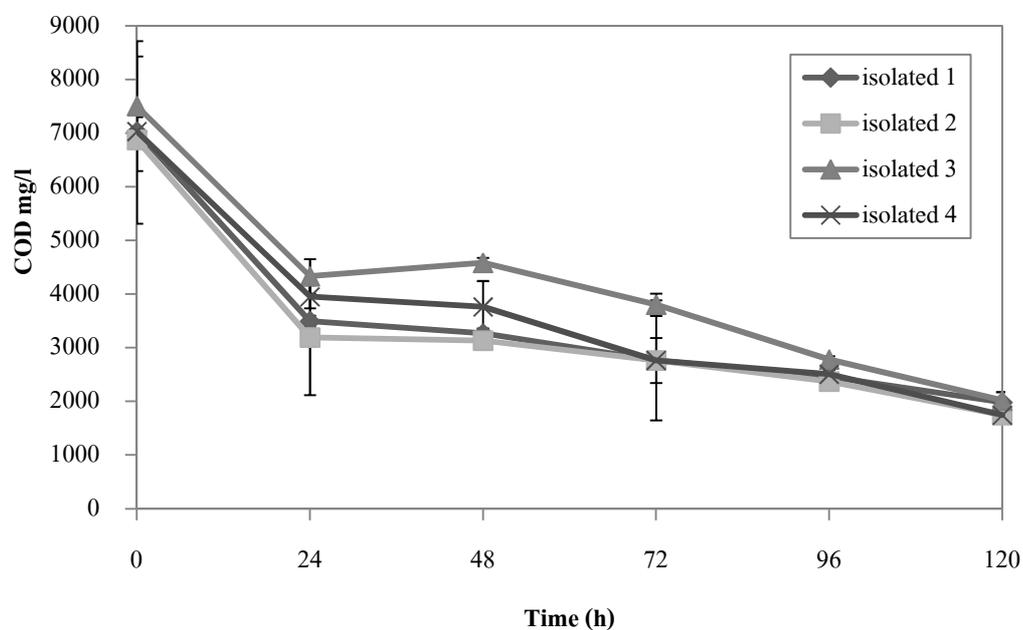
อาหารแล้วปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิต PHB ได้แก่ ความคงตัวของระบบการผลิต ปริมาณเซลล์ สะสม ประสิทธิภาพในการสกัด PHB และอัตราการใช้ PHB เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน โดยงานวิจัยต่างๆ ในตารางที่ 9-10 แสดงให้เห็นว่าชนิดของจุลินทรีย์ และวัตถุดิบต่างๆ ที่ใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ วัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิต PHB มีอยู่หลายประเภทขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ที่เราต้องการ ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิต PHB และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนนั้นๆ ของจุลินทรีย์ด้วย การใช้แหล่งคาร์บอนที่ผ่านการปรับแต่งเช่น การใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านการไฮโดรไลสเสท การเปลี่ยนสารอินทรีย์ในน้ำเสียให้กลายเป็นกรดไขมันระเหยง่าย เป็นต้น อาจช่วยส่งเสริมให้จุลินทรีย์สามารถนำสารอาหารจากแหล่งนั้นไปใช้ได้มากขึ้น การศึกษาในครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ อาจมีปริมาณการผลิต PHB ที่ต่ำกว่า แต่เนื่องจากการใช้วัตถุดิบที่หาง่ายและเป็นวัสดุเหลือทิ้ง ซึ่งเป็นการไม่สิ้นเปลืองในกระบวนการผลิต จึงมีความสามารถที่จะนำมาพัฒนาสู่กระบวนการผลิต PHB ได้เช่นกัน



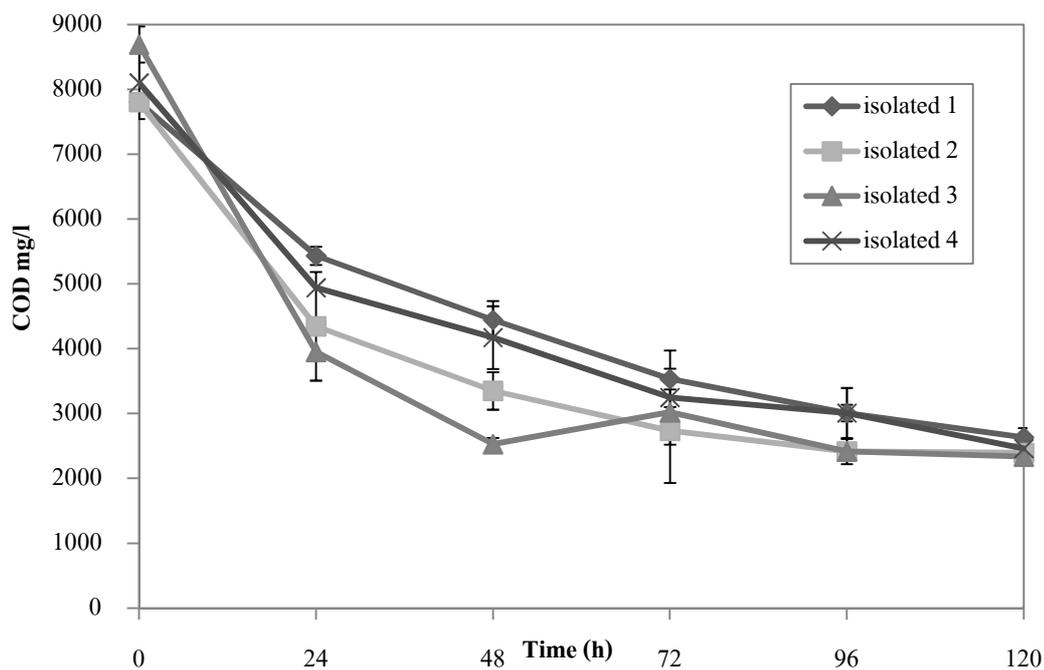
ภาพที่ 22 ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 75 ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



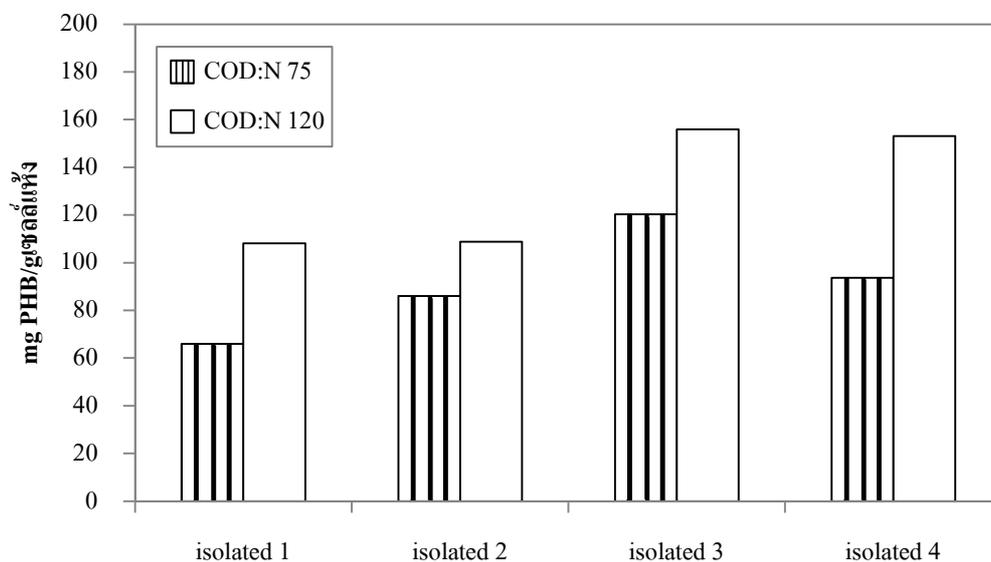
ภาพที่ 23 ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 75 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



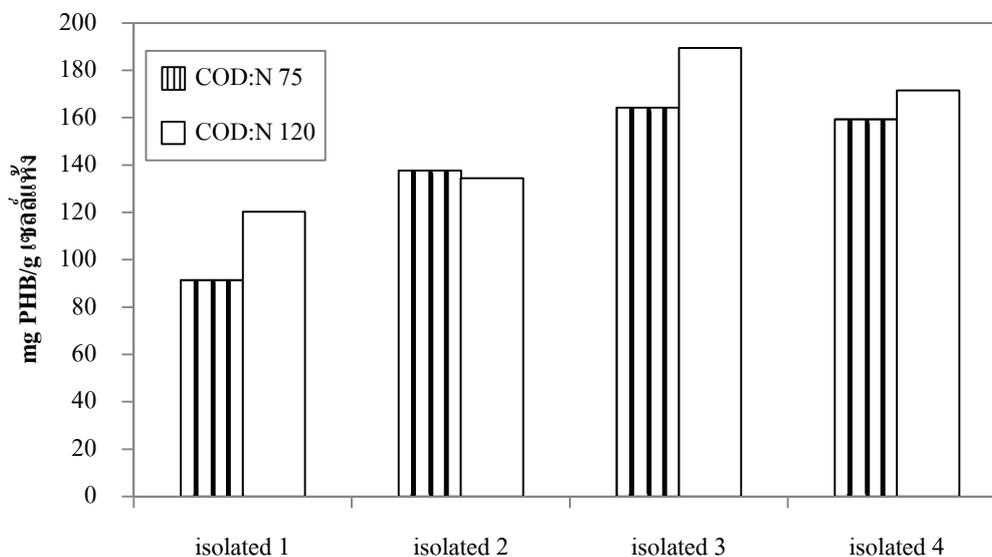
ภาพที่ 24 ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



ภาพที่ 25 ค่า COD ของน้ำเสียที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้ น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



ภาพที่ 26 PHB ที่ 72 ชั่วโมง ในไอโซเลต 1 2 3 และ 4 ที่อัตราส่วน COD:N 75 และ 120 ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



ภาพที่ 27 PHB ที่ 72 ชั่วโมง ในไอโซเลท 1 2 3 และ 4 ที่อัตราส่วน COD:N 75 และ 120 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

ตารางที่ 8 PHB ที่ 72 ชั่วโมง ในไอโซเลท 1 2 3 และ 4 ที่อัตราส่วน COD:N 120 ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง และสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

สภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ	isolated (mg/l)	ค่าเฉลี่ย PHB (mg/l)
24:0	isolated 1	108.06 ^a
	isolated 2	108.83 ^a
	isolated 3	165.87 ^b
	isolated 4	153.07 ^b
15:9	isolated 1	120.22 ^a
	isolated 2	134.93 ^b
	isolated 3	189.45 ^c
	isolated 4	171.46 ^d

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกัน a b c และ d แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 9 การผลิต PHB จากกากตะกอนจุลินทรีย์ที่สภาวะต่างๆ

source microorganisms	substrates	culture mode	PHB (%)	references
activated sludge	municipal wastewater+acetate	batch	31.0	Chua <i>et al.</i> (2003)
activated sludge	food processing wastewater	batch	28.3	Khardenavis <i>et al.</i> (2007)
activated sludge	molasses based spentwash	batch	22.2	Khardenavis <i>et al.</i> (2009)
activated sludge	municipal wastewater	batch	21.0	Chua <i>et al.</i> (2003)
activated sludge	synthetic wastewater +acetate	batch	18.3	Kumar <i>et al.</i> (2004)
activated sludge	น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม	batch	12.4	สิริลักษณ์ (2551)
activated sludge	น้ำเสียจากโรงงานขนม +sucrose	batch	11.8	การศึกษานี้

ตารางที่ 10 การผลิต PHB จากเชื้อบริสุทธิ์ที่สภาวะต่างๆ

source microorganisms	substrates	culture mode	PHB (%)	references
<i>Azotobacter chroococcum</i>	starch	batch oxygen limitation	73.9	Kim (2000)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I	น้ำเสียจากโรงงานอาหารทะเล	batch	30.6	ศิริวรรณ (2552)
<i>Vibrio</i> sp. M11	marine basal medium+sucrose	batch	30.4	Chien <i>et al.</i> (2007)
<i>Alcaligenes latus</i> TISTR 1403	อาหารตัดแปลงสำหรับผลิต PHB +กากมันสำปะหลังไฮโดรไลเสท	batch	57.6	ขวัญใจ (2011)
<i>Bacillus megaterium</i>	synthetic wastewater +sugarcane molasses	batch	44.6	Gouda <i>et al.</i> (2001)
<i>B. subtilis</i> 25	nutrient broth culture medium+sucrose	batch	7.37	Yüksekdag <i>et al.</i> (2003)
ไอโซเลท 3	น้ำเสียโรงงานขนม+sucrose	batch	18.94	การศึกษานี้

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการศึกษาการใช้น้ำเสียจากโรงงานขนมซึ่งมีค่า COD:N 75-80 เป็นวัตถุดิบในการผลิตโมโนเมอร์พลาสติกชีวภาพโดยกากตะกอนจุลินทรีย์ พบว่าน้ำเสียที่นำมาใช้ในการศึกษามีปริมาณสารอินทรีย์สูงเพียงพอที่จะนำมาเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตพลาสติกชีวภาพ และนอกจากนี้การเจริญในสภาวะที่ไม่สมดุลโดยการให้อากาศสลักับไม่ให้อากาศสามารถกระตุ้นให้จุลินทรีย์สะสม PHB ได้สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง สภาวะที่ไม่ได้รับอากาศนานขึ้นจะส่งผลให้การสะสม PHB เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งในสภาวะให้อากาศสลักับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง พบการสะสม PHB สูงสุด เท่ากับ 67.70 mg/g เซลล์แห้ง เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นต่ำ (1000 mg/l) และเมื่อศึกษาในน้ำเสียที่ปรับอัตราส่วน COD:N 25-120 พบว่า ในสภาวะการให้อากาศ 24 ชั่วโมง การสะสม PHB เพิ่มขึ้นตามอัตราส่วน COD:N ที่เพิ่มขึ้น แต่ที่ COD:N 75 100 และ 120 ให้ผลการสะสม PHB ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า น้ำเสียจากโรงงานขนมมีปริมาณสารอินทรีย์และไนโตรเจนเพียงพอที่จะสร้างสภาวะการเจริญที่ไม่สมดุลและกระตุ้นการสะสม PHB ในกากตะกอนจุลินทรีย์ได้ ในสภาวะให้อากาศสลักับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 25 ถึง 100 มีค่าใกล้เคียงกัน และที่อัตราส่วน COD:N 120 ปริมาณการผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 64.47 mg/g เซลล์แห้ง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสภาวะให้อากาศสลักับไม่ให้อากาศมีอิทธิพลต่อการสะสม PHB ที่อัตราส่วน COD:N 25-100 ส่วนอัตราส่วน COD:N ที่จะมามีอิทธิพลต่อการสะสม PHB ในสภาวะนี้ จะต้องมีความสูงมาก อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาการสะสม PHB ที่อัตราส่วน COD:N 120 150 และ 170 ภายใต้สภาวะให้อากาศสลักับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมต่างๆ กัน พบว่า การเพิ่ม COD:N จาก 120 เป็น 150 และ 170 ส่งผลให้การสะสม PHB ลดลงในทุกชุดการทดลอง และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการสะสม PHB พบว่า การปรับ COD:N เป็น 120 และใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมสามารถกระตุ้นให้จุลินทรีย์สะสม PHB ได้สูงสุด เท่ากับ 83.79 mg/g เซลล์แห้ง รองลงมาได้แก่ กากน้ำตาล ในขณะที่การใช้โพธิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมมีการสะสม PHB ต่ำสุด

จากนั้นคัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHB ได้ จากกากตะกอนที่ผ่านการกระตุ้นในสภาวะการให้อากาศสลักับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง ร่วมกับการให้อาหารทุก 5 วัน คัดเลือกเชื้อ

บริสุทธิ์ได้ 4 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้มาศึกษาในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้ อากาศ 15:9 ชั่วโมง ที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้ น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม พบว่า จุลินทรีย์ไอโซเลท 3 สะสม PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 189.45 mg/g เซลล์แห้ง การใช้กากตะกอน จุลินทรีย์ผลิต PHB นั้นมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้จริงเนื่องจากว่า ขั้นตอนในการเตรียมระบบ ไม่ยุ่งยากแม้ว่าจะมีข้อจำกัดคือได้ผลผลิตต่อเซลล์ต่ำ และปริมาณผลผลิตที่ได้ไม่สม่ำเสมอในแต่ละ ครั้งของการทดลอง ส่วนปริมาณการผลิต PHB จากเชื้อบริสุทธิ์ไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับการ ทดลองอื่น จึงควรศึกษาและพัฒนาต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาผลของฟอสฟอรัสต่อการสะสม PHB ของจุลินทรีย์โดยสร้างสภาวะการกระตุ้น โดยคิดอัตราส่วน COD:N:P ของฟอสฟอรัสเพิ่มเติม
2. วิเคราะห์องค์ประกอบของ PHAs ชนิดอื่นๆ เช่น PHV

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- เขมรัฐ เขมวงศ์. 2550. การคัดเลือกและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโคโพลีเมอร์จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์กลาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ขวัญใจ แก้วจันทร์, สมจิตต์ ปาละกาศ, อัญชญา พัฒนสุขพงษ์ และ กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์. 2554. การผลิตโพลีไฮดรอกซีบีวทิเรต (PHB) โดย *Alcaligenes lactus* TISTR 1403 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา ร่วมกับการได้รับ 2-aminoanthracene, น. 193-201. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ธงชัย วงศ์สุวรรณ. 2550. การผลิตโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้กรดคาร์บอกซิลิกที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ปิยะรัตน์ บุญแสง. 2552. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากจุลินทรีย์. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 37(3): 256-267.
- ปีวรา บุตรวงศ์. 2546. การสังเคราะห์ PHA จากกระบวนการแอนแอโรบิกและแอโรบิกแอกทิเวเต็ดสแตนด์ที่ใช้บำบัดน้ำเสียต่างชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- พิฑูร ตรีวิจิตรเกษม. 2555. ความเข้าใจที่ถูกต้องเกี่ยวกับพลาสติกชีวภาพและพลาสติกธรรมดาทั่วไป. แหล่งที่มา: <http://www.plastic.oie.go.th/fBox/GetFile.aspx>, 23 เมษายน 2555.
- วันกุศล ชนะสิทธิ์. 2553. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโพลี(3-ไฮดรอกซีบีวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลีเลต) โดย *Bacillus* sp. P-12. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด. 2551. สภาพะที่เหมะสมต่อการผลิตโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำเสีย
โรงงานอาหารทะเลโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์จากระบบเอสบีอาร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สิริลักษณ์ บัวทอง. 2551. การศึกษาศักยภาพในการผลิตสารโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากตะกอน
ของระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โสภา ชินเวชกิจวานิชย์. 2547. อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHA ของเชื้อผสมโดยน้ำเสีย.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

โสภา ชินเวชกิจวานิชย์. 2550. พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ. วารสารสิ่งแวดล้อม. 11(3): 49-
56.

Anderson, A.J. and J.P. Wynn. 1995. Microbial polyhydroxyalkanoates, polysaccharides and
lipid, pp. 325-333. In C. Ratiedge and B. Kristiansen, eds. **Basic Biotechnology**
Cambridge University.

Bengtsson, S., A. Werker, M. Christensson and T. Welander. 2008. Production of
polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater.
Bioresource Technology 99: 509-516.

Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganism: Technology and economic. **Trends**
Biotechnology 5: 246-250.

Cai M., C. Hong, Z. Qingliang, S.N. Shirley and R. Jie. 2009. Optimal production of
polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs)
generated from alkaline excess sludge fermentation. **Bioresource Technology** 100:
1399-1405.

- Castilho, L.R., D.A. Mitchell and D.M.G. Freire. 2009. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by products by submerged and solid state fermentation. **Bioresource Technology** 100: 5996-6009
- Chien, C.C., C.C. Chen, M.H. Choi, S.S. Kung and Y.H. Wei 2007. Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment. **Journal of Biotechnology** 132: 259-263.
- Chun, A.S.M., H. Takabatake, H. Satoh and T. Mino. 2003. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT) and acetate concentration in influent. **Water Research** 37: 3602-3611.
- Dionisi, D., G. Carucci, M.P. Petrangeli, C. Riccardi, M. Majone and F. Carrasc. 2005. Olive oil mill effluent as a feed stock for production of biodegradable polymers. **Water Research** 39: 2076-2084.
- Doi, Y., M. Kunioka, Y. Nakamura and K. Soag. 1987. Biosynthesis of copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from ^{13}C -labelled acetate and propionate. **Macromolecular** 20: 2988-2991.
- Fleit, E. 1995. Intracellular pH regulation in biological excess phosphorus removal systems. **Water Research** 29: 1787-1792.
- Gouda, M.K., A.E. Swellam and S.H. Omar. 2001. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research** 156: 201-207.
- Griffin, G.J.L. 1994. **Chemistry and technology of biodegradable polymers**. London: Blackie Academic and Professional.

- Grothe, E., M.M. Young and Y. Chisti. 1999. Fermentation optimization for the production of poly(β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme and Microbial Technology** 25: 132-141.
- Kasemsap, C. and C. Wantawin. 2007. Batch production of polyhydroxyalkanoate by low polyphosphate content activated sludge at varying pH. **Bioresource Technology** 98: 1020-1027.
- Khanna, S. and A.K. Srivastava. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry** 40: 607-619.
- Khardenavis, A.A., P.K. Guha, M.S. Kumar, S.N. Mudliar and T. Chakrabarti. 2005. Activated sludge is a potential source for production of biodegradable plastics from wastewater. **Environmental Technology** 26: 311-314.
- Khardenavis, A.A., M.S. Kumar, S.N. Mudliar and T. Chakrabarti. 2007. Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly- β -hydroxybutyrate. **Bioresource Technology** 98: 3579-3584.
- Khardenavis, A.A., A.N. Vaidya, M.S. Kumar and T. Chakrabarti. 2009. Utilization of molasses spentwash for production of bioplastics by waste activated sludge. **Waste Management** 29: 2558-2565.
- Kim, B.S. 2000. Production of poly(β -hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme and Microbiology Technology** 27: 774-777.
- Kumar, M.S., S.N. Mudliar, K.M.K. Reddy and T. Chakrabarti. 2004. Production of biodegradable plastic from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant. **Bioresource Technology** 95: 327-330.

- Lafferty, M.R., B. Korsatko and W. Korsatko. 1988. Special Microbial Process: Microbial Production of poly- β -hydroxybutyric acid. V.6b. **VCH Publishers Germany** 256.
- Law, J.H. and R.A. Slepecky.1960. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. **Journal Bacteriol** 82: 33-36.
- Law, K.H., Y.C. Leung, H. Lawford, L. Wai-Hung and P. H. Yu. 2001. Production of polyhydroxybutyrate by bacillus species isolated from municipal activated sludge. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 91-93: 515-524..
- Lee, S.Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology Bioengineering** 49: 1-14.
- Lemos, P.C., L.S. Serafim and M.A.M. Reis. 2006. Synthesis of ployhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. **Journal Biotechnology** 122: 226-238.
- Liu, Z., Y. Wang, N He, J. Huang, K. Zha, W. Shao,H. wang, W. Yuan and Q. Lu. 2011. Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by excess activated sludge and microbial community analysis. **Journal of Hazardous Materials** 185: 8-16.
- Luengo, J.M., B. Garcia, A. Sandoval, G. Naharro and E.R. Olivere. 2003. Bioplastica from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology** 6: 251-260.
- Marchessault, R.H. 1996. Tender mosels for bacteria.**Trip** 4: 163-168.
- Satoh, H., Y. Iwamoto, T. Mino and T. Matsuo. 1998. Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. **Water Science and Technology** (38): 103-109.

- Sangkharak, K. 2007. Production and application of polyhydroxybutyrate (PHB) from mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* ES 16. **Ph.D. Dissertation**. Prince of Songkla University.
- Suriyamongkol, P., R. Weselake, S. Narine, M. Moloney and S. Shah. 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants-A review. **Biotechnology Advances** 25: 148-175.
- Wang, Y.J., F.L. Hua, Y.F. Tsang, S.Y. Chan, S.N. Sin, H. Chua, P.H.F. Yu and N.Q. Ren. 2007. Synthesis of PHAs from waster under various C:N ratio. **Bioresource Technology** 98: 1690-1693.
- Wang, F. and S.Y. Lee. 1997. Poly (3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. **Applied and Enviromental Microbiology** 63: 3703-3706.
- Wen, Q., Z. Chen and T.T.W. Chen. 2010. Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. **Journal of Environmental Sciences** 22(10): 1602-1607.
- William, J.P. and K. Olga. 1989. Hyperproduction of poly-β- hydroxybutyrate during Exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. **Applied and Environmental Microbiology** 55: 1334-1339.
- Wu, Q., H. Huang, J. Chen, K.P. Ho and G.Q. Chen. 2001. Production of poly-3- hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JIMa5 cultivated in molasses media. **Antonie van Leeuwenhoek** 80: 111-118.
- Yüksekdağ, Z.N., B. Aslım, Y. Beyatlı and N. Mercan. 2003. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. **African Journal of Biotechnology** 3. 63-66.





วิธีการวัดความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ (MLSS)

1. เตรียมกระดาศกรองขนาด 0.45 ไมครอน อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน จดบันทึก
2. นำตัวอย่างปริมาตร 5 ml มากรองโดยใช้กระดาศกรองข้างต้น และเก็บส่วนใสเพื่อวิเคราะห์ซีโอดี
3. นำกระดาศกรองที่ได้ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงทิ้งให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้วคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

$$\text{MLSS (mg/L)} = \frac{\text{น้ำหนักกระดาศกรองและเซลล์แห้ง (g)} - \text{น้ำหนักกระดาศกรอง (g)}}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง} \times 10^{-3}}$$

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ PHB (ดัดแปลงจาก Law and Slepecky, 1960)

1. การสกัด

1.1 ล้างหลอดตัวอย่างด้วยเอทานอล (ethanol) และคลอโรฟอร์มร้อน (hot chloroform) เก็บตัวอย่างที่ต้องการสกัดใส่ลงในหลอดปริมาตร 14 ml เหยียงแยกเซลล์ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง

1.2 เติมน้ำฟอกขาวคลอโรกซ์ (clorox) จนได้ปริมาตร 14 ml เหยียงแยกเซลล์ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง

1.3 เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 14 ml เหยียงแยกเซลล์ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง

1.4 เติมน้ำอะซิโตน (acetone) เพื่อล้าง PHB แกรนูล จนได้ปริมาตร 14 ml เหยียงแยกเซลล์ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง

1.5 เติมเอทานอล (ethanol) เพื่อล้าง PHB แกรนูลอีกครั้ง จนได้ปริมาตร 14 ml มาเหยียงแยกเซลล์ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง

1.6 นำตะกอนที่ได้จากข้อ 1.5 มาเติมคลอโรฟอร์มร้อน 4 ml ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นกรองเก็บส่วนใสไว้ โดยระวังไม่ให้ตะกอนหาย และเติมคลอโรฟอร์มร้อน 5 ml ซ้ำ 2 ครั้ง กรองเก็บส่วนใสไว้รวมกันเพื่อนำไปวัดปริมาณ PHB ในขั้นต่อไป

2. การวิเคราะห์ปริมาณ PHB

2.1 นำสารละลายใสที่ได้จากการสกัดตั้งทิ้งไว้ให้ระเหยให้แห้งในตู้ควั่น

2.2 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 10 ml เขย่าให้ผสมกันดีนำไปบ่มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10-20 นาที

2.3 ทิ้งให้เย็น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของ PHB โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้ PHB เป็นสารมาตรฐาน

$$\text{PHB (g/l)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง}}{\text{ความชัน} \times V1 \times V2 \times 100}$$

V1 = ปริมาตรสารละลาย PHB ที่นำมาวิเคราะห์

V2 = ปริมาตรน้ำตัวอย่างที่นำมาสกัด PHB

การหากราฟมาตรฐาน

1. ชั่ง PHB 0.1 g ละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml จะได้สารละลายมาตรฐาน PHB เข้มข้น 1000 mg/l

2. ดูดสารละลายมาตรฐาน PHB ปริมาตร 5 10 15 20 และ 25 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 ml ซึ่งเท่ากับปริมาณความเข้มข้น PHB 1 2 3 4 และ 5 mg/l ตามลำดับ

การวิเคราะห์หา COD แบบ Close Reflux

1. การเตรียมสาร

1.1 Digestion reagent

ละลาย $K_2Cr_2O_7$ 4.913 g ซึ่งอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในน้ำกลั่น 500 ml ค่อยๆ เติม conc. H_2SO_4 167 ml ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 ml ด้วยน้ำกลั่น

1.2 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)

1.3 สารละลายมาตรฐาน ferrous ammonium sulfate (FAS) 0.1 M

ละลาย $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 39.2 g ในน้ำกลั่นจากนั้นเติม conc. H_2SO_4 ลงไป 20 ml ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปจนครบปริมาตร 1 L สารละลายนี้ต้องนำมาหาความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสารละลาย digestion reagent ดังนี้ คือ เติมน้ำกลั่น 50 ml สารละลาย digestion reagent 5 ml จากนั้นใช้ปิเปตค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ลงไป 15 ml ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาไทเทรตกับสารละลาย Ferrous ammonium sulfate (FAS) โดยใช้ ferroin จำนวน 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียวและเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติ

2. วิธีการทดลอง

2.1 ปิเปตตัวอย่างนำมา 2.5 ml ใส่ลงในหลอดทดลองที่สะอาด แล้วเติม digestion reagent ลงไป 1.5 ml

2.2 ค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3.5 ml ให้ไหลลงก้นหลอดแก้ว เพื่อให้ชั้นของกรดอยู่ใต้ชั้นของน้ำตัวอย่าง และ digestion reagent

2.3 ปิดจุกหลอดแก้วให้แน่น แล้วคว่ำหลอดแก้วไปมาหลายๆ ครั้งอย่างทั่วถึงก่อนจะนำตัวอย่างไปใส่ใน block heater ของเครื่อง COD reactor เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความร้อนสะสมอยู่ที่ก้นหลอด

2.4 ให้ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนน้ำตัวอย่างด้วยวิธีการทดลองเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์น้ำตัวอย่าง ประมาณ 1-2 หลอด

2.5 เทตัวอย่างจากหลอดใส่ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วไทเทรตกับสารละลาย FAS จนกระทั่งถึงจุดยุติ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียวและเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติ อ่านปริมาตรที่ไทเทรตตอนเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลแดงทันที

3. การคำนวณ

$$\text{COD (mg/l)} = \frac{(a - b) \times N \times 8000}{\text{ml sample}}$$

a = ml ของ $\text{Fe (NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ที่ใช้ไทเทรต Blank

b = ml ของ $\text{Fe (NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ที่ใช้ไทเทรตน้ำตัวอย่าง

N = Normality ของ $\text{Fe (NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ที่ใช้

วิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (Total Kjeldahl Method, TKN)

1. การย่อยตัวอย่าง

1.1 เปิดตัวอย่างปริมาตร 25 ml ใส่ใน digestion tube

1.2 เติม K_2SO_4 2 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g, H_2O_2 5 ml และ conc. H_2SO_4 12 ml

1.3 ย่อยตัวอย่างด้วยเครื่อง 2006 digester foss tecator 400 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นประมาณ 30 นาที

2. การกลั่น

2.1 เติมน้ำกลั่น 70 ml ใน digestion tube ที่ผ่านการย่อย

2.2 เติม 40 เปอร์เซ็นต์ NaOH ปริมาตร 60 ml (จากเครื่อง 2100 kjeltec Distillation Unit Foss Tecator)

2.3 เติม 4 เปอร์เซ็นต์ boric acid ปริมาตร 30 ml ใน 250 Erlenmeyer flask

2.4 กลั่น 4 นาที่โดยให้ท่ออากาศจุ่มในของเหลว

2.5 ไทเตรทด้วย 0.02 N HCl

3. การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ N} = \frac{(T-B) \times 14.007 \times [\text{HCl}] \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (mg)}}$$

วิธีวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

วัดโดยใช้ pH/TDS/EC/Temp pH Meter HANNA รุ่น HI98129

สีย้อม Sudan Black B

Sudan Black B	3	g
ethanol (95 เปอร์เซ็นต์)	75	ml
น้ำกลั่น	25	ml

ละลาย Sudan Black B ใน ethanol (95 เปอร์เซ็นต์) เติมน้ำกลั่น 25 ml ผสมให้เข้ากัน



ตารางผนวกที่ ข1 คุณลักษณะและปริมาณ PHB ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกันร่วมกับสถานะให้อากาศ 24 ชั่วโมง

Time (h)	condition	MLSS (mg/l)	PHB (mg/g dry cell)	COD (mg/l)
0	1	1043	5.04	7280
	2	2113	3.46	7280
	3	3680	2.85	7653
24	1	1346	4.97	6227
	2	2490	6.24	5824
	3	4763	8.39	5764
48	1	1286	6.33	3946
	2	2476	15.99	3942
	3	4226	14.54	3628
72	1	1416	6.457	4211
	2	2013	18.36	2912
	3	4153	21.12	3404
96	1	1590	3.63	2016
	2	2846	10.49	634
	3	4560	19.46	410

ตารางผนวกที่ ข2 คุณลักษณะและปริมาณ PHB ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกันร่วมกับสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 21:3 ชั่วโมง

Time (h)	condition	MLSS (mg/l)	PHB (mg/g dry cell)	COD (mg/l)
0	1	1000	3.17	7369
	2	1900	2.08	7047
	3	4620	11.62	4099
24	1	1700	6.43	5488
	2	2160	16.28	4771
	3	6560	14.03	3382
48	1	1640	6.69	4032
	2	2160	21.80	3180
	3	5400	20.27	2956
72	1	1400	11.16	4524
	2	2040	31.28	3494
	3	5660	48.46	2374
96	1	1400	8.14	2912
	2	1940	17.17	2105
	3	5300	24.38	1747

ตารางผนวกที่ ข3 คุณลักษณะและปริมาณ PHB ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกันร่วมกับสถานะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

Time (h)	condition	MLSS (mg/l)	PHB (mg/g dry cell)	COD (mg/l)
0	1	1043	1.49	6921
	2	2023	1.59	6249
	3	3833	1.78	4547
24	1	1530	16.60	5488
	2	2270	13.51	4681
	3	5463	23.81	3875
48	1	1566	31.08	4032
	2	2326	21.67	3225
	3	4463	24.48	2822
72	1	1346	66.70	3763
	2	2656	28.39	3494
	3	4553	36.14	2374
96	1	1406	37.02	2837
	2	2380	15.64	1941
	3	4240	12.77	1568

ตารางผนวกที่ ๔4 คุณลักษณะและปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N ต่างกันร่วมกับสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง

Time (h)	condition	MLSS (mg/l)	PHB (mg/g dry cell)	COD (mg/l)
0	COD:N 25	2540	6.51	3760
	COD:N 50	2780	5.08	3800
	COD:N 75	2400	7.58	4760
	COD:N 100	2620	8.09	6480
	COD:N 120	2860	7.31	8880
24	COD:N 25	3380	15.73	3090
	COD:N 50	3320	10.14	3480
	COD:N 75	3260	9.41	3360
	COD:N 100	3620	9.18	5450
	COD:N 120	3660	11.33	6400
48	COD:N 25	2640	20.05	2928
	COD:N 50	3300	10.87	3072
	COD:N 75	3240	11.59	2976
	COD:N 100	2980	17.79	5000
	COD:N 120	4040	22.93	6440
72	COD:N 25	3400	17.71	2880
	COD:N 50	3020	33.49	2640
	COD:N 75	2940	36.53	2900
	COD:N 100	3580	40.56	4248
	COD:N 120	4240	34.14	3924
96	COD:N 25	3260	27.81	2744
	COD:N 50	3320	35.89	2450
	COD:N 75	3320	45.10	1792
	COD:N 100	3400	46.82	4350
	COD:N 120	3580	48.47	4110

ตารางผนวกที่ ข5 คุณลักษณะและปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N ต่างกันร่วมกับสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

Time (h)	condition	MLSS (mg/l)	PHB (mg/g dry cell)	COD (mg/l)
0	COD:N 25	1860	9.80	3880
	COD:N 50	2860	7.27	3720
	COD:N 75	3080	6.37	4480
	COD:N 100	2720	10.70	6540
	COD:N 120	3320	14.64	7920
24	COD:N 25	3380	12.74	3420
	COD:N 50	3320	12.42	3210
	COD:N 75	3260	9.29	3180
	COD:N 100	3620	15.58	5200
	COD:N 120	3660	14.48	6100
48	COD:N 25	3120	12.20	2856
	COD:N 50	3000	18.81	2736
	COD:N 75	3480	17.50	2520
	COD:N 100	3360	17.19	5120
	COD:N 120	4540	13.44	6536
72	COD:N 25	3240	36.11	3440
	COD:N 50	3020	34.99	3080
	COD:N 75	2680	40.48	2620
	COD:N 100	3720	41.52	4500
	COD:N 120	3040	46.37	4536
96	COD:N 25	2880	38.53	2534
	COD:N 50	2740	40.83	2450
	COD:N 75	3920	41.75	2184
	COD:N 100	3440	45.00	3840
	COD:N 120	3980	64.47	4080

ตารางผนวกที่ ๖6 คุณลักษณะและปริมาณ PHB โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมต่างกันที่อัตราส่วน
COD:N ต่างกันร่วมกับสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง

Time (h)	COD:N	C source	MLSS (mg/l)	PHB (mg/g drycell)	COD (mg/l)
0	120	molasses	2400	8.83	9044
	120	sucrose	2300	8.27	8379
	120	acetate	1860	16.15	7980
	120	propionate	1980	15.33	7524
24	120	molasses	2460	26.72	5035
	120	sucrose	1920	31.67	5548
	120	acetate	1520	25.03	5453
	120	propionate	1580	29.81	5700
48	120	molasses	2680	36.89	3420
	120	sucrose	1740	36.85	4047
	120	acetate	1940	27.56	3420
	120	propionate	2420	24.78	2337
72	120	molasses	3260	56.95	1216
	120	sucrose	2300	76.40	2736
	120	acetate	2080	49.67	2394
	120	propionate	1900	44.36	1406
96	120	molasses	3200	56.04	1459
	120	sucrose	2640	67.72	1884
	120	acetate	1160	49.13	1945
	120	propionate	980	33.58	1311
120	120	molasses	4480	45.04	1550
	120	sucrose	2680	60.98	957
	120	acetate	1260	41.25	775
	120	propionate	1140	27.80	1299

ตารางผนวกที่ ๖ (ต่อ)

Time (h)	COD:N	C source	MLSS (mg/l)	PHB(mg/g drycell)	COD (mg/l)
0	150	molasses	2180	9.73	9728
	150	sucrose	2000	15.35	10488
	150	acetate	2080	12.03	11096
	150	propionate	1420	15.11	11704
24	150	molasses	1960	25.09	6916
	150	sucrose	2200	21.58	8550
	150	acetate	1820	26.02	8322
	150	propionate	1640	22.35	6156
48	150	molasses	2380	35.75	4940
	150	sucrose	3160	33.66	6080
	150	acetate	1980	30.25	3990
	150	propionate	1880	34.66	4104
72	150	molasses	3300	44.12	2660
	150	sucrose	3260	46.25	3990
	150	acetate	1580	41.74	2622
	150	propionate	1860	12.45	3420
96	150	molasses	2160	42.51	1292
	150	sucrose	2740	48.48	3344
	150	acetate	1260	38.74	2964
	150	propionate	1000	30.27	2432
120	150	molasses	4220	38.94	1945
	150	sucrose	3100	44.76	1824
	150	acetate	1100	27.30	1033
	150	propionate	1240	30.29	1793

ตารางผนวกที่ ข6 (ต่อ)

Time (h)	COD:N	C source	MLSS (mg/l)	PHB (mg/g drycell)	COD (mg/l)
0	170	molasses	1720	10.11	12616
	170	sucrose	1460	10.04	12483
	170	acetate	1820	15.63	11970
	170	propionate	1580	15.16	12825
24	170	molasses	2140	21.61	8645
	170	sucrose	2160	23.34	9690
	170	acetate	1140	17.17	8094
	170	propionate	1660	19.00	7714
48	170	molasses	2380	31.51	5605
	170	sucrose	2300	33.82	8360
	170	acetate	1960	17.39	6745
	170	propionate	1760	21.42	5890
72	170	molasses	2960	28.49	3325
	170	sucrose	3760	40.39	4377
	170	acetate	2440	39.99	4856
	170	propionate	2200	27.99	5540
96	170	molasses	2920	36.42	2280
	170	sucrose	1120	48.19	3363
	170	acetate	1220	35.25	3800
	170	propionate	1100	23.44	3306
120	170	molasses	6880	20.44	1520
	170	sucrose	2360	30.83	2280
	170	acetate	1500	26.45	1900
	170	propionate	2200	19.53	2052

ตารางผนวกที่ ๗7 คุณลักษณะและปริมาณ PHB โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมต่างกันที่อัตราส่วน COD:N ต่างกันร่วมกับสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

Time (h)	COD:N	C source	MLSS (mg/l)	PHB (mg/g drycell)	COD (mg/l)
0	120	molasses	1740	20.90	6600
	120	sucrose	2360	17.11	6800
	120	acetate	1220	21.06	6204
	120	propionate	1640	20.98	6732
24	120	molasses	1840	37.50	5880
	120	sucrose	2180	37.25	5600
	120	acetate	1380	36.54	4800
	120	propionate	1720	30.22	4400
48	120	molasses	2460	41.08	3600
	120	sucrose	1980	43.38	3240
	120	acetate	2000	40.57	2460
	120	propionate	1700	34.76	3840
72	120	molasses	2560	52.42	2700
	120	sucrose	2480	67.27	2200
	120	acetate	2080	41.04	1880
	120	propionate	1700	37.09	2640
96	120	molasses	2860	64.97	1280
	120	sucrose	2120	83.79	1536
	120	acetate	2100	59.12	1472
	120	propionate	2760	43.03	1992
120	120	molasses	2340	57.44	1340
	120	sucrose	3080	77.35	1140
	120	acetate	3620	50.87	1272
	120	propionate	2120	65.89	1312

ตารางผนวกที่ ข7 (ต่อ)

Time (h)	COD:N	C source	MLSS (mg/l)	PHB (mg/g drycell)	COD (mg/l)
0	150	molasses	2200	17.04	10080
	150	sucrose	2100	15.70	11200
	150	acetate	1280	19.46	10720
	150	propionate	1460	12.14	10400
24	150	molasses	2020	23.17	7840
	150	sucrose	2460	35.75	9480
	150	acetate	1580	36.38	7980
	150	propionate	1280	37.70	6240
48	150	molasses	2100	43.38	5700
	150	sucrose	2120	50.80	5920
	150	acetate	2000	35.92	7200
	150	propionate	1520	39.47	5120
72	150	molasses	2780	41.80	3040
	150	sucrose	2860	53.23	3900
	150	acetate	1940	49.12	5120
	150	propionate	1840	23.27	2940
96	150	molasses	3000	36.28	1840
	150	sucrose	2040	48.77	2800
	150	acetate	1700	46.43	3680
	150	propionate	1860	32.36	1960
120	150	molasses	1980	33.77	1380
	150	sucrose	1920	47.07	1888
	150	acetate	2680	38.44	3360
	150	propionate	3260	27.86	1560

ตารางผนวกที่ ข7 (ต่อ)

Time (h)	COD:N	C source	MLSS (mg/l)	PHB (mg/g drycell)	COD(mg/l)
0	170	molasses	2060	17.41	11880
	170	sucrose	3480	9.24	12240
	170	acetate	1920	17.14	11340
	170	propionate	1460	14.05	11700
24	170	molasses	2380	18.37	9760
	170	sucrose	1820	27.22	10220
	170	acetate	1520	18.19	10880
	170	propionate	1520	20.12	7800
48	170	molasses	2000	31.43	8160
	170	sucrose	2240	29.62	7900
	170	acetate	1680	28.83	9240
	170	propionate	1540	15.98	5920
72	170	molasses	2200	38.44	6900
	170	sucrose	1820	45.46	5832
	170	acetate	1660	39.39	6700
	170	propionate	2260	17.20	3240
96	170	molasses	1980	51.72	4608
	170	sucrose	1460	44.51	2592
	170	acetate	2280	38.48	4700
	170	propionate	2740	31.24	2760
120	170	molasses	5720	30.19	2960
	170	sucrose	2460	33.73	1440
	170	acetate	3340	37.06	4320
	170	propionate	2920	19.23	2640

ตารางผนวกที่ ๗8 ปริมาณ PHB ที่สภาวะการได้รับอาหารต่างกันร่วมกับสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง

sampling date	feeding (day)	MLSS (mg/l)	PHB (mg/g drycell)
21	2	8140	12.13
	3	5440	7.90
	5	4080	31.07
	7	2920	13.30
35	2	1780	15.85
	3	4560	11.46
	5	1820	12.25
	7	2440	4.19
42	2	2560	13.01
	3	4800	8.41
	5	1760	6.97
	7	3360	6.09
49	2	9720	4.83
	3	3940	24.64
	5	3740	3.21
	7	2240	16.22

ตารางผนวกที่ ๗๑ ปริมาณ PHB ที่สภาวะการได้รับอาหารต่างกันร่วมกับสภาวะให้อากาศสลับกับ
ไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

sampling date	feeding (day)	MLSS (mg/l)	PHB (mg/g drycell)
21	2	9460	7.88
	3	3860	15.42
	5	4240	43.54
	7	3080	18.44
35	2	680	31.94
	3	1480	15.01
	5	1620	64.73
	7	3100	5.915
42	2	10160	10.25
	3	2680	20.96
	5	1740	18.06
	7	2260	6.08
49	2	5500	21.87
	3	10600	5.90
	5	3080	49.56
	7	2240	16.22

ตารางผนวกที่ ข10 คุณลักษณะและปริมาณ PHB โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่อัตราส่วน COD:N 75 และ 120 ร่วมกับสภาวะให้อากาศ 24 ชั่วโมง

Time (h)	COD:N		MLSS (mg/l)	PHB(mg/g drycell)	COD (mg/l)
0	75	Isolated 1	940	5.23	4332
	75	Isolated 2	870	2.03	4921
	75	Isolated 3	900	7.23	4332
	75	Isolated 4	990	5.55	4180
	120	Isolated 1	1110	4.74	7030
	120	Isolated 2	760	1.96	6878
	120	Isolated 3	660	8.77	7505
	120	Isolated 4	770	7.29	7030
24	75	Isolated 1	1060	20.41	2804
	75	Isolated 2	920	27.17	2736
	75	Isolated 3	840	32.91	2736
	75	Isolated 4	930	52.22	2872
	120	Isolated 1	830	48.12	3268
	120	Isolated 2	1000	49.83	3192
	120	Isolated 3	680	58.34	4332
	120	Isolated 4	1010	76.21	3952
48	75	Isolated 1	1220	48.93	2736
	75	Isolated 2	840	78.58	2599
	75	Isolated 3	1350	64.27	2416
	75	Isolated 4	2110	66.97	2599
	120	Isolated 1	1290	43.67	4172
	120	Isolated 2	950	60.75	3135
	120	Isolated 3	1480	78.77	4582
	120	Isolated 4	2100	71.41	3762

ตารางผนวกที่ ข10 (ต่อ)

Time (h)	COD:N		MLSS (mg/l)	PHB (mg/g drycell)	COD (mg/l)
72	75	Isolated 1	2740	66.00	1824
	75	Isolated 2	1450	86.12	2006
	75	Isolated 3	2100	133.52	1869
	75	Isolated 4	2740	93.73	2006
	120	Isolated 1	1450	108.06	2766
	120	Isolated 2	1330	108.83	2766
	120	Isolated 3	1550	165.87	3803
	120	Isolated 4	2340	153.06	2766
96	75	Isolated 1	1220	49.55	1504
	75	Isolated 2	1330	91.82	1949
	75	Isolated 3	1310	111.04	1539
	75	Isolated 4	2040	91.78	1915
	120	Isolated 1	1510	123.91	2462
	120	Isolated 2	1020	51.07	2371
	120	Isolated 3	1690	102.19	2781
	120	Isolated 4	1930	112.79	2508
120	75	Isolated 1	1310	40.21	1102
	75	Isolated 2	990	41.53	1368
	75	Isolated 3	1750	87.70	1140
	75	Isolated 4	1090	33.33	1311
	120	Isolated 1	1340	67.58	1983
	120	Isolated 2	1050	29.56	1744
	120	Isolated 3	1960	43.05	2017
	120	Isolated 4	900	65.69	1744

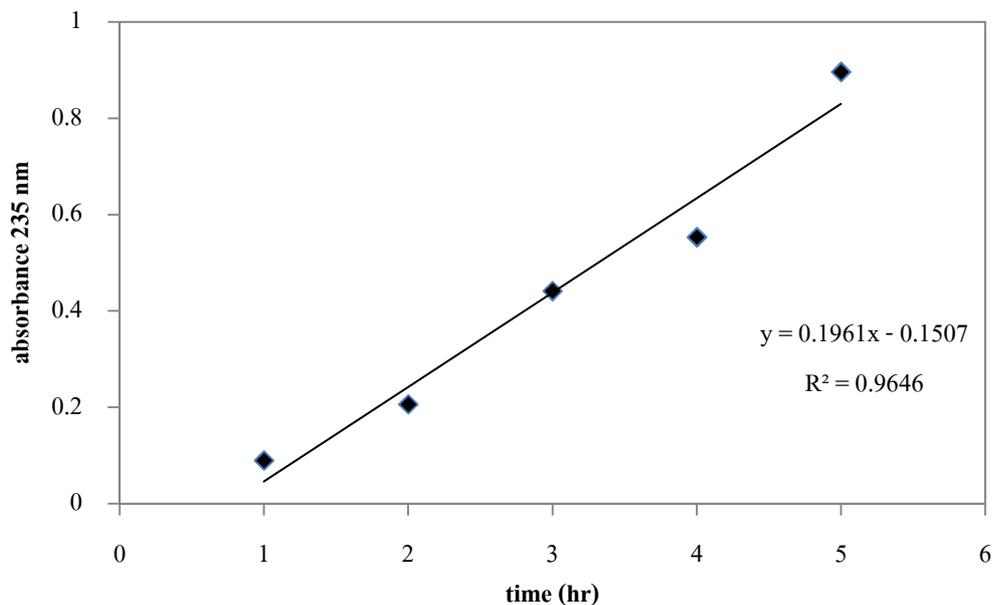
ตารางผนวกที่ ข11 คุณลักษณะและปริมาณ PHB โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่อัตราส่วน COD:N 75 และ 120 ร่วมกับสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

Time (h)	COD:N		MLSS (mg/l)	PHB (mg/g drycell)	COD (mg/l)
0	75	Isolated 1	1120	7.82	4180
	75	Isolated 2	820	1.73	4712
	75	Isolated 3	820	6.35	4484
	75	Isolated 4	1100	4.84	4408
	120	Isolated 1	1140	4.72	7805
	120	Isolated 2	840	5.52	7805
	120	Isolated 3	820	16.78	8694
	120	Isolated 4	960	5.58	8101
24	75	Isolated 1	940	23.13	2796
	75	Isolated 2	800	25.20	3059
	75	Isolated 3	940	28.79	3059
	75	Isolated 4	660	121.68	2534
	120	Isolated 1	960	53.46	5434
	120	Isolated 2	880	53.73	4347
	120	Isolated 3	880	113.95	3952
	120	Isolated 4	1340	62.52	4940
48	75	Isolated 1	1200	112.23	2280
	75	Isolated 2	820	91.77	2166
	75	Isolated 3	880	91.61	2793
	75	Isolated 4	1480	139.11	2337
	120	Isolated 1	1400	135.62	4446
	120	Isolated 2	920	110.39	3351
	120	Isolated 3	1600	189.44	2530
	120	Isolated 4	980	110.05	4172

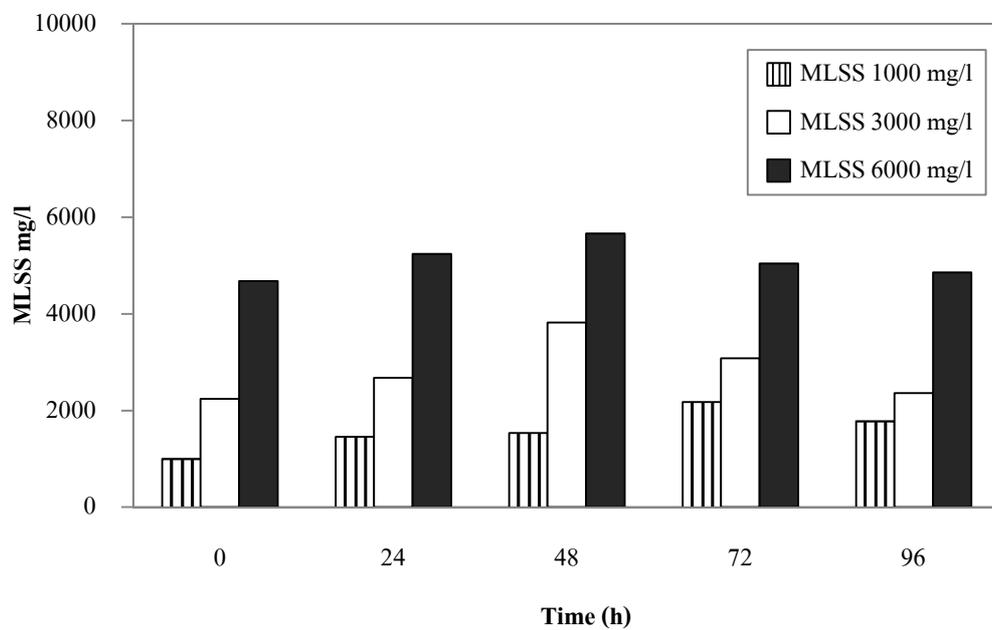
ตารางผนวกที่ ข11 (ต่อ)

Time (h)	COD:N	MLSS (mg/l)	PHB (mg/g drycell)	COD (mg/l)	
72	75	Isolated 1	1700	86.43	1915
	75	Isolated 2	780	137.80	2280
	75	Isolated 3	900	164.27	1824
	75	Isolated 4	1960	111.72	2325
	120	Isolated 1	1640	120.22	3534
	120	Isolated 2	860	134.93	2736
	120	Isolated 3	880	189.45	3021
	120	Isolated 4	1660	171.46	3249
96	75	Isolated 1	1580	134.64	1778
	75	Isolated 2	1300	82.67	1470
	75	Isolated 3	1060	147.54	1333
	75	Isolated 4	1380	133.48	1915
	120	Isolated 1	1540	100.65	3009
	120	Isolated 2	1320	98.20	2416
	120	Isolated 3	1240	124.31	2416
	120	Isolated 4	1180	103.93	3009
120	75	Isolated 1	1300	105.77	1162
	75	Isolated 2	1660	48.05	1273
	75	Isolated 3	1160	67.31	980
	75	Isolated 4	2920	59.89	1140
	120	Isolated 1	1120	66.09	2633
	120	Isolated 2	1700	49.54	2394
	120	Isolated 3	1320	62.17	2337
	120	Isolated 4	3100	57.82	2462

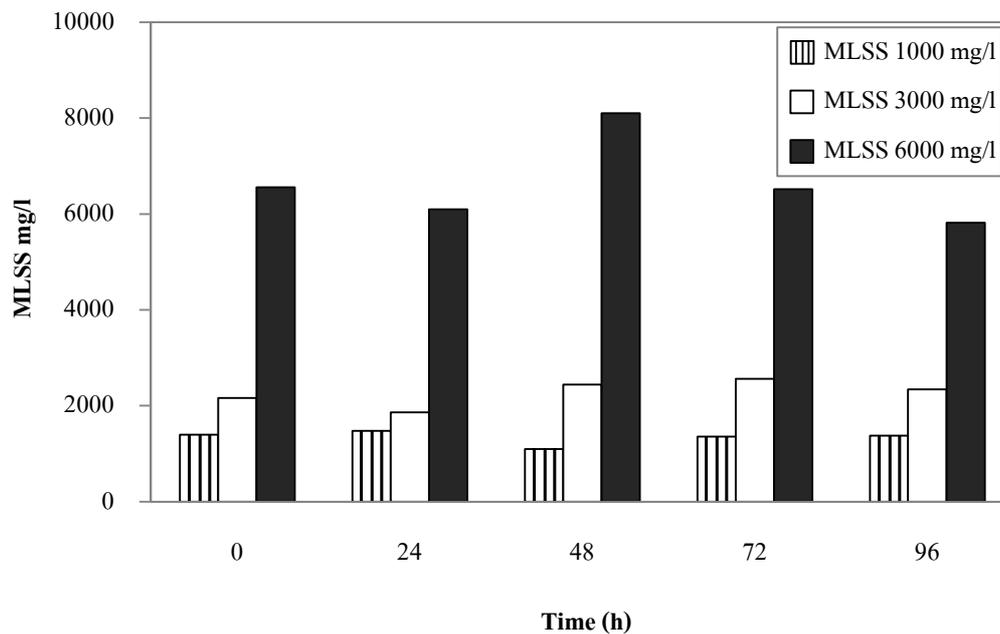




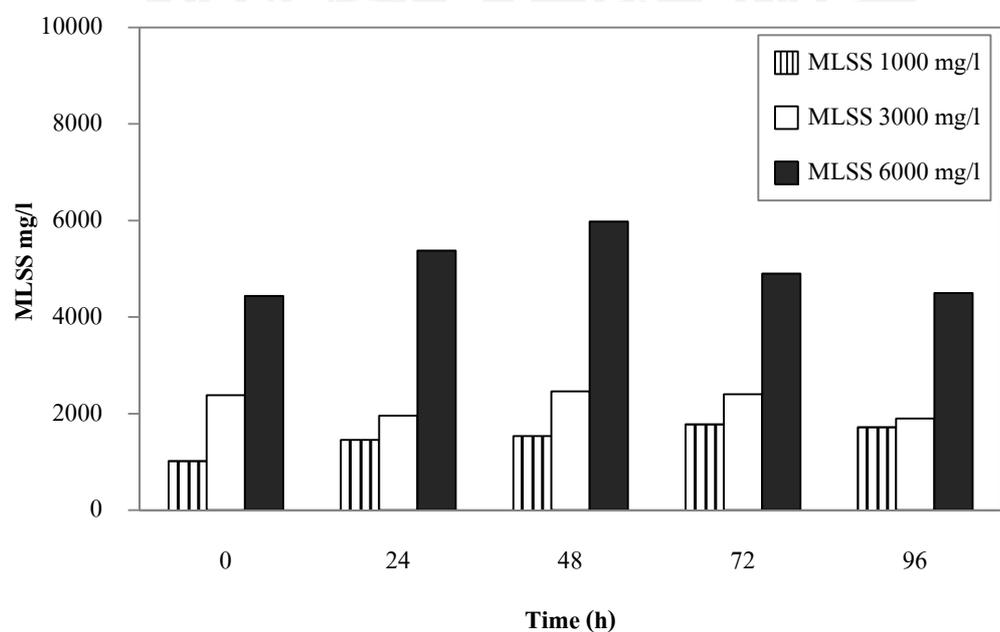
ภาพผนวกที่ ค1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ PHB กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 235 นาโนเมตร



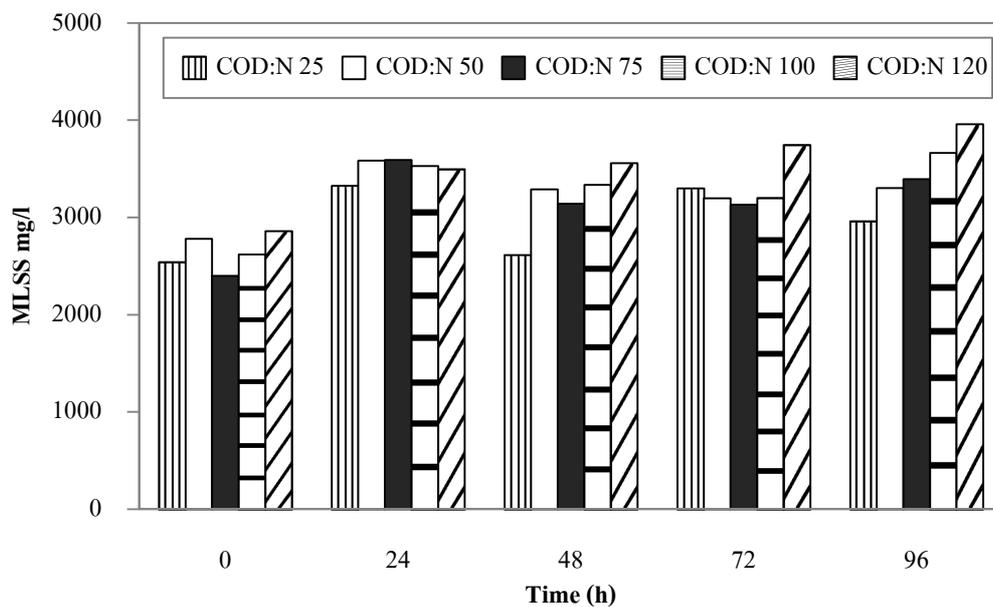
ภาพผนวกที่ ค2 ปริมาณ MLSS ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกันในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



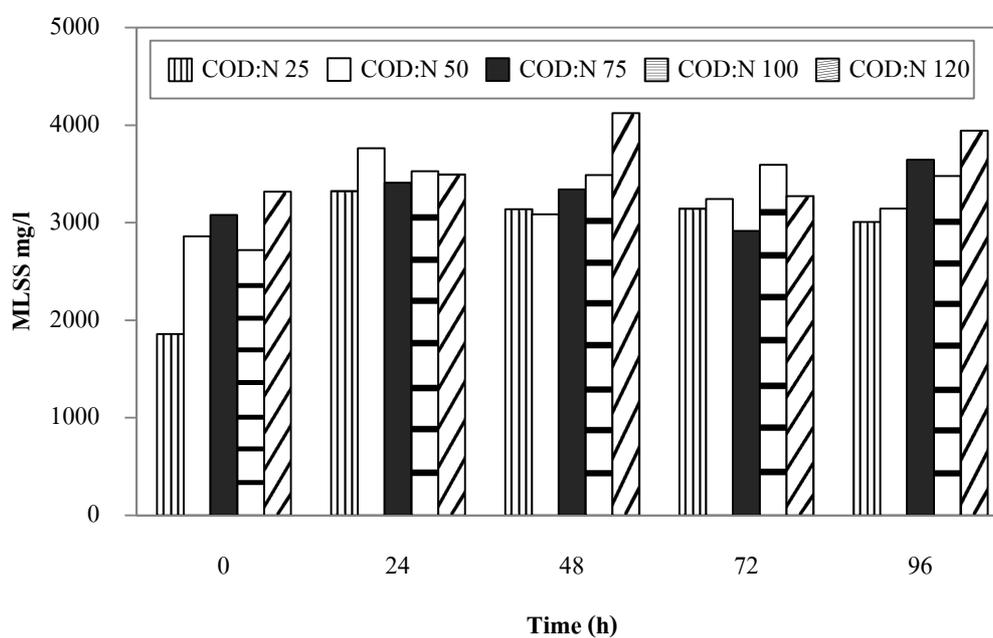
ภาพผนวกที่ ค3 ปริมาณ MLSS ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกัน ในสถานะให้อากาศสลักับไม่ให้
อากาศ 21:3 ชั่วโมง



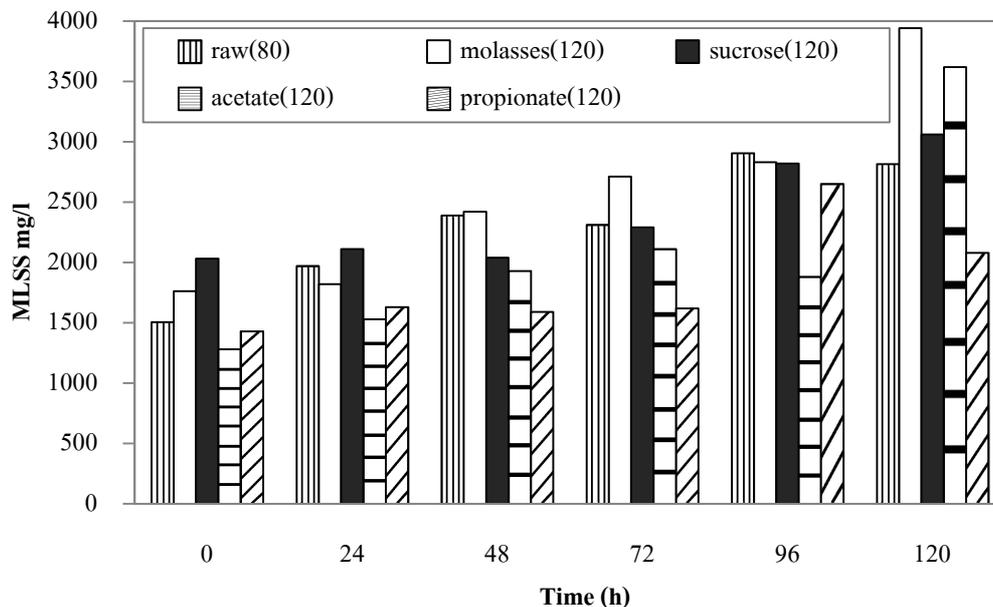
ภาพผนวกที่ ค4 ปริมาณ MLSS ที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นต่างกัน ในสถานะให้อากาศสลักับไม่ให้
อากาศ 15:9 ชั่วโมง



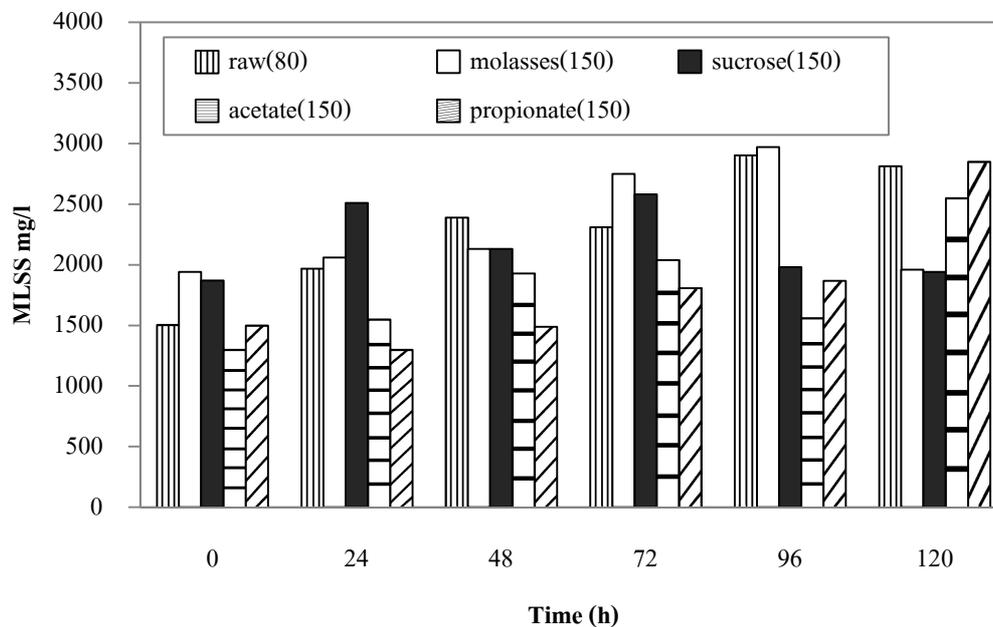
ภาพผนวกที่ ค5 ปริมาณ MLSS ที่อัตราส่วน COD:N ต่างกันในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



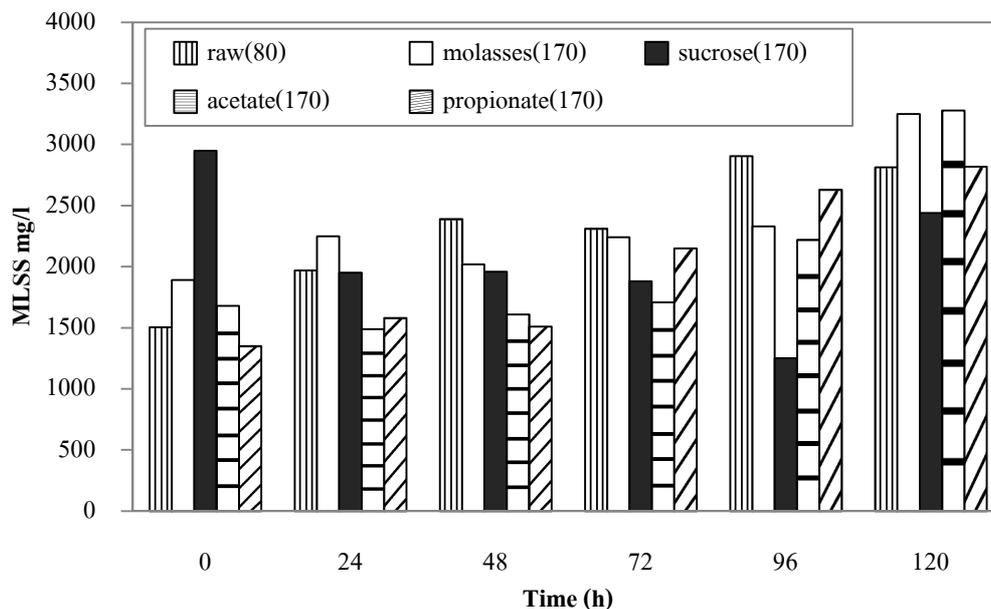
ภาพผนวกที่ ค6 ปริมาณ MLSS ที่อัตราส่วน COD:N ต่างกันในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้
อากาศ 15:9 ชั่วโมง



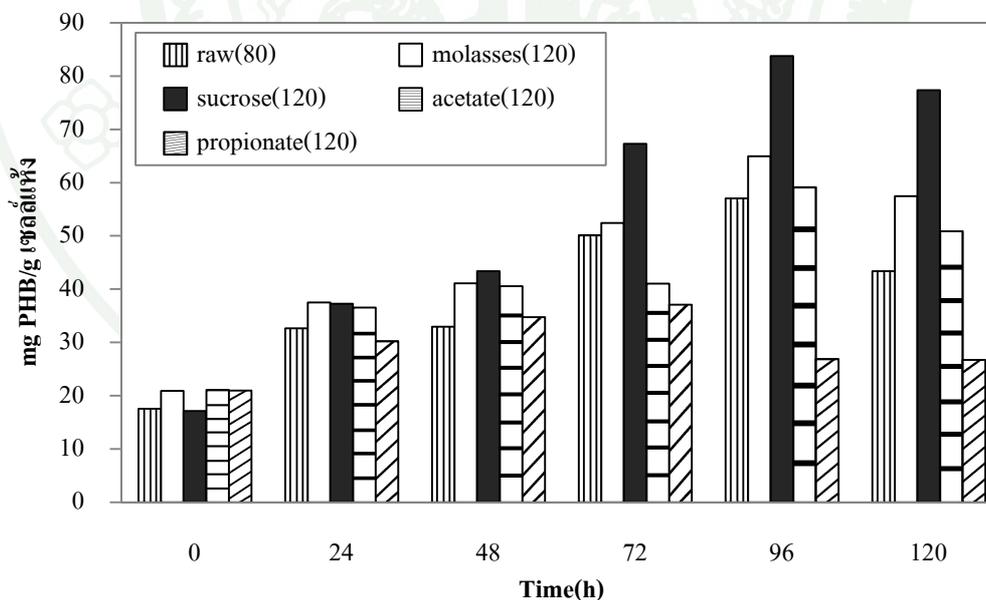
ภาพผนวกที่ ค7 ปริมาณ MLSS ที่อัตราส่วน COD:N 120 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



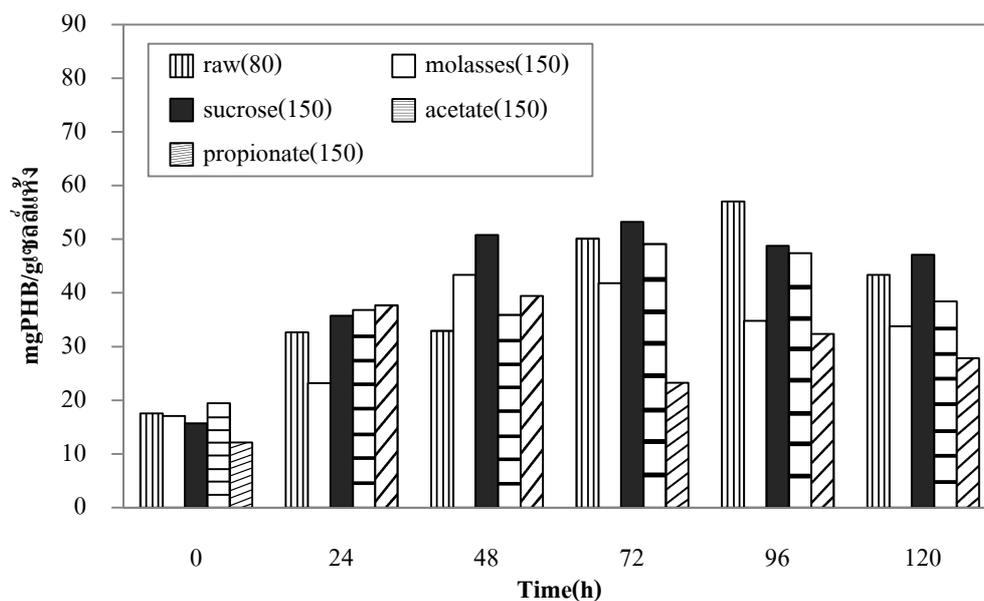
ภาพผนวกที่ ค8 ปริมาณ MLSS ที่อัตราส่วน COD:N 150 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



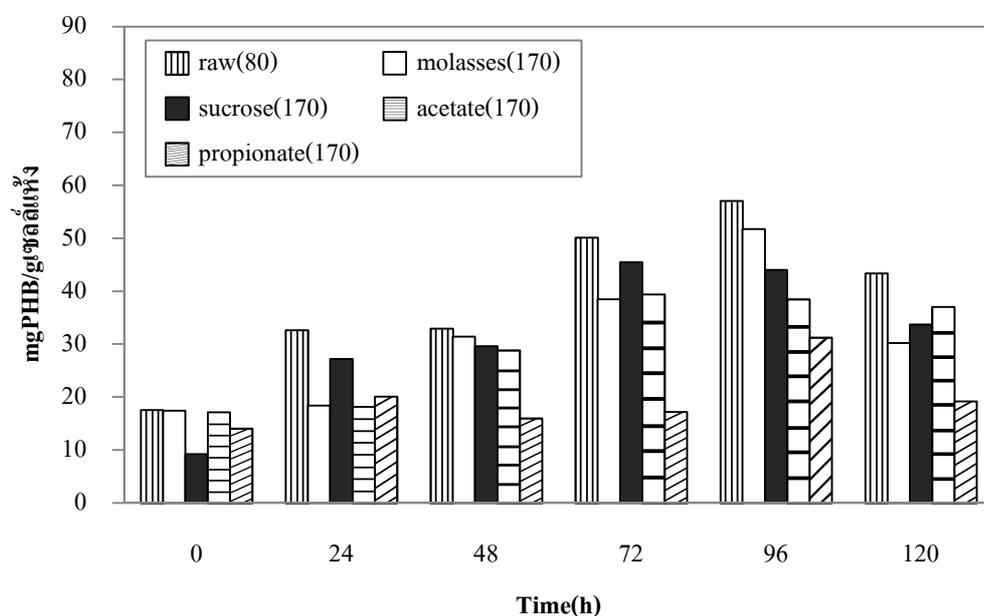
ภาพผนวกที่ ค9 ปริมาณ MLSS ที่อัตราส่วน COD:N 170 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



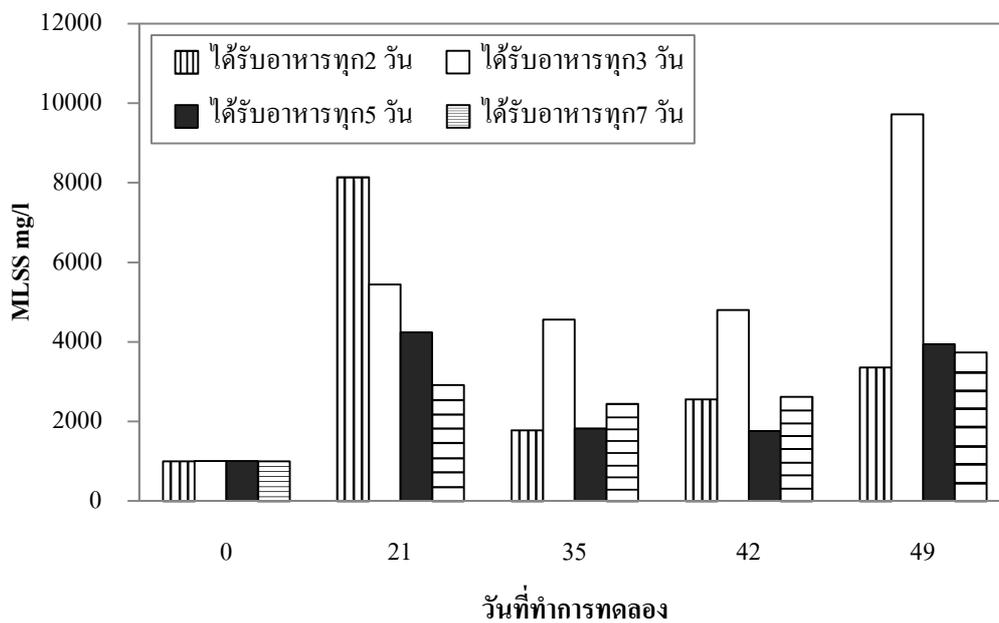
ภาพผนวกที่ ค10 ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



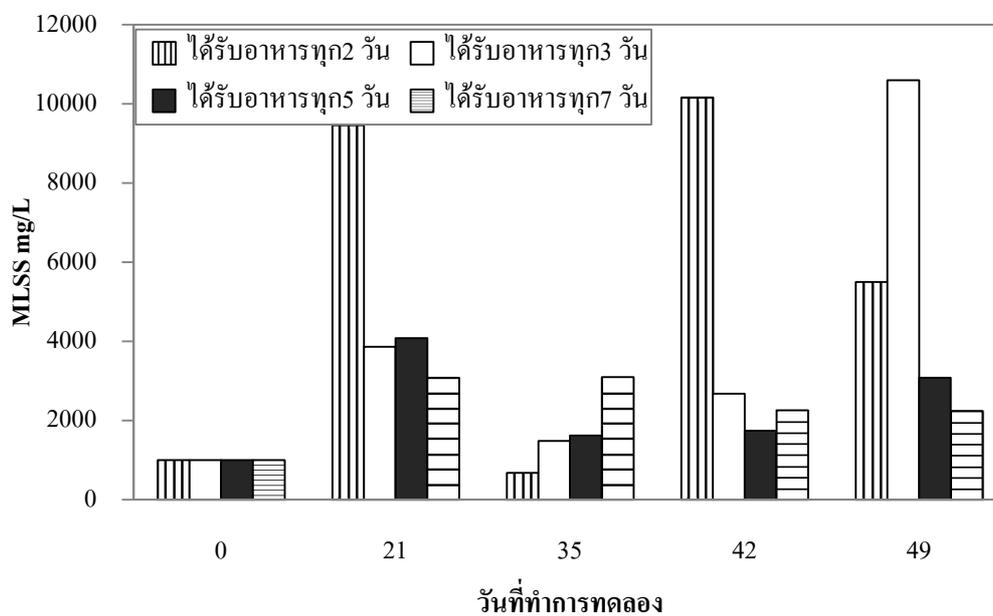
ภาพผนวกที่ ค11 ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 150 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกันในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



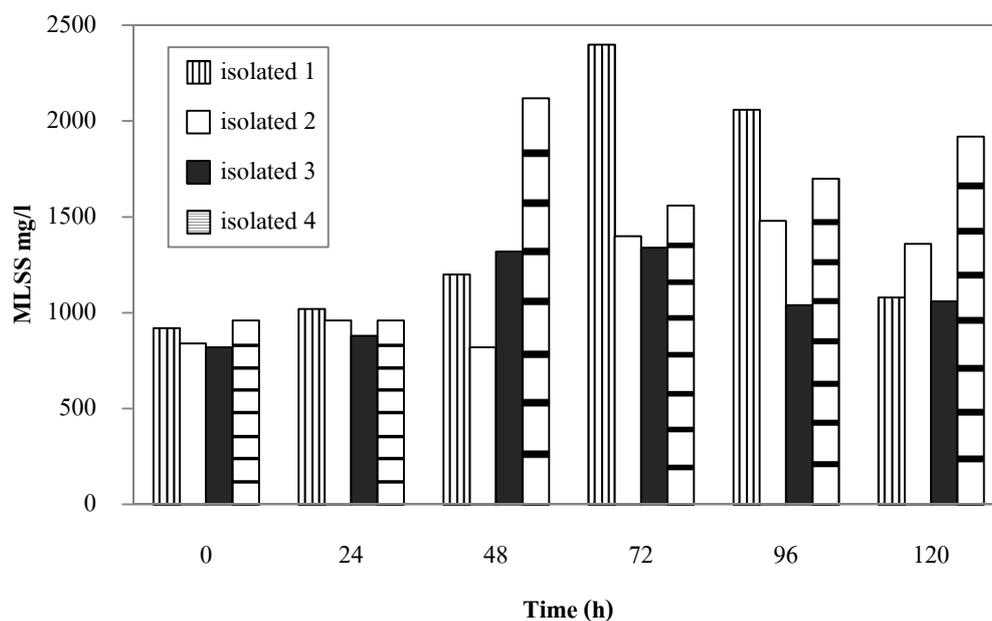
ภาพผนวกที่ ค12 ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 170 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกันในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



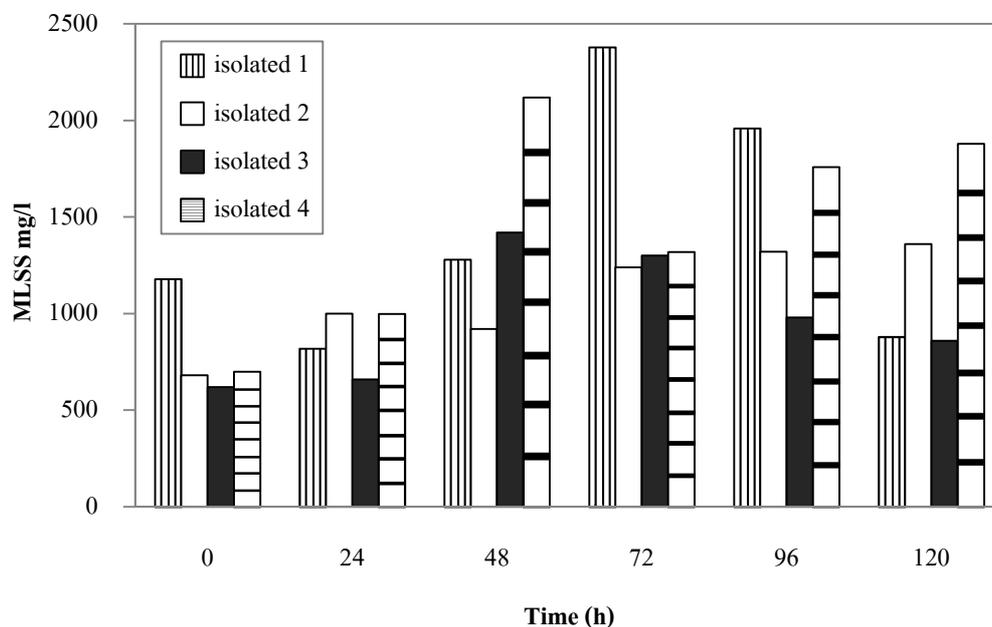
ภาพผนวกที่ ค13 ปริมาณ MLSS ที่สภาวะได้รับอาหารทุก 2 3 5 และ 7 วัน ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



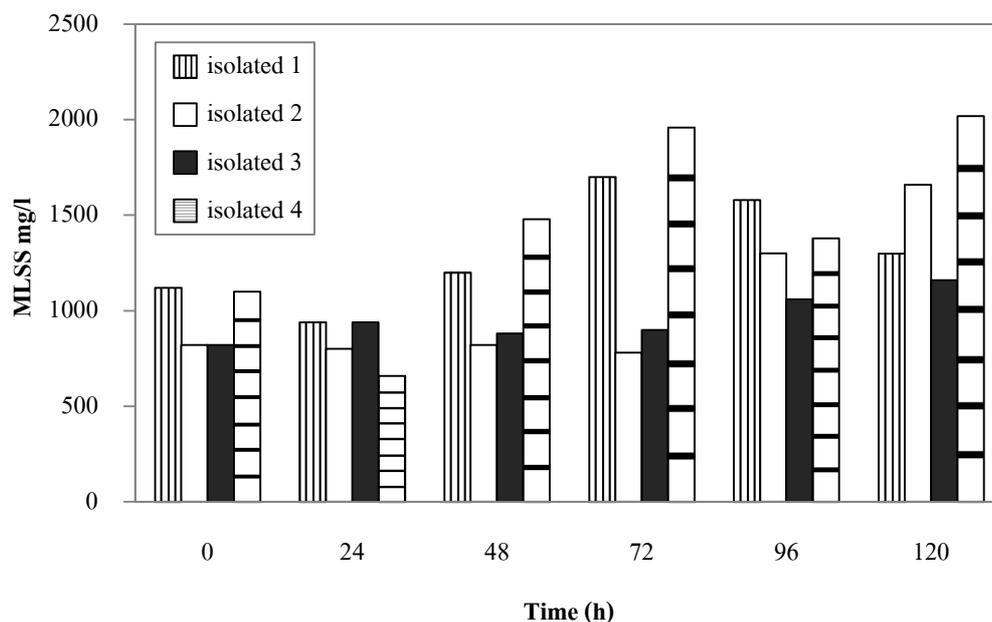
ภาพผนวกที่ ค14 ปริมาณ MLSS ที่สภาวะได้รับอาหารทุก 2 3 5 และ 7 วัน ในสภาวะให้อากาศ สลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



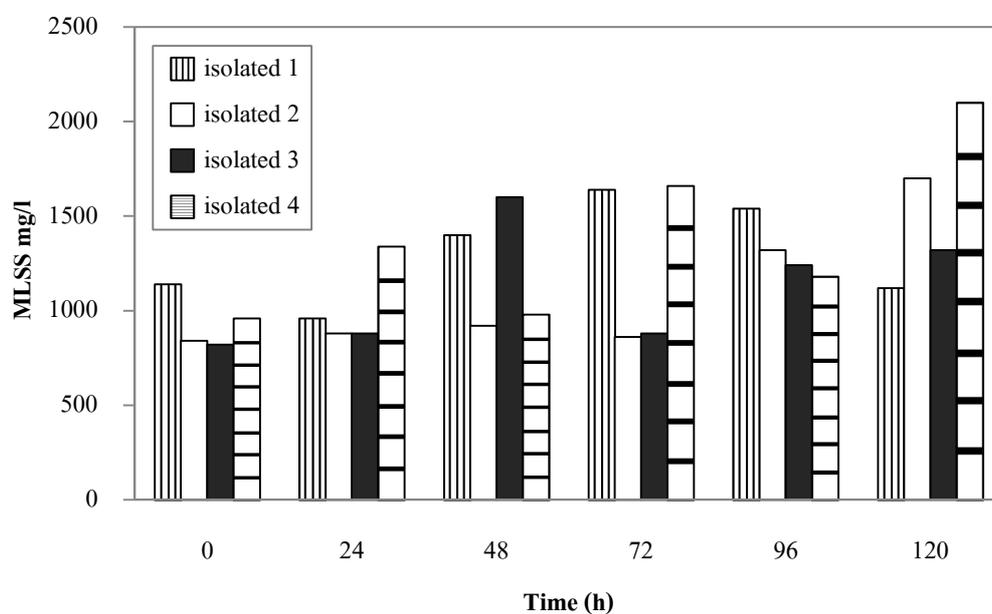
ภาพผนวกที่ ค15 ปริมาณ MLSS ที่ อัตราส่วน COD:N 75 ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



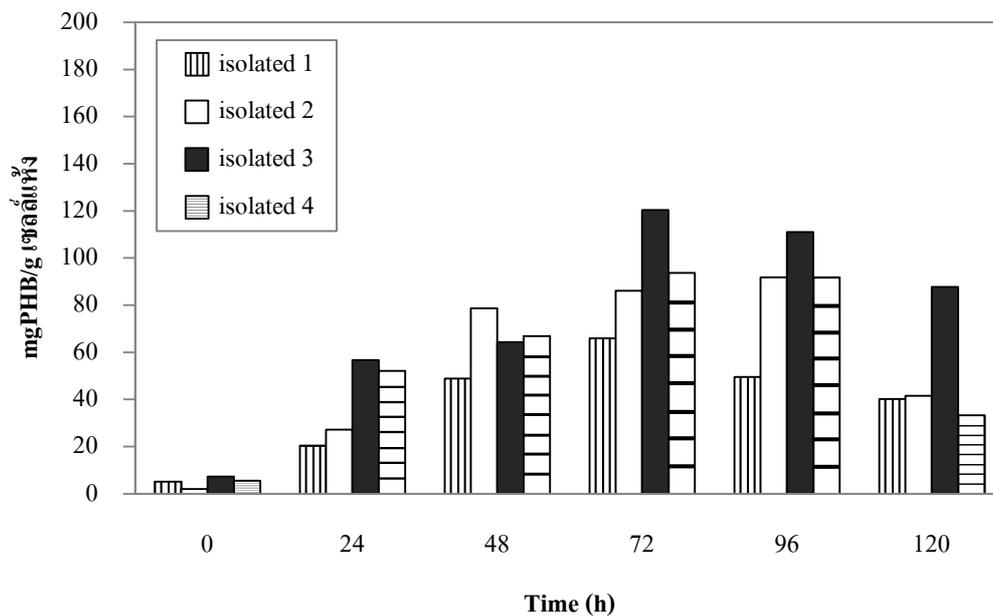
ภาพผนวกที่ ค16 ปริมาณ MLSS ที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



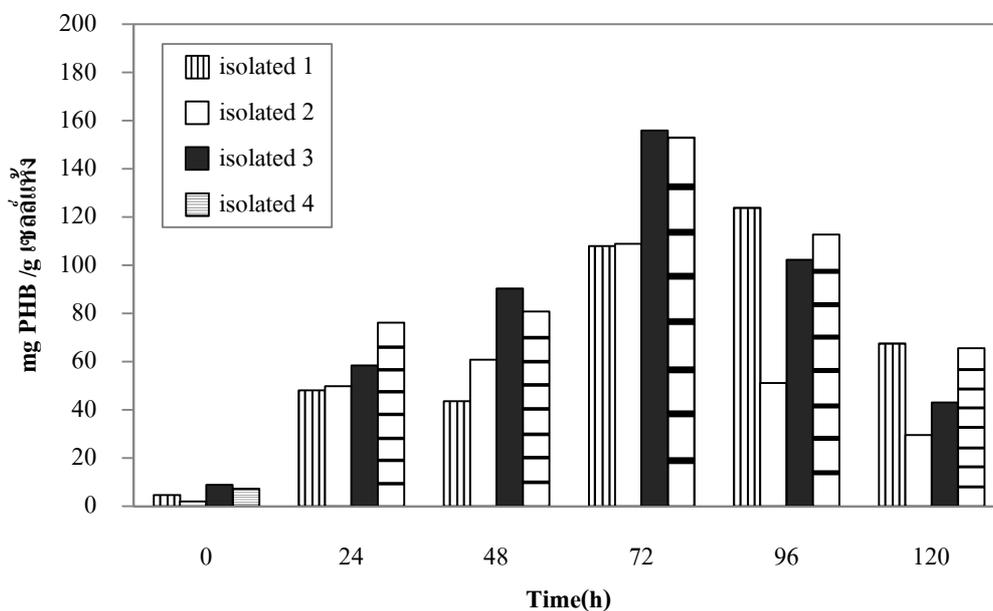
ภาพผนวกที่ ค17 ปริมาณ MLSS ที่ อัตราส่วน COD:N 75 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้
อากาศ 15:9 ชั่วโมง



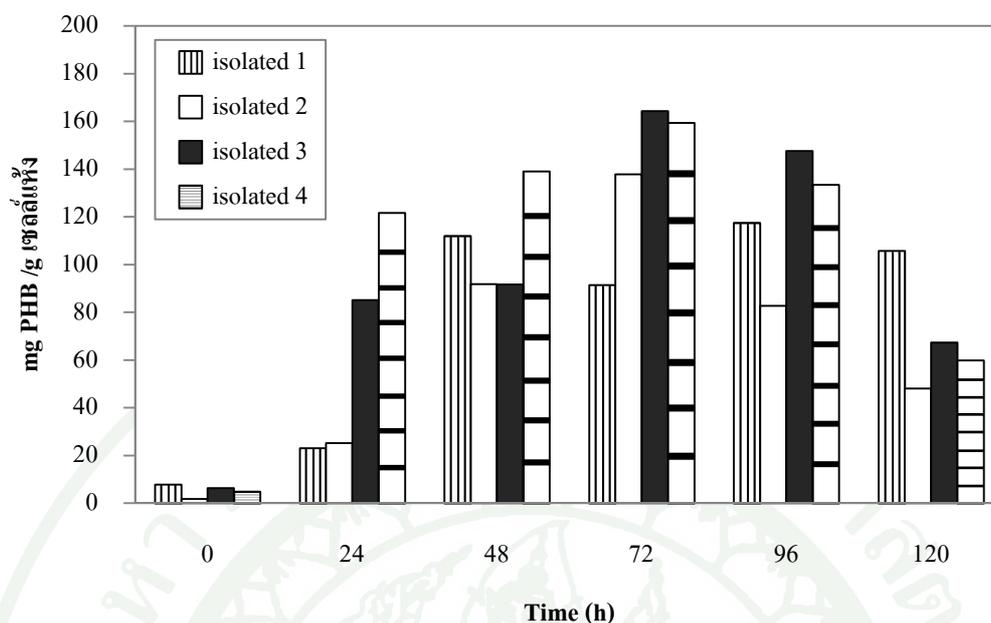
ภาพผนวกที่ ค18 ปริมาณ MLSS ที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน
เสริมในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



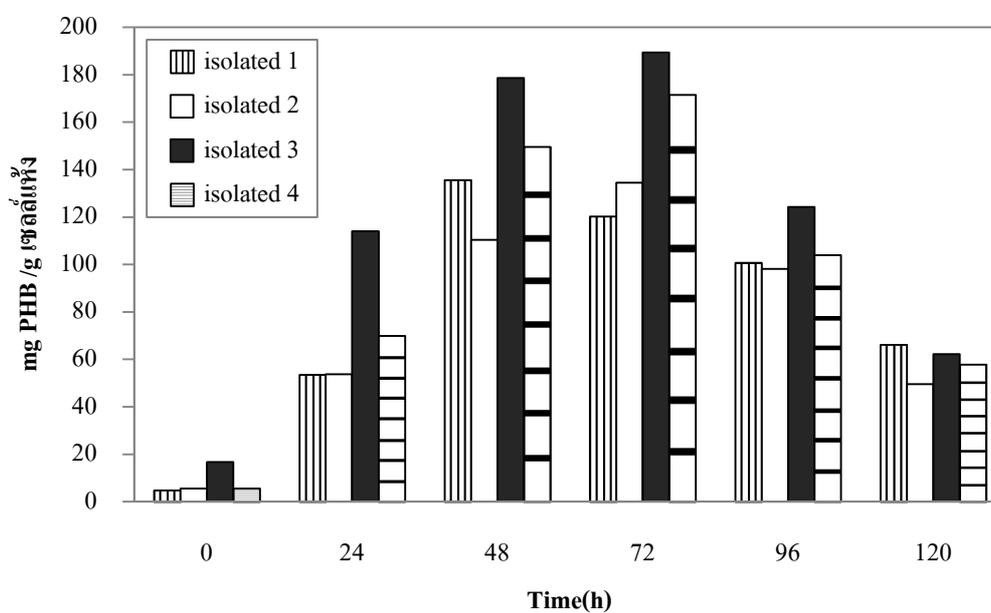
ภาพผนวกที่ ค19 ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 75 ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



ภาพผนวกที่ ค20 ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ในสภาวะให้อากาศ 24:0 ชั่วโมง



ภาพผนวกที่ ค21 ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 75 ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง



ภาพผนวกที่ ค22 ปริมาณ PHB ที่อัตราส่วน COD:N 120 โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ในสภาวะให้อากาศสลับกับไม่ให้อากาศ 15:9 ชั่วโมง

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวปรารถนา วิชชุมนี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	8 กรกฎาคม 2529
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ
ประวัติการศึกษา	วท.บ. วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยบูรพา
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี