

การผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล



นางสาวอัมทิกา เมืองวงษ์

ศูนย์วิทยพัทยาการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES USING ORGANIC WASTES FROM  
BIODIESEL PRODUCTION PROCESS



Miss Amtiga Muangwong

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้ของเสียอินทรีย์  
จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

โดย

นางสาวอัมทิกา เมืองวงษ์

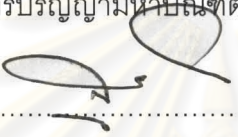
สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

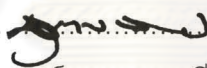
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

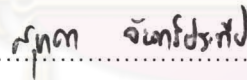
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย  
ของภาควิชาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

  
..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ นารหนองบัว)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

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

  
..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ปานัน เริงสำราญ)

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

อัมทิกา เมืองวงษ์ : การผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้ของเสียอินทรีย์จาก  
กระบวนการผลิตไบโอดีเซล (PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES  
USING ORGANIC WASTES FROM BIODIESEL PRODUCTION PROCESS) อ.ที่  
ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป, 117 หน้า.

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

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อ.....อัมทิกา เมืองวงษ์.....  
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....สุชาดา จันทร์ประทีป.....  
ปีการศึกษา..2553.....

# # 5072568423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: ORGANIC WASTE/ BIODIESEL INDUSTRY/ POLYHYDROXYALKANOATES

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

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

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

Department : .....Microbiology.....Student's Signature.....*Amiga Muangwong*

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

Academic Year : ..2010.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่ง จากหลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงสำหรับ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทรประทีป อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ แนวทาง ข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งได้เสียสละแรงกายแรงใจ และเวลาอันมีค่า ตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน ประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิไล ลือพร้อมชัย อาจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนัญ ผลประไพ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้ความสนใจ คำแนะนำต่างๆ ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้

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

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้คำปรึกษาเป็นอย่างดีรวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีในทุกๆ ด้าน

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

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและบุคคลรอบข้างที่ได้มอบความรัก ความห่วงใย ความอบอุ่น และทุกสิ่งทุกอย่างแก่ผู้วิจัย รวมถึงกำลังใจที่ตีมากที่สุดที่ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สามารถผ่านอุปสรรคต่างๆ และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ประวัติความเป็นมา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2. ทัศนวิสัยวรรณกรรม.....	4
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพลาสติก.....	4
2.2 ประเภทของพลาสติก.....	4
2.3 พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	5
2.4 พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต.....	7
2.5 วิธีการสังเคราะห์ PHA.....	12
2.6 แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA.....	17
2.7 ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล.....	23
2.8 วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนการสังเคราะห์ PHA โดยการใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็น ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน.....	26
2.9 การนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์.....	27
2.10 การวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของ PHA.....	32
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	39
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	39

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



บทที่	หน้า
3.7.3.1	47
ศึกษาหาปริมาณของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHAs ของแบคทีเรียในระดับขวดเขย่าตามวิธีของ Chanprateep และคณะ (2008)....	
3.7.3.2	48
ศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล.....	
3.7.3.3	48
วิเคราะห์น้ำหมักเซลล์แห้ง.....	
3.7.3.4	48
วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนที่เหลือทั้งหมดในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล.....	
3.7.3.5	49
วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนตามวิธีของ Kempers (1974) .....	
3.7.4	49
การผลิตในระดับถังหมัก.....	
3.8	49
ศึกษาการผลิต PHAs โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล.....	
3.8.1	49
ศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล	
3.8.2	50
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Bernfeld (1995).....	
3.9	50
วิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของ PHAs ที่ผลิตได้.....	
3.9.1	50
วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี.....	
3.9.2	51
การสกัด PHA จากเซลล์แห้งและทำให้บริสุทธิ์.....	
3.9.3	52
การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ด้วยเครื่อง NMR.....	
3.10	52
ทดสอบสมบัติทางกายภาพของ PHAs.....	
การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์ตามวิธีของ Abate และคณะ (1995).....	
4. ผลการทดลอง.....	53

บทที่	หน้า
4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs โดยใช้ของเสียจากการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชใช้แล้ว.....	53
4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	56
4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	56
4.2.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น	57
4.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA (16S rRNA).....	58
4.2.4 ต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree).....	59
4.3 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากของเสียที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลในระดับขวดเขย่า.....	64
4.3.1 วิเคราะห์การเจริญเติบโตของ <i>Acinetobacter</i> sp. ASC1 <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 <i>Enterobacter</i> sp. ASC3 และ <i>Bacillus</i> sp. ASC4 จากน้ำหมักเซลล์แห้ง.....	64
4.3.2 วิเคราะห์ปริมาณ PHAs ของ <i>Acinetobacter</i> sp. ASC1 <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 <i>Enterobacter</i> sp. ASC3 และ <i>Bacillus</i> sp. ASC4 ที่ผลิตได้โดยก๊าซโครมาโตกราฟี.....	66
4.4 ศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอน.....	71
4.5 ศึกษาปริมาณคาร์บอนที่เหลือทั้งหมดในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ลดลง.....	73
4.6 การสกัด PHAs จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์.....	75
4.7 ศึกษาโครงสร้างของ PHAs โดย $^1\text{H-NMR}$ , $^{13}\text{C-NMR}$ และ 2D- $^1\text{H-COSY}$ Spectroscopy.....	76
4.8 ทดสอบสมบัติทางกายภาพของ PHAs.....	83
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	85
รายการอ้างอิง.....	91

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



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHA (Chen, 2010b).....	14
2.2	วัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ในการผลิต PHA.....	18
2.3	การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกลงและของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ.....	19
2.4	การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีกรดไขมันผสมอยู่.....	21
2.5	บริษัทที่มีการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม.....	31
4.1	องค์ประกอบของกลีเซอรอลไลด์.....	54
4.2	ลักษณะของโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4.....	57
4.3	ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4..	58
4.4	น้ำหนักชีวมวลสุทธิสูงสุดของ <i>Acinetobacter</i> sp. ASC1 <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 <i>Enterobacter</i> sp. ASC3 และ <i>Bacillus</i> sp. ASC4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เป็น 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 20 80 และ 200 ตามลำดับ.....	65
4.5	ปริมาณ PHAs สูงสุดของ <i>Acinetobacter</i> sp. ASC1 <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 <i>Enterobacter</i> sp. ASC3 และ <i>Bacillus</i> sp. ASC4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เป็น 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 20 80 และ 200 ตามลำดับ.....	67
4.6	ตำแหน่ง Chemical shift (ppm) <sup>13</sup> C-NMR ของ PHAs.....	82
4.7	ค่า $M_w$ $M_n$ $M_w/M_n$ ของพอลิเมอร์ที่ <i>Acinetobacter</i> sp. ASC1 <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 <i>Enterobacter</i> sp. ASC3 และ <i>Bacillus</i> sp. ASC4 ผลิตได้.....	84

## สารบัญภาพ

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

รูปที่	หน้า	
4.1	โรงงานการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วของบริษัทวิทยาคอร์ป จำกัด มหาชน.....	55
4.2	ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตมาจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วของ บริษัทวิทยาคอร์ป จำกัด มหาชน.....	55
4.3	การสะสม PHAs ในแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4 ในอาหารเพื่อการผลิตที่มีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยรูป (A) ย้อมแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (B) ย้อมด้วย Sudan Black B กำลังขยาย 100 เท่า (C) ย้อมด้วย Nile Blue A กำลังขยาย 40 เท่า.....	56
4.4	ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rRNA ของ <i>Acinetobacter</i> sp. ASC1 (GU227612) โดยใช้ 16S rRNA ของ <i>Pseudomonas oleovorans</i> (AY623816) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap.....	60
4.5	ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rRNA ของ <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 (GU227613) โดยใช้ 16S rRNA ของ <i>Cupriavidus necator</i> A-04 (EF988626) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap.....	61
4.6	ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rRNA ของ <i>Enterobacter</i> sp. ASC3 (GU227614) โดยใช้ 16S rRNA ของ <i>Pseudomonas oleovorans</i> (AY623816) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap.....	62
4.7	ต้นไม้วิวัฒนาการของ 16S rRNA ของ <i>Bacillus</i> sp. ASC4 (GU227615) โดยใช้ 16S rRNA ของ <i>Cupriavidus necator</i> A-04 (EF988626) เป็น out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap.....	63

รูปที่	หน้า
4.8 ปริมาณน้ำหมักชีวมวลสุทธิ (กรัมต่อลิตร) ของ <i>Acinetobacter</i> sp. ASC1 <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 <i>Enterobacter</i> sp. ASC3 และ <i>Bacillus</i> sp. ASC4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA ที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์ จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล 10 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อ ไนโตรเจนเท่ากับ 200.....	68
4.9 ปริมาณ PHAs (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหมักเซลล์แห้ง) ที่ <i>Acinetobacter</i> sp. ASC1 <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 <i>Enterobacter</i> sp. ASC3 และ <i>Bacillus</i> sp. ASC4 ผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHAs ที่มีของเสียอินทรีย์ จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล 10 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อ ไนโตรเจนเท่ากับ 200.....	68
4.10 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ <i>Acinetobacter</i> sp. ASC1 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200.....	69
4.11 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200.....	69
4.12 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ <i>Enterobacter</i> sp. ASC3 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200.....	70
4.13 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ <i>Bacillus</i> sp. ASC4 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200.....	70
4.14 ปริมาณน้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำหมักชีวมวลสุทธิ (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHA (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหมักเซลล์แห้ง) และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง (กรัมต่อลิตร) ของ <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200.....	72

รูปที่	หน้า	
4.15	ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำหนักรชีวมวลสุทธิ (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHA (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักรเซลล์แห้ง) และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง (กรัมต่อลิตร) ของ <i>Bacillus</i> sp. ASC4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200.....	73
4.16	ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดในของเสียนินทรีย์ (กรัมต่อลิตร) ในอาหารเพื่อการผลิต PHA ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียนินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 เมื่อเลี้ยงด้วย <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 และ <i>Bacillus</i> sp. ASC4.....	74
4.17	ลักษณะของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จาก <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHAs ที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียนินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200.....	75
4.18	สเปกตรัมของ PHAs ที่ผลิตจาก <i>Acinetobacter</i> sp. ASC1 <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 <i>Enterobacter</i> sp. ASC3 และ <i>Bacillus</i> sp. ASC4 จาก <sup>1</sup> H-NMR ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A; ASC1 B; ASC2 C; ASC3 และ D; ASC4).....	77
4.19	สเปกตรัมของ PHAs ที่ผลิตจาก <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 จาก 2D- <sup>1</sup> H-COSY ความถี่ 400 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....	80
4.20	สเปกตรัมของ PHAs ที่ผลิตจาก <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 จาก <sup>13</sup> C-NMR ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....	81
4.21	โครงสร้างของ PHAs ที่ผลิตได้จาก <i>Acinetobacter</i> sp. ASC1 <i>Pseudomonas</i> sp. ASC2 <i>Enterobacter</i> sp. ASC3 และ <i>Bacillus</i> sp. ASC4.....	83



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบัน “พลาสติก” กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีบทบาทในชีวิตประจำวันของมนุษย์ สามารถพบเห็นได้ในทุกที่ทุกแห่ง และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยพบว่าทั่วโลกมีการใช้พลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีมากขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 1.5 ล้านตันในปี 1950 เป็น 245 ล้านตันในปี 2008 (Chanprateep, 2010) ทั้งนี้เพราะว่าพลาสติกมีคุณสมบัติเชิงวัสดุที่ได้เปรียบหลายประการที่เหมาะสมจะนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ แต่ด้วยสมบัติที่ทนทาน ไม่สลายตัวและยากต่อการนำมารีไซเคิล จึงก่อเกิดปัญหาในการกำจัดภายหลังจากการใช้สอย ผลที่เห็นได้โดยตรงคือมลภาวะที่มาจากกองขยะซึ่งเป็นแหล่งปฏิกรูและเป็นที่สะสมของเชื้อโรค ทำให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในบริเวณใกล้เคียง (Narayan, 1993) เนื่องจากพลาสติกจากปิโตรเคมีคงสภาพอยู่ในธรรมชาติได้นานเพราะจุลินทรีย์ในดินไม่สามารถย่อยสลายได้ และเมื่อนำมาเผาทำลายก็จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ทำให้เกิดภาวะเรือนกระจก การพัฒนาพลาสติกชีวภาพที่สามารถถูกย่อยสลายได้ เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์อาจช่วยลดปัญหาดังกล่าว ประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยเฉพาะกลุ่มสหภาพยุโรปมีการรณรงค์และออกกฎหมายบังคับให้มีการใช้วัสดุที่ถูกย่อยสลายได้ง่ายหรือเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากวัสดุธรรมชาติแทน อย่างไรก็ตามด้วยลักษณะจำเพาะของพลาสติกที่มีน้ำหนักเบา ความแข็งแรง ทนทาน สะดวกในการใช้ ถือหิ้ว หาได้ง่าย ตลอดจนมีความทนทาน สามารถทำได้หลากหลายรูปแบบ และที่สำคัญคือมีราคาถูกกว่าวัสดุประเภทอื่น จึงเป็นการยากที่จะใช้ผลิตภัณฑ์อื่นเข้ามาแทนที่พลาสติกได้ ประเทศต่างๆ ทั่วโลกมีการพัฒนาวิธีการผลิตพลาสติกชีวภาพอย่างต่อเนื่องรวมทั้งประเทศไทย พลาสติกชีวภาพที่ได้รับการพัฒนาจนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในบางรูปแบบผลิตภัณฑ์ ได้แก่ พลาสติกผสมแป้ง พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid, PLA) เป็นต้น ตัวอย่างการใช้ประโยชน์จากพลาสติกชีวภาพในปัจจุบัน ได้แก่ ใช้เป็นแคปซูลบรรจุยา เป็นบรรจุภัณฑ์อาหารและบรรจุภัณฑ์ทั่วไป กระดาษต้นไม้ ส่วนประกอบของยานยนต์ รวมถึงส่วนประกอบของคอมพิวเตอร์ ในอนาคตแนวโน้มการนำพลาสติกชีวภาพมาใช้น่าจะขยายตัวสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม พลาสติกผสมแป้งและ PLA ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงมีงานวิจัยอย่างต่อเนื่องในการพัฒนา พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate, PHA) และอนุพันธ์ของมัน (Madison และ Huisman, 1999) เนื่องจาก

เป็นพลาสติกชีวภาพที่ได้รับการยอมรับว่าสามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ภายใต้ภาวะมาตรฐานที่กำหนด

PHAs เป็นพอลิเอสเทอร์ที่จุลินทรีย์บางชนิดสร้างและสะสมภายในแกรนูลของเซลล์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของเซลล์ และสามารถถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีเอนไซม์เอสเทอเรสและดีพอลิเมอเรส ผลจากการย่อยสลายได้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสภาพแวดล้อม ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และกรดคาร์บอกซิลิก (Evans และ Sikdar, 1987; Brandl และคณะ, 1990; Lee, 1996b) PHAs มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (linear polyester) ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวหนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์อีกตัวหนึ่ง ตรงตำแหน่งปีต้าคาร์บอนจะเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration และแต่ละโมโนเมอร์จะเชื่อมต่อกันแบบหัวต่อหาง (head to tail configuration) (Brandl และคณะ, 1990) ความได้เปรียบที่สำคัญของ PHAs เมื่อเทียบกับพอลิเมอร์ที่มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี มีด้วยกัน 3 ประการ คือ ความเป็นวัสดุหมุนเวียนตามธรรมชาติ (naturally renewable) ความสามารถย่อยสลายได้โดยกระบวนการชีวภาพ (biodegradable) และความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatible) (ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล, 2552)

ปัญหาหลักของการผลิตพลาสติกชีวภาพในปัจจุบันคือ ต้นทุนการผลิตสูงเมื่อเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี โดยส่วนหนึ่งมีสาเหตุจากต้นทุนของแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส ซูโครส แอลกอฮอล์ ไชมัน กรดอินทรีย์ เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และชนิดของ PHAs ที่ต้องการผลิต ซึ่งต้นทุนการผลิตที่สูงดังกล่าวเป็นข้อจำกัดในการพัฒนาสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อแข่งขันกับพลาสติกสังเคราะห์ นักวิจัยจึงให้ความสนใจในการประยุกต์ใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นของเสียอินทรีย์จากโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อให้ต้นทุนการผลิตลดลง

จากวิกฤตการณ์ด้านราคาน้ำมันปิโตรเลียมที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้รัฐบาลและประชาชนทั่วไปให้ความสำคัญกับพลังงานทดแทนโดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตไบโอดีเซล (ในรูปเมทิลเอสเทอร์) จากน้ำมันปาล์ม สำนักงานนโยบายพลังงานแห่งชาติ ตั้งเป้าการผลิตไบโอดีเซลให้ได้ 600 ล้านลิตรต่อปี ภายในปี 2554 (พูนสุข ประเสริฐสุวรรณ และคณะ, 2550) กลีเซอรอลซึ่งเป็นองค์ประกอบในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ก็จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามกำลังการผลิตไบโอดีเซลที่เพิ่มขึ้น หากมีการแปรรูปของเสียเหล่านี้ให้เป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม เช่น การผลิตพลาสติกชีวภาพ จะช่วยให้โรงงานผู้ผลิตได้กำไรเพิ่มขึ้น และลดต้นทุนในการกำจัด เนื่องจากประเทศไทยหันมาสนใจการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลกันมากขึ้นซึ่งเป็นทางเลือกที่เหมาะสมกับประเทศ

ไทยในอนาคตเพื่อลดการพึ่งพาน้ำมันเชื้อเพลิงจากต่างประเทศ ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันหรือไขมันจากสิ่งมีชีวิต ซึ่งรวมไปถึงน้ำมันที่ผ่านการใช้งานหรือน้ำมันเหลือทิ้งในครัวเรือน จะเกิดผลิตภัณฑ์ร่วมชนิดหนึ่งคือ กลีเซอรอล โดยกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นนี้จะมีปริมาณสิ่งเจือปน เช่น ตัวเร่งปฏิกิริยา แอลกอฮอล์ ไขมัน กรดไขมันอิสระ ความชื้น และสิ่งเจือปนอื่นๆ ที่มาจากน้ำมันค่อนข้างสูง ทางโรงงานกำจัดของเสียนี้โดยการเผาทิ้ง ซึ่งเป็นวิธีที่ทำลายสิ่งแวดล้อมและก่อให้เกิดปัญหาภาวะโลกร้อน ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต ซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญที่ใช้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพโดยจุลินทรีย์ซึ่งใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาใช้ในการเจริญและการผลิต PHAs
2. ผลิต PHAs จากแบคทีเรียโดยใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว

## 1.3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs โดยใช้ของเสียจากการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว
2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทางอนุกรมวิธาน
3. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากของเสียที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลในระดับขวดเขย่า
4. วิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของ PHAs ที่ผลิตได้
5. ทดสอบสมบัติทางกายภาพของ PHAs

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตจากแบคทีเรียโดยใช้ของเสียจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว

## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรม

#### 2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพลาสติก

พลาสติก (Plastic) มาจากรากศัพท์ภาษากรีกว่า "plastikos" หมายความว่าหลอมหรือหล่อเป็นรูปร่างได้ง่าย ลักษณะที่เด่นชัดของพลาสติกอยู่ตรงที่โมเลกุลของพลาสติกมีขนาดใหญ่กว่าสารอื่นๆ มาก พลาสติกที่ใช้ส่วนใหญ่ได้จากปฏิกิริยาสังเคราะห์ทางเคมี ส่วนพลาสติกที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติและใช้มากคือ เซลแล็ก (shellac) เป็นสารจากธรรมชาติที่ได้จากการแปรรูปเรซินหรือสารคัดหลั่งที่ได้จากแมลงครั่ง (สมชาย พวงเพ็ชร์ และ ชูศักดิ์ แซ่มเกษม, 2518) พลาสติกเป็นสารประกอบอินทรีย์ สารอินทรีย์หมายถึงสารซึ่งในโมเลกุลมีธาตุไฮโดรเจน และคาร์บอนรวมกันอยู่ อาจมีเพียงอะตอมของธาตุทั้งสองหรือมีอะตอมของธาตุอื่นรวมอยู่ด้วย เช่น มีเทน ( $\text{CH}_4$ ) เป็นสารอินทรีย์ที่มีแต่อะตอมของไฮโดรเจน และคาร์บอน กรดอะซิติก ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) มีอะตอมของไฮโดรเจน คาร์บอน และออกซิเจนรวมอยู่ด้วย เป็นต้น พลาสติกเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถนำมาหล่อเป็นรูปร่างต่างๆ ตามแบบ โดยใช้ความร้อนและแรงอัดเพียงเล็กน้อย มีจุดหลอมเหลวระหว่าง 80-350 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของพลาสติก (นิทัศน์ จิระอรุณ, 2543)

#### 2.2 ประเภทของพลาสติก

พลาสติกแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ เทอร์โมพลาสติก และ เทอร์โมเซตติงพลาสติก (สารานุกรมเสรี, 2548)

##### 2.2.1 เทอร์โมพลาสติก

เทอร์โมพลาสติก หรือเรซิน เป็นพลาสติกที่ใช้กันแพร่หลายที่สุด เมื่อได้รับความร้อนจะอ่อนตัว และเมื่อเย็นจะแข็งตัว สามารถเปลี่ยนรูปได้ พลาสติกประเภทนี้โครงสร้างโมเลกุลเป็นโซ่ตรงยาว มีการเชื่อมต่อระหว่างโซ่พอลิเมอร์น้อยมาก จึงสามารถหลอมเหลว หรือเมื่อผ่านการอัดแรงมากจะไม่ทำลายโครงสร้างเดิม เมื่อหลอมเหลวแล้วสามารถนำมาขึ้นรูปกลับมาใช้ใหม่ได้ ชนิดของพลาสติกในตระกูลเทอร์โมพลาสติก ได้แก่ พอลิเอทิลีน (Polyethylene; PE) พอลิโพรพิลีน (Polypropylene; PP) พอลิสไตรีน (Polystyrene; PS) แซน (styrene-acrylonitrile;

SAN) อะครีโลไนไทรล์-บิวทาไดเอิน-สไตรีน (Acrylonitrile-butadiene-styrene; ABS) พอลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinylchloride; PVC) ไนลอน (Nylon) พอลิเอทิลีน เทเรฟทาเลต (polyethylene terephthalate; PET) และพอลิคาร์บอเนต (Polycarbonate; PC)

### 2.2.2 เทอร์โมเซตติงพลาสติก

เทอร์โมเซตติงพลาสติก (thermosetting plastic) เป็นพลาสติกที่มีสมบัติพิเศษ คือทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและทนปฏิกิริยาเคมีได้ดี เกิดคราบและรอยเปื้อนได้ยาก คงรูปหลังการผ่านความร้อนหรือแรงดันเพียงครั้งเดียว เมื่อเย็นลงจะแข็งมาก ทนความร้อนและความดัน ไม่อ่อนตัวและเปลี่ยนรูปร่างไม่ได้ แต่ถ้าอุณหภูมิสูงจะแตกและไหม้เป็นขี้เถ้าสีดำ พลาสติกประเภทนี้โมเลกุลจะเชื่อมโยงกันเป็นร่างแหจับกันแน่น แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลแข็งแรงมาก จึงไม่สามารถนำมาหลอมเหลวได้ กล่าวคือ เกิดการเชื่อมต่อข้ามไปมาระหว่างสายโซ่ของโมเลกุลพอลิเมอร์ (cross linking among polymer chains) เหตุนี้หลังจากพลาสติกเย็นจนแข็งตัวแล้วจะไม่สามารถทำให้อ่อนได้อีกโดยใช้ความร้อน หากแต่จะสลายตัวทันทีที่อุณหภูมิสูงถึงระดับ การทำพลาสติกชนิดนี้ให้เป็นรูปลักษณะต่างๆ ต้องใช้ความร้อนสูง และโดยมากต้องการแรงอัดด้วย เทอร์โมเซตติงพลาสติก ได้แก่ เมลามีน ฟอรัมาลดีไฮด์ (melamine formaldehyde) ฟีนอลฟอรัมาลดีไฮด์ (phenol-formaldehyde) อีพ็อกซี (epoxy) พอลิเอสเตอร์ (polyester) ยูรีเทน (urethane) และพอลิยูรีเทน (polyurethane)

### 2.3 พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastic)

มีการให้คำนิยามของคำว่า “biodegradable plastic” หลายๆ นิยามจนเมื่อ American Society for Testing and Materials (ASTM) สรุปเป็นมาตรฐานและให้คำนิยามของพลาสติกประเภทนี้ว่าเป็น “พลาสติกที่ย่อยสลายได้ โดยการย่อยมีผลมาจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ หรือสาหร่าย เป็นต้น” (Raghavan, 1995) ซึ่งพลาสติกประเภทนี้มีหลายชนิด ทั้งที่เกิดในธรรมชาติและเป็นพลาสติกสังเคราะห์ที่มีการใส่สารเติมแต่งได้แก่

### 2.3.1 พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีการใส่สารเติมแต่ง (additive based polymer)

ได้แก่ PE PP PS ที่มีการใส่สารเติมแต่งธรรมชาติบางชนิด เช่น แป้งจากข้าวโพด ข้าวโพด และเซลลูโลส เป็นต้น (Evans และ Sikdar, 1990; Raghavan, 1995) เมื่อพลาสติกเหล่านี้ถูกทิ้งในธรรมชาติ จุลินทรีย์จะย่อยสารเติมแต่งมีผลให้พลาสติกมีความอ่อนตัวลง มีรูพรุน และพื้นที่ผิวมากขึ้น โคลงหรือน้ำที่มีอยู่ในดินจะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้สายของพอลิเมอร์ขาดและน้ำหนักโมเลกุลลดลง (Johnson และคณะ, 1993)

### 2.3.2 พลาสติกที่ถูกสลายตัวโดยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV degradable plastic)

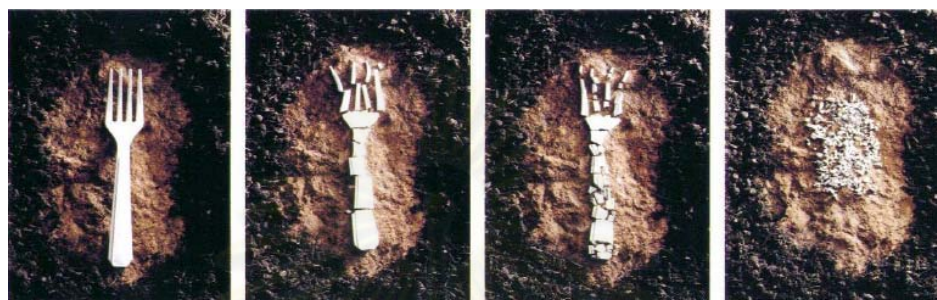
เนื่องจากพลาสติกชนิดนี้มีหมู่คาร์บอนิล ( $C=O$ ) เป็นองค์ประกอบซึ่งมีความไวสูงต่อแสงอัลตราไวโอเล็ต ทำให้เกิดการแตกตัวของสายพอลิเมอร์ทำให้พลาสติกกรอบและแตกได้ หรือมีการเติมสารแต่งเติมชนิดที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำลายพอลิเมอร์เมื่อได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ต เช่น เหล็ก และทองแดง เป็นต้น (Brandl และคณะ, 1990)

### 2.3.3 พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์ (microbial polymer)

เป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพ โดยถูกสร้างและสะสมอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด พอลิเมอร์ดังกล่าวได้แก่ พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate; PHA) ซึ่งจัดเป็นเทอร์โมพลาสติก หมายถึงมีสมบัติที่สามารถนำมาขึ้นรูปได้เมื่อได้รับความร้อน และเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้โดยตรงด้วยเอนไซม์บางชนิด เช่น เอสเทอเรสหรือดีพอลิเมอเรสจากจุลินทรีย์ ได้สารที่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานของจุลินทรีย์ต่อไป จึงจัดเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ (Evans และ Sikdar, 1987; Brandl และคณะ, 1990)

ขยะพลาสติกที่ผลิตมาจากปิโตรเคมีปัจจุบันมีการสะสมในสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น พบว่าทั่วโลกมีการใช้พลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีมากขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 1.5 ล้านตันในปี 1950 เป็น 245 ล้านตันในปี 2008 (Chanprateep, 2010) นักวิจัยได้ศึกษา วิจัยและพัฒนาพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น เช่น PHA (Verlinden และคณะ, 2007) พอลิแลคไทด์ (Polylactide; PLA) อะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyester) พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharides) เป็นต้น ในกลุ่มพอลิเมอร์ที่กล่าวมาพบว่า PHA มีคุณสมบัติด้านต่างๆ ที่

ใกล้เคียงกับพลาสติกที่ผลิตมาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีมากที่สุด (Howell, 1982) มีคุณสมบัติทางกายภาพเป็นเทอร์โมพลาสติก และมีความยืดหยุ่น อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ภายใต้ภาวะที่แตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายภายในระยะเวลา 1 ปี (Cavalheiro และคณะ, 2009)

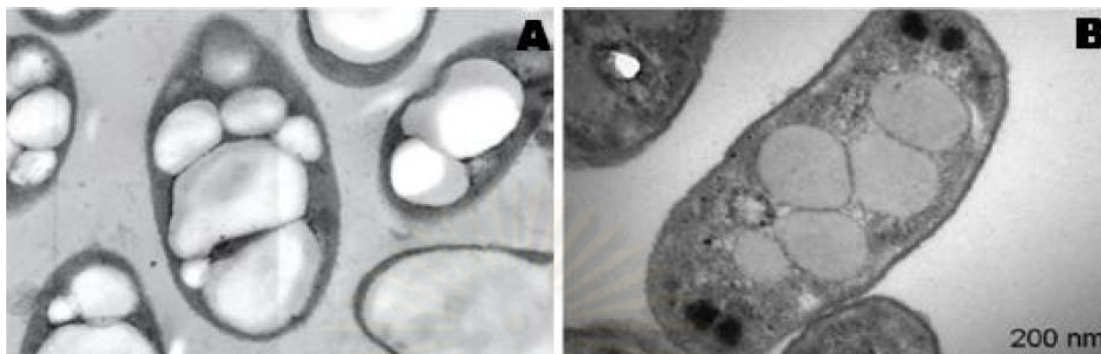


**รูปที่ 2.1** แสดงการย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพที่ผลิตมาจาก PHA ภายในระยะเวลา 45 วัน  
ที่มา : [www.hdb.hr/bec2008/PDF\\_files/Braunegg\\_pha.pdf](http://www.hdb.hr/bec2008/PDF_files/Braunegg_pha.pdf) (Accessed 3 August 2010)

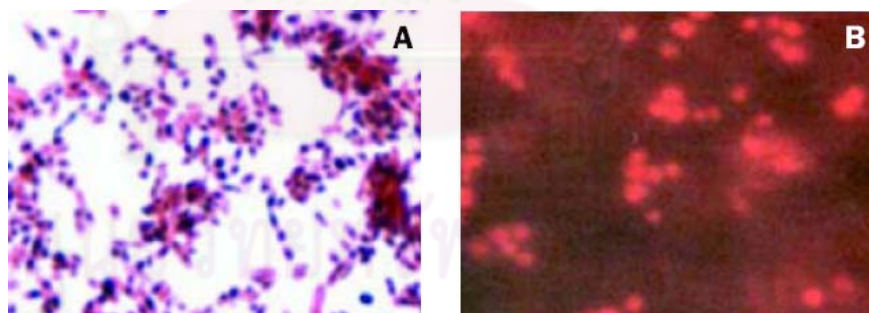
#### 2.4 พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate, PHA)

PHA เป็นพอลิเอสเทอร์ชีวภาพที่จุลินทรีย์บางชนิดสร้างและสะสมภายในแกรนูลในเซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของเซลล์ ภายใต้ภาวะที่จำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ออกซิเจน แมกนีเซียม เป็นต้น แต่จะต้องมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป (Anderson และ Dawes, 1990; Doi, 1990; Steinbüchel, 1991; Reddy และคณะ, 2003) จำนวนและขนาดของแกรนูลในหนึ่งเซลล์จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ จากการรายงานของ Byrom (1994) พบว่า *Cupriavidus necator* (ชื่อเดิม *Alcaligenes eutrophus*) ในหนึ่งเซลล์จะมีจำนวนแกรนูล 8-13 แกรนูล มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.5  $\mu\text{m}$  ซึ่งจะดูได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน PHA สามารถถูกย่อยสลายได้ตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีเอนไซม์เอสเทอเรสและดีพอลิเมอเรส ผลจากการย่อยสลายได้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสภาพแวดล้อม ได้แก่ กรดคาร์บอกซิลิก คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ (Evans และ Sikdar, 1990; Brandl และคณะ, 1990; Lee, 1996b) Lee (1996b) ได้กล่าวว่า PHA มีโมโนเมอร์ที่มากกว่า 300 ชนิดที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA (Lee, 1996b) เช่น *Alcaligenes* sp. *Acinetobacter* sp. *Azotobacter* sp. *Bacillus* sp. *Burkholderia* sp. *Corynebacterium*

sp. *Escherichia* sp. *Pseudomonas* sp. *Paracoccus* sp. *Rhodobacter* sp. *Rhodococcus* sp. *Rhodopseudomonas* sp. *Thermus* sp. เป็นต้น (Lu และคณะ, 2009)



**รูปที่ 2.2** (A) ภาพถ่ายแกรนูลที่มีการสะสม PHA ของ *Cupriavidus necator* DSM 545 โดยเลี้ยงในถังหมักแบบต่อเนื่องที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) กำลังขยาย 150,000 เท่า (Koller และคณะ, 2010) (B) ภาพตัดแกรนูลที่มีการสะสม PHA ของ *Pseudomonas aeruginosa* 42A2 โดยมีน้ำมันเมล็ดปอ (linseed oil) เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน TEM (Bassas และคณะ, 2008)



**รูปที่ 2.3** แกรนูลของแบคทีเรียที่ย้อมด้วย (A) Sudan Black B และ (B) Nile Blue A (López-Cortés และคณะ, 2008)

การตรวจสอบจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการย้อมสีของสารประเภทไขมันที่อยู่ภายในเซลล์เนื่องจากแกรนูลที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ได้เป็นสารประเภทไขมันชนิดหนึ่ง เช่น การย้อมด้วย Sudan Black B และ Nile Blue A การย้อมด้วย Sudan Black B เป็นการทดสอบเบื้องต้นซึ่งสามารถส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั่วไปได้โดยจะเห็นแกรนูลเป็นจุด



สีดำภายในเซลล์ ส่วนการย้อมด้วย Nile Blue A จะเห็นแกรนูลเป็นจุดสีแดงหรือสีส้มภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ (Song และคณะ, 2008)

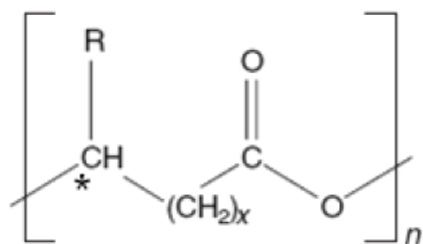
PHA ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำรองให้กับเซลล์ จึงหมายความว่าจุลินทรีย์จะสลาย PHA เพื่อดึงคาร์บอนที่สำรองไว้กลับไปใช้ในการเจริญเติบโตเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลนแหล่งคาร์บอน นั่นก็เป็นการบ่งชี้อย่างชัดเจนว่า PHA มีคุณสมบัติเป็นพอลิเอสเทอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการชีวภาพ (biodegradable polymer) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ตรงกับความต้องการด้านพอลิเมอร์สำหรับอุตสาหกรรมยุคใหม่ (ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล, 2552)

คุณสมบัติทางกายภาพของ PHA มีความยืดหยุ่น ทนความร้อน ไม่ละลายน้ำ enantiomeric มีความบริสุทธิ์ ไม่เป็นพิษ สามารถเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatible) ไม่นำไฟฟ้า (piezoelectric) จุดหลอมเหลวสูง และบางโมโนเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1,000,000 ดาลตัน (Da) ขึ้นไป สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน รวมทั้งทางด้านการแพทย์และเภสัชกร (Steinbüchel และ Hein, 2001)

#### 2.4.1 โครงสร้างของ PHA

PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (linear polyester) ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวหนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์อีกตัวหนึ่ง ตรงตำแหน่งปีศาจคาร์บอนจะเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration แต่ละโมโนเมอร์จะเชื่อมต่อกันแบบหัวต่อหาง (head to tail configuration) เช่นเดียวกับ PP (Brandl และคณะ, 1990) แสดงในรูปที่ 2.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



\*C แสดงตำแหน่งปีต้าคาร์บอน

n = 1	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต)	หรือ P(3HP)
	R = เมทิล (CH <sub>3</sub> )	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	หรือ P(3HB)
	R = เอทิล (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	หรือ P(3HV)
	R = โพรพิล (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต)	หรือ P(3HHx)
	R = บิวทิล (C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต)	หรือ P(3HH)
	R = เพนทิล (C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต)	หรือ P(3HO)
	R = เฮกซิล (C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> )	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโนนาโนเอต)	หรือ P(3HN)
	R = เฮปทิล (C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีเดคะโนเอต)	หรือ P(3HD)
	R = ออกทิล (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีอันเดคะโอเนต)	หรือ P(3HUD)
	R = โนทิล (C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> )	สารนี้คือ พอลิ (3-ไฮดรอกซีโดเดคะฟิโอเนต)	หรือ P(3HDD)
n = 2	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ (4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)	หรือ P(4HB)
n = 3	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ (5-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	หรือ P(3HV)

## รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHA

(ดัดแปลงจาก Braunegg และคณะ, 2004)

### 2.4.2 การจัดจำแนกชนิดของ PHA

2.4.2.1 การจัดจำแนกชนิดตามองค์ประกอบทางเคมีของโมโนเมอร์ (Luengo และคณะ, 2003)

2.4.2.1.1 พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีอนุพันธ์ของกรดไขมันแบบอะโรมาติก

2.4.2.1.2 พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีอนุพันธ์ของกรดไขมันทั้งแบบอะลิฟาติกและแบบอะโรมาติก

2.4.2.1.3 พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ที่มีสารประกอบอื่น เช่น พอลิ-แกมมา-กลูตามิก แอซิด (poly- $\gamma$ -glutamic acid)

2.4.2.2 การจัดจำแนกชนิดตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยโมโนเมอร์ (Lee และคณะ, 1996a; Yim และคณะ, 1996; Hazenberg และ Witholt, 1997; Song และคณะ, 2008)

2.4.2.2.1 short-chain-length (SCL) PHA คือ พอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 3-5 อะตอม

2.4.2.2.2 medium-chain-length (MCL) PHA คือพอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 6-14 อะตอม

2.4.2.2.3 long-chain-length (LCL) PHA คือพอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมมากกว่า 14 อะตอม

2.4.2.3 การจัดจำแนกชนิดโดยแบ่งตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์แบ่งเป็น 2 ประเภทดังนี้ (Luengo และคณะ, 2003)

2.4.2.3.1 โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน ตัวอย่างเช่น พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-3-hydroxybutyrate) และพอลิ-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (poly-3-hydroxyvalerate) เป็นต้น

2.4.2.3.2 เฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบดังนี้

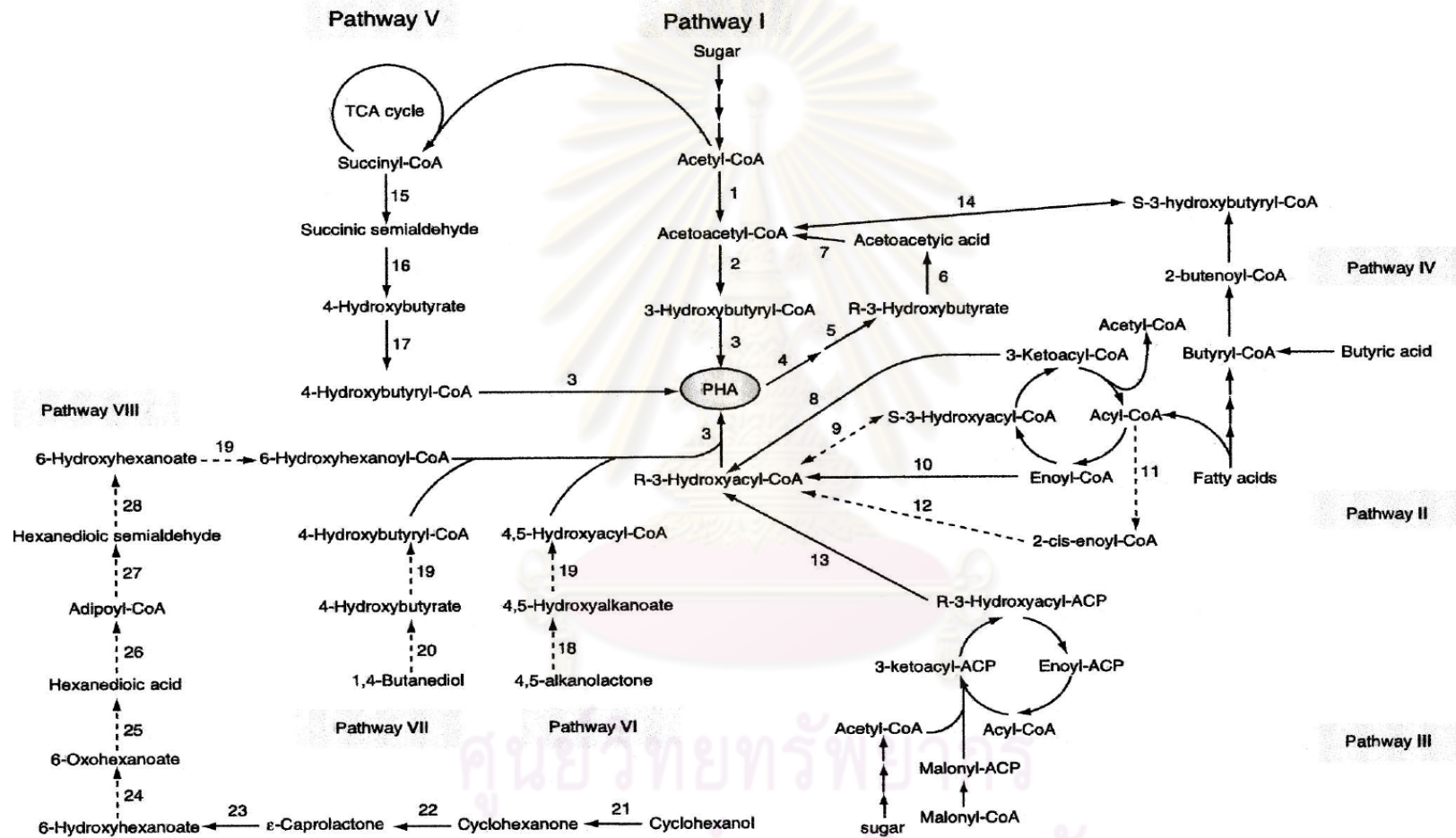
2.4.2.3.2.1 โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [polyhydroxy(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate); PHBV] พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate); P(3HB-co-4HB)] เป็นต้น

2.4.2.3.2.2 เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต [poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate; P(3HB-co-3HV-co-4HB)] พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate-co-4-hydroxyvalerate; P(3HB-co-3HV-co-4HV)]

## 2.5 วิธีการสังเคราะห์ PHA

วิธีการสังเคราะห์ PHA จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ได้มีการศึกษามาหลายปี พบว่าอะเซทิลโคเอ (acetyl-CoA) เป็นส่วนประกอบสำคัญที่จะทำให้เกิด 3-ไฮดรอกซีแอลคานอยล์โคเอ (3-hydroxyalkanoyl-CoA) ที่มีความยาวต่างกันขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นและเอนไซม์ที่จำเพาะในการสังเคราะห์ PHA นอกจากนี้ 3-ไฮดรอกซีแอลคานอยล์โคเอสามารถเกิดจากกระบวนการเบต้าออกซิเดชัน ( $\beta$ -oxidation) ของกรดไขมันได้เช่นกัน จากตารางที่ 2.1 มียื่นหลายตัวที่แสดงรหัสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHA ทั้งทางตรงและทางอ้อม วิธีการสังเคราะห์ PHA สรุปได้เป็น 8 วิธี แสดงในรูปแบบที่ 2.5 และตารางที่ 2.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



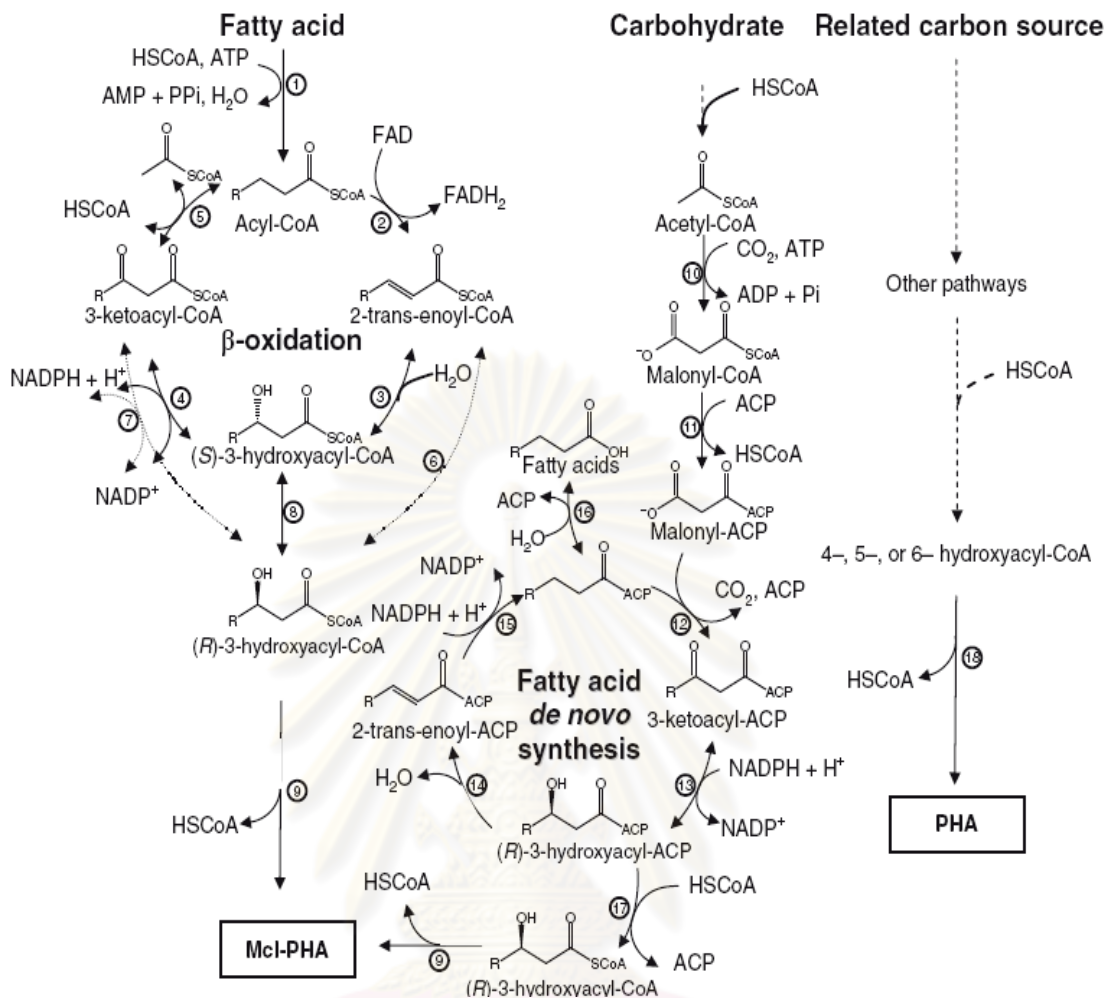
รูปที่ 2.5 วิธีการสังเคราะห์ PHA ตัวเลขแสดงเอนไซม์ (หรือยีน) ที่เกี่ยวข้องในวิธีการสังเคราะห์แสดงในตารางที่ 2.1 (Chen, 2010b)

ตารางที่ 2.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHA (Chen, 2010b)

ตัวเลข	วิถีการสังเคราะห์	ตัวย่อ	เอนไซม์	สายพันธุ์	อ้างอิง		
1	Pathway I	PhaA	$\beta$ -Ketothiolase	<i>Ralstonia eutropha</i>	Sudesh และคณะ (2000)		
2		PhaB	NADPH dependent acetoacetyl-CoA reductase				
3		PhaC	PHA synthase				
4		Associated way	PhaZ	PHA depolymerase		<i>Aeromonas hydrophila</i> 4AK4	Sudesh และคณะ (2000)
5				Dimer hydrolase		<i>Pseudomonas stutzeri</i> 1317	
6				(R)-3-Hydroxybutyrate dehydrogenase		<i>R. eutropha</i>	
7				Acetoacetyl-CoA synthetase		<i>P. oleovorans</i>	
8	Pathway II	FabG	3-Ketoacyl-CoA reductase	<i>P. putida</i> KT2442,	Sudesh และคณะ (2000)		
9			Epimerase	<i>A. hydrophila</i> 4AK4,		Mittendorf และคณะ (1998)	
10		PhaJ	(R)-Enoyl-CoA hydratase/enoyl-CoA hydratase I	<i>P. aeruginosa</i>			
11			Acyl-CoA oxidase, putative				
12			Enoyl-CoA hydratase I, putative				
13	Pathway III	PhaG	3-Hydroxyacyl-ACP-CoA transferase	<i>P. mendocina</i> ,	Sudesh และคณะ(2000),		
		FabD	CoA-ACP transacylase	recombinant <i>Escherichia coli</i>		Zheng และคณะ (2005), Taguchi และคณะ (1999)	

ตารางที่ 2.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์ PHA (ต่อ)

ตัวเลข	วิถีการสังเคราะห์	ตัวย่อ	เอนไซม์	สายพันธุ์	อ้างอิง
14	Pathway IV		NADH-dependent acetoacetyl-CoA reductase	<i>Rhizobium</i> (Cicer) sp. CC 1192	Chohan และ Copeland (1998)
15		SucD	Succinic semialdehyde dehydrogenase	<i>Clostridium kluyveri</i>	
16	Pathway V	4hbD	4-Hydroxybutyrate dehydrogenase		Valentin และ Dennis (1997)
17		OrfZ	4-Hydroxybutyrate-CoA:CoA transferase		
18			Lactonase, putative	Mutants and recombinant of	
19	Pathway VI		Hydroxyacyl-CoA synthase, putative	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Valentin และ Steinbüchel (1995)
20			Alcohol dehydrogenase, putative	<i>A. hydrophila</i> 4AK4	
21	Pathway VII	ChnA	Cyclohexanol dehydrogenase	<i>Acinetobacter</i> sp. SE19,	Xie และ Chen (2008)
22	Pathway VIII	ChnB	Cyclohexanone monooxygenases	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	Brzostowicz และคณะ (2002)
23		ChnC	Caprolactone hydrolase	HCU	
24		ChnD	6-Hydroxyhexanoate dehydrogenase		
25		ChnE	6-Oxohexanoate dehydrogenase		
26			Semialdehyde dehydrogenase, putative		
27			6-Hydroxyhexanoate dehydrogenase, putative		
28			Hydroxyacyl-CoA synthase, putative		



**รูปที่ 2.6** กระบวนการเมแทบอลิซึมของการชีวสังเคราะห์ mcl-PHA 1) acyl-CoA synthetase, 2) acyl-CoA dehydrogenase, 3) enoyl-CoA hydratase, 4) NAD-dependent (S)-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, 5) 3-ketoacyl-CoA thiolase, 6) (R)-specific enoyl-CoA hydratase, 7) NADPH-dependent 3-ketoacyl-CoA reductase, 8) 3-hydroxyacyl-CoA epimerase, 9) mcl-PHA polymerase, 10) acetyl-CoA carboxylase, 11) malonyl-CoA-acyl carrier protein (ACP) transacylase, 12) 3-keto-ACP synthase, 13) 3-keto-ACP reductase, 14) 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase, 15) enoyl-ACP reductase, 16) acyl-ACP thiolase, 17) (R)-3-hydroxyacyl-ACP-CoA transacylase, 18) mcl-PHA polymerase (Zinn, 2010)

เนื่องจากงานวิจัยนี้ศึกษาถึงแหล่งคาร์บอนคือของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วซึ่งมีกรดไขมันเป็นส่วนประกอบ จึงได้เน้นศึกษาถึงกระบวนการเบต้าออกซิเดชัน ซึ่งแสดงในรูปที่ 2.6



เบต้าออกซิเดชันเป็นวิถีหลักในการชีวสังเคราะห์ mcl-PHA เมื่อแบคทีเรียเจริญในอาหารที่มีกรดไขมัน (Kessler และ Witholt, 2001) ในกรณีนี้สารตั้งต้นในการผลิตจะเกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ที่ได้ ซึ่งหมายความว่า โมโนเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบใน mcl-PHA จะมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับสารตั้งต้นแต่อาจจะสั้นลงและแตกเป็นสองหน่วย ดังนั้นกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่จะผลิต (R)-3-hydroxyalkanoates ที่เป็นเลขคู่เท่านั้น ส่วนกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคี่จะผลิต (R)-3-hydroxyalkanoates ที่เป็นเลขคี่เท่านั้น (Huijberts และคณะ, 1995) หลังจากทีกรดไขมันเกิดปฏิกิริยาเบต้าออกซิเดชันแล้วจะได้ เอซิลโคเอ (acyl-CoA) เข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์โมโนเมอร์ของ PHA ซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีนี้แสดงในรูปที่ 2.6

วิถีการชีวสังเคราะห์ที่ 2 จะได้เป็น 3-ไฮดรอกซีแอลคานอยล์โคเอ จากการสังเคราะห์ด้วยวิถี *de novo* fatty acid ยกตัวอย่างเมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นคาร์โบไฮเดรตหรือกลีเซอรอล มีรายงานก่อนหน้านี้กล่าวว่ารูปแบบการสังเคราะห์นี้ไม่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ที่ได้ Huijberts และคณะ (1992) รายงานว่าโมโนเมอร์ที่พบใน *P. putida* KT2442 ซึ่งเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นได้ PHA ที่มีโมโนเมอร์ที่ไม่อิ่มตัว เช่น (R)-3-ไฮดรอกซีโดเดคะโนอิก แอซิด [(R)-3-hydroxydodecenoic acid] และ (R)-3-ไฮดรอกซีเตตระเดคะโนอิก แอซิด [(R)-3-hydroxytetradecenoic acid]

## 2.6 แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA

ในปัจจุบันได้มีการผลิต PHA มาใช้แทนพลาสติกที่ผลิตมาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีเพิ่มมากขึ้น แต่ปัญหาสำคัญที่ตามมาคือ ต้นทุนในการผลิต PHA มีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นทุนในการผลิตพลาสติกที่ผลิตมาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี (Lee และคณะ, 1998) โดยพบว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนในการผลิต PHA เป็นต้นทุนของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต PHA มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิต PHA ได้จากวัตถุดิบเหล่านี้ซึ่งมีราคาสูง เช่น น้ำตาล น้ำตาลทราย หางนม สไตรีน กรดฟีนอลอะซีติก แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง เป็นต้น (Song และคณะ, 2008) ซึ่งแสดงในตารางที่ 2.2 ในอนาคตการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมจะเพิ่มขึ้นจึงได้มีการลดต้นทุนในการผลิต PHA โดยนำของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ นำกลับมาใช้ใหม่เพื่อเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ในการผลิต PHA (Braunegg และคณะ, 2004)

ดังนั้นจึงเป็นมูลเหตุจูงใจในการทำวิจัยครั้งนี้ โดยการนำของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตไบโอดีเซลซึ่งผลิตมาจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว โดยในของเสียนี้จะประกอบไปด้วยกลีเซอรอลและสารเคมีชนิดอื่นๆ เจือปนอยู่จำนวนมาก เพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจของ

ของเสียนี้โดยการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA ต่อไป เป็นการลดต้นทุนในการผลิต PHA และลดปริมาณขยะอินทรีย์ที่จะถูกกำจัดทิ้งโดยไม่เกิดประโยชน์

**ตารางที่ 2.2** วัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ในการผลิต PHA (Braunegg และคณะ, 2004)

คาร์โบไฮเดรต	กากน้ำตาล (Molasses) แป้ง และแป้งที่ผ่านการแตกตัวได้เป็นน้ำตาลมอลโตส (Maltose) น้ำตาลแลคโตสจากหางนม (Lactose from whey) เซลลูโลสที่ผ่านการแตกตัวแล้ว (เช่น เส้นใยที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษหลังจากผ่านการไฮโดรไลซิสและใช้การแลกเปลี่ยนไอออนเพื่อดึงเอาโลหะหนักออก)
แอลกอฮอล์	ของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยมีเมทานอลและกลีเซอรอลผสมอยู่
ไขมันและน้ำมัน	ของเหลือทิ้งจากพืชและสัตว์
กรดอินทรีย์	กรดแลคติกจากอุตสาหกรรมนม

ทุกวันนี้ นักวิจัยหันมาสนใจเทคโนโลยีในการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกหรือเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ มาเป็นวัตถุดิบดังแสดงในตารางที่ 2.3 เพื่อลดต้นทุนการผลิต ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง

จากตารางที่ 2.4 แสดงแหล่งคาร์บอนที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ พบว่า PHA ที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะเป็น mcl-PHAs ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนและแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิต PHA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์จุลินทรีย์	PHAs โมโนเมอร์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	PHAs (g/L)	ปริมาณPHAs (wt %)	อ้างอิง
Hydrolyzed corn oil	<i>Pseudomonas putida</i>	mcl-PHAs	103	28	27.2	Shang และคณะ, 2008
Whey	<i>P. hydrogenovora</i>	PHB	5	1.27		Koller และคณะ, 2008
Sugar cane molasses	Mixed bacteria	PHBV			30	Albuquerque และคณะ, 2007
Soy molasses	<i>P. corrugate</i>	P(HDD-HO-HTDE)	3.6		5-17	Solaiman และคณะ, 2006
Enzymatic extruded starch	<i>Haloferax mediterranei</i>	PHBV	39.4	20	50.8	Chen และคณะ, 2006
Petrochemical plastic waste	<i>P. putida</i> CA-3		1.14	0.84	43	Goff และคณะ, 2007
Paper mill wastewater	Activated sludge	PHBV			48.2	Bengtsson และคณะ, 2008
Bagasse hydrolysates	<i>Ralstonia eutropha</i>	PHB	11.1±0.4		56.5±0.5	Yu และคณะ, 2008
Waste tomato starch	<i>R. eutropha</i> NCIMB 11599	PHB	179	94	55	Haas และคณะ, 2008
Crude glycerol	<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134	PHB	50		48	Mothes และคณะ, 2007

ตารางที่ 2.3 การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์จุลินทรีย์	PHAs โมโนเมอร์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)	PHAs (g/L)	ปริมาณPHAs (wt %)	อ้างอิง
Palm kernel oil	<i>C. necator</i> PHB-4	P(HB-HV-HHx)	7.9		79	Bhubalan และคณะ, 2008
Plant oils	<i>C. necator</i> H16	PHBV	4.4-5.6	6.8	80	Lee และคณะ, 2008
Wheat bran	<i>P. aeruginosa</i> MTCC 7925	P(3HB-co-3HV-co-3HHD-co-3HOD)	0.168		12.5	Singh และ Mallick, 2009

ตารางที่ 2.4 การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีกรดไขมันผสมอยู่

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์จุลินทรีย์	PHAs โมโนเมอร์	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (g/L)	ปริมาณPHAs (wt %)	อ้างอิง
Waste vegetable oil	<i>Pseudomonas</i> sp.strain DR2	mcl-PHAs	0.54	23.52	Song และคณะ, 2008
Saponified vernonia galamensis oil	<i>Alcaligenes eutrophus</i> strain17699	PHB	0.27	42.8	Ayorinde และคณะ, 1998
Reused oil	<i>P. aeruginosa</i>	mcl-PHAs	5.41±0.05	5.72±1.0	Chan และคณะ, 2006
Biodiesel Co- production stream	<i>P. corrugata</i> 388	mcl-PHAs	2.1	42	Ashby และคณะ, 2004
Waste glycerol	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	PHB	38.1	50	Cavalheiro และคณะ, 2009
Glycerol	<i>Zobellella denitrificans</i> strain MW1	PHB	5	87	Ibrahim และ Steinbüchel, 2009
Soybean oil	<i>P. stutzeri</i> 1317	3HO,3HD,3HDD	2.7	63	He และคณะ, 1998
Plam kernel oils และ sodium valerate	<i>C. necator</i> H16	P(3HB-co-3HV)	7.5	90	Lee และคณะ, 2008
Oil wastes	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PHB	2.5	15.02	Wong และคณะ, 2000
Linseed oil	<i>P. putida</i> strain KT2442	LC-PHAs	3	20	Casini และคณะ, 1997
Plam oil	<i>Wautersia eutropha</i> H16 PHB <sup>4</sup>	P(3HB-co-3HHx)	4.3	87±2	Loo และคณะ, 2005

ตารางที่ 2.4 การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีกรดไขมันผสมอยู่ (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์จุลินทรีย์	PHAs โมโนเมอร์	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (g/L)	ปริมาณPHAs (wt %)	อ้างอิง
Coprah oil	<i>P. guezenei</i> biovar. <i>tikehau</i>	P(HO-HD-HDD)		63	Simon-Colin และคณะ, 2008
Waste cooking oil	<i>P. aeruginosa</i> 47T2 (NCBIM 40044)	mcl-PHAs	7.6	36	Haba และคณะ, 2007
Mustard oil	<i>P. aeruginosa</i> MTCC 7925	P(3HB-co-3HV-co- 3HHD-co-3HOD)	1.58	27.3	Singh และ Mallick, 2009

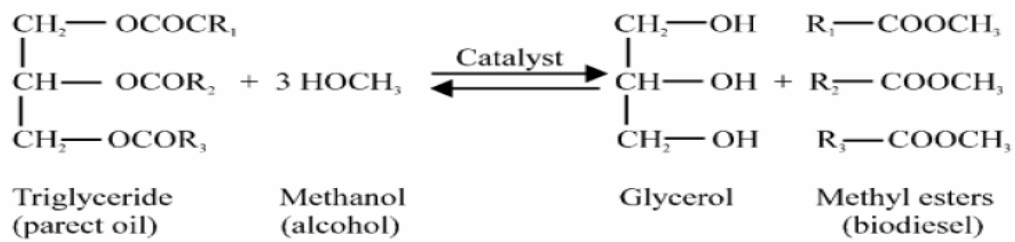
## 2.7 ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Waste from biodiesel production process)

ปัจจุบันยุโรปมีการออกกฎหมายใหม่ให้มีการใช้ biofuel เพิ่มขึ้นในตลาด 5.75% ในช่วงเดือนธันวาคม ปี 2010 (Bozbas, 2008; Vasudevan และ Briggs, 2008) ทำให้มีการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ร่วมปริมาณมากชนิดหนึ่งคือ กลิเซอรอล โดยจะนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิต PHA ได้ โดยพบว่าในการผลิตไบโอดีเซล 1 กิโลกรัมจะทำให้เกิดกลิเซอรอล 100 กรัม ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงหลักที่นำมาใช้แล้วไม่ก่อผลเสียให้กับระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิตและพบว่าไบโอดีเซลมีคุณภาพในการปล่อยพลังงานได้ดีกว่าน้ำมันดีเซลที่มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีโดยขึ้นอยู่กับการนำไปใช้ (Koller และคณะ, 2010)

ไบโอดีเซลผลิตมาจากแหล่งไขมันที่แตกต่างกัน เช่น น้ำมันเมล็ดเรพ น้ำมันปาล์ม เป็นต้น ในปัจจุบันการนำน้ำมันพืชที่ใช้ประกอบอาหารมาผลิตไบโอดีเซลถือว่าไม่เหมาะสมและทำให้ไม่ได้รับการยอมรับ ดังนั้นจึงนำน้ำมันที่ใช้แล้วจากร้านอาหารและ soapstocks ซึ่งเป็นการลดราคาวัตถุดิบที่ดีมากในการผลิต PHA (Vasudevan และ Briggs, 2008)

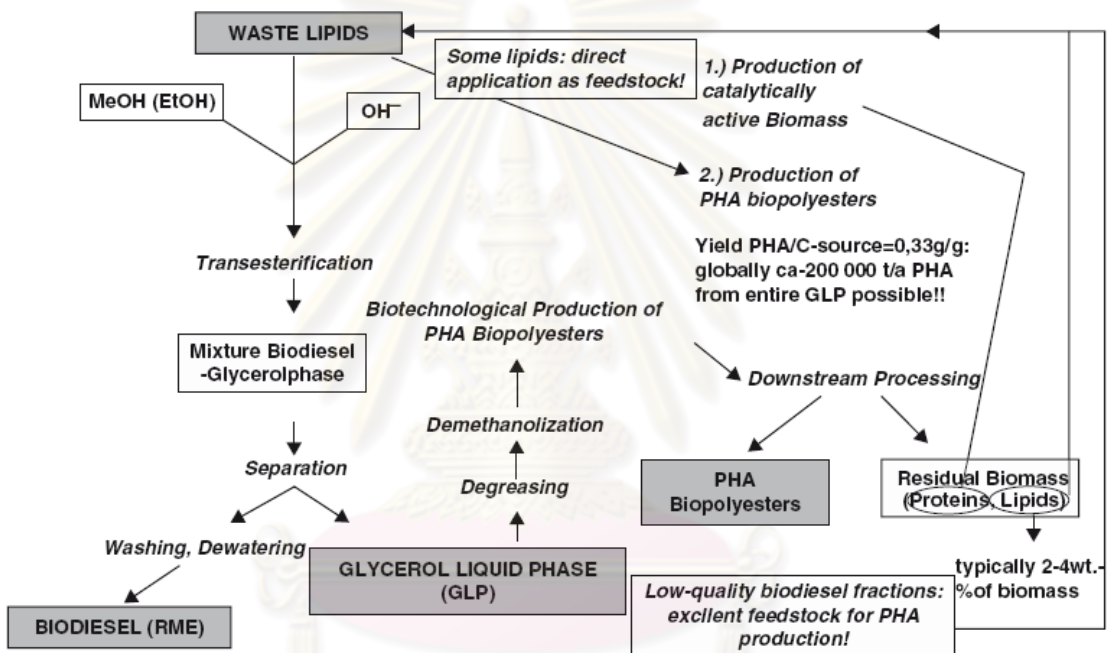
รูปที่ 2.7 แสดงปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นการนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ โดยใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี (catalyst) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ หรือที่เรียกว่า น้ำมันไบโอดีเซล และกลิเซอรอล โดยแอลกอฮอล์ที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ เมทานอล หรือเอทานอล ซึ่งเอสเทอร์ที่ได้นั้นอาจเป็นเมทิลเอสเทอร์ หรือเอทิลเอสเทอร์ ตามชนิดแอลกอฮอล์ที่เลือกใช้ และได้กลิเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมปริมาณมากแสดงในรูปที่ 2.8 (ณัฐกานต์ บุศรพงษ์พานิช และ ณรงค์ฤทธิ์ คงอยู่, 2548) หากน้ำมันพืชที่นำมาใช้ผลิตเป็นไบโอดีเซลเป็นน้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้ว จะทำให้คุณภาพของกลิเซอรอลต่ำเนื่องจากมีปริมาณสิ่งเจือปนสูง ยากต่อการทำให้บริสุทธิ์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป และเป็นปัญหาในระบบบำบัดน้ำเสีย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ที่มา : <http://econuz.com/page/7/> (Accessed 11 August 2010)



รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซล และการนำกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้มาใช้เป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ในการผลิต PHA รวมทั้งการนำของเสียที่เป็นไขมันมาผลิต PHA โดยตรง (Koller และคณะ, 2010)

จากการที่น้ำมันจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีนั้นมีราคาสูงเพิ่มขึ้นต่อเนื่อง ทำให้มีการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นด้วยในหลายพื้นที่ทั่วโลก ส่งผลให้ราคาของกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้ลดลงด้วย ในปี 2008 Canakci และ Sanli รายงานว่าในปี 2006 ทั่วยุโรปมีการผลิตไบโอดีเซล  $4.6 \times 10^6$  ตันซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิม 77 เปอร์เซนต์ ในสหรัฐอเมริกามีการผลิต  $7.5 \times 10^5$  ตัน ในประเทศออสเตรเลียมีการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มมากขึ้นจาก 121,665 ไปถึง 241,381 ตัน ตั้งแต่ปี



2006 ถึง 2007 ซึ่งเพิ่มถึง 98 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกิดกลีเซอรอล 24,000 ตัน การนำกลีเซอรอลมาประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกชีวภาพนอกจากเป็นการเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจแล้วยังเป็นการลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

Cavalheiro และคณะ (2009) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Cupriavidus necator* DSM 545 โดยใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลและกลีเซอรอลที่ใช้ทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบเฟดแบตช์ (fed-batch) เปรียบเทียบกัน พบว่ากลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 51.2 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB 62 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนการกลีเซอรอลที่ใช้ทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอนมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 38.1 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Ibrahim และ Steinbüchel (2009) คัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต PHA จากแหล่งน้ำ น้ำเสีย และดิน ในประเทศเยอรมันและอียิปต์ พบว่า *Zobellella denitrificans* สายพันธุ์ MW1 สามารถผลิต PHA ได้ทดสอบเบื้องต้นโดยการย้อมแกรนูลด้วย Nile Blue A นำกลีเซอรอลมาเป็นแหล่งคาร์บอน มีการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ แอมโมเนียมคลอไรด์ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต 41 องศาเซลเซียส มีค่าความเป็นกรด ต่างเท่ากับ 7.3 พบว่ามีการผลิต PHB 80.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 20 กรัมต่อลิตร ทำให้มีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น 5 กรัมต่อลิตร มีปริมาณ PHB 87 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้พบว่า *Z. denitrificans* สายพันธุ์ MW1 สามารถผลิต P(3HB-co-3HV) ได้เมื่อใช้โพทิโอเนตเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับกลีเซอรอลด้วย

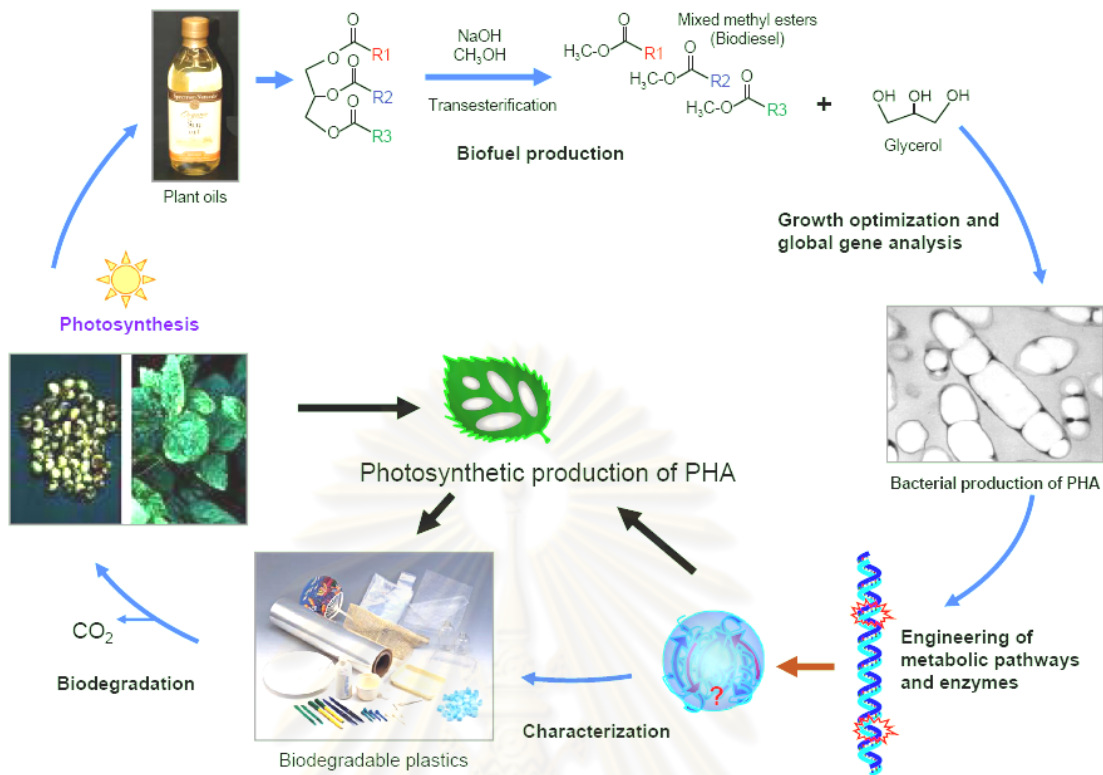
Song และคณะ (2008) คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการนำน้ำมันพืชไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยคัดเลือกจากดินในทุ่งข้าวของประเทศเกาหลีโดยใช้น้ำมันข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในการคัดเลือก พบทั้งหมด 4 สายพันธุ์ที่สามารถนำน้ำมันพืชไปใช้ได้ ได้แก่ *Enterobacteriaceae* sp. CR1, *Rhodococcus* sp. CR2, *Acinetobacter* sp. DR1 และ *Pseudomonas* sp. DR2 เมื่อนำไปผลิต PHA โดยใช้น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันที่ใช้แล้วมาเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Acinetobacter* sp. DR1 และ *Pseudomonas* sp. DR2 สามารถผลิต mcl-PHA ได้ ทำการทดสอบเบื้องต้นด้วยการย้อมด้วย Nile Blue A แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า *Pseudomonas* sp. DR2 แสดงจุดสีส้มจำนวนมากซึ่งมากกว่า *Acinetobacter* sp. DR1 Song และคณะจึงได้ศึกษาการผลิต mcl-PHAs ต่อโดยใช้ *Pseudomonas* sp. DR2 พบว่าเมื่อใช้น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันที่ใช้แล้วมาเป็นแหล่งคาร์บอนได้ PHA เท่ากับ 37.34 เปอร์เซ็นต์ และ 37.52 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ [mcl-

PHAs ที่ได้ประกอบด้วยโมโนเมอร์หลักคือ 3HO (39.63 เปอร์เซ็นต์, 3-hydroxyoctanoate), 3HD (34.13 เปอร์เซ็นต์, 3-hydroxydecanoate) และ 3HDD (11.37 เปอร์เซ็นต์, 3-hydroxydodecanoate) ส่วนโมโนเมอร์ย่อยอื่นๆ น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์]

## 2.8 วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนการสังเคราะห์ PHA โดยการใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน

วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของ PHA จากของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลแสดงในรูปที่ 2.9 เป็นการนำกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยในกลีเซอรอลนั้นอาจมีสารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ และเมทานอลเจือปนจำนวนมากมาเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ซึ่งจะสร้างและสะสมแกรนูลของ PHA ที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ จากนั้นสกัด PHA และทำให้บริสุทธิ์ นำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกชนิดต่างๆ หลังจากผ่านการใช้งานแล้ว PHA อาจถูกกำจัดเช่นเดียวกับขยะประเภทของแข็งทั่วไป เมื่อเกิดการย่อยสลายโดยธรรมชาติจะได้เป็นปุ๋ยที่มีแหล่งอินทรีย์คาร์บอนที่สมบูรณ์ ช่วยเพิ่มปริมาณน้ำ รักษาปริมาณสารอาหารในดิน เมื่อย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จะได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้สำหรับกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช และนำกลับมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิต PHA ต่อไป (Gerngross, 1999; Dove, 2000; Stevens, 2002; Kim และ Dale, 2005)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.9 วงจรแสดงการหมุนเวียนการสังเคราะห์ PHA โดยการใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน

ที่มา: [http://www.bio.org/ind/wc/08/breakout\\_pdfs](http://www.bio.org/ind/wc/08/breakout_pdfs) (Accessed 10 August 2010)

## 2.9 การนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์

PHA ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมผลิตเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้และ/หรือสามารถผสมเข้ากับพลาสติกเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านอื่นๆ อีกมากมาย (Lee, 1996a) ดังแสดงในรูปที่ 10 PHB ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 100-200 หน่วย ซึ่งพบว่ามีองค์ประกอบคล้ายกับผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต Reusch และคณะ (1992) ได้พบองค์ประกอบที่คล้ายกับ PHB จำนวนมากในพลาสมาของเลือดมนุษย์ (blood plasma) ดังนั้นมีความน่าจะเป็นไปได้สูงที่จะนำ PHB ไปใช้กับเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยไม่เป็นพิษกับสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ด้วยคุณสมบัติที่ PHA มีสมบัติการเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) จึงมีศักยภาพในการใช้เป็นวัสดุปลูกถ่ายที่มีสมบัติการเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดกลไกการต่อต้านระหว่างวัสดุปลูกถ่ายและเซลล์เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต

ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติเด่นของ PHA ที่นำไปสู่ในการประดิษฐ์วัสดุทางการแพทย์ ตัวอย่างความเป็นไปได้ที่จะนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ

- บรรจุภัณฑ์ทางอุตสาหกรรม เช่น ฟิล์มห่อหุ้มวัสดุ กระเป่าและถุงบรรจุภัณฑ์ บรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในยารักษาโรค ยาฆ่าแมลง ยากำจัดวัชพืช หรือปุ๋ย (Brandl และคณะ, 1990)
- ผลิตภัณฑ์ที่ออกแบบมาให้ใช้แล้วทิ้ง เช่น ใบบิดโกน เครื่องใช้ในบ้านบางชนิด ผ้าอ้อม หรือผลิตภัณฑ์ที่ใช้ดูแลทำความสะอาดสำหรับผู้หญิง (Lee, 1995)
- อุตสาหกรรมเคมี เป็นวัตถุดิบในการผลิตองค์ประกอบไครล (chiral compound) (Chen และ Wu, 2005)
- วัสดุที่ใช้ทางการแพทย์ เช่น วัสดุตกแต่งบาดแผล เข็มที่ใช้ในการเย็บแผล ผ้าก๊อชหรือสำลีที่ใช้ในการทำแผล (Lee, 1995)
- วัสดุค้ำจุนและช่วยการผสมกระดูกในทางการแพทย์ออร์โธพีดิกส์ กระตุ้นการเจริญของกระดูกและสมานกระดูก (Brandl และคณะ, 1990)
- ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารเพื่อสุขภาพ (Chen, 2009)
- อุตสาหกรรมทอผ้า โดย PHA สามารถนำไปผ่านกระบวนการผลิตเป็นไฟเบอร์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอเช่นเดียวกับไนลอน (Chen, 2009)
- อุตสาหกรรมยา เฉพาะ PHB ที่มีโครงสร้างเป็น R-configuration มีคุณสมบัติรักษาโรคอัลไซเมอร์ และโรคพาร์กินสัน (Alzheimer's และ Parkinson's diseases) (Kashiwaya และคณะ, 2000) โรคข้อกระดูกอักเสบ (Massieu และคณะ, 2003) ช่วยปรับปรุงและฟื้นฟูความจำ (Zou และคณะ, 2009)
- ใช้ในการทำบริสุทธิ์โปรตีน (Protein purification) โดยให้แกรนูลของ PHA จับกับ phasin proteins (PHA granule binding protein phasin; PhaP) ทำให้ recombinant proteins บริสุทธิ์ (Wang และคณะ, 2008)

ในปัจจุบันประเทศที่มีเทคโนโลยีด้านพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพจะเป็นผู้นำในการกำหนดทิศทางการใช้สินค้าจากพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และพัฒนารูปแบบไปสู่กฎหมายหรือแผนปฏิบัติการระหว่างประเทศที่ทำให้เกิดอำนาจต่อรองด้านธุรกิจการค้าในเวทีโลก เราจึงเห็นได้ว่าความตื่นตัวด้านพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพทั้งด้านนโยบาย การวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรม และการสร้างผลิตภัณฑ์เพื่อเร่งรัดให้เกิดการทดแทนพลาสติกทั่วไปนั้นเป็นไปอย่างรวดเร็วและมีขั้นตอนที่มีทิศทางอย่างชัดเจน เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นหนึ่งในประเทศ

ผู้นำด้านวิทยาการและเทคโนโลยีพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยประสบความสำเร็จในการผลิตเม็ดพลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม เช่น บริษัท NatureWorks LLC ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดแลคติกและ PLA โดยมีชื่อทางการค้าว่า Ingeo™ ในขณะที่บริษัท Telles ประเทศสหรัฐอเมริกาสามารถผลิต PHAs โดยมีชื่อทางการค้าว่า Mirel™ ในปี 2009 มีการผลิต PHAs 50,000 ตัน โดยกำหนดราคาขายในราคา กิโลกรัมละ €1.50 (Chanprateep, 2010)



รูปที่ 2.10 การนำ PHA ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ (Chen, 2010b)

ในปัจจุบันมีหลายบริษัททั่วโลกได้พัฒนาการผลิต PHA ดังแสดงในตารางที่ 2.5 บริษัท ZENECA Bio-Products หรือบริษัท Imperial Chemical Industries (ICI plc) เป็นบริษัทแรกที่ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Cupriavidus naccator* (โดยชื่อเดิมคือ *Ralstonia eutropha* หรือ *Alcaligenes eutrophus*) (Vandamme และ Coenye, 2004; Vaneechoutte และคณะ, 2004) ในการผลิตโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) และ PHB มีชื่อทางการค้าว่า BIOPOL ในปี 1990 มีการผลิต 1,000 ตันต่อปีและมีการตั้งเป้าหมายไว้ว่าในปี 2008 มีการผลิตถึง 50,000 ตันต่อปี (Verlinden และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังมีหลายบริษัทที่ผลิต PHB เช่น Mitsubishi Gas Chemical Company

Inc. ประเทศญี่ปุ่น มีชื่อทางการค้าว่า Biogreen<sup>®</sup> PHB Industrial Company ประเทศบราซิล มีชื่อทางการค้าว่า Biocycle<sup>®</sup> Biomer Inc. ประเทศเยอรมนี มีชื่อทางการค้าว่า Biomer<sup>®</sup> บริษัทที่ผลิต P(3HB-co-3HV) เช่น บริษัท Tianan Biologic, Ningbo ประเทศจีน มีชื่อทางการค้าว่า Enmat<sup>®</sup> เป็นต้น ปัจจุบันมีหลายประเทศที่รณรงค์และออกกฎหมายเกี่ยวกับการใช้ถุงพลาสติก เช่น ในประเทศไอร์แลนด์ สก๊อตแลนด์ เดนมาร์ก และสวีเดนมีการจัดเก็บภาษีการใช้ถุงพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ ในประเทศบังคลาเทศมีการต่อต้านการใช้ถุงพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้เริ่มต้นเมื่อเดือนมกราคม ปี 2002 ในประเทศอิตาลีมีการเก็บเงินเพิ่ม €0.10–0.20 เมื่อซื้อของโดยใส่ถุงพลาสติกเมื่อปี 2009 เป็นต้น (Chanprateep, 2010)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

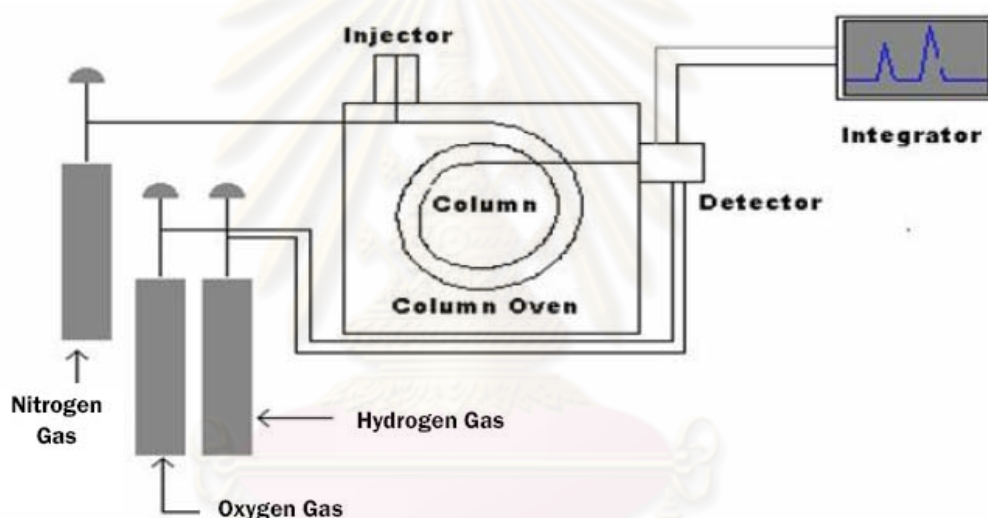
ตารางที่ 2.5 บริษัทที่มีการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม (Lee, 1996a; Reddy และคณะ, 2003; Chen, 2010a)

จุลินทรีย์ / วัตถุประสงค์	บริษัท
<i>Alcaligenes eutrophus</i> (H16)	- ZENECA Bio-Products ชื่อเดิม ICI Ltd.(อังกฤษ)
<i>A. latus</i>	- Tianjin Northern Food (จีน)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	- Biotechnologische Forschungs gesellschaft mbH (ออสเตรีย)
<i>Burkholderia</i> sp.	- Petrochemia Danubia
พืชตัดแต่งพันธุกรรม	- Procter & Gamble (สหรัฐอเมริกา)
พืชตัดแต่งพันธุกรรม (เมล็ดเรพ, ถั่วเหลือง)	- PHB Industrial Usina da Pedra-Acucare Alcool (บราซิล)
พืชตัดแต่งพันธุกรรม (เมล็ดเรพ)	- Metabolix Inc. (สหรัฐอเมริกา)
<i>Escherichia coli</i> ตัดแต่งพันธุกรรม	- Monsanto (สหรัฐอเมริกา)
แป้ง	- ZENECA Seeds (อังกฤษ)
เฮมิเซลลูโลส	- Bio Ventures Alberta Inc. (แคนาดา)
แบคทีเรียชนิดอื่นๆ	- Lantian Group (จีน)
	- Warner_s Lambert (สหรัฐอเมริกา)
	- Fertec (Ferruzi e Tecnologia) (อิตาลี)
	- Biotec(Melitta) Emmerich (เยอรมนี)
	- BASF Ludwigshafen (เยอรมนี)
	- Bayer/Wolf Walsrode Leverkusen (เยอรมนี)
	- Novamont Novara (อิตาลี)
	- Polyferm Inc. (แคนาดา)
	- Biocorp (สหรัฐอเมริกา)
	- Asahi Chemicals and Institute of Physical and Chemical Research (ญี่ปุ่น)

## 2.10 การวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของ PHA

### 2.10.1 ก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography: GC) (รุจิลักษณ์ รัตตะรมย์, 2549)

เป็นเทคนิคสำหรับแยกสารตัวอย่างที่เป็นสารผสม โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง แล้วให้ไอของสารเหล่านั้นผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือก๊าซตัวพา องค์ประกอบของสารผสมที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่และการกระจายตัวผ่านเฟสคงที่ต่างกันจะแยกออกจากกัน โดยองค์ประกอบภายในเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี แสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 องค์ประกอบของเครื่อง Gas chromatography

ที่มา: [http://classes.engr.oregonstate.edu/cbee/spring2005/che415/PublicTeam1/Biodiesesl\\_Project\\_Proposal.html](http://classes.engr.oregonstate.edu/cbee/spring2005/che415/PublicTeam1/Biodiesesl_Project_Proposal.html) (Accessed 15 August 2010)

ในการวิเคราะห์สารผสม ตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าที่ช่องฉีดตัวอย่าง (injection port) สารผสมจะถูกให้ความร้อนจนกลายเป็นไอแล้วถูกพาเข้าไปในคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบของสารผสมจะแยกออกจากกันเมื่อเคลื่อนผ่านคอลัมน์และถูกตรวจวัดโดยดีเทคเตอร์ สัญญาณการตรวจวัดที่ได้จากดีเทคเตอร์จะถูกบันทึกและแสดงออกมาในรูปแบบของโครมาโตแกรม



เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

ก๊าซตัวพาที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่นั้นต้องเป็นก๊าซเฉื่อยไม่ทำปฏิกิริยา ได้แก่ ไนโตรเจน ฮีเลียม อาร์กอน และคาร์บอนไดออกไซด์ การเลือกชนิดของก๊าซจะขึ้นอยู่กับชนิดของดีเทคเตอร์ที่ใช้

Sample Injection System อุณหภูมิของ Injector จะสูงกว่าใน oven ประมาณ 50 องศาเซลเซียส สารตัวอย่างจะถูกทำให้เป็นไอและส่งผ่านสู่ chamber ปริมาณสารที่ฉีดเข้าสู่ระบบ ~1 ไมโครลิตร คอลัมน์ที่ใช้เป็นแคพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) เส้นผ่านศูนย์กลางภายในประมาณ 0.2 มิลลิเมตร ประกอบด้วย wall coated open tubular จะเคลือบผนังภายในด้วยเฟสของเหลวคงที่ (liquid stationary phase) และสารเคลือบค้ำจุน (support coated tubular) เคลือบผนังภายในด้วยเฟสของแข็งคงที่ (solid stationary phase) ประสิทธิภาพของคอลัมน์สองชนิดนี้ดีกว่าคอลัมน์แบบแพ็ค (packed column)

Oven จะเป็นส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ เพื่อให้ได้งานที่มีความแม่นยำ การควบคุมอุณหภูมิจะต้องมีความละเอียดถึง 0.1 องศาเซลเซียส การตั้งค่าอุณหภูมินั้นจะขึ้นอยู่กับจุดเดือดของตัวอย่าง โดยปกติแล้วอุณหภูมิคอลัมน์จะถูกตั้งไว้สูงกว่าจุดเดือดของตัวอย่าง ขณะที่ตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่อุณหภูมิจะทำให้ค่าความละเอียดของการวัดสูง แต่ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น ถ้าสารประกอบแต่ละชนิดในตัวอย่างมีจุดเดือดใกล้เคียงกัน จะตั้งค่าอุณหภูมิเพียงค่าเดียว (isothermal) ถ้าสารประกอบแต่ละชนิดในตัวอย่างมีจุดเดือดช่วงกว้าง จะใช้โปรแกรมอุณหภูมิในการแยกสาร คือ อุณหภูมิของคอลัมน์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งการแยกเสร็จสิ้น ส่วน detector และ recorder ที่ใช้เป็นแบบไม่จำเพาะเพื่อให้ใช้งานได้หลากหลาย

เมื่อสารถูกแยกและทำการวิเคราะห์แล้ว หน่วยประมวลผลจะแสดงผลการวิเคราะห์ออกมาในรูปโครมาโตแกรมซึ่งจะแสดงเปอร์เซ็นต์ abundance และเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (retention time) เครื่องสามารถวิเคราะห์หาความสูงของพีคและพื้นที่ใต้พีคเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารได้อีกด้วย การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis) ด้วยวิธีสารมาตรฐานภายในเป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณของสารได้ถูกต้องที่สุด แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารมาตรฐานภายในต้องมีคุณสมบัติดังนี้ สารนั้นต้องมีคุณสมบัติคล้ายสารที่จะวิเคราะห์ ต้องถูกชะออกจากคอลัมน์หมด ต้องให้พีคที่แยกอยู่ต่างหาก โดยพีคจะไม่ซ้ำหรือเหลื่อมทับพีคอื่นๆ และอยู่ใกล้พีคที่ต้องการหา และสารนั้นต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

2.10.2 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy: NMR) (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2539)

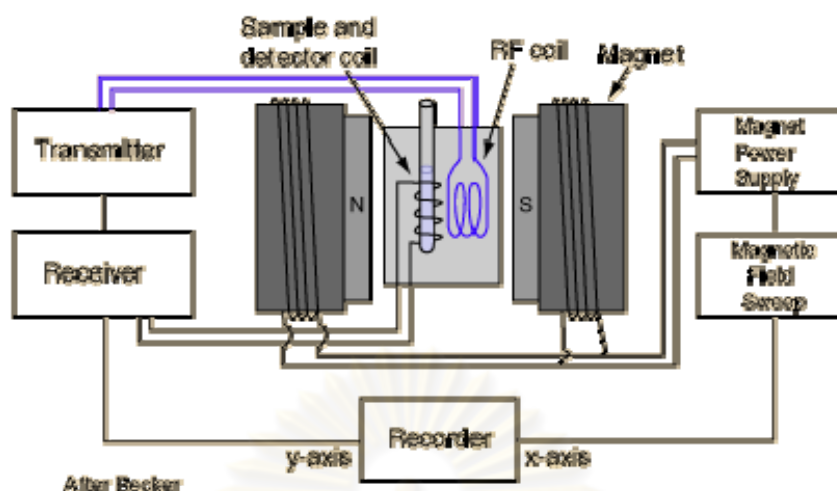
นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี หรือที่เรียกโดยย่อว่า เอ็นเอ็มอาร์ (NMR) เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกันของนิวเคลียสที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก มีประโยชน์มากในการศึกษาเกี่ยวกับสูตรโครงสร้างของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์ได้ด้วย แสดงองค์ประกอบของเครื่อง NMR ในรูปที่ 2.12

หลักการของ NMR นิวเคลียสเป็นอนุภาคที่มีประจุ ในนิวเคลียสของธาตุบางชนิด ประจุนี้จะหมุนหรือสปิน (spin) เป็นวงรอบแกนนิวเคลียส (nuclear axis) (Field และ Sternhell, 1989) การสปินของนิวเคลียสนี้จะก่อให้เกิดโมเมนต์แม่เหล็ก (magnetic moment) เมื่อสนามแม่เหล็กภายนอกกระทำกับนิวเคลียส จะไปทำให้นิวเคลียสที่จำเพาะเจาะจงเกิดการหันไปในทิศทางที่แน่นอนเมื่อเทียบกับทิศทางของสนามแม่เหล็ก ทิศทางการจัดตัวที่ต่างกันจะมีค่าพลังงานที่ต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถนำข้อมูลค่าพลังงานที่วัดได้มาบ่งบอกถึงทิศทางการจัดตัวของนิวเคลียสชนิดต่างๆ ได้ ในการวัดสัญญาณ NMR จะต้องนำตัวอย่างที่ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม (ซึ่งจะต้องปราศจากนิวเคลียสชนิดเดียวกับที่กำลังจะตรวจวัดสัญญาณ NMR ตัวอย่างเช่นหากจะวัดสัญญาณของโปรตอนในสารตัวอย่างตัวทำละลายจะต้องไม่มีโปรตอน เช่น  $\text{CCl}_4$  หรือต้องเป็นตัวทำละลายที่มีดิวเทอเรียมแทน เช่น  $\text{CDCl}_3$ ) อยู่ในหลอดแก้วยาว ไปวางไว้ในสนามแม่เหล็กที่มีความแรงมาก ซึ่งในยุคแรกๆ จะใช้แม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งสามารถเพิ่มความแรงได้อย่างจำกัด ในปัจจุบันจะนิยมใช้แม่เหล็กแบบซูเปอร์คอนดักเตอร์ ซึ่งจะต้องหล่อเย็นด้วยฮีเลียมเหลวตลอดเวลาจึงจะทำงานได้ แม่เหล็กแบบนี้จะสร้างสนามแม่เหล็กที่เข้มกว่าแบบแม่เหล็กไฟฟ้าปกติมาก และความแรงสนามแม่เหล็กนี้เองที่เป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพของเครื่อง NMR โดยมักจะเปรียบเทียบกับตัวเลขสัญญาณความถี่ของโปรตอน เช่น เครื่อง 500 MHz, 200 MHz หรือ 60 MHz โดยถ้ายิ่งตัวเลขมาก ก็แสดงว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าทั้งในแง่ของความไว (sensitivity) และความละเอียดของการวัด (resolution) อย่างไรก็ตามราคาของเครื่องและค่าใช้จ่ายการดูแลรักษา ก็จะสูงตามไปด้วย เครื่องที่ใช้กันในห้องปฏิบัติการวิจัยทั่วไปปัจจุบันจะทำงานที่ความถี่ 200-500 MHz

ส่วนประกอบสำคัญอีกส่วนหนึ่งนอกจากแม่เหล็กก็คือตัวส่ง (radiofrequency generator) และตัวรับสัญญาณคลื่นวิทยุ (detector and amplifier) ซึ่งจะทำหน้าที่ส่งสัญญาณคลื่นวิทยุไปยังตัวอย่างและตรวจวัดสัญญาณที่ถูกดูดกลืน หรือปลดปล่อยออกมา ในยุคแรกการ

วัดสัญญาณ NMR จะทำในลักษณะที่เรียกว่าคลื่นต่อเนื่อง (continuous wave; CW) โดยเครื่องส่งสัญญาณคลื่นวิทยุจะต้องแปรความถี่ของคลื่นวิทยุที่ส่งผ่านเข้าไปในตัวอย่างไปเรื่อยๆ และตรวจวัดสัญญาณหลังจากผ่านตัวอย่างเปรียบเทียบกับสัญญาณที่ส่งเข้าไปที่ความถี่เดียวกัน หากความเข้มของสัญญาณลดลงก็แสดงว่ามีการดูดกลืนเกิดขึ้น ลักษณะการดูดกลืนก็จะเป็นพีค ซึ่งจะนำมาพล็อตเทียบกับความถี่คล้ายกับในกรณีของอินฟราเรดสเปกตรัม อย่างไรก็ตามการทำเช่นนี้จะกินเวลามาก และไม่ค่อยมีประสิทธิภาพนัก เครื่อง NMR สมัยใหม่จะใช้เทคนิคที่เรียกว่า Pulsed NMR ซึ่งจะเป็นการส่งสัญญาณคลื่นวิทยุที่ทุกความถี่ในช่วงที่สนใจเข้าไปยังตัวอย่างพร้อมๆ กัน ซึ่งจะทำให้เกิดการพลิกของสปินทั้งหมดอย่างทันทีทันใดเรียกว่าอยู่ในสถานะถูกกระตุ้น (excited state) จากนั้นนิวเคลียสก็จะกลับเข้าสู่สถานะเดิม (ground state) พร้อมทั้งปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปของคลื่นวิทยุ เฉพาะความถี่ที่เกิดการดูดกลืน ซึ่งอาจมีมากกว่า 1 ค่าก็ได้ ความถี่ของคลื่นที่ปลดปล่อยออกมาจะอยู่ในรูปของคลื่นที่ซ้อนกันที่เรียกว่าสัญญาณ FID (free induction decay) ซึ่งสามารถแยกออกเป็นแต่ละความถี่ โดยที่แต่ละความถี่ก็มีความเข้มของสัญญาณที่แตกต่างกันได้โดยกระบวนการทางคณิตศาสตร์ที่เรียกว่าฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม (Fourier transform) ดังนั้นเครื่อง NMR สมัยใหม่จึงมักเรียกว่า FT NMR การทำฟูเรียร์ทรานสฟอร์มจะต้องใช้การคำนวณที่ซับซ้อน คอมพิวเตอร์สำหรับเก็บข้อมูลและประมวลผลจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งสำหรับ FT NMR ในขณะที่อาจไม่ใช่สิ่งจำเป็นสำหรับ CW NMR ข้อดีประการสำคัญของ FT NMR คือสามารถเก็บสัญญาณ FID รวมกันหลายๆ ครั้ง แล้วนำมาทำฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเพียงครั้งเดียว ซึ่งจะทำให้ได้สัญญาณที่ชัดเจนขึ้น โดยเฉพาะกับสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยหรือเมื่อบันทึก NMR สเปกตรัมของนิวเคลียสที่มีปริมาณน้อยในธรรมชาติเช่น  $^{13}\text{C}$   $^{15}\text{N}$  เป็นต้น

ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.12 องค์ประกอบของเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี

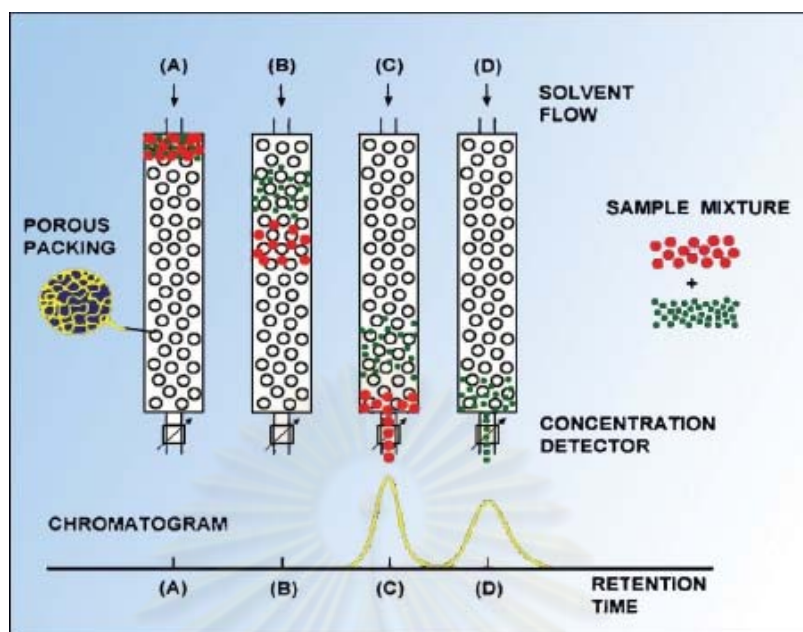
ที่มา <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/nuclear/nmr.html>

(Accessed 15 August 2010)

### 2.10.3 เจลเพอร์มิเอชันโครมาโตกราฟี (Gel permeation chromatography: GPC)

(แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2539)

เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อศึกษาการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ หรืออาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า size exclusion chromatography (SEC) แสดงองค์ประกอบของเครื่อง GPC ในรูปที่ 2.14 เป็นวิธีแยกและตรวจหาสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง คอลัมน์ที่ใช้บรรจุด้วยอนุภาคที่มีขนาดของรูพรุนต่างๆ กัน การเลือกขนาดของรูของตัว packing ขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของโมเลกุลของตัวถูกละลายที่ต้องการแยก มีบ่อยครั้งที่สารตัวอย่างที่ต้องการแยกประกอบด้วยตัวถูกละลายมีขนาดต่างๆ กัน (น้ำหนักโมเลกุลต่างกัน) และ packing มีรูขนาดเดียว จึงไม่สามารถแยกทุกตัวที่ละลายในสารตัวอย่งนั้นได้ เนื่องจากโมเลกุลบางตัวที่มีขนาดใหญ่กว่ารูของอนุภาคจะถูกชะออกไป และปรากฏออกมาเป็นพีคแรกและพีคเดียวในโครมาโตแกรม และพีคนี้จะมี retention volume เท่ากับ  $V_m$  ส่วนโมเลกุลตัวอื่นๆ ที่มีขนาดเล็กกว่ารูของอนุภาคก็จะแพร่ผ่านเข้าไปในอนุภาคและจะปรากฏออกมาที่ retention volume ต่างๆ กัน

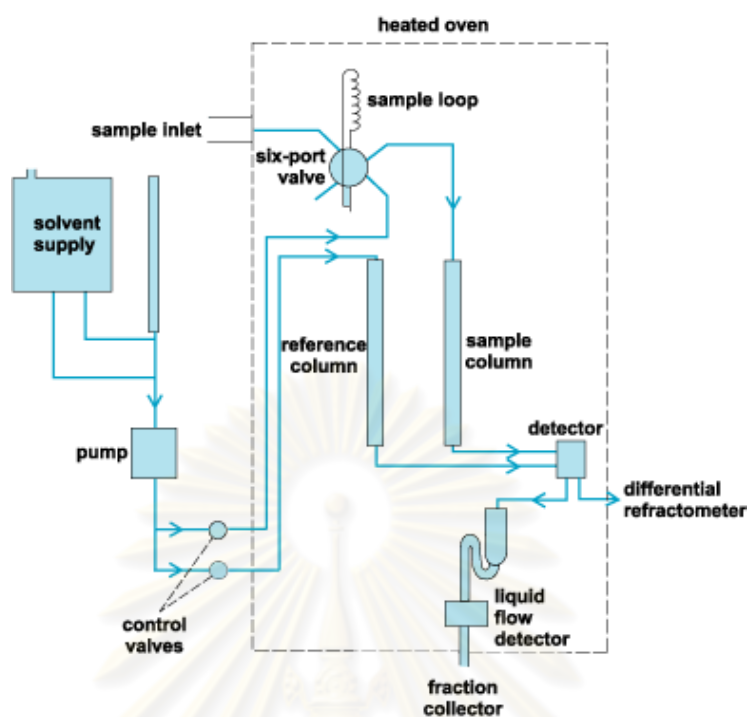


รูปที่ 2.13 กลไกการทำงานของ Gel permeation chromatography

ที่มา: <http://pharamcytimes.wordpress.com/category/instrumental-analysis-studies/chromatography/> (Accessed 15 August 2010)

GPC เป็นวิธีการแยกโดยอาศัยขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ การแยกเกิดขึ้นในคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่บรรจุเม็ด (bead) ของแข็งที่มีรูพรุนหรือเจล (gel) โดยทั่วไปมักใช้เม็ดพอลิสไตรีนที่ผ่านการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุล และมีรูพรุน หรือแก้วที่เป็นรูพรุน

ตัวอย่างของสารละลายพอลิเมอร์เจือจางจะถูกใส่ลงไปในคอลัมน์ และชะด้วยกระแสของตัวทำละลาย โมเลกุลพอลิเมอร์จะผ่านเม็ดรูพรุนและสามารถแพร่เข้าไปในรู ซึ่งลักษณะการแพร่ขึ้นกับขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์และขนาดของรูพรุน โมเลกุลขนาดต่าง ๆ จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ตามลำดับขนาด โมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนได้ จะผ่านคอลัมน์ออกมาก่อนเป็นอันดับแรก ส่วนโมเลกุลขนาดเล็กจะติดอยู่ในรูพรุนของเจลและใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นานกว่าและถูกชะออกมาภายหลัง ดังแสดงในรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.14 องค์ประกอบของเครื่องเจลเพอร์มิเอชันโครมาโตกราฟี  
 ที่มา: <http://www.answers.com/topic/gel-permeation-chromatography>  
 (Accessed 15 August 2010)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

##### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ถังหมักขนาด 5 ลิตรและชุดควบคุมถังหมัก รุ่น EPC-1000 ของบริษัท EYELA, Japan
2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaker) รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R ของบริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920, รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota, Japan และรุ่น Avanti J-30I ของบริษัท Beckman Coulter, Germany
4. เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
5. เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น AG 204 และรุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic, USA และรุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer ของบริษัท PerkinElmer, Inc., USA
7. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอน (Total organic carbon analyzer) รุ่น TOC V-csh ของบริษัท Shimadzu
8. เครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC) รุ่น CLASS-VP V6.14 ของบริษัท Shimadzu
9. เครื่องวิเคราะห์ Nuclear magnetic resonance analyzer ของบริษัท Varian Inova, USA
10. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
11. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus, Japan
12. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ของบริษัท Olympus, Japan

13. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow ISSCO รุ่น BV-124 ของบริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clear รุ่น V3-4 ของบริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S ของบริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
14. ตู้อบแห้ง (hot air oven) ของบริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
15. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko Ltd., Japan รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama Co., Ltd., Japan
16. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น SevenEasy ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
17. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น INE 500 ของบริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
18. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 ของบริษัท PMC, USA
19. เครื่องให้ความร้อน (stirring hot plate) รุ่น DS 201HS ของบริษัท DMC, Japan
20. ถังน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB14 และรุ่น W760 ของบริษัท Memmert, Germany
21. เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น 3400C ของบริษัท Varian, USA
22. แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด cabowax-PEG ขนาด 60 m×25 mm ID×25  $\mu$ m Df
23. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของบริษัท Forma Scientific, USA และ Sanyo Electric, Japan
24. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
25. ตู้เย็น (freezer) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท Mitsubishi Electric, Japan
26. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) รุ่น P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France
27. ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane) ขนาด 0.45  $\mu$ m ของบริษัท Sartorius, Germany
28. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ 2 ของบริษัท Whatman International Ltd., England
29. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) จัดจำหน่ายโดยบริษัท Bioadvance, Thailand
30. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX



31. หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX
32. กระบอกตวง (Cylinder) ของบริษัท PYREX
33. ปีกเกอร์ (Beaker) ของบริษัท PYREX
34. หลอดทดลองฝาเกลียว (screw-cap tube) ของบริษัท PYREX
35. กระบอกเหวี่ยง (centrifuge ware) ของบริษัท Nalgene

### 3.2 เคมีภัณฑ์

1. ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ของบริษัท Witcorp Co.Ltd., Thailand
2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น ( $H_2SO_4$ ) ของบริษัท Merck, Germany
3. กรดเบนโซอิก ( $C_7H_6O_2$ ) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan
4. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
5. กลีเซอรอล ( $C_3H_8O_3$ ) ของบริษัท Merck, Germany
6. คลอโรฟอร์ม ( $CHCl_3$ ) ของบริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Ireland
7. คอปเปอร์ไดคลอไรด์ไดไฮเดรต ( $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ) ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
8. แคลเซียมคลอไรด์ ( $CaCl_2$ ) ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
9. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ของบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
10. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
11. โซเดียมซิเตรท ( $C_6H_5Na_3O_7$ ) ของบริษัท Merck, Germany
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
13. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $Na_2HPO_4$ ) ของบริษัท Merck, Germany
14. ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) ของบริษัท Merck, Germany
15. ทริปโตส (tryptose) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
16. เปปโตน (peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
17. โพแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Merck, Germany
18. โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) ของบริษัท Merck, Germany
19. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ของบริษัท Merck, Germany
20. เมทานอล ( $CH_3OH$ ) ของบริษัท Merck, Germany
21. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ของบริษัท Merck, Germany

22. แมงกานีสไดคลอไรด์เตตระไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Merck, Germany
23. ภู่นผง (agar) ของบริษัท บิกเบน โปรดักตอรา เดอ อะการ์ เอส.เอ., Chile
24. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Ireland
25. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Springer, France
26. อะซีโตน ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ) ของบริษัท Merck, Germany
27. เอทานอล ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) ของบริษัท Merck, Germany
28. แอมโมเนียมซัลเฟต [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] ของบริษัท Merck, Germany
29. เฮกเซน ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) ของบริษัท Merck, Germany
30. Sudan Black B ของบริษัท Merck, Germany
31. Nystatin ( $\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{NO}_{17}$ ) ของบริษัท MP Biomedicals, France
32. Nile Blue A ของบริษัท Sigma, USA
33. กรดออกตะโนอิก ( $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$ ) ของบริษัท Merck, Germany
34. กรดเดคะโนอิก ( $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$ ) ของบริษัท Merck, Germany
35. ก๊าซไฮโดรเจน ( $\text{H}_2$ ) ของบริษัท PRAXAIR, Thailand
36. ก๊าซออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) ของบริษัท TIG (Thai Industrial Gas), Thailand
37. ก๊าซไนโตรเจน ( $\text{N}_2$ ) ของบริษัท PRAXAIR, Thailand

หมายเหตุ: สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

### 3.3. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยคือ *Acinetobacter* sp. ASC1, *Pseudomonas* sp. ASC2, *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกโดย อัมทิกา เมืองวงษ์ มีความสามารถในการสร้างและสะสมพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (PHA) ซึ่งคัดแยกมาจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันพืชที่ใช้แล้วในจังหวัดสุพรรณบุรี

### 3.4 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

#### 3.4.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

เชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเชี่ยเชื้อลาก (streak) บนอาหารแข็งเอียง LB (ภาคผนวก ก)  
 1) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  
 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ และถ่ายลงในอาหารใหม่ทุกๆ 1 เดือน

#### 3.4.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (ภาคผนวก ก2) นำไปเลี้ยงในตู้  
 บ่มควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง  
 หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ  
 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์  
 เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข4) จากนั้นปั่นแยกเซลล์และทำซ้ำอีกรอบ กระจายเซลล์ใน  
 กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข1) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโน  
 เมตร และปรับให้อยู่ในช่วง 0.8-1.0 (จำนวน  $10^9$  CFUต่อมิลลิลิตร) บรรจุลงในหลอดเยือกแข็ง  
 (cryotube) ที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน หรือเก็บที่  
 อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

### 3.5 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs โดยใช้ของเสียจากการผลิตไบโอดีเซลที่ ผลิตจากน้ำมันพืชใช้แล้ว

#### 3.5.1 การเก็บตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่ปนเปื้อนน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว บันทึกวันและเวลาที่เก็บ  
 นำตัวอย่างมาแยกเชื้อทันที หรือเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าดำเนินการ  
 แยกเชื้อ

### 3.5.2 การเก็บตัวอย่างของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

เก็บตัวอย่างของเสียอินทรีย์จากโรงงานผลิตไบโอดีเซลซึ่งผลิตมาจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วของบริษัท วิทย์คอร์ป จำกัด มหาชน ตั้งอยู่เลขที่ 52/4 หมู่ 6 ซอยสุขชัย ถนนพระราม 2 ตำบลท่าทราย อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์สำหรับคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย และเป็นแหล่งคาร์บอนให้แบคทีเรียในการผลิต PHA ต่อไป

### 3.5.3 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs โดยใช้ของเสียที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

นำตัวอย่างดิน 10 กรัม เติมลงในอาหารสังเคราะห์ (Chanprateep และคณะ, 2008) โดยมีของเสียอินทรีย์ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับค่าความเป็นกรด ต่างเท่ากับ 7 ซึ่งบรรจุปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร โดยเติม Nystatin ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาคผนวก ข7) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอาหารเริ่มขุ่น ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารสังเคราะห์สูตรเดิมทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นกระจายเชื้อบนอาหารแข็งสูตรเดียวกัน แยกโคโลนีเดี่ยวและทำให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ นำเชื้อที่บริสุทธิ์มาย้อมด้วย Sudan Black B และ Nile Blue A ตามวิธีข้อ 3.5.4 เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นว่าแบคทีเรีนั้นสามารถผลิต PHAs ได้หรือไม่ จากการย้อมแกรนูล PHAs แบคทีเรียที่มีแกรนูล PHAs จะถูกนำมาศึกษาต่อไป และเก็บรักษาแบคทีเรียโดยการเตรียมหัวเชื้อใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำเป็นหัวเชื้อตามข้อ 3.4.1 และ 3.4.2

### 3.5.4 การย้อมแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ด้วย Sudan Black B และ Nile Blue A ตามวิธีของ Jenkins และคณะ (1993) และ Song และคณะ (2008) ตามลำดับ

นำแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วมากระจายตัวบนสไลด์ ย้อมด้วย Sudan Black B (ภาคผนวก ข4) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ย้อมด้วย Safranin เป็นเวลา 5-10

วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้ามี PHAs ซึ่งสะสมอยู่ในรูปของแกรนูล แกรนูลจะติดสีเทาดำและอยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย

การย้อมด้วย Nile blue A นำแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วมากระจายตัวบนสไลด์ ย้อมด้วย Nile blue A (ภาคผนวก ข5) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ นำไปตรวจสอบแกรนูลภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ถ้ามี PHAs ซึ่งสะสมในรูปของแกรนูลภายในเซลล์จุลินทรีย์ แกรนูลจะมีสีแดงหรือสีส้ม

### 3.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทางอนุกรมวิธาน

#### 3.6.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.3 บนอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิต PHA (ภาคผนวก ก3) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีและการเจริญบนอาหาร ศึกษารูปร่างและลักษณะการย้อมติดสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

#### 3.6.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา หรือการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น (Physiological characteristic and Biochemical test)

แปรผลการทดสอบต่างๆ โดยการอ้างอิงกับคู่มือการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรีย Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974)

เตรียมแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชั่วโมง เชื้อโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหารต่างๆ และทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ ศึกษาการเจริญบนอาหารแข็ง McConky ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ความสามารถในการหมักน้ำตาล ความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) ความสามารถในการผลิต Indole (Indole test) การทดสอบ Methyl Red-Vogesprokauer tests (MR-VP test) การทดสอบการใช้ซิเตรต (citrate utilization test) การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI) reaction ความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ( $H_2S$ )

ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Lysine decarboxylase Lysine deaminase และ Ornithine decarboxylase และทดสอบความสามารถในการผลิตยูเรียเอส (Urease test)

### 3.6.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA (16S rRNA)

นำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้ของเสียอินทรีย์ที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซล และสะสมแกรนูล PHA ภายในเซลล์จากข้อ 3.5.4 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA โดยนำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เก็บในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยใช้ไพรเมอร์คือ 518F และ 800R เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของซีเอ็นดีเอ็นเอแล้ว เชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac Software Version 2.05 (Hitachi Software Engineering Co.Ltd., Yokohama, Japan) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

### 3.6.4 ต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ ทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X จากนั้นนำข้อมูลผ่านการปรับแนว มาคำนวณ distance matrix สร้าง phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining และ Bootstrap ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package version 3.752c ซึ่งประกอบด้วย PRODIST.EXE NEIGHBOR.EXE SEQBOOT.EXE และ CONSENSE.EXE ตามลำดับ ต้นไม้วิวัฒนาการที่ถูกสร้างขึ้น นำเสนอโดยใช้โปรแกรม TREEVIEW (Kimura,1980)

### 3.7 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากของเสียที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลในระดับขวดเขย่า

#### 3.7.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเตรียมกล้าเชื้อ (Chanprateep และคณะ, 2008) โดยใช้อาหารเตรียมกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาดปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อที่เก็บรักษาในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ (จำนวน  $10^9$  CFUต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อ 1 ฟลาस्क เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บตะกอนเซลล์มาล้างด้วยสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ที่ปราศจากเชื้อ ทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง จากนั้นกระจายเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเพื่อเตรียมสำหรับการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า

#### 3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

นำของเสียอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลประมาณ 10 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Total organic carbon analyzer (TOC analyzer) ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 3.7.3 การผลิตในระดับขวดเขย่า

3.7.3.1 ศึกษาหาปริมาณของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHAs ของแบคทีเรียในระดับขวดเขย่าตามวิธีของ Chanprateep และคณะ (2008)

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.7.1 ถ่ายลงสู่อาหารเพื่อการผลิตปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด ต่างเท่ากับ 7 บรรจุในฟลาस्कขนาดปริมาตร 500 มิลลิลิตร แปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนคือ ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่เติมลงใน

อาหารเพื่อการผลิตดังนี้ 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนดังนี้ 4 20 80 และ 200 ทั้งนี้ต้องวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดในของเสียอินทรีย์ (Total Organic Carbon; TOC) เพื่อใช้คำนวณอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักรเซลล์แห้งตามข้อ 3.7.3.3 ปริมาณไนโตรเจนตามข้อ 3.7.3.5 ปริมาณของคาร์บอนในของเสียอินทรีย์ที่เหลืออยู่ตามข้อ 3.7.3.4 และองค์ประกอบของ PHAs ตามขั้นตอนในข้อ 3.8.1 ต่อไป

3.7.3.2 ศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.7.1 ถ่ายลงอาหารเพื่อการผลิตปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด ต่างเท่ากับ 7 บรรจุใน ฟลasks ขนาดปริมาตร 500 มิลลิลิตร แหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 200 เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักรเซลล์แห้งตามข้อ 3.7.3.3 ปริมาณไนโตรเจนตามข้อ 3.7.3.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามข้อ 3.7.3.6 และองค์ประกอบของ PHAs ตามขั้นตอนในข้อ 3.8.1 ต่อไป

3.7.3.2 วิเคราะห์น้ำหนักรเซลล์แห้ง

อบเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสขนาด 0.45 ไมโครเมตร จนได้น้ำหนักคงที่ กรองน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บไว้ในเดซิเคเตอร์จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาน้ำหนักรเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.7.3.3 วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนที่เหลือทั้งหมดในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง TOC analyzer ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 3.7.3.4 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนตามวิธีของ Kempers (1974)

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำน้ำหมักที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมฟีนอลไนโตรพัสไฮดรอกไซด์ 2 มิลลิลิตร เติมบัพเฟอร์ไฮโปคลอไรต์เอเจนต์ 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร คำนวณปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

### 3.7.4 การผลิตในระดับถังหมัก

นำภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ คือมีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 เลี้ยงในถังหมัก EYELA รุ่น EPC-1000 ขนาด 5 ลิตร เลี้ยงเชื้อแบบแบบแบตช์ (batch) เตรียมกล้าเชื้อตามข้อ 3.7.1 ถ่ายลงสู่อาหารเพื่อการผลิตปริมาตร 2.5 ลิตร อัตราเร็วในการกวน 600 รอบต่อนาที มีอัตราการให้อากาศ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าความเป็นกรด ต่าง เริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

## 3.8 ศึกษาการผลิต PHAs โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

### 3.8.1 ศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.7.1 ถ่ายลงอาหารเพื่อการผลิตปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด ต่างเท่ากับ 7 บรรจุในพลาสติกขนาดปริมาตร 500 มิลลิลิตร แหล่งคาร์บอนคือน้ำตาลกลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต อัตราส่วนคาร์บอน

ต่อไนโตรเจน 200 เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งตามข้อ 3.7.3.2 ปริมาณไนโตรเจนตามข้อ 3.7.3.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามข้อ 3.8.2 และองค์ประกอบของ PHAs ตามขั้นตอนในข้อ 3.9.1 ต่อไป

### 3.8.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Bernfeld (1995)

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรอยู่ในช่วง 0.2 ถึง 0.8 จากนั้นใช้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid หรือ DNSA reagent, ภาคผนวก ข13) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค1) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

## 3.9 วิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของ PHAs ที่ผลิตได้

3.9.1 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography: GC) ตามวิธีของ Comeau และคณะ (1988)

แยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก โดยการปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 20 มิลลิกรัม ใส่เซลล์แห้งที่ชั่งแล้วลงในหลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 3 เปอร์เซนต์ กรดซัลฟูริกในเมทานอล 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิก 2 กรัมต่อลิตรเป็นสารมาตรฐานภายใน ปิดฝาเกลียวให้แน่น นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เขย่าด้วยเครื่องเขย่าอย่างรุนแรงทุก 30 นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเขย่าผสมให้เข้ากันนาน 5 นาที ทิ้งให้สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น เลือกเก็บชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของคลอโรฟอร์มและเก็บในขวดฝาเกลียวขนาดเล็ก ปิดฝาให้แน่น วิเคราะห์ปริมาณ PHA โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟีโดยใช้ภาวะการวิเคราะห์และการคำนวณตามวิธีของสุชาติ จันทรประทีป (2539) ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG ขนาด 60 m×25 mm ID× 25 $\mu$ m Df
อุณหภูมิของ injector	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของ column	: 130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ detector (FID)	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
split ratio	: 50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: He อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรฉีด	: 1 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์ โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารมาตรฐาน

การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ PHA (กรัมต่อลิตร) ปริมาณปริมาณโมโนเมอร์ (ที่มีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน (ภาคผนวก ค2 และ ค3)

### 3.9.2 การสกัด PHA จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์

ใช้วิธีของ Doi และคณะ (1995) โดยปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ทั้งหมดไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะแห้ง จากนั้นบรรจุเซลล์แห้งลงในถุงกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 เย็บปิดด้วยด้ายทุกด้านให้สนิท นำไปใส่ขวดที่มีฝาปิดสนิท และสกัดพอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเทใส่ภาชนะตั้งทิ้งไว้ที่ตู้ระเหยสารเคมีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อระเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมด จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์ม นำมาทำให้บริสุทธิ์อีกรอบ โดยละลายแผ่นฟิล์มที่ได้ในคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนเป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้ง นำมาตกตะกอนในเฮกเซน ปริมาตร 4 เท่า ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บพอลิเมอร์ที่ตกตะกอนในเฮกเซนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นผงสีขาวไว้ในเดซิเตเตอร์

### 3.9.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิเมอร์ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

นำพอลิเมอร์ที่บริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 3.9.2 มาละลายด้วย  $\text{CDCl}_3$  วิเคราะห์โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ( $^1\text{H-NMR}$ ) และคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) spectra ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometer) ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิเคราะห์ Two dimension- $^1\text{H}$ -correlation spectroscopy (2D- $^1\text{H}$ -COSY) ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ความถี่ 400 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.10 ทดสอบสมบัติทางกายภาพของ PHAs

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารผลิตภัณฑ์ตามวิธีของ Abate และคณะ (1995)

ละลายพอลิเมอร์ในคลอโรฟอร์มชนิดเกรด HPLC เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ กรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography รุ่น Shimadzu CLASS-VP V6.14 ที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้คอลัมน์ Water Styragel HT 6E มีตัวพาเป็นคลอโรฟอร์ม อัตราการชะที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพอลิสไตรีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 96,400 ถึง 456 ดาลตัน (Da) ซึ่งวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs โดยใช้ของเสียจากการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชใช้แล้ว

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

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

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของกลีเซอรอลใส

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

ที่มา: บริษัท วิทย์คอร์ป จำกัด มหาชน

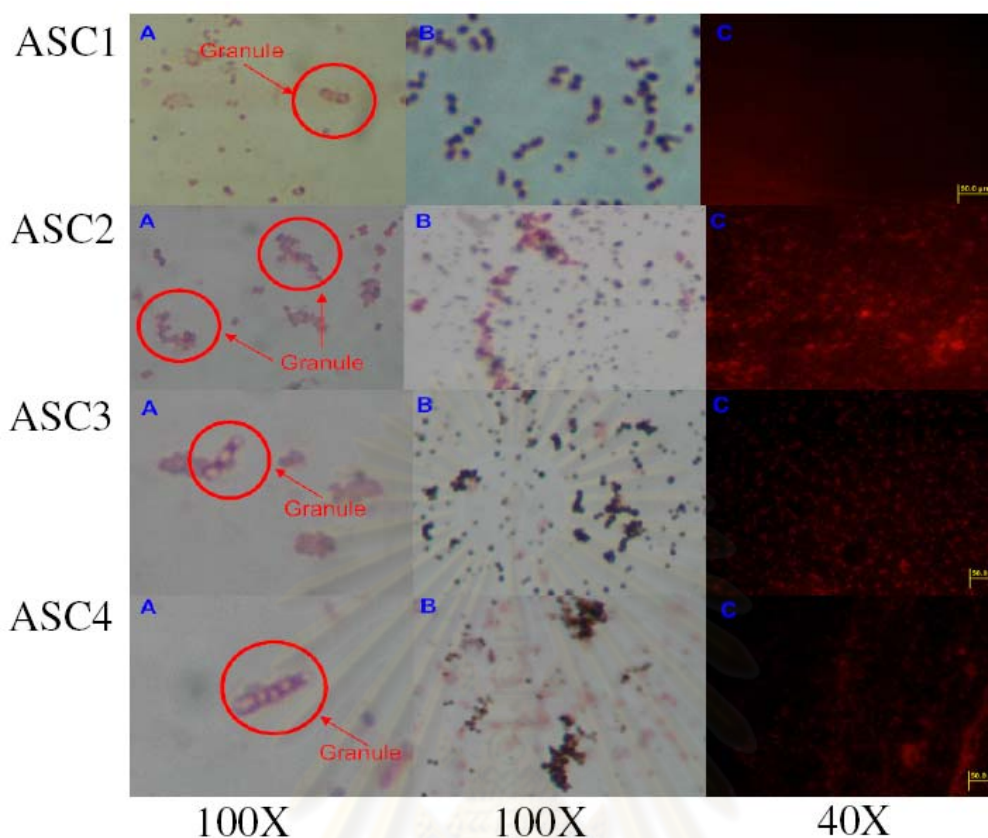
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 โรงงานการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วของบริษัทวิทยาคอร์ป จำกัด มหาชน



รูปที่ 4.2 ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตมาจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วของบริษัทวิทยาคอร์ป จำกัด มหาชน



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

## 4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

### 4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

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

4.2



ตารางที่ 4.2 ลักษณะของโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4

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

#### 4.2.2 การศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น (Physiological characteristic and Biochemical test)

เมื่อศึกษาลักษณะทางชีวเคมี เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่เรียโดยทดสอบเลี้ยงบนอาหารแข็ง MacConkey พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC3 ชนิดเดียวที่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโทสในอาหารได้ จึงมีโคโลนีสีชมพู และมีลักษณะเป็นเมือกเยิ้ม

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

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4

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

หมายเหตุ: (+) สามารถใช้ได้ เจริญได้ หรือ เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ

(-) ไม่สามารถใช้ได้ ไม่เจริญ หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับการทดสอบ

A/A สร้างกรดและก๊าซ

K/A สร้างเบสและก๊าซ

K/K ไม่หมักน้ำตาล

#### 4.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal RNA (16S rRNA)

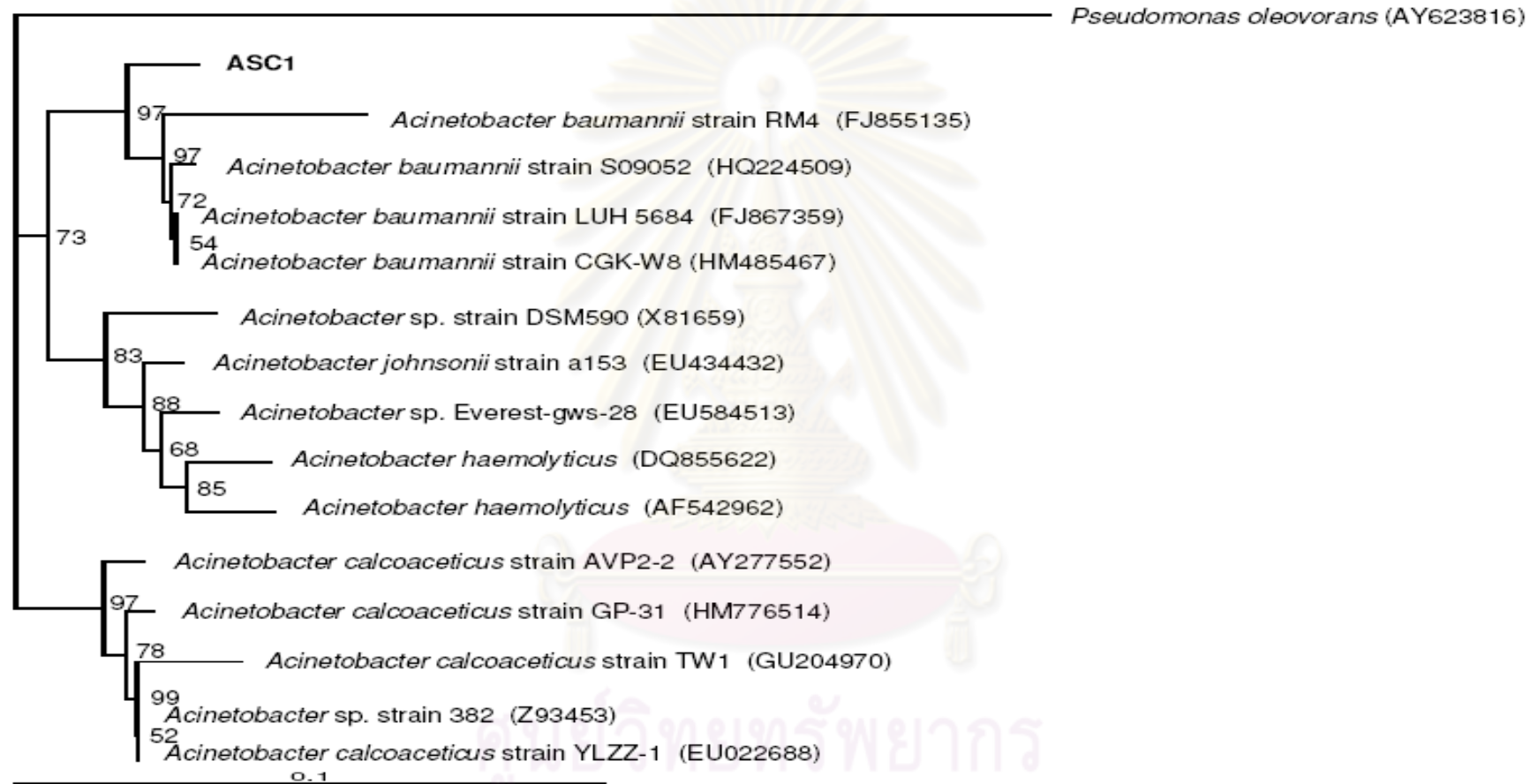
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ตามวิธีในข้อ 3.6.3 ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4 มีความยาว 1,536 1,465 1,453 และ 1,503 bp ตามลำดับ (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์แสดงในภาคผนวก ง) เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล

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

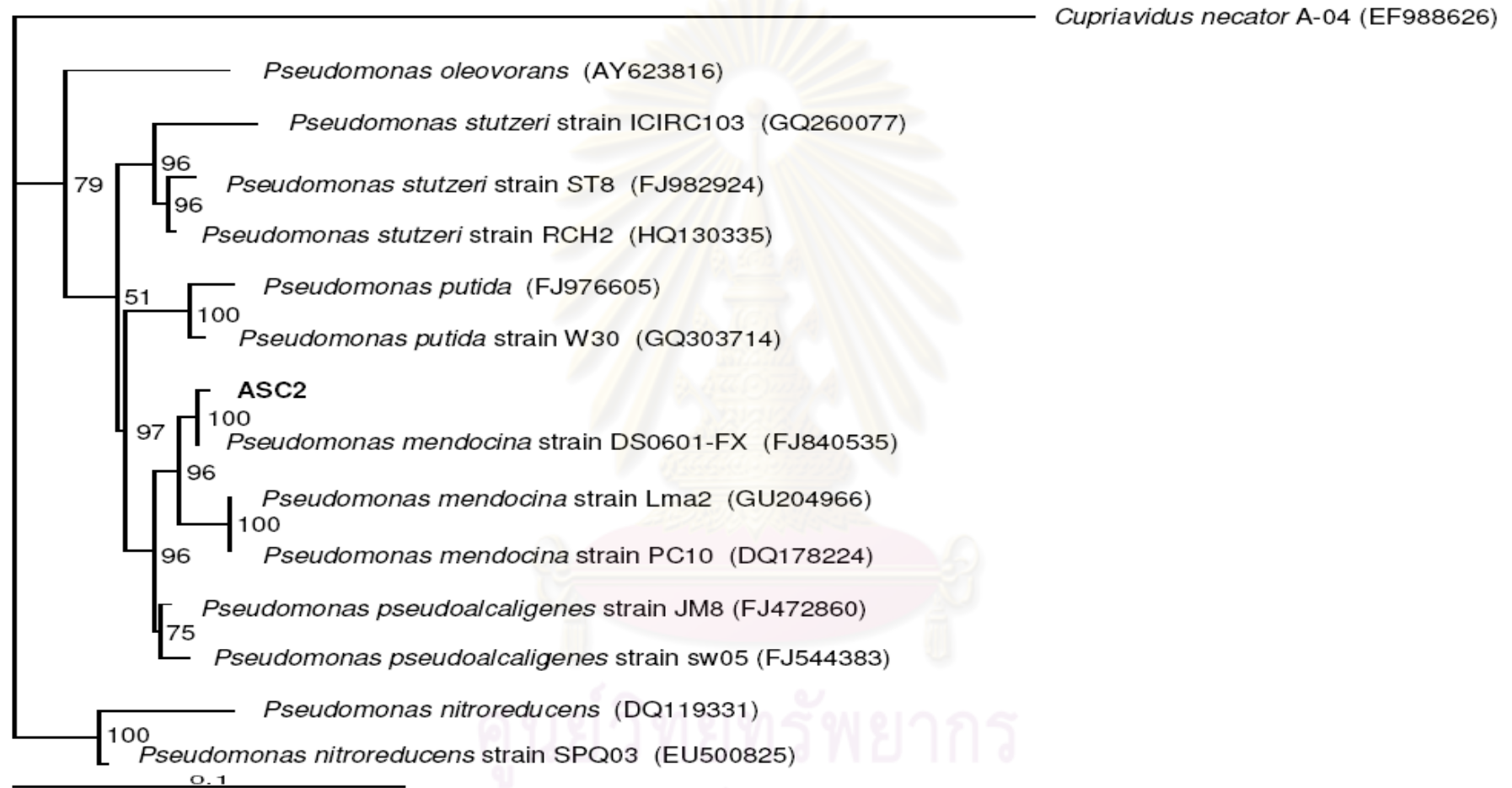
#### 4.2.4 ต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

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

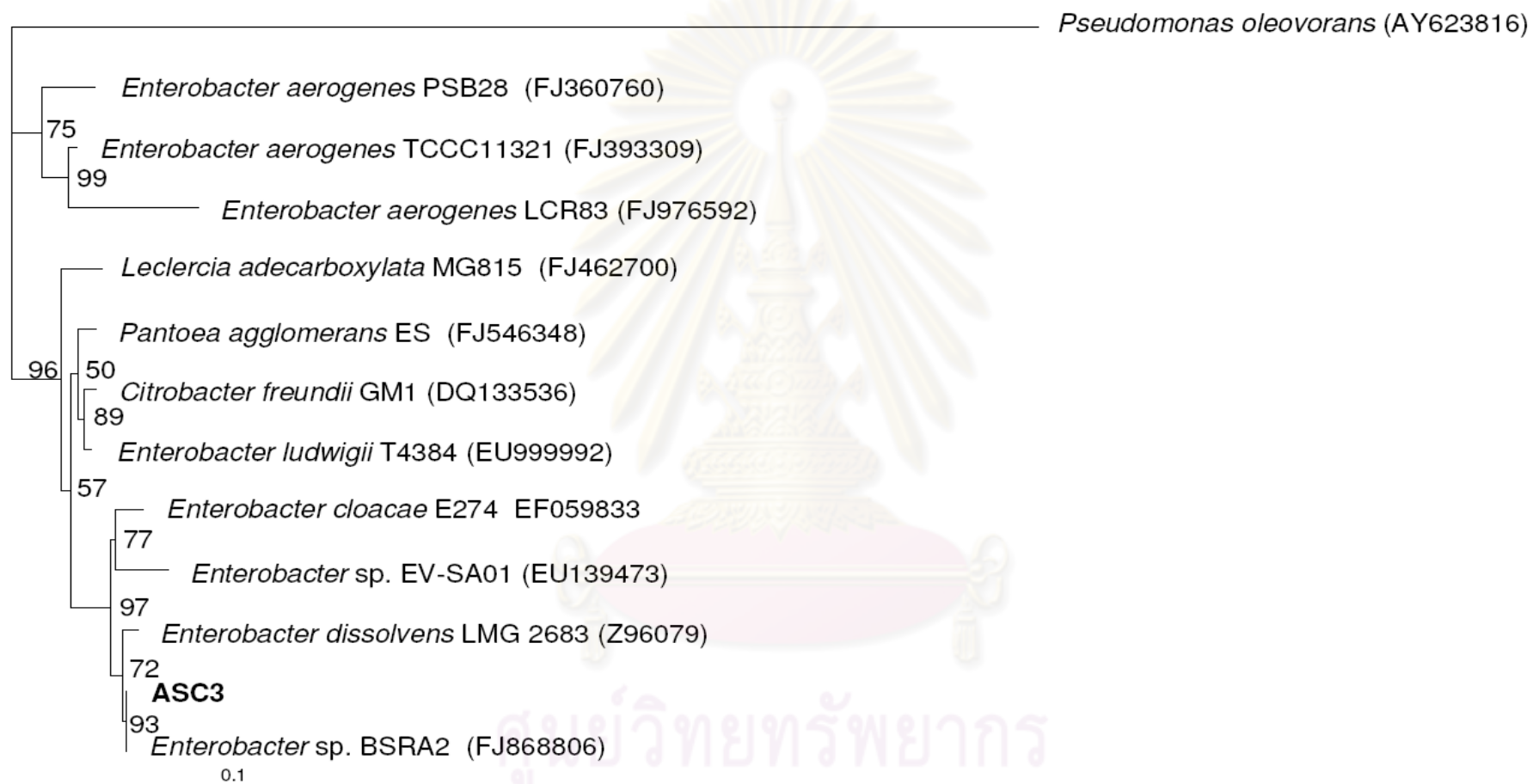
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



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



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



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



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

#### 4.3 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากของเสียที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลในระดับขวดเขย่า

ศึกษาหาปริมาณของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHAs ของแบคทีเรียในระดับขวดเขย่าตามวิธีของ Chanprateep และคณะ (2008)

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

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

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

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



PHAs หน่วยกรัมต่อลิตร พบว่าในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 *Acinetobacter* sp. ASC1 มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดโดยมีน้ำหนักชีวมวลสุทธิเท่ากับ 23.57 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 12 จากการศึกษาคาดว่าปริมาณคาร์บอนและปริมาณไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่าในอาหารเพื่อการผลิตเมื่อมีไนโตรเจนในปริมาณที่มากขึ้นแบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อปริมาณของเสียอินทรีย์เพิ่มมากขึ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลับลดลงสาเหตุเนื่องมาจากในของเสียอินทรีย์มีปริมาณสารพิษจำนวนมากซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

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

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

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

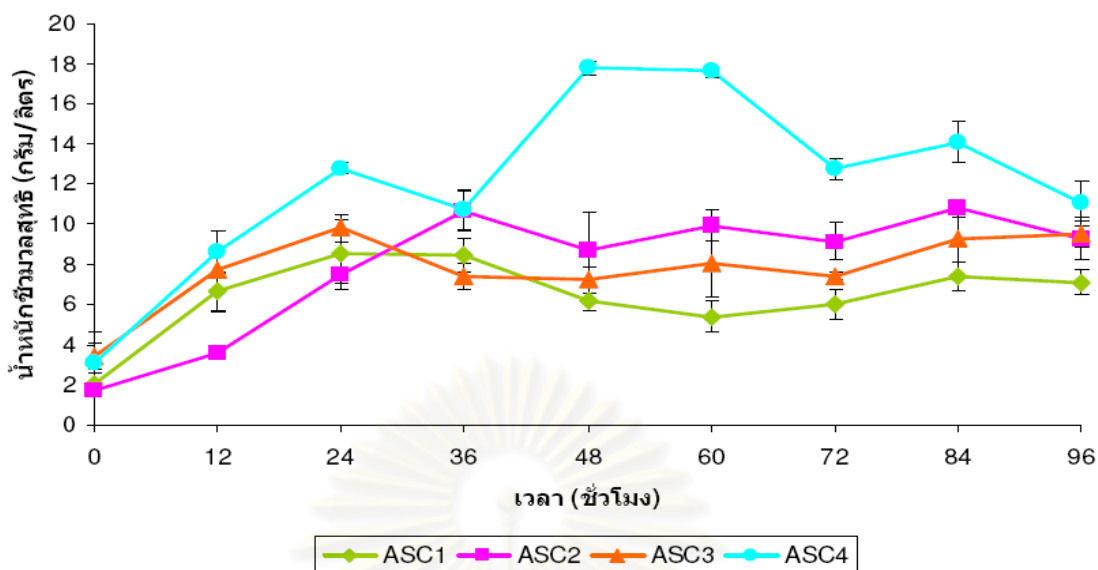
การผลิต PHAs ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตโดยมีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมงเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง นำเซลล์แห้งมาสกัดตามข้อ 3.8.1 พบว่าเมื่อเลี้ยงในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ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

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

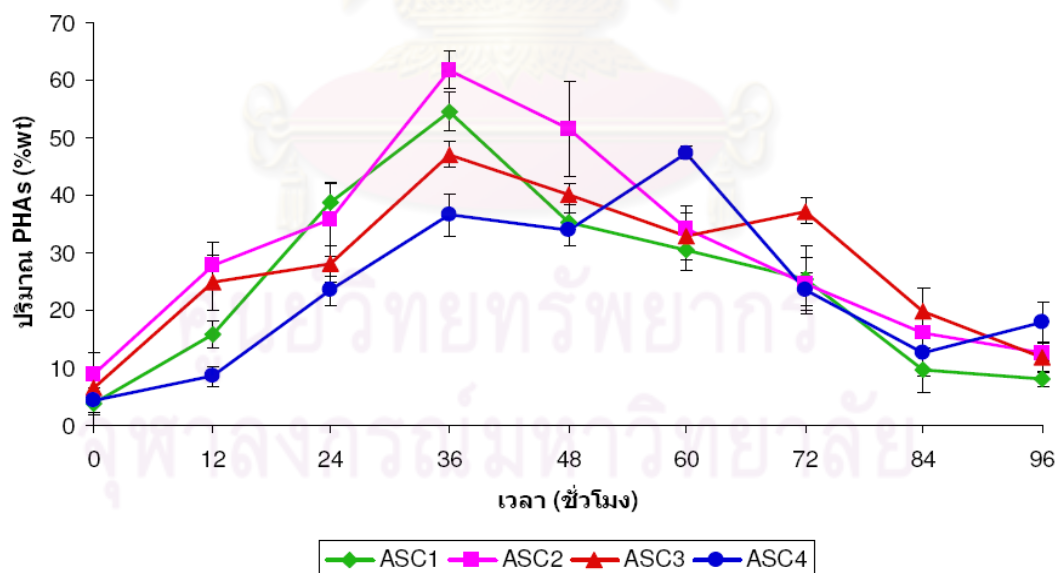
ได้ในปริมาณมาก จากการทดลองเมื่อเพิ่มปริมาณของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลแบบที่เรียกทั้ง 4 สายพันธุ์มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นขึ้นอยู่กับปริมาณของแหล่งไนโตรเจนด้วย เช่นเดียวกับปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลอาจเนื่องมาจากในของเสียอินทรีย์มีปริมาณสารเคมีที่เป็นพิษกับจุลินทรีย์ในปริมาณมากจึงทำให้การผลิต PHAs ลดลง

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

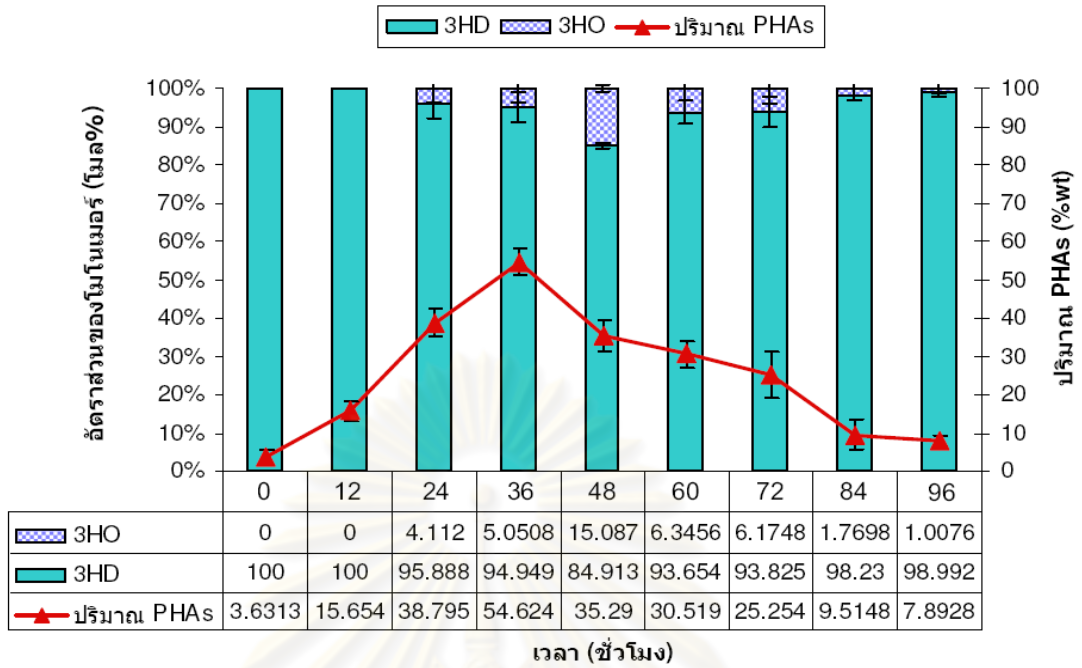
สภาวะ	ปริมาณ PHAs (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง)			
	ASC1	ASC2	ASC3	ASC4
คาร์บอน 5 กรัมต่อลิตร C/N 200	15.63 (36 h)	22.44 (72 h)	18.46 (84h)	33.49 (60h)
คาร์บอน 10 กรัมต่อลิตร C/N 4	30.21 (48 h)	27.72 (48 h)	33.01 (60 h)	32.42 (36 h)
C/N 20	25.41 (60h)	28.15 (48h)	33.73 (60 h)	33.94 (48h)
C/N 80	29.79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



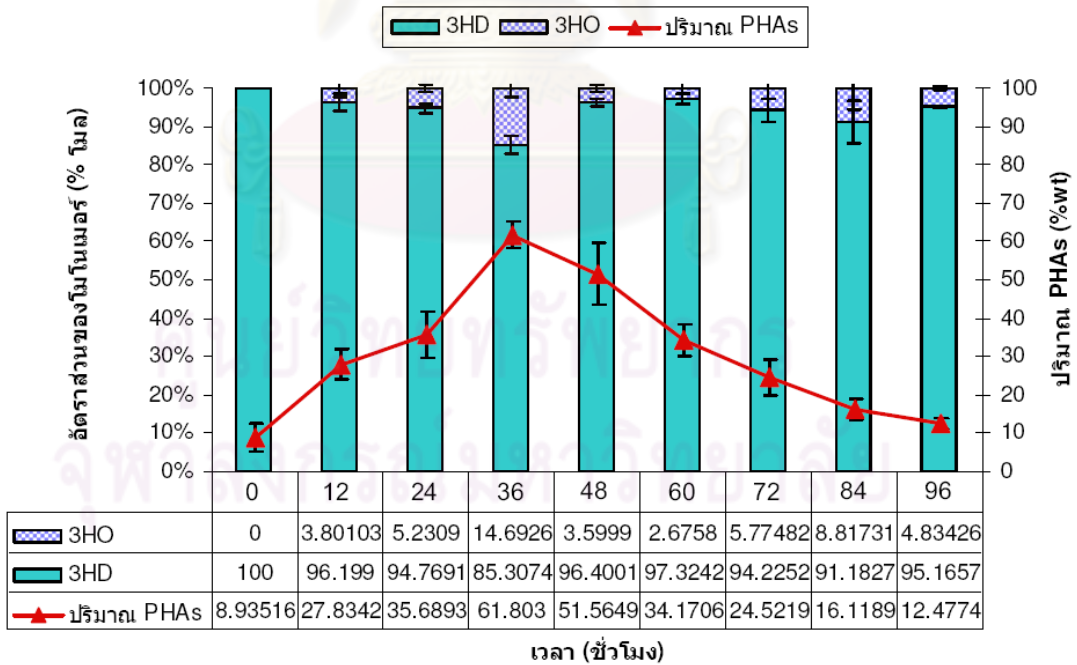
รูปที่ 4.8 ปริมาณน้ำหนักรวมของจุลินทรีย์ (กรัมต่อลิตร) ของ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA ที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล 10 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ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



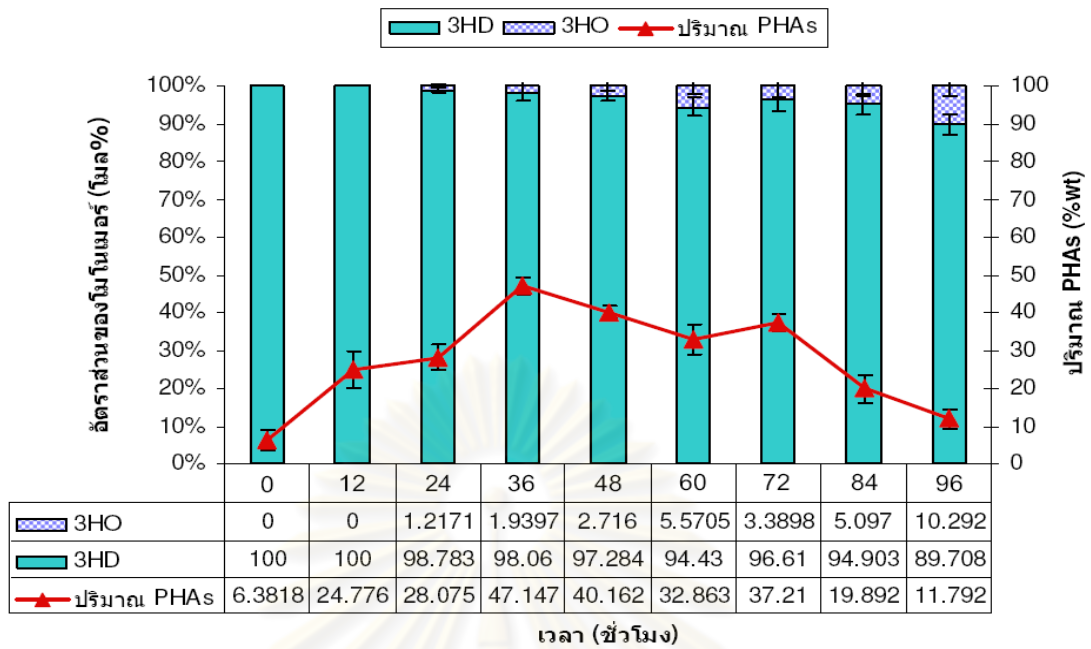
รูปที่ 4.9 ปริมาณ PHAs (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 ผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHAs ที่มีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล 10 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200



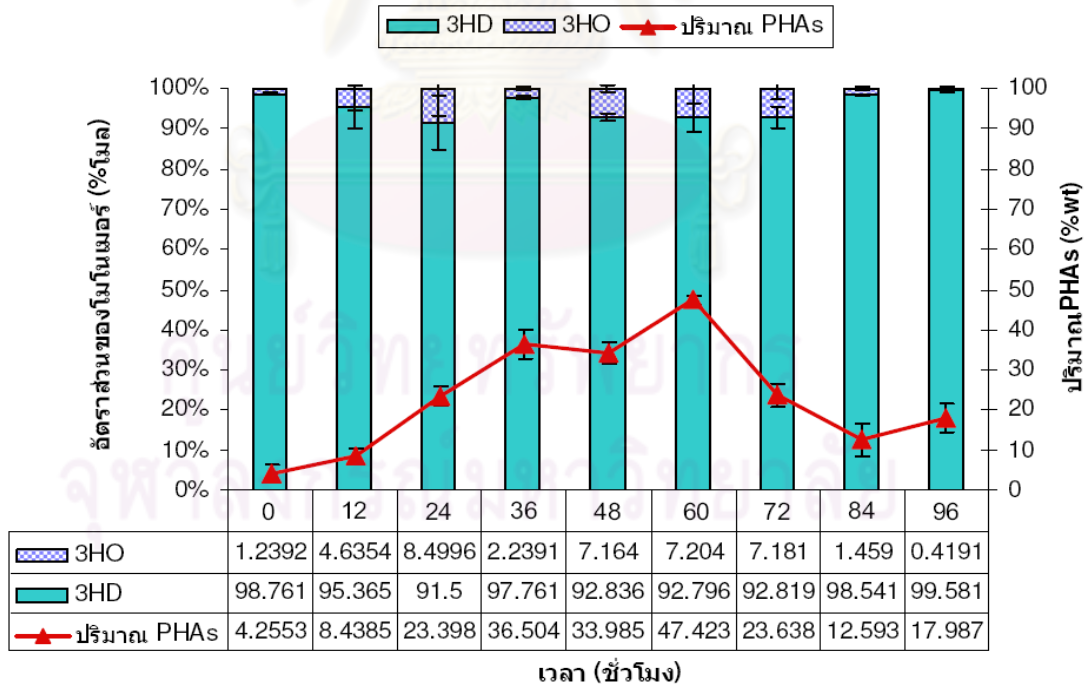
รูปที่ 4.10 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ *Acinetobacter* sp. ASC1 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200



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



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



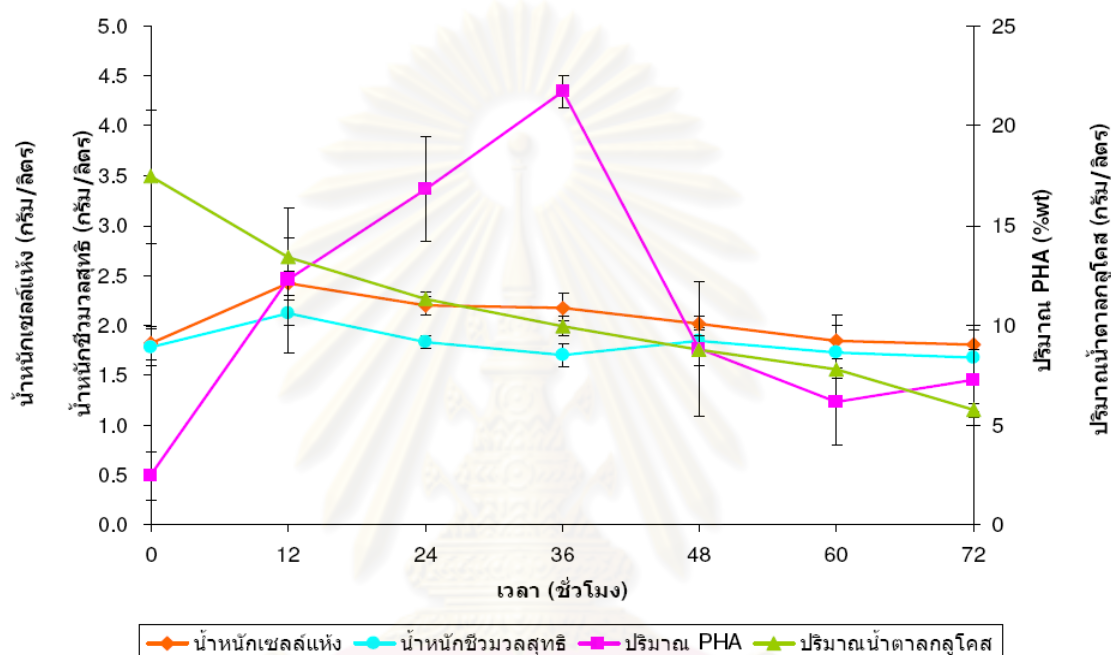
รูปที่ 4.13 สัดส่วนของโมโนเมอร์ 3HO และ 3HD ที่ *Bacillus* sp. ASC4 ผลิตได้ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200

#### 4.4 ศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนของเสียอินทรีย์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอน

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

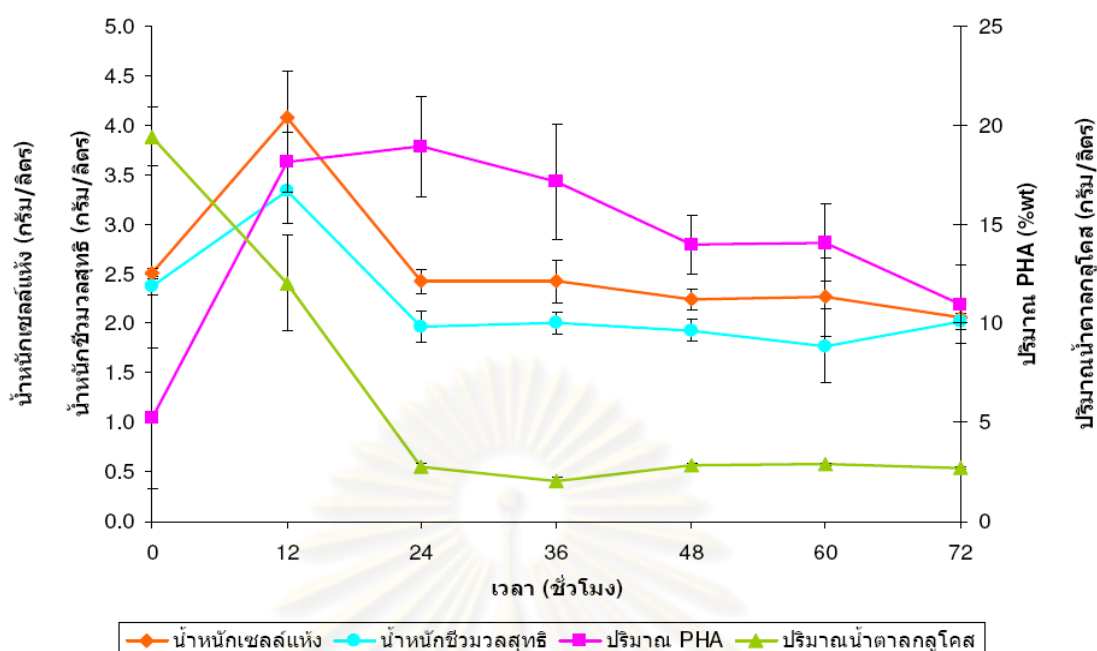
นำ *Pseudomonas* sp. ASC2 และ *Bacillus* sp. ASC4 มาเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาทุกๆ 12 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณ PHAs ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟีตามข้อ 3.8.1 และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงตามวิธีของ Bernfeld (1995) ในการวิเคราะห์ปริมาณ PHAs ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟี พบว่าพอลิเมอร์ที่ได้เป็นโฮโมพอลิเมอร์ซึ่งคล้ายคลึงกับพอลิเมอร์ที่ได้จากการใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรียในการผลิต PHAs เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟีพบว่าเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของพอลิเมอร์ที่ได้จากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีหนึ่งช่วงเวลาที่ขึ้นช่วงเดียวกับพอลิเมอร์ที่ได้จากการใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน พอลิเมอร์นั้นคือ 3HD จากการวิเคราะห์พบว่า *Pseudomonas* sp. ASC2 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.42 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 น้ำหนักชีวมวลสุทธิสูงสุดเท่ากับ 2.12 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 ปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 21.73 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งใน

ชั่วโมงที่ 36 และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 5.73 กรัมต่อลิตร แสดงในรูปที่ 4.14 ส่วน *Bacillus* sp. ASC4 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.08 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 ปริมาณน้ำหนักรวมของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3.34 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 ปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 18.90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 24 และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 2.07 กรัมต่อลิตร แสดงในรูปที่ 4.15



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



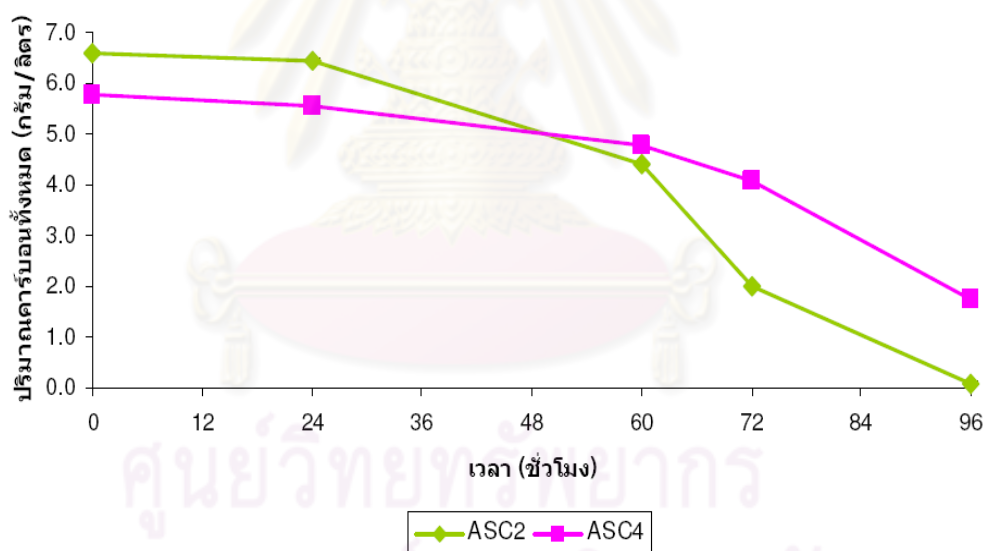


รูปที่ 4.15 ปริมาณน้ำหนักเซลลแห้ง (กรัมต่อลิตร) ปริมาณน้ำหนักชีวมวลสุทธิ (กรัมต่อลิตร) ปริมาณ PHA (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลลแห้ง) และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง (กรัมต่อลิตร) ของ *Bacillus* sp. ASC4 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHA ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ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

#### 4.5 ศึกษาปริมาณคาร์บอนที่เหลือทั้งหมดในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลและปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ลดลง

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

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

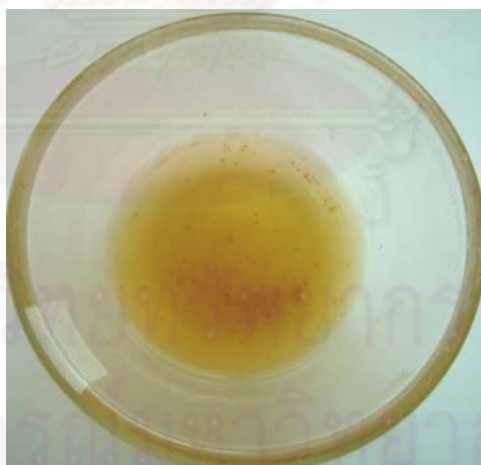


รูปที่ 4.16 ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดในของเสียอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร) ในอาหารเพื่อการผลิต PHA ในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 เมื่อเลี้ยงด้วย *Pseudomonas* sp. ASC2 และ *Bacillus* sp. ASC4

#### 4.6 การสกัด PHAs จากเซลล์แห้งและการทำให้บริสุทธิ์

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

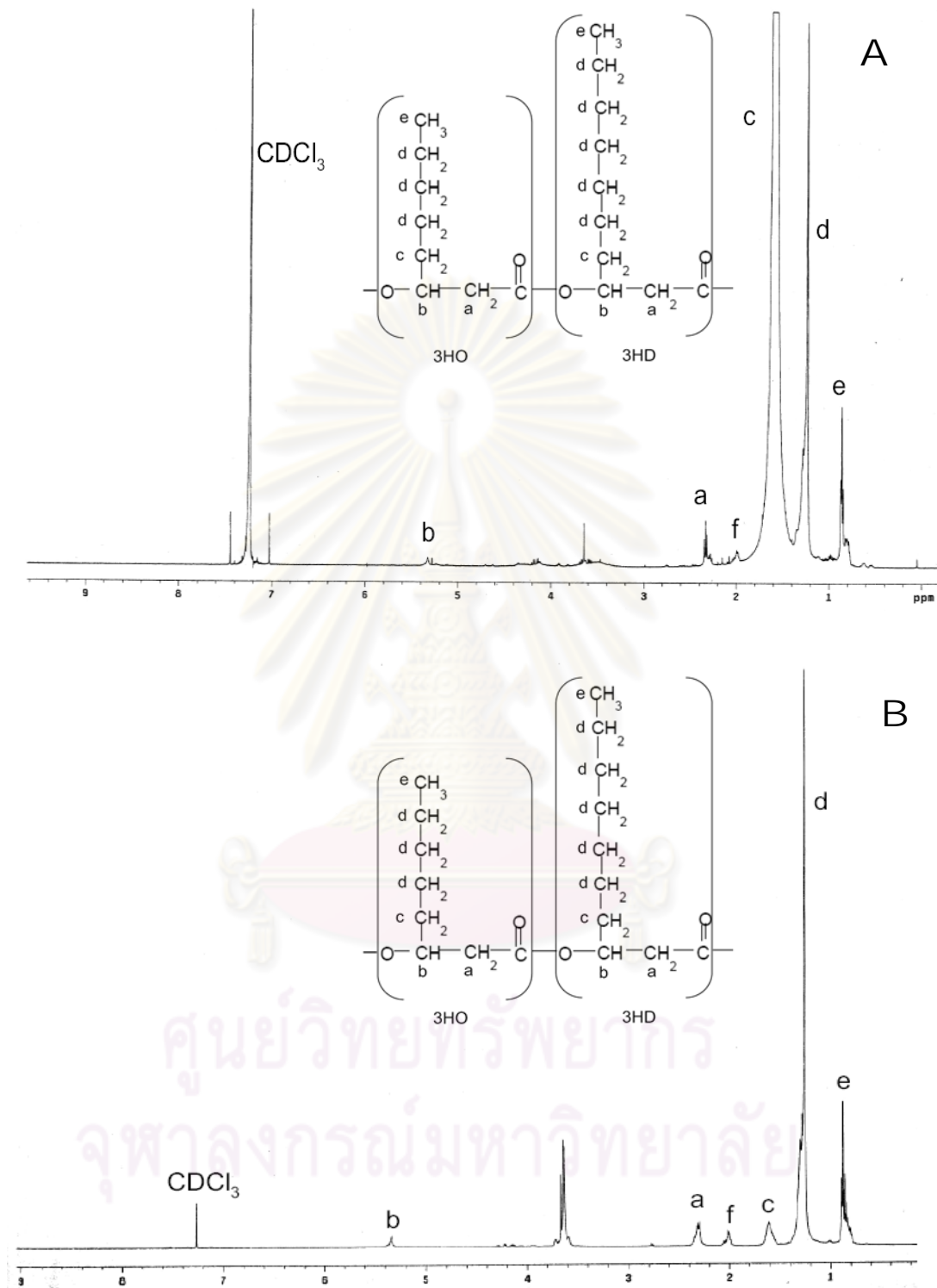
พอลิเมอร์ที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะนำไปศึกษาโครงสร้างของพอลิเมอร์และน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ต่อไปในข้อ 4.7 และ 4.8



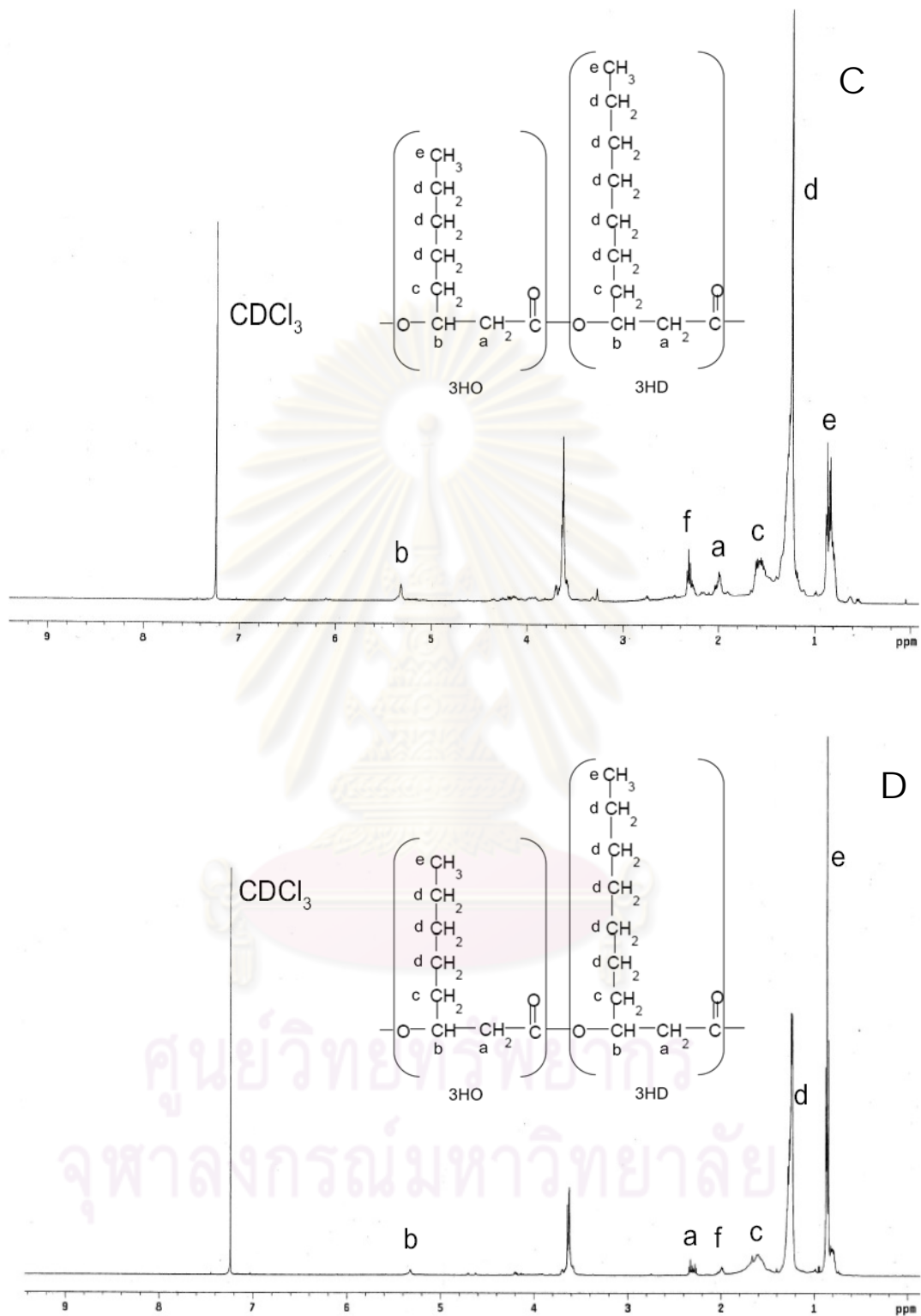
**รูปที่ 4.17** ลักษณะของพอลิเมอร์ที่สกัดได้จาก *Pseudomonas* sp. ASC2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต PHAs ที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200

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

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



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

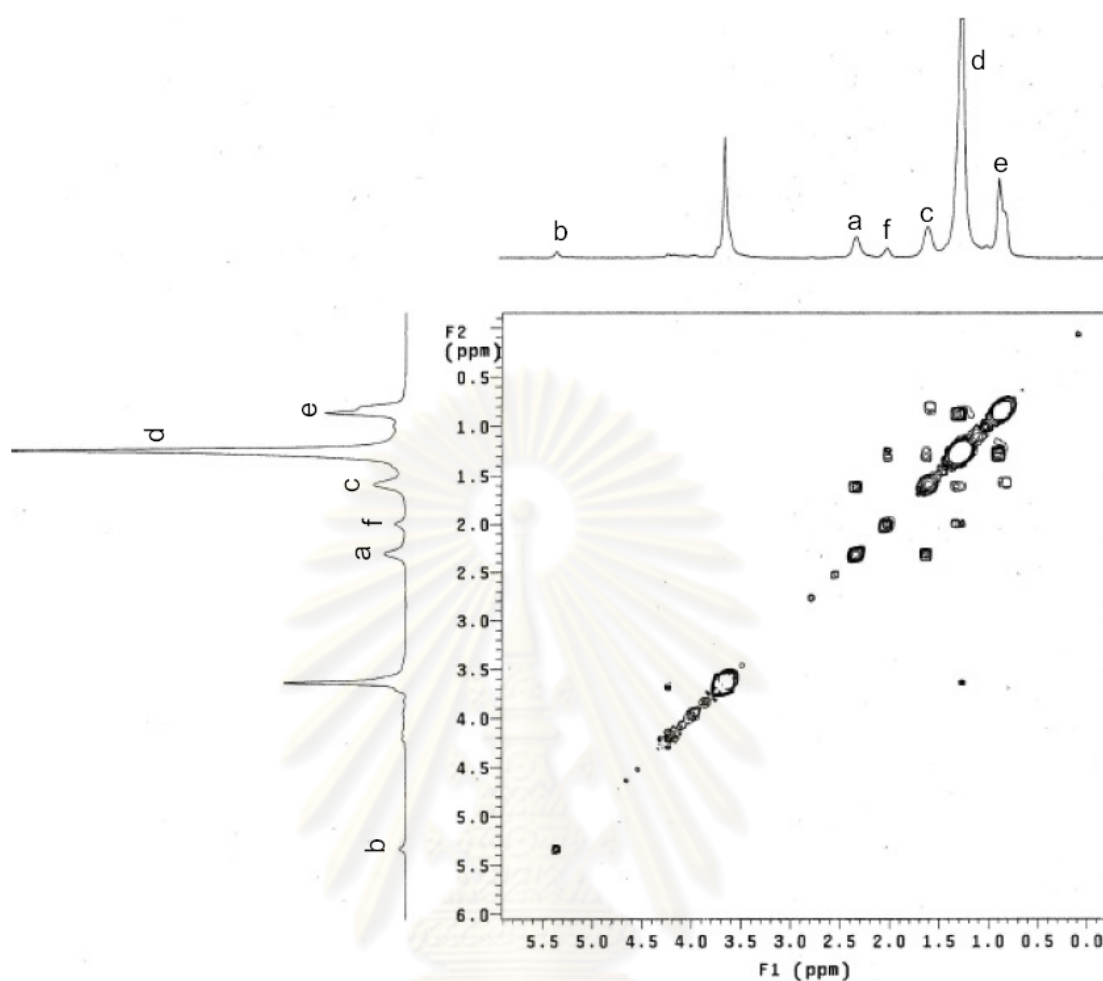


รูปที่ 4.18 (ต่อ) สเปกตรัมของ PHAs ที่ผลิตจาก *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 จาก  $^1\text{H-NMR}$  ความถี่ 500 MHz ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (A; ASC1 B; ASC2 C; ASC3 และ D; ASC4)

จากรูปที่ 4.18 (A) (B) (C) และ (D) พบว่ามีตำแหน่ง  $\delta$  (chemical shift) ที่ขึ้นในแต่ละตำแหน่งตรงกันแต่มีสัดส่วนโมโนเมอร์ที่ต่างกัน จากการศึกษาในข้อ 4.3.1.2 พบว่า *Pseudomonas* sp. ASC2 มีการผลิต PHAs เท่ากับ 61.80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสูงสุดในภาวะที่มีคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 จึงได้ศึกษา PHAs ที่ได้จาก *Pseudomonas* sp. ASC2 อย่างละเอียด จากรูปที่ 4.18 (B) พบว่ามี 6 สัญญาณที่ชัดเจนในช่วง  $\delta$  เท่ากับ 0.845 – 5.356 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของ anomeric proton โดยให้ชื่อตำแหน่งเป็น a b c d e และ f ที่ตำแหน่ง  $\delta$  เท่ากับ 0.880 ppm (a) แสดงสัญญาณที่ชัดเจนซึ่งเป็นสัญญาณโปรตอนจากหมู่เมทิล ( $\text{CH}_3$ ) ของ PHAs ส่วนที่ตำแหน่ง  $\delta$  เท่ากับ 1.255 (d) 1.616 (c) 2.015 (f) และ 2.302 ppm (a) แสดงสัญญาณโปรตอนจากหมู่เอทิล ( $-\text{CH}_2$ ) ที่ตำแหน่ง  $\delta$  เท่ากับ 5.342 ppm (b) แสดงสัญญาณโปรตอนจากหมู่ asymmetric carbons (CH) และที่ตำแหน่ง  $\delta$  เท่ากับ 7.235 ppm แสดงสัญญาณที่หนาแน่นของโปรตอนจาก  $\text{CDCl}_3$  ซึ่งเป็นตัวทำละลายพอลิเมอร์ของ PHAs (Haywood และคณะ, 1990)

จากรูป 4.18 (A) - (D) สัญญาณในช่วง  $\delta$  เท่ากับ 3.592-3.724 ppm สันนิษฐานว่า อาจแสดงสัญญาณโปรตอนของโมโนเมอร์ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ หรือแสดงสัญญาณโปรตอนของสารที่ปนเปื้อนที่ปนมากับพอลิเมอร์ที่ได้ ทำการยืนยันโดยการวิเคราะห์ด้วย 2D- $^1\text{H}$ -COSY ต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 4.19

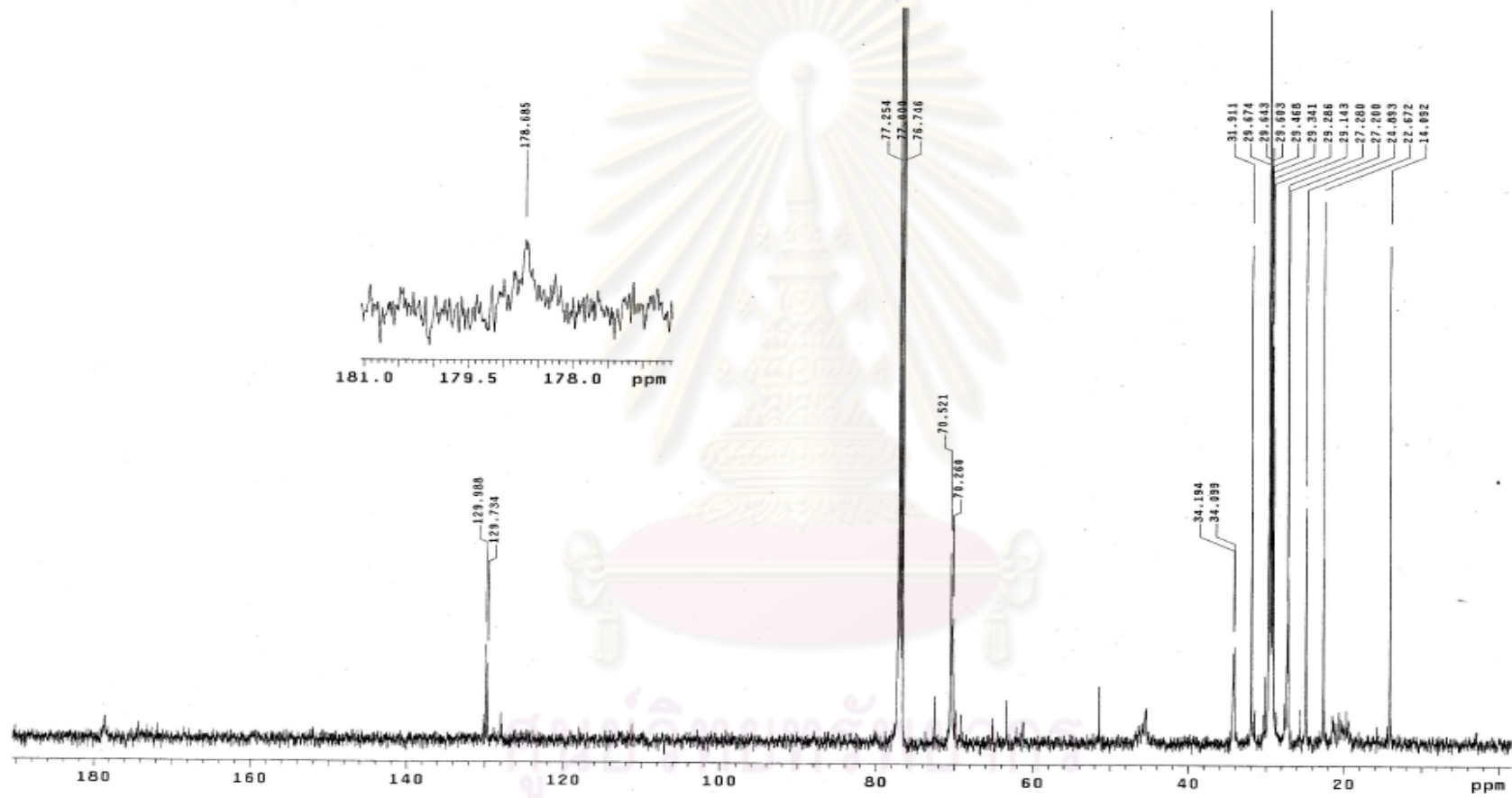
จากรูปที่ 4.19 แสดง 2D- $^1\text{H}$ -COSY ของ PHAs ที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. ASC2 พบว่าในตำแหน่ง e มีการเชื่อมต่อกับตำแหน่ง e d และ c ในตำแหน่ง d มีการเชื่อมต่อกับตำแหน่ง e, d, c และ f ในตำแหน่ง c มีการเชื่อมต่อกับตำแหน่ง e d c และ a ในตำแหน่ง f มีการเชื่อมต่อกับตำแหน่ง d และ f ในตำแหน่ง a มีการเชื่อมต่อกับตำแหน่ง c และ a และในตำแหน่ง b มีการเชื่อมต่อกับตำแหน่ง c a และ b โดยทั้งหมดนี้เป็นการยืนยันว่าตำแหน่ง b (CH) มีการเชื่อมต่อกับหมู่เอทิล ( $-\text{CH}_2$ ) ในตำแหน่ง c และ a ตามรูปที่ 4.21 ตำแหน่ง c เชื่อมต่อกับหมู่เอทิลในตำแหน่ง d ต่อไป และสุดท้ายตำแหน่ง d ไปเชื่อมต่อกับหมู่เมทิล ( $\text{CH}_3$ ) ในตำแหน่ง e



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

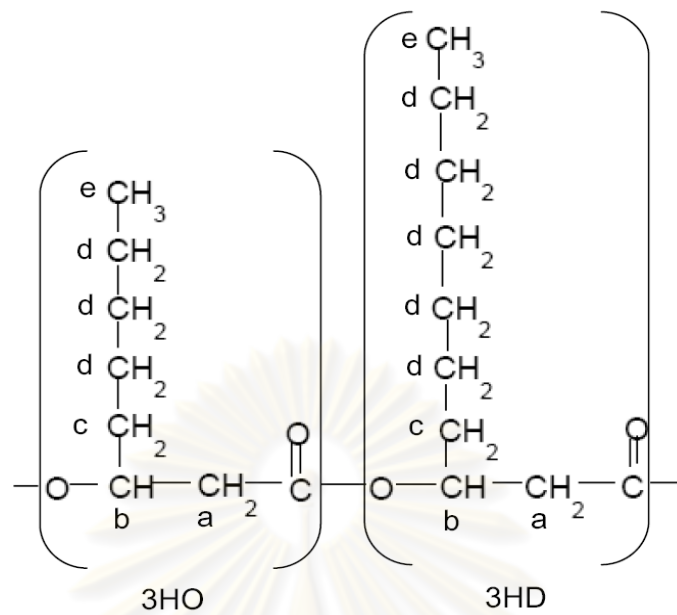
จากการวิเคราะห์ด้วย 2D-<sup>1</sup>H-COSY สามารถสรุปได้ว่าสัญญาณโปรตอนในช่วง  $\delta$  เท่ากับ 3.592-3.724 ppm ในรูป 4.18 (A) - (D) เป็นสัญญาณโปรตอนของสารปนเปื้อนที่ปนมากับพอลิเมอร์ เนื่องจาก PHAs ยังมีไม่มีความบริสุทธิ์พอ โดยสารที่ปนเปื้อนนั้นไม่ได้เป็นองค์ประกอบของ PHAs ทราบได้จาก 2D-<sup>1</sup>H -COSY (รูปที่ 4.19) เพราะตำแหน่งในช่วงนี้ไม่ได้ correlation กับตำแหน่งโปรตอนของ PHAs





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





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

#### 4.8 ทดสอบสมบัติทางกายภาพของ PHAs

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

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

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

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

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

PHAs เป็นพอลิเอสเทอร์ชีวภาพที่จุลินทรีย์บางชนิดสร้างและสะสมภายในแกรนูลในเซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของเซลล์ ภายใต้ภาวะที่จำกัดสารอาหารบางชนิด และมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป (Reddy และคณะ, 2003) แต่ปัญหาสำคัญในการผลิต PHAs คือต้นทุนในการผลิตมีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นทุนการผลิตพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี โดยส่วนหนึ่งมีสาเหตุจากแหล่งคาร์บอน ผู้วิจัยมีความสนใจนำของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHAs โดยจุลินทรีย์ เพื่อลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากประเทศไทยมีการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลมากขึ้นเพราะเป็นพลังงานทางเลือกที่เหมาะสมกับประเทศไทยในอนาคตเพื่อลดการพึ่งพาน้ำมันเชื้อเพลิงจากต่างประเทศ น้ำมันไบโอดีเซลเกิดจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันหรือไขมันจากสิ่งมีชีวิต ซึ่งรวมไปถึงน้ำมันที่ผ่านการใช้งานหรือน้ำมันเหลือทิ้งในครัวเรือน งานวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือจากบริษัท วิทย์คอร์ป จำกัด มหาชน ซึ่งผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนั้นมีผลิตภัณฑ์ร่วมเกิดขึ้นคือ กลีเซอรอลซึ่งเป็นของเสียอินทรีย์โดยมีสารเคมีที่เป็นพิษเจือปนอยู่จำนวนมาก ทางโรงงานจึงมีแนวคิดในการนำของเสียอินทรีย์นี้มาพัฒนาให้เกิดมูลค่าให้กับของเสียอินทรีย์นี้แทนการส่งเข้าสู่กระบวนการบำบัด หรือกระบวนการกลั่นเพื่อนำกลีเซอรอลกลับมาใช้ในด้านอื่นๆ ผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์ของเสียอินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ในการผลิต PHAs โดยได้รับตัวอย่างในช่วงเดือนสิงหาคม ปี 2551 เมื่อนำของเสียอินทรีย์นี้ไปวิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนด้วยเครื่อง TOC analyzer พบว่ามีปริมาณคาร์บอนทั้งหมดเท่ากับ 300.88 กรัมต่อลิตร

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต PHAs จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันโดยใช้อาหารเพื่อการผลิต PHA ที่มีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นทำการทดสอบเบื้องต้นโดยการย้อมแกรม Sudan Black B และ Nile Blue A ตามวิธีของ Song และคณะ (2008) ซึ่งแบคทีเรียที่มีการสะสม PHAs เมื่อย้อมด้วย Nile Blue A จะเห็นเป็นจุดสีส้มสะท้อนแสงภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ ส่วนการย้อมด้วย Sudan Black B จะเห็นเป็นจุดสีดำภายในเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 20 สายพันธุ์ และคัด

แยกแบคทีเรียที่ผลิต PHA ได้ 4 สายพันธุ์ จึงตั้งชื่อแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ว่า ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4 ตามลำดับ

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4 ทางอนุกรมวิธานโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี รวมถึงการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4 จัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter* *Pseudomonas* *Enterobacter* และ *Bacillus* ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์ RM4 94.89 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียสายพันธุ์ ASC2 คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Pseudomonas mendocina* สายพันธุ์ DS0601-FX 99.18 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียสายพันธุ์ ASC3 คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Enterobacter* sp. สายพันธุ์ BSRA2 99.24 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียสายพันธุ์ ASC4 คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ IAM 12118T 98.40 เปอร์เซ็นต์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ไปเสนอใน Genbank เพื่อให้ได้ accession numbers จึงให้แบคทีเรียสายพันธุ์ ASC1 ASC2 ASC3 และ ASC4 ชื่อว่า *Acinetobacter* sp. ASC1 (GU227612) *Pseudomonas* sp. ASC2 (GU227613) *Enterobacter* sp. ASC3 (GU227614) และ *Bacillus* sp. ASC4 (GU227615) ตามลำดับ

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs โดยแปรผันปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่เติมลงในอาหารเพื่อการผลิตเท่ากับ 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร มีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแปรผันอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 20 80 และ 200 พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ของ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 ในระดับขวดเขย่าคือภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lee และคณะ (1999) ที่รายงานว่า PHAs มีการสะสมในแกรนูลของแบคทีเรียภายใต้ภาวะที่มีการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แมกนีเซียม เป็นต้น และต้องมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอ ในภาวะนี้ *Pseudomonas* sp. ASC2 มีการผลิต PHAs ได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 61.80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง มีน้ำหนักชีวมวลสุทธิสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ

8.51 กรัมต่อลิตร จึงกล่าวได้ว่าปริมาณของเสียอินทรีย์และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและปริมาณ PHAs ที่แบคทีเรียผลิตได้ จากผลงานวิจัยเมื่อเพิ่มปริมาณของเสียอินทรีย์ในอาหารเพื่อการผลิต พบว่าการผลิต PHAs ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ลดลงเนื่องจากในของเสียอินทรีย์มีปริมาณสารเคมีที่เป็นพิษกับจุลินทรีย์ในปริมาณมากจึงทำให้การผลิต PHAs ลดลง และถ้ามีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนน้อย (มีปริมาณไนโตรเจนมาก) การเจริญเติบโตของแบคทีเรียก็มากขึ้นเพราะแบคทีเรียนำไนโตรเจนไปใช้ในการเจริญเติบโต

1. เนื่องจากอะเซทิลโคเอถูกนำไปใช้ใน tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) 2. งานวิจัยนี้ยังพบอีกว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้ทั้ง 4 สายพันธุ์มีวิถีชีวสังเคราะห์ PHA ที่ไม่เกี่ยวข้องกับ การเจริญ (non-growth associate product) 3. เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตดีจึงไม่มีการสร้างและสะสม PHAs ทำให้อัตราการการผลิต PHAs ลดลง และพบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ต้องถูกจำกัดปริมาณไนโตรเจน จากการวิเคราะห์ปริมาณ PHAs ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีพบว่าเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของ PHAs มีสองช่วงเวลา แสดงว่า PHAs ประกอบด้วย 2 โมโนเมอร์ที่แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีพบว่าแต่ละโมโนเมอร์คือ 3HO และ 3HD เมื่อคำนวณสัดส่วนโมลระหว่าง 3HO และ 3HD พบว่ามีอัตราส่วนของ 3HO เท่ากับ 14.69 โมลเปอร์เซ็นต์ และ 3HD เท่ากับ 85.31 โมลเปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการรายงานของ Haywood และคณะ (1990) ที่พบว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ NCIMB 40135 สามารถผลิต PHAs โดยมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลิต PHAs ได้เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง พอลิเมอร์ที่ได้ประกอบด้วย 2 โมโนเมอร์ ได้แก่ 3HO 10 โมลเปอร์เซ็นต์ และ 3HD 90 โมลเปอร์เซ็นต์ และจากรายงานของ Song และคณะ (2008) ที่รายงาน ว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ DR2 สามารถผลิต PHAs โดยใช้น้ำมันพืชที่ใช้แล้วมาเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลิต PHAs ได้เท่ากับ 23.52 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง พอลิเมอร์ที่ได้ประกอบด้วย 5 โมโนเมอร์ ได้แก่ 3HHx 5.86 โมลเปอร์เซ็นต์ 3HO 45.67 โมลเปอร์เซ็นต์ 3HD 36.74 โมลเปอร์เซ็นต์ 3HTD 7.5 โมลเปอร์เซ็นต์ และ 3HHxD 5.24 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์การลดลงของปริมาณ TOC โดยศึกษาจากการทดลองของการผลิต PHA โดยเฉพาะใน *Pseudomonas* sp. ASC2 และ *Bacillus* sp. ASC4 ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิต PHAs ได้ในปริมาณมาก โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตในภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์มีปริมาณลดลงเหลือ 0.09 และ

1.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Ibrahim และ Steinbüchel (2009) ซึ่งได้ศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB โดย *Zobellella denitrificans* สายพันธุ์ MW1 โดยแปรผันปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นเป็น 5 10 15 20 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับ 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตรนั้น *Z. denitrificans* สายพันธุ์ MW1 สามารถผลิต PHB เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่เมื่อมีปริมาณ กลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร จะผลิต PHB ลดลง นอกจากนี้ Ibrahim และ Steinbüchel ได้วิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลที่ลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าที่กลีเซอรอลเริ่มต้นเป็น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณกลีเซอรอลลดลงเป็น 0 กรัมต่อลิตร ส่วนกลีเซอรอลเริ่มต้นเป็น 15 20 30 และ 50 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณกลีเซอรอลเท่ากับ 2.8 9.5 21.1 และ 45.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตไม่สามารถวิเคราะห์ได้เพราะน้ำหมักที่เก็บตัวอย่างได้ในแต่ละชั่วโมงเมื่อนำเซลล์ของแบคทีเรียออกจากน้ำหมักด้วยการปั่นแยกเซลล์แล้วน้ำหมักก็ยังคงมีลักษณะขุ่นซึ่งเกิดจากน้ำมันเกิดแขวนลอยเป็นอิมัลชันขณะอยู่ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs โดยมีของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว ผู้วิจัยได้นำภาวะนั้นมาศึกษาการผลิต PHAs โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากของเสียอินทรีย์เป็นน้ำตาลกลูโคสด้วย *Pseudomonas* sp. ASC2 และ *Bacillus* sp. ASC4 โดยใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า *Pseudomonas* sp. ASC2 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.42 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 น้ำหนักชีวมวลสุทธิสูงสุดเท่ากับ 2.12 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 ปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 21.73 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 36 และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 5.73 กรัมต่อลิตร ส่วน *Bacillus* sp. ASC4 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.08 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 ปริมาณ น้ำหนักชีวมวลสุทธิสูงสุดเท่ากับ 3.34 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 12 ปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 18.90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 24 และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 2.07 กรัมต่อลิตร แสดงในรูปที่ 4.15 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีพบว่าโครมาโตแกรมที่ได้มีพีคขึ้นที่เวลาเดียวกันกับพีคของโมโนเมอร์ 3HD ที่ได้จากการใช้ของเสียอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน จึงสรุปได้ว่าพอลิเมอร์ที่ได้จากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเป็น 3HD เพียงโมโนเมอร์เดียว ในการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า *Pseudomonas* sp. ASC2 และ *Bacillus* sp. ASC4 สามารถนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญเติบโตและการผลิต PHAs ได้ แต่น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักชีวมวลสุทธิ และปริมาณ PHAs ที่แบคทีเรีย



ทั้ง 2 สายพันธุ์นั้นผลิตได้น้อยกว่าการใช้ของเสียอินทรีย์จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากแบคทีเรียนี้ได้ทำการคัดเลือกมาเพื่อการผลิต PHAs โดยใช้ของเสียอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะเมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นชนิดอื่นแบคทีเรียจึงมีการเจริญเติบโตและผลิต PHAs ได้ในปริมาณที่น้อยลง

เพื่อให้ได้ PHAs ในปริมาณที่มากเพียงพอต่อการศึกษาศสมบัติพื้นฐานของพอลิเมอร์ จึงนำภาวะที่เหมาะสมคือ ปริมาณคาร์บอนในของเสียอินทรีย์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 200 มาขยายส่วนการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีภาวะการเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรด ต่างเท่ากับ 7 อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.5 vvm จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงแล้วนำไปอบให้แห้ง จากนั้นนำมาสกัด PHAs โดยใช้คลอโรฟอร์มเนื่องจากมีรายงานว่า การสกัดพอลิเมอร์จากเซลล์แห้งของแบคทีเรียด้วยคลอโรฟอร์มเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ (สุชาดา จันทร์ประทีป, 2539) นำ PHAs ที่สกัดได้ไปตกตะกอนด้วยเฮกเซนเพื่อให้พอลิเมอร์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น นำพอลิเมอร์ที่ได้ไปวิเคราะห์โครงสร้างของพอลิเมอร์ด้วย  $^1\text{H-NMR}$   $^{13}\text{C-NMR}$  และ  $2\text{D-}^1\text{H-NMR-COSY}$  พบว่าพอลิเมอร์ที่ได้จากแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ประกอบด้วย 2 โมโนเมอร์ ได้แก่ 3HO และ 3HD เหมือนกันแต่มีสัดส่วนโมโนเมอร์ที่ต่างกัน เมื่อนำพอลิเมอร์ที่ได้ไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง GPC พบว่าพอลิเมอร์ของ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 ที่ผลิตได้มีค่า  $M_w$  เท่ากับ 1,222 525 752 1,433 Da ตามลำดับ สอดคล้องกับการรายงานของ He และคณะ (1998) ซึ่งรายงานการผลิต PHAs ด้วย *P. stutzeri* 1317 โดยมีน้ำมันถั่วเหลือง 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งจัดเป็นกรดไขมันเช่นเดียวกับของเสียอินทรีย์จากการผลิตไบโอดีเซล มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า  $M_w$  มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ได้แสดงค่า Polydispersity index ( $M_w/M_n$ ) ของ PHAs ที่ *Acinetobacter* sp. ASC1 *Pseudomonas* sp. ASC2 *Enterobacter* sp. ASC3 และ *Bacillus* sp. ASC4 ผลิตได้เท่ากับ 1.72 1.32 1.35 และ 2.11 ซึ่งตรงกับกรรายงานของ Zinn และคณะ (2001) และ Hazer และ Steinbüchel (2007) ได้รายงานตรงกันว่าค่า Polydispersity index ของ mcl-PHAs มีค่าอยู่ในช่วง 1.3 -2.6

พอลิเมอร์ที่ได้จากงานวิจัยนี้คือ 3HO และ 3HD จัดเป็น mcl-PHAs เนื่องจาก 3HO ประกอบด้วยคาร์บอน 8 อะตอม และ 3HD ประกอบด้วยคาร์บอน 10 อะตอม สอดคล้องกรรายงานของ Kim และคณะ (2007) ที่รายงานว่า mcl-PHAs คือพอลิเมอร์ที่แต่ละหน่วยโมโนเมอร์

ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 6-14 อะตอม เช่นเดียวกับการรายงานของ Chan และคณะ (2006) มีการผลิต PHAs ด้วย *P. aeruginosa* โดยใช้กรดไขมันชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า PHAs ที่ผลิตได้เป็น mcl-PHAs ประกอบด้วย 3HO 3HD และ 3HDD Kessler และ Witholt (2001) กล่าวว่า เบต้าออกซิเดชันหรือวิถีชีวสังเคราะห์ Fad (Fad Pathway) เป็นวิถีหลักในการชีวสังเคราะห์ mcl-PHA เมื่อแบคทีเรียเจริญในอาหารที่มีกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอน วิถีชีวสังเคราะห์นี้สามารถพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *P. oleovorans* *P. fragii* *P. aeruginosa* โดยสังเคราะห์ mcl-PHAs จากกรดแอลคานอิก (alkanoic acid) หรือกรดไขมัน ในกรณีนี้สารตั้งต้นในการผลิตจะเกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ที่ได้ ซึ่งหมายความว่า โมโนเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบใน mcl-PHA จะมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับสารตั้งต้นแต่อาจจะสั้นลงและแตกเป็นสองหน่วย (Huijberts และคณะ, 1995) สารตัวกลางในวิถีเบต้าออกซิเดชัน รวมทั้งอีโนอิลโคเอ (enoyl-CoA) 3-คีโตเอซิลโคเอ (3-ketoacyl-CoA) และ (S)-3-ไฮดรอกซีเอซิลโคเอ [(S)-3-hydroxyacyl-CoA] จัดเป็นสารตั้งต้นของ mcl-(R)-3-ไฮดรอกซีเอซิลโคเอ [mcl-(R)-3-hydroxyacyl-CoA] แสดงในรูป 2.6 ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ mcl-PHAs โดยตรง (Suriyamongkol และคณะ, 2007) Zinn และคณะ (2001) ได้กล่าวว่า mcl-PHAs มีลักษณะยืดหยุ่น (elastic) หรือมีลักษณะคล้ายของกึ่งเหลวกึ่งแข็ง ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับพอลิเมอร์ที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ ตกผลึกได้ที่อุณหภูมิต่ำ และมีจุดหลอมเหลวต่ำ mcl-PHAs จึงเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์ นอกจากนี้ Hazer และ Steinbüchel (2007) ได้กล่าวว่า mcl-PHAs และหมู่ฟังก์ชัน (functional group) นั้นมีความน่าสนใจเป็นอย่างมาก เพราะการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันนั้นสามารถปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์ได้ นอกจากนี้บางหมู่ฟังก์ชันสามารถปรับเปลี่ยนได้โดยปฏิกิริยาเคมีเพื่อให้ได้พอลิเมอร์ที่นำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ที่หลากหลายมากขึ้น มีการนำ mcl-PHAs ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติและนำไปเป็นวัสดุชีวภาพทางการแพทย์มากขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- ณัฐกานต์ บุตรพงษ์พานิช และ ณรงค์ฤทธิ์ คงอยู่. 2548. การทำกลีเซอรอลที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์ รายงานโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิทัศน์ จิระอรุณ. 2543. วัสดุพอลิเมอร์ ชุดที่ 2. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : โครงการเอกสาร และตำราภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พูนสุข ประเสริฐสุวรรณ ภาวดี เมธะคานนท์ และ ศุภลักษณ์ สัตยสมิทสถิตย์. 2550. การแยกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิต 1,3-โพรเพนไดออลจากกลีเซอรอลที่เหลือจากการผลิตไบโอดีเซล รายละเอียดโครงการร่วมมือกับศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. แม่น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2539. Principles and techniques of instrumental analysis (หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ). พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ชวนพิมพ์.
- รุจิลักษณ์ รัตตะรมย์. 2549. ก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography; GC). เอกสารประกอบการเรียนคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล. 2552. PHA : พลาสติกชีวภาพจากแบคทีเรีย. วารสารส่งเสริมเทคโนโลยี ปีที่ 35 ฉบับที่ 202 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา.
- สมชาย พวงเพ็ชร์ และ ชูศักดิ์ แซ่มเกษม. 2518. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ 2 พลาสติก [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : [http://guru.sanook.com/enc\\_preview.php?id=673](http://guru.sanook.com/enc_preview.php?id=673) [4 สิงหาคม 2553]
- สุชาดา จันทร์ประทีป. 2539. การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สารานุกรมเสรี. 2548. พลาสติก [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://th.wikipedia.org/wiki/พลาสติก> [3 สิงหาคม 2553]

## ภาษาอังกฤษ

- Abate, R., Ballistrri, A. and Montaudo, O. 1995. Separation and structural characterization of cyclic and open chain oligomers produced in the partial pyrolysis of microbial poly(hydroxybutyrates). Macromolecules 28 : 791-796.
- Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R. and Reis, M.A.M. 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. Journal of Biotechnology 130 : 411-421.
- Anderson, A.J., Dawes, E.A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial use of bacteria polyhydroxyalkanoates. Microbiology Review 54 : 450-472.
- Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y. and Foglia, T.A. 2004. Bacterial poly(hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream. Journal of Polymers and the Environment 12(3) : 105-112.
- Ayorinde, F.O., Saeed, K.A., Price, E., Morrow, A., Collins, W.E., McInnis, F., Pollack, S.K. and Eribo, B.E. 1998. Production of poly-( $\beta$ -hydroxybutyrate) from saponified *Vernonia galamensis* oil by *Alcaligenes eutrophus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 21 : 46-50.
- Bassas, M., Marqués, A.M. and Manresa, A. 2008. Study of the crosslinking reaction (natural and UV induced) in polyunsaturated PHA from linseed oil. Biochemical Engineering Journal 40 : 275-283.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M. and Welander, T. 2008. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. Bioresource Technology 99 : 509-516.
- Bernfeld, P. 1955. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . Methods in Enzymology 1 : 149-158.
- Bhubalan, K., Lee, W.H., Loo, C.Y., Yamamoto, T., Tsuge, T., Doi, Y. and Sudesh, K. 2008. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. Polymer Degradation and Stability 93 : 17-23.

- Bozbas, K. 2008. Biodiesel as an alternative motor fuel: production and policies in the European Union. Renewable and Sustainable Energy Reviews 12 : 542–552.
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W. and Fuller, R.C. 1990. Plastics from bacteria and for bacteria: poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology 41 : 77-93.
- Braunegg, G., Bona, R. and Koller, M. 2004. Sustainable polymer production. Polymer-Plastic Technology and Engineering. 43(6) : 1779-1793.
- Braunegg, G., Lefebvre, G. and Gecser, K.F. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. Journal of Biotechnology 65 : 127-161.
- Brzostowicz, P.C., Blasko, M.S. and Rouvire, P.E. 2002. Identification of two gene clusters involved in cyclohexanone oxidation in *Brevibacterium epidermidis* strain HCU. Applied Microbiology and Biotechnology 58 : 781–789.
- Byrom, D. 1994. Polyhydroxyalkanoates. In: Mobley D.P. (ed.), Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors, pp. 5-33. Hanser Munich.
- Canakci, M. and Sanli, H. 2008. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35 : 431–441.
- Casini, E., de Rijk, T.C., de Waard, P. and Eggink, G. 1997. Synthesis of poly(hydroxyalkanoate) from hydrolyzed linseed oil. Journal of Environmental Polymer Degradation 5(3) : 153-158.
- Cavalheiro, J.M.B.T., de Almeida, M.C.M.D., Grandfils, C. and da Fonseca, M.M.R. 2009. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. Process Biochemistry 44 : 509-515.
- Chan, P.L., Yu, V., Wai, L., and Yu, H.F. 2006. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa* with fatty acids and alternative carbon sources. Applied Biochemistry and Biotechnology 132 : 933-941.

- Chanprateep, S. 2010. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal of Bioscience and Bioengineering (in press, available only doi:10.1016/j.jbiosc.2010.07.014).
- Chanprateep, S., Katakura, Y., Visetkoop, S., Shimizu, H., Kulpreecha, S. and Shioya, S. 2008. Characterization of new isolated *Ralstonia eutropha* strain A-04 and kinetic study of biodegradable copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35 : 1205–1215.
- Chen, C.W., Don, T.M. and Yen, H.F. 2006. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. Process Biochemistry 41 : 2289-2296.
- Chen, G.Q. and Wu, Q. 2005. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. Applied Microbiology and Biotechnology 67 : 592-599.
- Chen, G.Q. 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and material industry. Chemical Society Reviews 38 : 2434-2446.
- Chen, G.Q. 2010a. Industrial production of PHA. In Chen, G.Q. (ed.), Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications, pp. 121-132. Chaina : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Chen, G.Q. 2010b. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. In Chen, G.Q. (ed.), Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications, pp. 17-37. Chaina : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Chohan, S.N. and Copeland, L. 1998. Acetoacetyl coenzyme A reductase and polyhydroxybutyrate synthesis in *Rhizobium* (Cicer) sp. strain CC 1192. Applied and Environmental Microbiology 64 : 2859–2863.
- Comeau, Y., Hall, K.J. and Oldham, W.K. 1988. Determination of poly-3-hydroxybutyrate and poly-3-hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography. Applied and Environmental Microbiology 54 (9) : 2325-2327.
- Doi, Y. Microbial Polyesters. New York: VCH, 1990.

- Doi, Y., Kitamura, S. and Abe, H. 1995. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). Macromolecules 28 (14) : 4822–4828.
- Dove, A. 2000. Experts disagree over color of biomass. Nature Biotechnology 18 : 490.
- Evans, J.D. and Sikdar, S.K. 1990. Biodegradable plastics: An idea whose time has come. Chemtech 5 : 38-42.
- Field, L.D. and Sternhell, S. 1989. Analytical NMR. Avon : Bath press.
- Goff, M., Ward, P.G. and O'Connor, K.E. 2007. Improvement of the conversion of polystyrene to polyhydroxyalkanoate through the manipulation of the microbial aspect of the process: A nitrogen feeding strategy for bacterial cells in a stirred tank reactor. Journal of Biotechnology 132 : 283-286.
- Gerngross, T.U. 1999. Can biotechnology move us toward a sustainable society? Nature Biotechnology 17 : 541–544.
- Gross, R.A., DeMello, C., Lenz, R.W., Brandl, H. and Fuller, R.C. 1989. Biosynthesis and characterization of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. Macromolecules 22 : 1106-1115.
- Haas, R., Jin, B. and Zepf, F.T. 2008. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 72(1) : 253-256.
- Haba, E., Vidal-Mas, J., Bassas, M., Espuny, M.J., Llorens, J. and Manresa, A. 2007. Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): Effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition. Biochemical Engineering Journal 35 : 99–106.
- Haywood, G.W., Anderson, A.J., Ewing, D.F. and Dawes, E.A. 1990. Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 40135. Applied and Environmental Microbiology 56(11) : 3354-3359.
- Hazenberg, W. and Witholt, B. 1997. Efficient production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from octane by *Pseudomonas oleovorans* : economic considerations. Applied Microbiology and Biotechnology 48 : 588-596.

- Hazer, B. and Steinbüchel, A. 2007. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. Applied Microbiology and Biotechnology 74 : 1-12.
- He, W., Tian, W., b, Zhang, G., Chen, G.Q., and Zhang, Z. 1998. Production of novel polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil. FEMS Microbiology Letters 169 : 45-49.
- Howell, R. 1982. Opportunities in biotechnology for the chemical industry. Chemical Industry 8 : 508–511.
- Huijberts, G.N.M., de Rijk, T.C., de Waard, P. and Eggink, G. 1995. <sup>13</sup>C Nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. Journal of Bacteriology 176 : 1661–1666.
- Huijberts, G.N., Eggink, G., de Waard, P., Huisman, G.W. and Witholt, B. 1992. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. Applied and Environmental Microbiology 58 : 536–544.
- Ibrahim, M.H.A. and Steinbüchel, A. 2010. *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. Journal of Applied Microbiology 108 : 214–225.
- Jenkins, D., Richard, M.G. and Daigger, G.T. 1993. Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. 2<sup>nd</sup> edn. Lewis Publishers, Michigan
- Johnson, H.E., Douglas, J.F. and Granick, S. 1993. Topological influences on polymer adsorption and desorption dynamics. Physical Review Letters 70(21) : 3267–3270.
- Kashiwaya, Y., Takeshima, T., Mori, N., Nakashima, K., Clarke, K., and Veech, R.L. 2000. D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97 : 5440-5444.



- Kempers, A.J. 1974. Determination of sub-micro quantities of ammonium and nitrates in soils with phenol, sodiumnitroprusside and hypochlorite. Geoderma 12 : 201-206.
- Kessler, B. and Witholt, B. 2001. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. Journal of Biotechnology 86 : 97–104.
- Kim, D.Y., Kim, H.W., Chung, M.G., and Rhee, Y.H. 2007. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. Journal of Microbiology 45(2) : 87-97.
- Kim, S. and Dale, B.E. 2005. Life cycle assessment study of biopolymers (polyhydroxyalkanoates) derived from no-tilled corn. International Journal of Life Cycle Assessment 10 : 200–210.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. Journal of Molecular Evolution 16 : 111-120.
- Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Fernandes, E.G., Horvat, P., Kutschera, C., Hesse, P. and Braunegg, G. 2008. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. Bioresource Technology 99(11) : 4854-63.
- Koller, M., Atlic, A., Dias, M., Reiterer, A. and Braunegg, G. 2010. Microbial PHA production from waste raw materials. In Chen, G.Q. (ed.), Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications, pp. 85-119. Austria : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B. and Thongchul, N. 2009. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus magisterium*. Journal of Bioscience and Bioengineering 107(3) : 240-245.
- Lee, S.Y. 1996a. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnology and Bioengineering 49 :1-14.
- Lee, S.Y. 1996b. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Trends Biotechnology 14 : 431– 438.

- Lee, S.Y., Choi, J.I. 1998. Effect of fermentation of performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. Journal of Polymer Degradation and Stability 59 : 387-393.
- Lee, S.Y., Choi, J.L., Wong, H.H., 1999. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. International Journal of Biological Macromolecules 25 : 31–36.
- Lee, W.H., Loo, C.Y., Nomura, C.T. and Sudesh, K. 2008. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. Bioresource Technology 99: 6844-6851.
- Loo, C.Y., Lee, W.H., Tsuge, T., Doi Y. and Sudesh K. 2005. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. Biotechnology Letters 27 : 1405–1410.
- López-Cortés, A., Lanz-Landázuri, A. and García-Maldonado, J.Q. 2008. Screening and isolation of PHB-producing bacteria in a polluted marine microbial mat. Microbial Ecology 56 :112–120.
- Luengo, M.J., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, R.E. 2003. Bioplastics from microorganisms. Current Opinion in Microbiology 6 : 251-260.
- Madison, L. and Huisman, G. 1999. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA plastic. Microbiology and Molecular Biology 63 : 21-53.
- Massieu, L., Haces, M.L., Montiel, T. and Hernandez-Fonseca, K. 2003. Acetoacetate protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. Neuroscience 120(2) : 365-378.
- Mittendorf, V., Robertson, E.J., Leech, R.M., Krüger, N., Steinbüchel, A. and Poirier, Y. 1998. Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis thaliana* using intermediates of peroxisomal fatty acid b-oxidation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95 : 13397–13402.

- Mothes, G., Schnorpfel, C. and Ackermann, J.U. 2007. Production of PHB from crude glycerol. Engineering in Life Sciences 7(5) : 475-479.
- Narayan, R. 1993. *Biodegradable Plastics*, In Opportunities for innovation: Biotechnology. Proceeding of National Institute of Standards and Technology (NIST, U.S. Department of Commerce) Monograph; NIST GCR-93-633. : 135-150.
- Ojumu, T.V., Yu, J. and Solomon, B.O. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. Journal of Biotechnology 3(1) : 18-24.
- Pantazaki, A.A., Papanephytous, C.P., Pritsa, A.G., Liakopoulou-Kyriakides, M. and Kyriakidis, D.A. 2009. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. Process Biochemistry 44 : 847–853.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi, and Kalia, V.C. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresource Technology 87 : 137-146.
- Reusch, R. N., Sparrow, A. W., Gardiner, J . 1992. Transport of poly-P-hydroxybutyrate in human plasma. Biochimica et Biophysica Acta 1123 : 33-40.
- Raghavan, D. 1995. Characterization of Degradable Plastics. Polymer Plastics Technology and Engineering 34 (1) : 41-63.
- Shang, L., Jiang, M., Yun, Zh., Yan, H.Q. and Chang, H.N. 2008. Mass production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from hydrolyzed corn oil by fed-batch culture of *Pseudomonas putida*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24(12) : 2783-2787.
- Singh, A.K., Mallick, N. 2009. Exploitation of inexpensive substrates for production of a novel SCL–LCL-PHA co-polymer by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36 : 347–354.
- Simon-Colin, C., Raguenes, G., Crassous, P., Moppert, X. and Guezennec, J. 2008. A novel mcl-PHA produced on coprah oil by *Pseudomonas guezennei* biovar. *tikehau*, isolated from a “kopara” mat of French Polynesia. International Journal of Biological Macromolecules 43(2) : 176-181.

- Solaiman, D., Ashby, R., Hotchkiss, A. and Foglia, T. 2006. Biosynthesis of medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) from soy molasses. Biotechnology Letters 28 : 57-162.
- Song, Hwan, J., Jeon, C.O., Choi, M.H., Yoon, S.C., and Park, W. 2008. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using waste vegetable oil by *Pseudomonas* sp. strain DR2. Journal of Microbiology and Biotechnology 18(8) : 1408–1415.
- Steinbüchel, A. Novel materials from biological sources. 1991. In: Byrom, D. (ed.) Biomaterials, pp. 124–213. New York: Stockton.
- Steinbüchel, A. and Hein, S. 2001. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. Advances in biochemical engineering/biotechnology 71: 81-123
- Stevens, E.S. 2002. How green are green plastics? Biocycle, Dec. : 42–45.
- Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Progress in Polymer Science 25 : 1503–1555.
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. and Shah, S. 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review. Biotechnology Advances 25 : 148–175.
- Taguchi, K., Aoyagi, Y., Matsusaki, H., Fukui, T., Doi, Y. 1999. Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB101. Biotechnology Letters 21 : 579–584.
- Tian P.Y., Shang L., Ren H., Mi Y., Fan D.D. and Jiang M. 2009. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Current research and development. African Journal of Biotechnology 8 (5) : 709-714.
- Valentin, H.E. and Dennis, D. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. Journal of Biotechnology 58 : 33–38.

- Valentin, H.E. and Steinbüchel, A. 1995. Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid-co-4-hydroxyvaleric acid) by mutants and recombinant strains of *Alcaligenes eutrophus*. Journal of Environmental Polymer Degradation 3 : 169–175.
- Vandamme, P. and Coenye, T. 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54 : 2285–2289.
- Vaneechoutte, M., Kampfer, P., De Baere, T., Falsen, E. and Verschraegen, G. 2004. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia [Pseudomonas] syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54 : 317–327.
- Vasudevan, P.T. and Briggs, M. 2008. Biodiesel production – current state of the art and challenges. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35 : 421–430.
- Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D. and Radecka, I. 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal of Applied Microbiology 102 : 1437–1449.
- Wang, Z.H., Wu, H.N., Chen, J., Zhang, J. and Chen, G.Q. 2008. A novel self-cleaving phasin tag for purification of recombinant proteins based on hydrophobic nanoparticles. Lab on a Chip 8 : 1957–1962.
- Wong, A.L., Chua, H. and Yu, P.H.F. 2000. Microbial production of polyhydroxyalkanoates by bacteria isolated from oil wastes. Applied Biochemistry and Biotechnology 84–86 : 843–852.
- Xie, W.P. and Chen, G.Q. 2008. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *phaPCJ*. Biochemical Engineering Journal 38 : 384–389.
- Yim, K.S., Lee, S.Y., and Chang, H.N. 1996. Synthesis of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering 49 : 495–503.

- Yu, J., and Heiko, S. 2008. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. Bioresource Technology 99 : 8042-8048.
- Zheng, L.Z., Li, Z., Tian, H.L., Li, M. and Chen, G.Q. 2005. Molecular cloning and functional analysis of (*R*)-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein: coenzyme A transacylase from *Pseudomonas mendocina* LZ. FEMS Microbiology Letters 252 : 299–307.
- Zinn, M. Biosynthesis of medium-chain-length poly[(*R*)-3-hydroxyalkanoates]. 2010. In Chen, G.Q. (ed.), Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications, pp. 213-236. Switzerland : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Zinn, M., Witholt, B. and Egli, T. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. Advanced Drug Delivery Reviews 53 : 5-21.
- Zou, X.H., Li, H.M., Wang, S., Leski, M., Yao, Y.C., Yang, X.D., Huang, Q.J. and Chen, G.Q. 2009. The effect of 3-hydroxybutyrate methyl ester on learning and memory in mice. Biomaterials 30 : 1532-1541.
- Available from: Analytical Equipment. [online]. [http://classes.engr.oregonstate.edu/cbee/spring2005/che415/PublicTeam1/Biodiesel\\_Project\\_Proposal.html](http://classes.engr.oregonstate.edu/cbee/spring2005/che415/PublicTeam1/Biodiesel_Project_Proposal.html) Accessed 15 August 2010.
- Available from: Biotechnological Polyester Production from Renewable Resources. [online]. [www.hdb.hr/bec2008/PDF\\_files/Braunegg\\_pha.pdf](http://www.hdb.hr/bec2008/PDF_files/Braunegg_pha.pdf). Accessed 3 August 2010.
- Available from: Biodiesel Series: Production Costs. [online]. <http://econuz.com/page/7/> Accessed 11 August 2010.
- Available from: Bacterial production of polyhydroxyalkanoates from biodiesel process waste glycerol. [online]. [http://www.bio.org/ind/wc/08/breakout\\_pdfs](http://www.bio.org/ind/wc/08/breakout_pdfs). Accessed 10 August 2010.
- Available from: Nuclear Magnetic Resonance. [online]. <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/nuclear/nmr.html> Accessed 15 August 2010.
- Available from: Application of gel chromatography. [online]. <http://pharamcytimes.wordpress.com/catagory/instrumental-analysis-studies/chromatography/> Accessed 15 August 2010.

Available from: [Gel permeation chromatography](#). [online].

<http://www.answers.com/topic/gel-permeation-chromatography>. Accessed 15 August 2010.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ก

### สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
เปปโตเน	5	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

2. สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) โดย Chanprateep และคณะ (2008) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ผงสกัดจากยีสต์	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
ทริปโตส	10	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	5	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิต PHA (Production Medium) สูตรปรับปรุงโดย Chanprateep และคณะ (2008) ใน 1 ลิตรประกอบด้วย

โบแตสซีเอ็มไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.4	กรัม
ไดโบแตสซีเอ็มไฮโดรเจนฟอสเฟต	5.8	กรัม
แมกนีซีเอ็มซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.12	กรัม
โซเดียมซีเตรท	5.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต แปรผันตามอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน		
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ینگ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย trace element ใน HCl 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	1.67	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	2.78	กรัม
แมงกานีสไดคลอไรด์เตตระไฮเดรต	1.98	กรัม
คอปเปอร์ไดคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.17	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม

แยกละลายเกลือ แมกนีซีเอ็มซัลเฟต และ สารละลาย trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับ pH เป็น 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3 โมลาร์ ینگ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข

### สารเคมีและวิธีเตรียมที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยนำกลีเซอรอล 87 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 11.5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 88.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (NaOH 1 M)

เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5.844 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 3. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 โมลาร์ (HCl 3 M)

เตรียมโดยเติมน้ำกลั่นปลอดประจุไปปริมาตรหนึ่ง จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 48.99 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 300 มิลลิลิตร

#### 4. สารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl)

เตรียมโดยละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 5. Nile blue A

เตรียมโดยละลาย Nile blue A 0.05 มิลลิกรัม ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอนเมตร เก็บไว้ในขวดสีชา

## 6. Sudan Black B

เตรียมโดยละลาย Sudan Black B 0.3 กรัม ใน 70 เปอร์เซ็นต์ v/v เอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บไว้ในขวดสีชา

## 7. Nyatatin

เตรียมโดยละลาย Nyatatin 40 มิลลิกรัมใน DMSO 1 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ในภาชนะที่ไม่โดนแสง เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

## 8. สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ (KCl 2 M)

เตรียมโดยละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 150 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

## 9. สารละลาย Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

เตรียมโดยละลายเกลือของ EDTA ไดโซเดียม (EDTA disodium salt) 6 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด ต่างเท่ากับ 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

## 10. สารละลายฟีนอลไนโตรฟัสเฟอไรเอเจนท์

เตรียมโดยละลายฟีนอล 7 กรัมและโซเดียมไนโตรฟัสเฟอไรด์ 34 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 11. สารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรต์เอเจนต์

เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.48 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมไดโซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.98 กรัม และเติมสารละลายโซเดียมไฮโป

คลอไรท์ (5-5.25 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 11.4-12.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

#### 12. สารละลาย 3 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟูริกในเมทานอล 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิก 2 กรัมต่อลิตรเป็นสารมาตรฐานภายใน

เตรียมโดยใช้ขวดคูแวนฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร เติมเมทานอลเกรด AR ปริมาตร 485 มิลลิลิตร ลงไปช้าๆ จะเกิดความร้อนและเกิดควัน จึงควรทำที่ตู้ดูดไอระเหยปิดฝา เขย่าผสมให้เข้ากัน ซึ่งกรดเบนโซอิก 1 กรัม ละลายในสารละลายดังกล่าว เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เขียนระบุที่ข้างขวดว่าเป็น 2 กรัมต่อลิตร กรดเบนโซอิกและเมทานอลที่มี 3 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริก

#### 13. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

เตรียมโดยละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ละลายบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hotplate Stirrer) เติมโปแตสเซียมคาร์เตรต 30 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ เก็บไว้ในขวดสีชา

#### 14. สารละลายมาตรฐานของกรดออกตะโนอิก (Octanoic acid)

กรดออกตะโนอิก (สามารถละลายได้ใน 2 กรัมต่อลิตร กรดเบนโซอิกและเมทานอลที่มี 3 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริก) เตรียมโดยละลายกรดออกตะโนอิก 1 กรัม ใน 2 กรัมต่อลิตร กรดเบนโซอิกและเมทานอลที่มี 3 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริกปริมาตร 100 มิลลิลิตร (เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร) เก็บไว้เป็นสต็อก โดยเตรียมกรดออกตะโนอิกความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร เติมกรดออกตะโนอิก ปริมาตร 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ในหลอดฝาเกลียว จากนั้นเติม 2 กรัมต่อลิตร กรดเบนโซอิกและเมทานอลที่มี 3 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริกปริมาตร 1.8 1.6 1.4 1.2 และ 1.0 มิลลิลิตร และเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 2.0 มิลลิลิตรในทุกความเข้มข้น โดยมีปริมาตรรวมในทุกความเข้มข้นเท่ากับ 4 มิลลิลิตร

### 15. สารละลายมาตรฐานของกรดเดคะโนอิก (Decanoic acid)

กรดเดคะโนอิก (สามารถละลายได้ในคลอโรฟอร์ม) เตรียมโดยละลายกรดเดคะโนอิก 1 กรัม ในคลอโรฟอร์มปริมาตร 100 มิลลิลิตร (เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร) เก็บไว้เป็นสต็อก โดยเตรียมกรดเดคะโนอิกความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร เติมกรดเดคะโนอิกปริมาตร 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ในหลอดฝาเกลียว จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 1.8 1.6 1.4 1.2 และ 1.0 มิลลิลิตร และเติม 2 กรัมต่อลิตร กรดเบนโซอิกและเมทานอลที่มี 3 เปอร์เซนต์กรดซัลฟูริกปริมาตร 2.0 มิลลิลิตรในทุกความเข้มข้น โดยมีปริมาตรรวมในทุกความเข้มข้นเท่ากับ 4 มิลลิลิตร

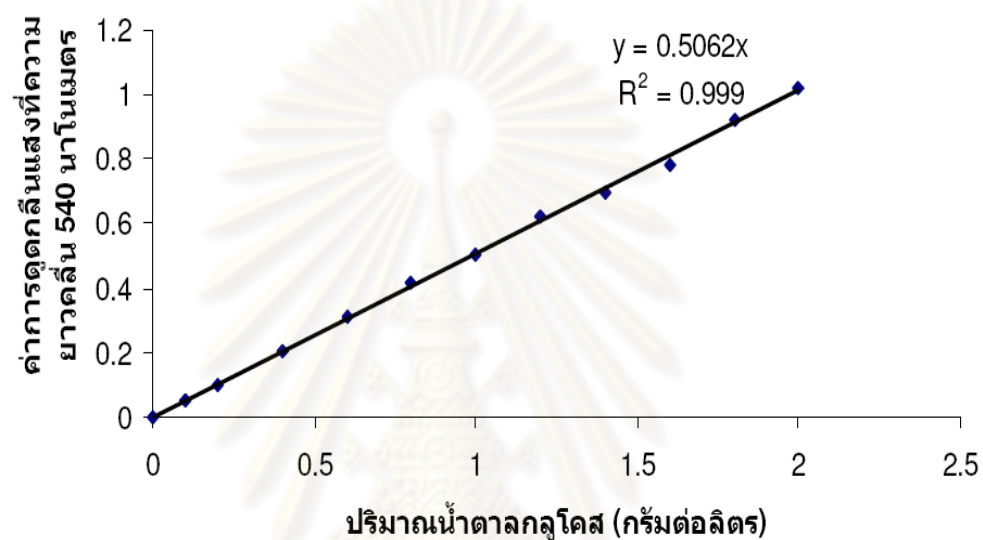


ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค

## โครมาโตแกรม

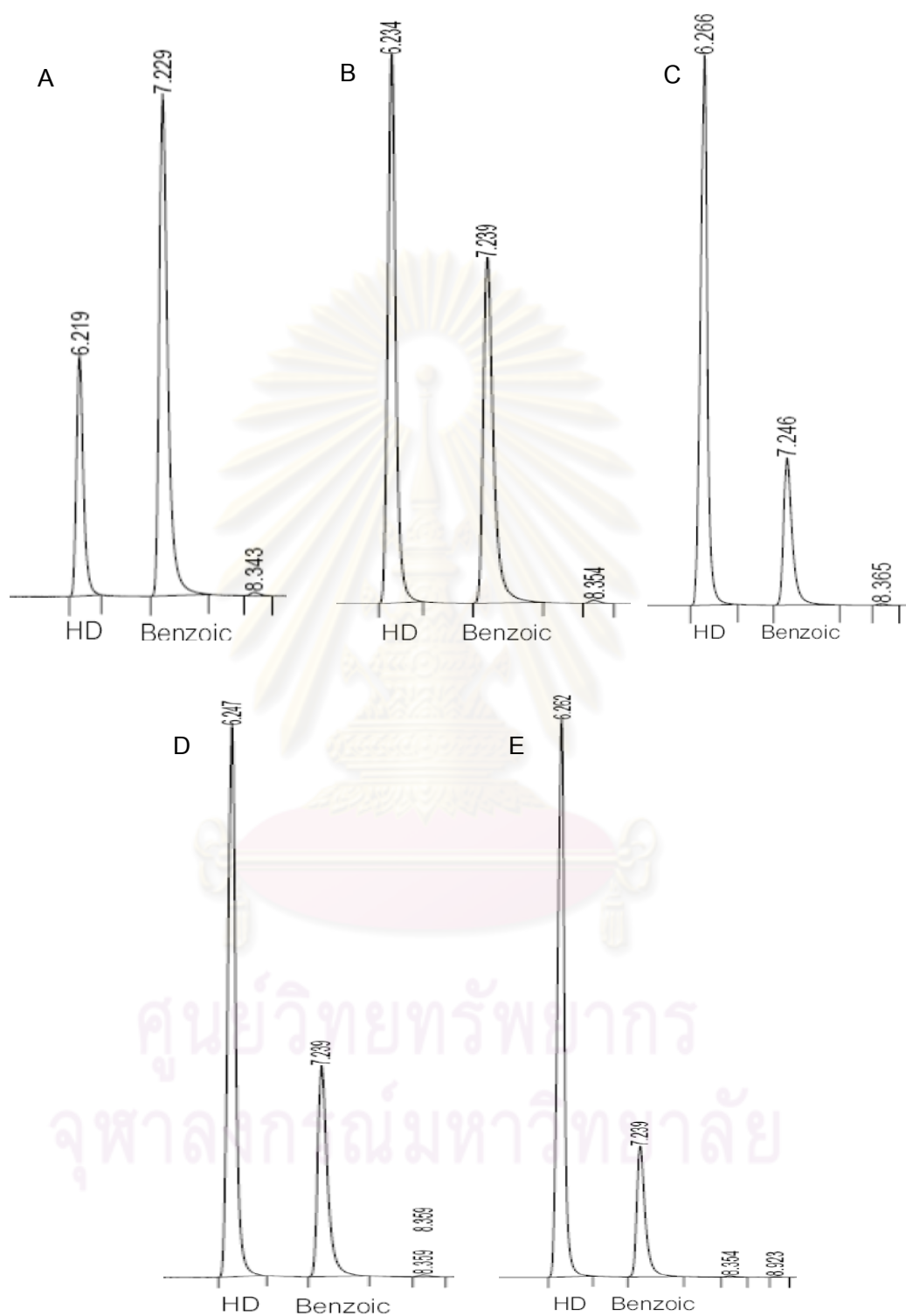
## 1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-2 กรัมต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

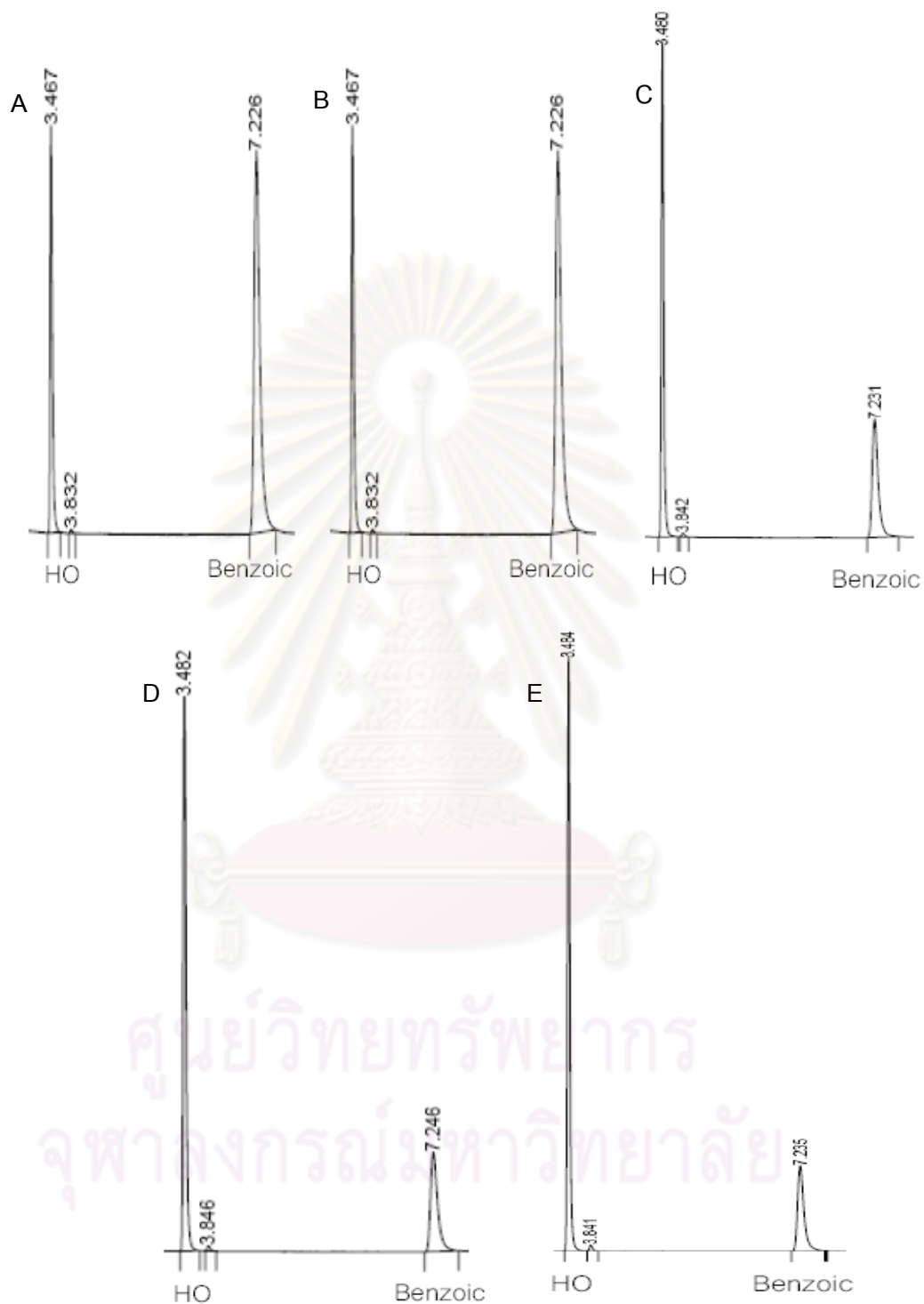
## 2. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน HD



รูปโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน HD ปริมาณ 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร แสดงดังรูป A B C D และ E ตามลำดับ



### 3. โคโรมาโตรแกรมของสารมาตรฐาน HO



รูปโครมาโตรแกรมของสารมาตรฐาน HO ปริมาณ 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร แสดงดังรูป A B C D และ E ตามลำดับ

## ภาคผนวก ง

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของ *Acinetobacter* sp. ASC1 (GU227612)

1 cggggaaacgt attcgcgagg gcaattctgat tcatcgatta actagcgatt cagatttcaa  
 61 gcttttgagtt gcaaacgctg agagtttgat catggctcag attgaacgct ggcggcaggg  
 121 ttaacacatg caagtcgagc gggggaagtt gcttcggtaa ctaacctagc ggcggacggg  
 181 tgagtaatgc ttaggaatct gcctattaat gggggacaac atctcgaaag ggatgcta  
 241 accgcatacg ccctacgggg gaaagcaggg gatcttcgga ccttgcgta atagatgagc  
 301 ctaagtcgga ttagctagtt ggtggggtaa aggcctacca aggcgacgat ctgtagcggg  
 361 tctgagagga tgatccgcca cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggagggc  
 421 gcagtgggga atattggaca atggggggaa ccctgatcca gccatgacgc gtgtgtgaa  
 481 aaggccttat ggttgtaaag cactttaagc gaggagggagg ctctgtagt taatactac  
 541 agagagtggg cgttactcgc agaataagca ccggctaact ctgtgccagc agccgcggta  
 601 atacagaggg tgcgagcgtt aatcggattt actgggcgta aagcgtgctg aggcggcttt  
 661 ttaagtcgga tgtgaaatcc ccgagcttaa cttgggaatt gcattcgata ctgggaagct  
 721 agagtatggg agaggatggt agaattccag gtgtagcggg gaaatgcgta gagatctgga  
 781 ggaataaccg tggcgaaggc agccatctgg cctaatactg acgctgaggt acgaaagcat  
 841 ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccatgccg taaacgatgt ctactagccg  
 901 ttggggcctt tgaggcttta gtggcgcagc taacgcgata agtagaccgc ctggggagta  
 961 cggtcgcaag actaaaactc aaatgaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt  
 1021 ggtttaattc gatgcaacgc gaagaacctt acctggcctt gacatactag aaactttcca  
 1081 gagatggatt ggtgccttcg ggaatctaga tacagggtgct gcatggctgt cgtcagctcg  
 1141 tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttttcctt acttgccagc  
 1201 atttcggatg ggaactttaa ggatactgcc agtgacaaac tggaggaagg cggggacgac  
 1261 gtcaagtcac catggccctt acggccaggg ctacacacgt gctacaatgg tcggtacaaa  
 1321 gggttgctac ctagcgatag gatgctaata tcaaaaagcc gatcgtagtc cggattggag  
 1381 tctgcaactc gactccatga agtcggaatc gctagtaatc gcggatcaga atgccgcggg  
 1441 gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc atggagtttg ttgcaccaga  
 1501 gtagctagcc tactgcaaag agggcgtaca cgtgtg

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของ *Pseudomonas* sp. ASC2 (GU227613)

1 catggctcag attgaacgct ggcggcaggg ctaacacatg caagtcgagc ggatgaaggg  
 61 agcttgctcc ctgatttagc ggcggacggg tgagtaatgc ctaggaatct gcctggtagt  
 121 gggggataac gttccgaaag gaacgctaata accgcatacg tcctacggga gaaagcaggg  
 181 gaccttcggg ccttgcgcta tcagatgagc ctaggctcgg ttagctagtt ggtgaggtaa  
 241 tggctcacca aggcgacgat ccgtaactgg tctgagagga tgatcagtca cactggaact  
 301 gagacacggg ccagactcct acgggagggc gcagtgggga atattggaca atgggcgaaa  
 361 gcctgatcca gccatgccgc gtgtgtgaaag aaggctcttc gattgtaaag cactttaagt  
 421 tgggaggaag ggcattaacc taatacgtta gtgttttgac gttaccaaca gaataagcac  
 481 cggctaactt cgtgccagca gccgcggtaa tacgaagggt gcaagcgta atcggaaata  
 541 ctgggcgtaa agcgcgcgta ggtggttcgt taagtggat gtgaaagccc cgggctcaac  
 601 ctgggaactg catccaaaac tggcgcgcta gagtacgta gaggggtggt gaatttcctg  
 661 tgtagcgggtg aaatgcgtag atataggaag gaacaccagt ggcgaaggcg accacctgga  
 721 ctgatactga cactgagggtg cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag  
 781 tccacgccgt aaacgatgtc aactagccgt tggaaatcct gagatttttag tggcgcagct  
 841 aacgcattaa gttgaccgcc tggggagtac ggccgcaagg ttaaaactca aatgaattga  
 901 cgggggcccg cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta  
 961 cctggccttg acatgctgag aactttccag agatggattg gtgccttcgg gaactcagac  
 1021 acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgtaac  
 1081 gagcgcaacc cttgtcctta gttaccagca cctcgggtgg gcaactctaa gagactgccg  
 1141 gtgacaaaacc ggaggaagggt ggggatgacg tcaagtcac atggccctta cggccagggc

1201 tacacacgtg ctacaatggg cggtagcaag ggtccccaag cccgagaggt ggagctaatt  
 1261 ccataaaacc gatcgtagtc cggatcgcag tctgcaactc gactgcgtga agtcggaattc  
 1321 gctagtaatt gtgaatcaga atgtcacggg gaatacgttc cggggccttg tacacaccgc  
 1381 ccgtcacacc atgggagtggt gttgctccag aagtagctag tctaactctc gggggacggt  
 1441 accacggatg atcatgactg ggtga

### 3. ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของ *Enterobacter* sp. ASC3 (GU227614)

1 gctcagattg aacgctggcg gcaggcctaa cacatgcaag tcgaacggta gcacagagag  
 61 cttgctctcg ggtgacgagt ggcggacggg tgagtaatgt ctgggaaact gcctgatgga  
 121 gggggataac tactggaaac ggtagctaatt accgcataac gtcgcaagac caaagagggg  
 181 gaccttcggg cctcttgcca tcagatgtgc ccagatggga ttagctagta ggtggggtaa  
 241 cggctcacct aggcgacgat ccctagctgg tctgagagga tgaccagcca cactggaact  
 301 gagacacggg ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattgcaca atgggcgcaa  
 361 gcctgatgca gccatgccgc gtgtatgaag aaggccttcg gttgttaaag tactttcagc  
 421 ggggaggaag gtgttggtgt taataaccac agcaattgac gttaccgca gaagaagcac  
 481 cggctaactc cgtgccagca gccgcggtaa tacggagggt gcaagcgta atcggaatta  
 541 ctgggcgtaa agcgcacgca ggcggtctgt caagtccgat gtgaaatccc cgggctcaac  
 601 ctgggaaact cattcgaaac tggcaggctg gactcttgta gaggggggta gaattccagg  
 661 tgtagcgggt aatgcgtag agatctggag gaataccggt ggcgaaggcg gccccctgga  
 721 caaagactga cgtcaggtg cgaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag  
 781 tccacgccgt aaacgatgtc gatttgaggg ttgtgccctt gaggcgtggc ttccggagct  
 841 aacgcgttaa atcgaccgcc tggggagtac ggccgcaagg ttaaaactca aatgaattga  
 901 cggggggccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg atgcaacgcy aagaacctta  
 961 cctgggtctg acatccacag aactttccag agatggattg gtgccttcgg gaactgtgag  
 1021 acagggtgct catggctgtc gtcagctcgt gttgtgaaat gttgggttaa gtcccgcaac  
 1081 gagcgcaacc cttatccttt gttgccagcg gttaggccgg gaactcaaag gagactgcca  
 1141 gtgataaact ggaggaaagg ggggatgacg tcaagtcac atggccccta cgaccagggc  
 1201 tacacacgtg ctacaatggc gcatacaaa agaaagcagc ttcgagagag caagcggacc  
 1261 tcataaagtg cgtcgtagtc cggattggag tctgcaactc gactccatga agtcggaattc  
 1321 gctagtaatt gtagatcaga atgctacgtg aatacgttcc cgggcttgta cacaccgccc  
 1381 gtcacaccat ggagtgggtg caaagaagta gtagctaacc ttcgggaggc gcttaccact  
 1441 ttgtgatcat ga

### 4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA ของ *Bacillus* sp. ASC4 (GU227615)

1 ttattgtatg tttttttttt tcgctcagga cgaacgctgg cggcgtgcct aatacatgca  
 61 agtcgagcgg acagatggga gccttgctcc ctgatgtag cggcggacgg gtgagtaaca  
 121 cgtgggtaac ctgcctgtaa gactgggata actccgggaa accggggccta ataccggatg  
 181 gttgtttgaa ccgcatggtt caaacataaa aggtggcttc ggctaccact tacagatgga  
 241 cccgcccgc attagctagt tggtaggta acggctcacc aaggcaacga tgcgtagccg  
 301 acctgagagg gtgatcggcc aactgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc  
 361 agcagtaggg aatcttccgc aatggacgaa agtctgacgg agcaacgcy cgtgagtgat  
 421 gaagggtttt ggatcgtaaa gctctgtgtg tagggaagaa caagtaccgt tcgaataggg  
 481 cggtaccttg acggtaccta accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcygt  
 541 aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggaat tattgggcyt aaagggctcg caggcggttt  
 601 cttaagtctg atgtgaaagc ccccggctca accggggagg gtcattggaa actggggaac  
 661 ttgagtgcag aagaggagag tggaaattcca cgtgtagcgg tgaatgcyt agagatgtgg  
 721 aggaacacca gtggcgaagg cgaactctctg gtctgtaact gacgctgagg agcgaagcgy  
 781 tggggagcga acaggattag ataccctggt agtccacgcy gtaaacgat agtgctaagt  
 841 gttagggggt ttccgcccct tagtgctgca gctaacgcat taagcactcc gcctggggag  
 901 tacggtcgca agactgaaac tcaaaggaat tgacggggcy ccgcacaagc ggtggagcat  
 961 gtgggttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct ctgacaatcc

1021 tagagatagg acgtcccctt cgggggcaga gtgacaggtg gtgcatgggt gtcgtcagct  
 1081 cgtgtcgtga gatggtgggt taagtcccg c aacgagcgca acccttgatc ttagttgcca  
 1141 gcattcagtt gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa ccgggaggaa ggtggggatg  
 1201 acgtcaaatc atcatgcccc tttatgacct ggggctacac acgtgctaca atggacagaa  
 1261 acaaagggca gcgaaaccg cgaggttaag ccaatcccca caaatctgtt ctcagttcgg  
 1321 atcgcagtct gcaactcgac tgcgtgaagc tggaatcgct agtaatcgcg gatcagcatg  
 1381 ccgcggtgaa tacgttcccc ggccttgtag acaccgcccg tcacaccacg agagtttgta  
 1441 acaccgaag tcgtgaggta accttttaga gccagccgcc gaagtggaca gatgatgggt  
 1501 gat



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว อัมทิกา เมืองวงษ์ เกิดวันที่ 18 มกราคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดสุพรรณบุรี สำเร็จ การศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะ วิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปีการศึกษา 2549

เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 ได้นำเสนอบทความเรื่อง “Production of Polyhydroxyalkanoates Using Organic Wastes from Biodiesel Production Process” ในการประชุมสัมมนาเชิงวิชาการระดับนานาชาติ “The 3<sup>rd</sup> Technology and Innovation for Sustainable Development Conference (TISD 2010)” ซึ่งจัดโดยคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างวันที่ 4-6 มีนาคม 2553 ณ โรงแรม รอยัลแม่โขง หนองคาย จังหวัด หนองคาย ได้รับรางวัล “ TISD 2010 Best Presentation Award” และได้นำเสนอบทความเรื่อง “Production of Polyhydroxyalkanoates Using Organic Wastes from Biodiesel Production Process” ในการประชุมวิชาการโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สำนักงานกองทุนวิจัยมหาบัณฑิต สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีครั้งที่ 4 ระหว่างวันที่ 30 มีนาคม- 1 เมษายน 2553 ณ โรงแรมจอมเทียน ปาล์ม บีช รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย