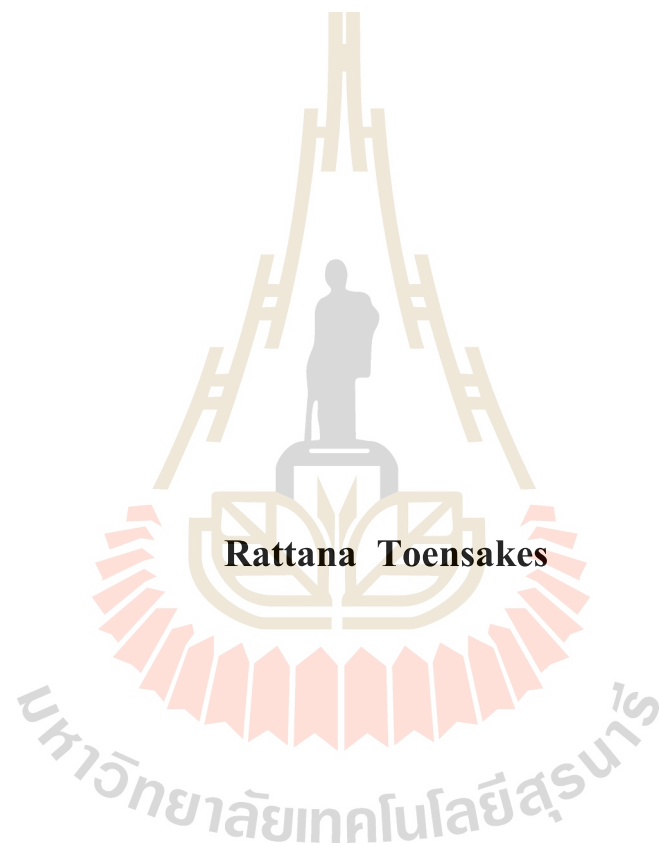


การคัดเลือกแบบที่เรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต
โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชามลพิษสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัย
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2560

**ISOLATION OF POLYHYDROXYALKANOATE-PRODUCING
BACTERIA BY UTILIZING CASSAVA PULP AS
A SUBSTRATE FOR BIODEGRADABLE
PLASTIC PRODUCTION**



**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Environmental Pollution and Safety**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2017

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต
โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(รองศาสตราจารย์ ดร.นเรศ เชื้อสุวรรณ)

ประธานกรรมการ



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิราภรณ์ โพธิ์วิชยานนท์)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



(รองศาสตราจารย์ ดร.วิสิทธิ์ แว่วสูงเนิน)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม)



(รองศาสตราจารย์ ดร.พรรณลดดา ติตตะบุตร)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม)



(ศาสตราจารย์ ดร.สันติ แม่นศิริ)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและพัฒนาความเป็นสากล



(อาจารย์ ดร.ชลาลัย หาญเจนลักษณ์)

คณบดีสำนักวิชาสาธารณสุขศาสตร์

รัตนา เทินสะเกษ : การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพ (ISOLATION OF POLYHYDROXYALKANOATE-PRODUCING BACTERIA BY UTILIZING CASSAVA PULP AS A SUBSTRATE FOR BIODEGRADABLE PLASTIC PRODUCTION)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิราภรณ์ โพธิ์วิชยานนท์, 213 หน้า

พลาสติกชีวภาพเป็นพลาสติกทางเลือกชนิดหนึ่ง ที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ ในรูปของพอลิเมอร์ภายในไซโตพลาซึมของเซลล์จุลินทรีย์ อันเนื่องมาจากสภาวะที่ไม่สมดุลของสารอาหาร การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate : PHA) โดยใช้ น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะเงื่อนไขที่เหมาะสมต่อการผลิต รวมถึงศึกษาคุณลักษณะของพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดผลิตได้ ผลการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำทิ้งระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่มีการเติมสีย้อม Nile red เพื่อเป็นการตรวจวัดการสังเคราะห์ PHA เบื้องต้น พบว่า โคโลนีของจุลินทรีย์ SUTR 1 และ SUTS 1 เป็นจุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกกับสีย้อม Nile red ผลการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ ระบุว่า SUTR 1 คือ *Candida rugosa* จัดอยู่ในกลุ่มของยีสต์และ SUTS 1 จัดเป็นแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* เมื่อตรวจสอบการสะสมของพอลิเมอร์ชีวภาพภายในเซลล์จุลินทรีย์ด้วยการย้อมสี Nile blue A พบว่า *Candida rugosa* SUTR 1 มีแนวโน้มสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์ได้ดีกว่า *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1 โดยตรวจวัดจากการปรากฏแกรนูลสีส้มแดงภายในเซลล์เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติมกากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการสกัดพอลิเมอร์ออกจากเซลล์ พบว่ามีปริมาณพอลิเมอร์สะสมภายในเซลล์ยีสต์ *Candida rugosa* SUTR 1 และแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1 สูงสุด 0.1367 และ 0.0727 กรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์ของยีสต์ *Candida rugosa* SUTR 1 โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 2 กรัมต่อลิตร และปริมาณกากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณพอลิเมอร์สะสมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 0.3912 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สูงสุด 10^9 CFU/ml ในชั่วโมงที่ 36 ของการศึกษา นอกจากนี้การทดสอบคุณสมบัติของสารประกอบของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มผลิตได้ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) พบว่าสเปกตรัมของพอลิเมอร์มีความคล้ายคลึงกับพอลิเมอร์มาตรฐาน

พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต [Poly-3-hydroxybutyrate : P(3HB)] ดังนั้นพอลิเมอร์ชนิดนี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นแผ่นฟิล์มหรือขึ้นรูปบรรจุภัณฑ์เพื่อนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่ผลิตจากกระบวนการปิโตรเคมีได้



สาขาวิชามลพิษสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัย
ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนักศึกษา รัฐาน

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ปิ่น ๒.

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิชัย คุ้ม

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ๒.

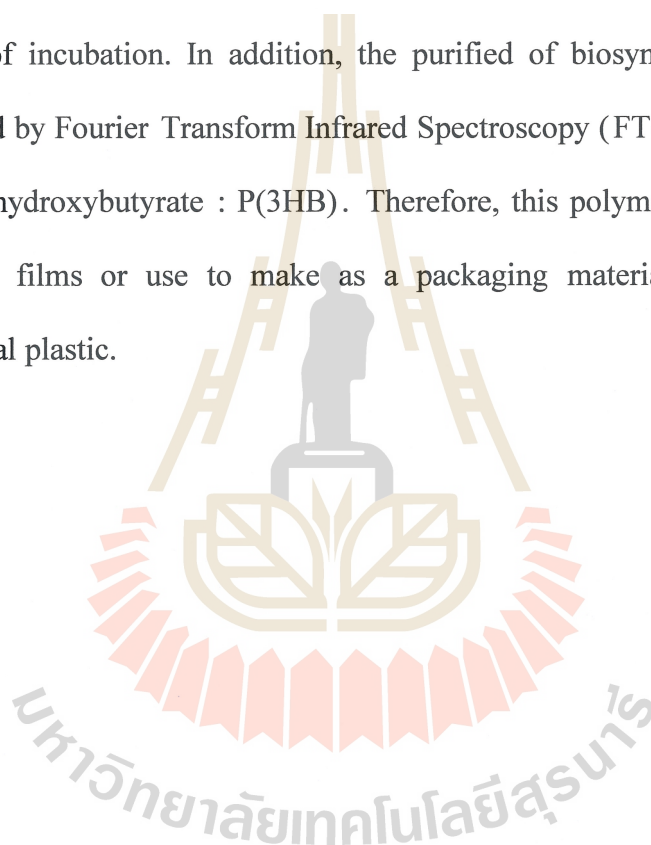
RATTANA TOENSAKES : ISOLATION OF POLYHYDROXYALKANOATE-
PRODUCING BACTERIA BY UTILIZING CASSAVA PULP AS A SUBSTRATE
FOR BIODEGRADABLE PLASTIC PRODUCTION.

THESIS ADVISOR : ASST.PROF.SIRAPORN POTVICHAYANON, Ph.D. 213 PP.

POLYHYDROXYALKANOATE/ BIODEGRADABLE PLASTIC/ PHA-PRODUCING
STRAIN/ CASSAVA PULP/NILE RED/ NILE BLUE A/ FOURIER TRANSFORM
INFRARED SPECTROSCOPY (FT-IR)

Polyhydroxyalkanoate (PHA) is one of the biodegradable polymers and promising alternative materials to synthetic plastics that can be produced by microorganisms and accumulated as inclusion in the cytoplasm under the imbalance of nutrient for cell growth. The aims of this study were to screen of PHA-producing strains by utilizing cassava pulp as a substrate for PHA production and optimize of process parameters for higher production and identification of this polymer. The primary screening of PHA-producing strains using Nile red dyeing technique with directly growing colonies on minimal medium agar was showed 2 isolates, SUTR 1 and SUTS 1, were positive colonies. The SUTR 1 was yeast *Candida rugosa* and SUTS 1 was bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Both isolates presented the spherical bright orange fluorescence granules inside the cells with Nile blue A staining under the fluorescence microscope at excitation wavelength 546 nm. However, SUTR 1 presented these granules more than that of SUTS 1. Quantification of PHA yield from *Candida rugosa* SUTR 1 and *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1 were cultivated in nitrogen limitation as ammonium sulfate 1.0 g/L and cassava pulp 50 g/L as a sole carbon source.

The results revealed that the maximum PHA production by SUTR 1 and SUTS 1 were 0.1367 and 0.0727 g/L, respectively. Moreover, the optimum conditions for PHA production by *Candida rugosa* SUTR 1 were examined including concentration of ammonium sulfate and agitation speed. It was found that the agitation speed at 150 rpm and ammonium sulfate at 2 g/L with 50 g/L of cassava pulp exhibited the maximum PHA production increased to 0.3912 g/L with the maximum cells growth at 10^9 CFU/ml after 36 h of incubation. In addition, the purified of biosynthesized polymer was characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and indicated that was Poly-3-hydroxybutyrate : P(3HB). Therefore, this polymer might be developed into coating films or use to make as a packaging material for replacement of petrochemical plastic.



School of Environmental Pollution and Safety

Academic Year 2017

Student's Signature อริศรา

Advisor's Signature วิไล

Co-Advisor's Signature ปิยะ

Co-Advisor's Signature วิไล

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิราภรณ์ โพธิ์วิชยานนท์ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำและให้คำปรึกษา รวมทั้งข้อคิดเห็นต่าง ๆ ต่องานวิจัยทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้แล้วเสร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นเรศ เชื้อสุวรรณ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วิศิษฐ์ แวสูงเนิน และ รองศาสตราจารย์ ดร.พรรณลดา ติตตะบุตร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมและคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสาขาวิชานามยสังเวชศาสตร์ สำนักวิชาสาธารณสุขศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และบุคลากรที่ให้ความอนุเคราะห์ เครื่องมือ อุปกรณ์ และห้องปฏิบัติการ รวมถึงอำนวยความสะดวกต่าง ๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์นี้แล้วเสร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บริษัท เซวาน์ดี สตาร์ช (2004) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์และกากมันสำปะหลังสำหรับเป็นวัตถุดิบในการศึกษาตลอดการวิจัยนี้

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจากทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์ สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ที่เป็นแรงบันดาลใจและกำลังใจ ในการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

รัตนา เทินสะเกษ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฅ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพลาสติก	4
2.1.1 เทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic)	4
2.1.2 เทอร์โมเซตติงพลาสติก (Thermosetting plastic)	5
2.2 พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastic)	5
2.2.1 พลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายโดยอาศัยแสง (Photodegradable)	5
2.2.2 พลาสติกกึ่งย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Semi-biodegradable)	6
2.2.3 พลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ (Completely biodegradable)	6
2.3 พอลิไฮดรอกซีแอลคาเนต (Polyhydroxyalkanoate : PHA)	6
2.3.1 โครงสร้างของ PHA	8

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.2	การจำแนกชนิดของ PHA	10
2.3.2.1	การจัดจำแนกกลุ่มโดยแบ่งตามชนิดของมอนอเมอร์ ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์	10
2.3.2.2	จำแนกกลุ่มโดยแบ่งตามจำนวนคาร์บอน ในหน่วยมอนอเมอร์	11
2.3.3	พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate : PHB)	11
2.4	จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์และสะสม PHA	12
2.5	เมตาบอลิซึมและระบบพลังงานของเซลล์	15
2.5.1	การสลายโมเลกุลของสารอาหารแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic respiration)	16
2.5.1.1	กระบวนการไกลโคลิซิส (Glycolysis pathway)	16
2.5.1.2	การสร้างแอสिटิลโคเอนไซม์ เอ (Acetyl Coenzyme A)	18
2.5.1.3	วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle หรือ Tricarboxylic acid cycle; TCA cycle)	18
2.5.1.4	การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Electron transfer)	20
2.5.2	การหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน	20
2.5.2.1	กระบวนการไกลโคลิซิส (Glycolysis หรือ Embden-Meyerhof Parnas pathway)	20
2.5.2.2	การหมัก (Fermentation)	20
2.6	วิธีการสังเคราะห์ PHA	21
2.7	วิธีการตรวจวัดการผลิต PHA ของเซลล์ (Methods for the detection of PHA granules in bacterial cells)	27
2.7.1	การตรวจวัดการสังเคราะห์ PHA บนโคโลนี (Detection of PHA synthesized on colonies)	27
2.7.2	การตรวจวัดการสังเคราะห์ PHA ภายในเซลล์ (Detection of PHA accumulation in cells)	28

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.8 แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์	28
2.9 การย่อยสลาย PHA ในธรรมชาติ	31
2.9.1 ภายใต้อากาศปลอดเชื้อ	31
2.9.2 ภายใต้อากาศการย่อยในธรรมชาติ	31
2.10 การผลิต PHA ในภาคอุตสาหกรรม	32
2.11 การนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์	33
2.12 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHA ของจุลินทรีย์	35
2.12.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์	35
2.12.2 แหล่งคาร์บอน	36
2.12.3 แหล่งไนโตรเจน	37
2.12.4 แหล่งฟอสฟอรัสและอาหารเสริมเกลือแร่	37
2.12.5 ออกซิเจน	38
2.12.6 พีเอช	38
2.12.7 อุณหภูมิ	39
2.13 การสกัดแยก PHA และทำให้บริสุทธิ์	39
2.13.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย	40
2.13.2 การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์	40
2.13.3 การสกัดด้วยเอนไซม์	40
2.14 เครื่องมือวิเคราะห์	41
2.14.1 เครื่องมือวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์	41
2.14.1.1 กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope)	41
2.14.1.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)	44
2.14.2 เครื่องมือวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของ PHA	45
2.14.2.1 แก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography : GC)	45

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.14.1.2 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy : NMR)	47
2.14.1.3 เจลเพอร์มิเอชันโครมาโตกราฟี (Gel permeation chromatography : GPC)	49
2.14.1.4 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)	50
2.15 วัสดุชีวมวล (Biomass)	50
2.15.1 มันสำปะหลัง (cassava)	50
2.15.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง	51
2.15.3 กากมันสำปะหลัง	51
2.15.4 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง	52
2.15.5 โครงสร้างของแป้ง	53
2.15.6 โครงสร้างของเส้นใย	54
2.15.7 การย่อยหรือการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)	54
2.15.7.1 การย่อยด้วยสารเคมี (Chemical hydrolysis)	55
2.15.7.2 การย่อยด้วยกรด (Acid hydrolysis)	55
2.15.7.3 การย่อยด้วยด่าง (Alkaline hydrolysis)	55
2.15.8 การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymetic hydrolysis)	55
2.15.8.1 เอนไซม์อะไมเลส (Amylase)	55
2.15.8.2 เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)	56
2.15.9 การย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์	57
3 วิธีดำเนินการวิจัย	58
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย (Instruments)	59
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (Chemicals)	60
3.3 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	61
3.3.1 Complex medium (broth)	61
3.3.2 Complex medium agar	61

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.3	Minimal medium (broth)	61
3.3.4	Minimal medium agar	62
3.3.5	Yeast peptone cassava (broth)	62
3.3.6	Yeast peptone cassava agar	62
3.4	วัสดุชีวมวล	63
3.4.1	กากมันสำปะหลัง	63
3.5	วิธีดำเนินการทดลอง	63
3.5.1	การทดลองช่วงที่ 1 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ มีความสามารถในการผลิต PHA	63
3.5.1.1	แหล่งที่มาของจุลินทรีย์	63
3.5.1.2	การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์	63
3.5.1.3	การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถ ในการผลิต PHA	64
3.5.1.4	การศึกษาการสะสม PHA ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์	65
3.5.1.5	การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง	66
3.5.1.6	การศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์	66
3.5.1.7	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)	67
3.5.1.8	การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์	69
3.5.1.9	การเก็บรักษาจุลินทรีย์	69
3.5.2	การทดลองช่วงที่ 2 ศึกษาปริมาณกากมันสำปะหลังที่เหมาะสม ต่อการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์	69
3.5.2.1	การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น	69
3.5.2.2	ศึกษาปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง	70
3.5.3	การทดลองช่วงที่ 3 การทดสอบความสามารถในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์	70

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.3.1	ทดสอบความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็น น้ำตาลและผลิต PHA ในขั้นตอนเดียวของจุลินทรีย์	70
3.5.3.2	ทดสอบความสามารถในผลิต PHA ของจุลินทรีย์ ด้วยน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังของยีสต์	71
3.5.4	การทดลองช่วงที่ 4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA	71
3.5.4.3	การศึกษาผลของความเข้มข้นแหล่งอาหารไนโตรเจน	71
3.5.4.4	การศึกษาผลของอัตราการเขย่า	72
3.6	วิธีการวิเคราะห์	72
3.6.1	การสกัด PHA ออกจากเซลล์จุลินทรีย์	72
3.6.2	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพอลิเมอร์โดยการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน (Functional group)	73
3.6.3	การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)	74
3.6.4	การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย (NH ₃ -N)	74
3.6.5	การคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์ (Kinetic parameter)	74
3.6.5.1	อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ)	75
3.6.5.2	ค่าสัมประสิทธิ์การผลิต PHB ต่อเซลล์	75
3.6.5.3	ค่าสัมประสิทธิ์การผลิต PHB จากหนึ่งกรัมใน ไตรเจน	75
3.6.5.4	ค่าประสิทธิภาพการผลิต	75
4	ผลการทดลองและอภิปรายผล	78
4.1	การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA	78
4.2	การศึกษาการเจริญเติบโต (Growth curve) ของจุลินทรีย์	87
4.3	การศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังของจุลินทรีย์	89
4.4	การศึกษาองค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง	92
4.5	การศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังของจุลินทรีย์	93

สารบัญ (ต่อ)

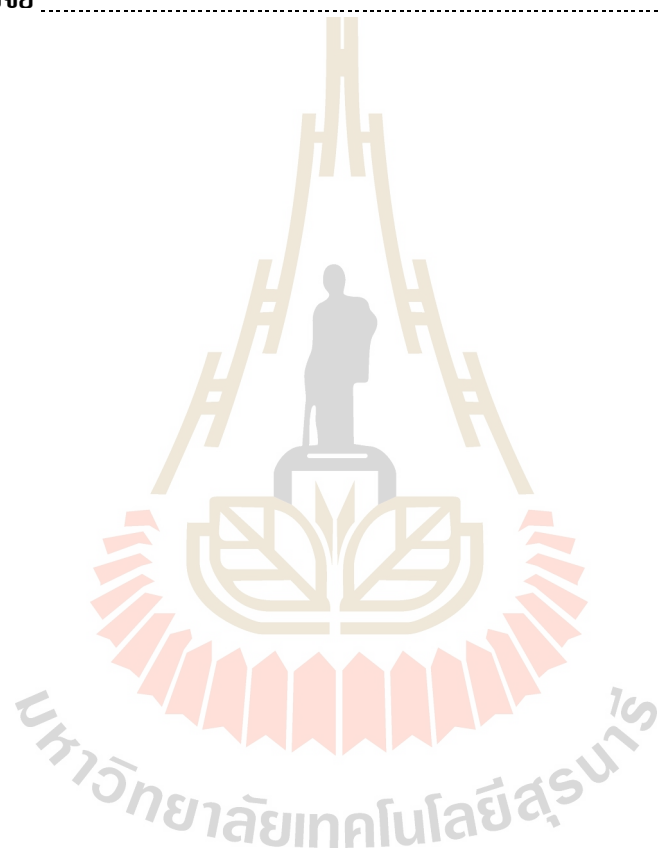
หน้า

4.5.1	ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังของยีสต์ <i>C. rugosa</i> SUTR 1	94
4.5.2	ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังของ <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1	95
4.5.3	ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังของ <i>Delftia</i> sp. SUTR	95
4.5.4	ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังของยีสต์ <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> TISTR 5118	101
4.6	การสะสม PHA ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์	103
4.7	การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์เมื่อมีการสะสม PHA	107
4.8	การผลิต PHA จากกากมันสำปะหลัง	111
4.8.1	การผลิต PHA ของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1	111
4.8.2	การผลิต PHA ของ <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1	113
4.9	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1	120
4.9.1	ผลของความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต และการสะสมพอลิเมอร์	121
4.9.2	การศึกษาอัตราการเขย่า	133
4.10	การศึกษาหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ (Functional group)	140
5	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	148
5.1	การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA	148
5.2	การศึกษาความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังของจุลินทรีย์	149
5.3	การสะสม PHA ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์	150
5.4	การผลิต PHA จากกากมันสำปะหลัง	151
5.5	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1	152
5.6	คุณลักษณะของพอลิเมอร์	153
5.7	ข้อเสนอแนะ	153

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม	155
ภาคผนวก	179
ประวัติผู้วิจัย	213



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	คุณสมบัติเชิงกลของ PHB และ Polypropylene 8
2.2	วัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ในการผลิต PHA 29
2.3	การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและของเหลือทิ้ง จากอุตสาหกรรมต่างๆ 30
2.4	บริษัทที่ทำการผลิต PHA ในเชิงอุตสาหกรรม 35
2.5	องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง 53
4.1	ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิต PHA 80
4.2	จำนวนเซลล์และอัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate ; μ) ของจุลินทรีย์ 88
4.3	คุณสมบัติของกากมันสำปะหลัง 92
4.4	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด จากการย่อยกากมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร 97
4.5	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของ <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1 99
4.6	การสะสมพอลิเมอร์ของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1 เมื่อใช้กากมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน 113
4.7	การสะสมพอลิเมอร์ของ <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1 เมื่อใช้กากมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน 115
4.8	การสะสมพอลิเมอร์ของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1 เมื่อแปรผันปริมาณไนโตรเจน 129
4.9	ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิต PHB ของยีสต์ <i>C.rugosa</i> SUTR1 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจน 132
4.10	การสะสมพอลิเมอร์ของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1 เมื่อแปรผันอัตราการเขย่า 137
4.11	ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิต PHB ของยีสต์ <i>C.rugosa</i> SUTR1 เมื่อแปรผันอัตราการเขย่า 138
4.12	สเปกตรัมที่เกิดขึ้นและ wave number ของหมู่ฟังก์ชัน ที่ดูดกลืนแสงของพอลิเมอร์ 142

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	สูตรโครงสร้างทั่วไปของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต	9
2.2	องค์ประกอบของ PHA granules	10
2.3	สูตรโครงสร้างทั่วไปของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต	12
2.4	(ก) Transmission electron microscope (TEM) ของ <i>R. eutropha</i> . (ข) Scanning transmission electron microscope (STEM) ของ <i>Cupriavidus necator</i> ที่มีการสะสม PHA granule ภายในเซลล์	14
2.5	สรุปขั้นตอนการสลายกลูโคส 1 โมเลกุล	17
2.6	ขั้นตอนการสลายกลูโคส 1 โมเลกุล โดยวิถี Entner-Doudoroff ของแบคทีเรีย	18
2.7	วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle หรือ Tricarboxylic acid cycle; TCA cycle)	19
2.8	กระบวนการหมักเอธานอลจากกลูโคส 1 โมเลกุล	21
2.9	ลักษณะของ <i>phbCBA</i> cluster ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ PHB ของ <i>Ralstonia eutropha</i>	24
2.10	วิธีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต	24
2.11	โคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารแข็งที่มีการเติม Nile red 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสง UV (ultraviolet light) (ก) โคโลนีที่มีการสังเคราะห์ PHA, (ข) โคโลนีที่ไม่มีการสังเคราะห์ PHA	27
2.12	ลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ที่ย้อมด้วยวิธี Nile blue A dyeing technique ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร (ก) เซลล์ที่มีการสะสม PHA (ข) เซลล์ที่ไม่มีการสะสม PHA	27
2.13	กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมและการสลายพอลิเบต้า ไฮดรอกซีบิวทิเรตที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของ <i>Ralstonia eutropha</i>	32
2.14	กระบวนการผลิตและสกัด PHA โดยทั่วไปในภาคอุตสาหกรรม	33

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
2.15	แสดงแผนผังการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์และ การเดินทางของแสง จากแหล่งกำเนิด 42
2.16	แถบสเปกตรัมของสีย้อม Nile blue A เมื่อให้แสงกระตุ้น (excitation light) จากแหล่งกำเนิดแสงผ่าน exciter filter Cy3 เพื่อตรวจวัดการสะสม PHA ภายในเซลล์ 43
2.17	หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 45
2.18	องค์ประกอบของเครื่อง Gas chromatography 46
2.19	องค์ประกอบของเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy : NMR) 48
2.20	กลไกการทำงานของเครื่องเจลเพอร์มิเอชันโครมาโตกราฟี (Gel permeation chromatography : GPC) 49
2.21	ลักษณะของต้นและหัวมันสำปะหลัง 51
2.22	โครงสร้างของกามันสำปะหลังจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงเม็ดแป้ง ที่ถูกกักในโครงสร้างเส้นใยของผนังเซลล์ 53
3.1	กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) 66
3.2	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Field Emission Scanning Electron Microscope : FE-SEM) 68
3.3	เครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) 73
3.4	สรุปขั้นตอนการดำเนินการทดลอง 76
3.5	สรุปขั้นตอนการสกัด PHA จากเซลล์จุลินทรีย์ 77
4.1	ลักษณะโคโลนีของ <i>Candida rugosa</i> SUTR 1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium agar 81
4.2	ลักษณะการเรืองแสงของโคโลนี <i>Candida rugosa</i> SUTR 1 ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร 81
4.3	ลักษณะเซลล์ <i>Candida rugosa</i> SUTR 1 ด้วยการย้อมติดสี Crystal violet ที่กำลังขยาย 100 เท่า 82

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.4	รูปร่างของ <i>Candida rugosa</i> SUTR 1 จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) ที่กำลังขยาย 4,000 เท่า 82
4.5	ลักษณะโคโลนีของ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> SUTS 1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium agar 83
4.6	ลักษณะการเรืองแสงของโคโลนี <i>Agrobacterium tumefaciens</i> SUTS 1 ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร 83
4.7	ลักษณะของเซลล์ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> SUTS 1 ด้วยการย้อมติดสีแกรม (Gram staining) ที่กำลังขยาย 100 เท่า 84
4.8	รูปร่างของ <i>Candida rugosa</i> SUTR 1 จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) ที่กำลังขยาย 17,000 เท่า 84
4.9	ลักษณะโคโลนีของ <i>Delftia</i> sp. SUTR 3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium agar 85
4.10	ลักษณะการเรืองแสงของโคโลนี <i>Delftia</i> sp. SUTR 3 ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร 85
4.11	ลักษณะของเซลล์ <i>Delftia</i> sp. SUTR 3 ด้วยการย้อมติดสีแกรม (Gram staining) ที่กำลังขยาย 100 เท่า 86
4.12	รูปร่างของ <i>Delftia</i> sp. SUTR 3 จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) ที่กำลังขยาย 12,000 เท่า 86
4.13	การเจริญเติบโต (Growth curve) ของจุลินทรีย์ 88
4.14	อัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate ; μ) ของจุลินทรีย์ 89
4.15	ลักษณะของโคโลนี <i>C. rugosa</i> SUTR 1 ที่นำมาทดสอบการย่อยแป้งมันสำปะหลัง 91
4.16	ลักษณะของโคโลนี <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1 ที่นำมาทดสอบ การย่อยแป้งมันสำปะหลัง 91

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.17 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1 จากการย่อย กากมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร	94
4.18 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของ <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1 จากการย่อย กากมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร	95
4.19 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของ <i>Delftia</i> sp. SUTR 3 จากการย่อย กากมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร	96
4.20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยกากมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร	97
4.21 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของ <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1 จากการย่อย กากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร	101
4.22 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของ <i>S. fibuligera</i> TISTR 5118 และ <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1	102
4.23 ลักษณะการสะสม PHA granule ภายในเซลล์ของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1 ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ (ก) Fluorescence microscope, (ข) Bright-field microscope, (ค) Fluorescence microscope overlay with bright-field microscope	105
4.24 ลักษณะการสะสม PHA granule ภายในเซลล์ของ <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ก) Fluorescence microscope, (ข) Bright-field microscope, (ค) Fluorescence microscope overlay with bright-field microscope	106
4.25 ค่าความเข้มของการเรืองแสงสีข้อม (fluorescence intensity spectrum) ของจุลินทรีย์ (ก) <i>C. rugosa</i> SUTR 1, (ข) <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1	107
4.26 ลักษณะของเซลล์ <i>C. rugosa</i> SUTR 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่ไม่เติมแหล่งอาหารไนโตรเจน ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) กำลังขยาย 5,000 เท่า	109
4.27 ลักษณะของเซลล์ <i>C. rugosa</i> SUTR 1 ที่มีการสะสม PHA granule ภายในเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) กำลังขยาย 5,000 เท่า	109

สารบัญรูป (ต่อ)

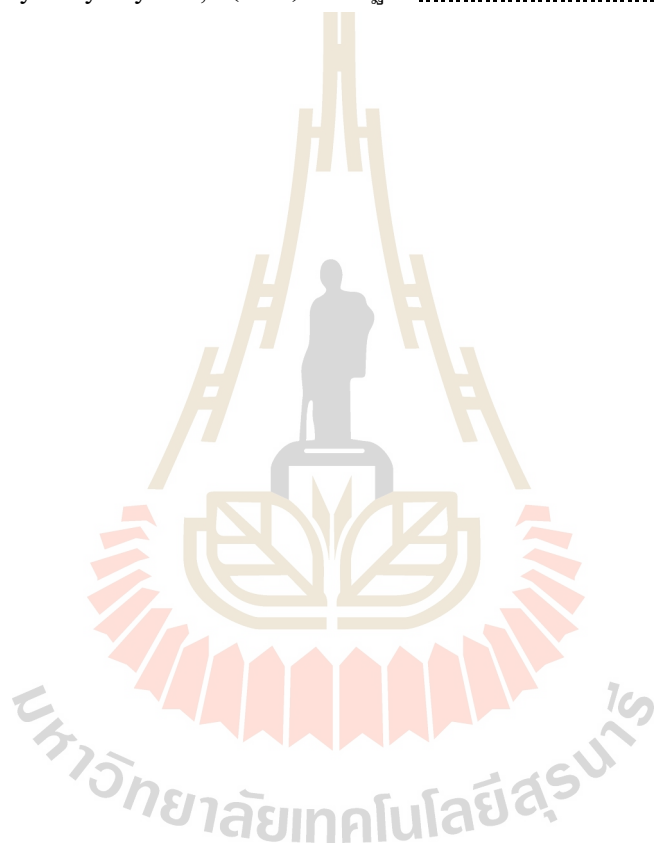
รูปที่		หน้า
4.28	ลักษณะของเซลล์ <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่ไม่เติมแหล่งอาหารไนโตรเจน ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) กำลังขยาย 5,000 เท่า	110
4.29	ลักษณะของเซลล์ <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1 ที่มีการสะสม PHA granule ภายในเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) กำลังขยาย 5,000 เท่า	110
4.30	การเจริญเติบโตและการสะสม PHA ของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1 เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวิซ์ จากกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน	112
4.31	การเจริญเติบโตและการสะสม PHA ของ <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1 เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวิซ์จากกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน	114
4.32	วิธีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากกลูโคส	118
4.33	การสะสม PHA ของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมไนโตรเจน	126
4.34	การสะสม PHA ของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร	126
4.35	การสะสม PHA ของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร	127
4.36	การสะสม PHA ของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร	127
4.37	วิธีการสังเคราะห์ PHB	131
4.38	ผลของอัตราการเขย่าต่อการสะสม PHA ของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1	135
4.39	ตัวอย่างผลึกพอลิเมอร์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ <i>C. rugosa</i> SUTR 1	143
4.40	ตัวอย่างผลึกพอลิเมอร์ที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรีย <i>A. tumefaciens</i> SUTS 1	143
4.41	อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ PHB มาตรฐาน	144
4.42	อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ <i>C. rugosa</i> SUTR 1	144
4.43	อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ <i>A. tumefaciens</i> SUTS	145

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่

หน้า

- 4.44 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 เปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ Poly-3-hydroxybutyrate ; P(3HB) มาตรฐาน.....145



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

มม.	=	มิลลิเมตร
ATP	=	Adenosine triphosphate
ATR	=	Attenuated total reflectance
CFU	=	Colony forming unit
-CH ₂	=	Methylene
-CH ₃	=	Methyl
C-O-C	=	Ethers
FADH ₂	=	Flavin adenine dinucleotide
FT-IR	=	Fourier-transform infrared spectroscopy
g	=	กรัม
g/l	=	กรัม/ลิตร
g-PHB/g-N	=	กรัม-PHB/กรัมของไนโตรเจน
g-PHB/l/h	=	กรัม-PHB/ลิตร/ชั่วโมง
HB	=	Hydroxybutyrate
HV	=	Hydroxyvalerate
MHz	=	Megahertz
NADH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen
NADPH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NH ₃ -N	=	แอมโมเนีย-ไนโตรเจน
NMR	=	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
ml	=	มิลลิลิตร
mg/l	=	มิลลิกรัม/ลิตร
-OH	=	Hydroxy group
PHA	=	พอลิไฮดรอกซีแอลคานอยด์ (Polyhydroxyalkanoate)
P(3HB)	=	พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต (Poly-3-hydroxybutyrate)
R-C=O	=	Esters

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

rRNA	=	Ribosomal ribonucleic acid
TCA cycle	=	Tricarboxylic acid cycle
UV	=	Ultraviolet
Q_p	=	ค่าประสิทธิภาพการผลิต (Volumetric productivity)
$Y_{p/x}$	=	ค่าสัมประสิทธิ์การผลิต PHB ต่อเซลล์ (PHB yield coefficient per cell)
$Y_{p/s}$	=	ค่าสัมประสิทธิ์การผลิต PHB จากหนึ่งกรัมไนโตรเจน (PHB yield coefficient per gram nitrogen)
μ	=	อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate)
$\mu\text{g-PHB/cell}$	=	ไมโครกรัม-PHB/เซลล์



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันการหาพลังงานทดแทนและวัสดุที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่ยั่งยืน ยิ่งทวีความต้องการมากขึ้น เพื่อตอบสนองต่อความต้องการและอำนวยความสะดวกสบายแก่มนุษย์ให้ดำเนินไปอย่างสอดคล้องกับธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ทั้งในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ การตอบสนองด้านการใช้งาน ความคงทนถาวร ตลอดจนราคาที่เหมาะสม ล้วนเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ได้มาจากระบวนการปิโตรเคมีเกือบทั้งสิ้น ซึ่งมีคุณสมบัติยืดหยุ่น มีความแข็งแรง ทนการซึมผ่านของน้ำ ทนความร้อน และทนต่อการกัดกร่อนด้วยสารเคมีหลายชนิด ที่นับว่าเป็นจุดเด่นของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวที่สามารถตอบสนองและให้ความพึงพอใจเป็นอย่างยิ่ง แต่ด้วยคุณสมบัติที่มีความคงทน และไม่สามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้ จึงส่งผลให้เกิดการสะสมของขยะพลาสติกจำนวนมาก นอกจากนี้การกำจัดด้วยการเผาก็จะส่งผลให้เกิดก๊าซเรือนกระจกแพร่กระจายไปในบรรยากาศ ซึ่งส่งผลกระทบต่ออุณหภูมิของโลกที่เพิ่มสูงขึ้น เพื่อแก้ปัญหาผลกระทบของขยะกับสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้น ทำให้เกิดการกระตุ้นที่จะพัฒนาการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี ซึ่ง โพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate : PHA) จัดเป็นวัสดุพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้โดยวิธีทางธรรมชาติ ที่มีคุณสมบัติที่ดีในการนำมาใช้แทนที่พลาสติกที่ผลิตจากกระบวนการปิโตรเคมี เนื่องจากย่อยสลายได้ดี (Doi, 1990; Anderson and Dawes, 1990) และมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับพลาสติกสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมพลาสติก (Chen, 2009) โดยแบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้าง PHA ซึ่งเป็นพอลิเอสเทอร์ของไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Hydroxyalkanoate) ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นและสะสมอยู่ในแกรนูล (Granules) ในสถานะที่เซลล์ขาดธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ออกซิเจนหรือในสถานะที่มีปริมาณคาร์บอนสูงเกินไป เพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำรองให้กับเซลล์ในสถานะที่เซลล์ต้องการสะสมพลังงานหรือคาร์บอน (Rehm and Steinbuchel, 1999; Chen, 2010; Mizuno, Ohta, Hyakutake, Ichinomiya and Tsuge, 2010) จึงหมายความว่า เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลนแหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์จะสลายพอลิเมอร์ดังกล่าวเพื่อดึงคาร์บอนที่สำรองไว้กลับไปใช้ในการเจริญเติบโต จึงเป็นการบ่งชี้อย่างชัดเจนว่าพอลิเมอร์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายได้ด้วยการบวนการทางชีวภาพ (López-Cuellar, Alba-Flores,

Gracida, Rodríguez, and Pérez-Guevara, 2011) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติคล้ายกับ โพลีเอทิลีน (polyethylene: PE) และ โพลีโพรไพลีน (Polypropylene: PP) แต่มีคุณสมบัติที่ยอมให้ออกซิเจนผ่านได้น้อยกว่าโพลีโพรไพลีนมาก จึงมีคุณสมบัติดีกว่าพลาสติกที่ใช้ในการบรรจุภัณฑ์ในปัจจุบัน เพราะทำให้ลดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ที่ต้องนำมาใช้เป็นสารเติมแต่ง (Additive) เพื่อประโยชน์ในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์และการนำไปใช้งาน อย่างไรก็ตามปัญหาหลักที่ทำให้การนำพลาสติกชีวภาพไปใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ยังไม่แพร่หลายเนื่องจากมีข้อจำกัดอยู่มากในเรื่องของต้นทุนของสารตั้งต้นในการผลิตที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์ ทำให้ไม่สามารถแข่งขันกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี ซึ่งใช้ต้นทุนการผลิตต่ำและสามารถผลิตในปริมาณมากได้อย่างรวดเร็ว

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA และศึกษาความเป็นไปได้ในการนำวัสดุชีวมวลจากอุตสาหกรรมการแปรรูปมันสำปะหลังมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากประเทศไทยมีความสามารถในการผลิตมันสำปะหลังประมาณ 17 ล้านตันต่อปี และมีปริมาณการส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังเป็นอันดับ 1 ของโลก (Thai Tapioca Starch Association, 2017)) ทำให้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งวัตถุดิบที่สามารถหาได้ง่ายและมีอยู่ตลอดฤดูกาลในประเทศไทย โดยในกระบวนการแปรรูปมันสำปะหลังจะก่อให้เกิดกากของเสียเป็นกากมันสำปะหลัง 0.33 ตันต่อตันหัวมันสำปะหลัง (Chavalparit and Ongwadee, 2009) นอกจากนี้ในกากมันสำปะหลังยังมีลักษณะทางเคมีที่สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ได้ รวมทั้งมีปริมาณเส้นใยและสิ่งเจือปนอื่นในปริมาณน้อย อีกทั้งยังมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างจำกัด จึงมีความเป็นไปได้ในการนำกากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการผลิต PHA ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตพลาสติกชีวภาพให้มีการแข่งขันกับพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเคมี และพัฒนาไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์และเพิ่มความเข้มแข็งให้กับประเทศในเชิงเศรษฐกิจ รวมถึงการสร้างมูลค่าเพิ่มและการจัดการทรัพยากรชีวมวลอย่างยั่งยืน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA ได้
- 1.2.2 เพื่อศึกษาปริมาณการสะสม PHA ภายในเซลล์จุลินทรีย์
- 1.2.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและผลิต PHA

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คัดแยกชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA จากกากมันสำปะหลัง ศึกษาปริมาณการสะสมสาร PHA ภายในเซลล์แบคทีเรีย รวมทั้งพิสูจน์เอกลักษณ์ของพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์ผลิตได้ โดยทำการแปรผันสภาวะการทดลอง ได้แก่ ปริมาณแหล่งอาหารไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และอัตราการใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA เพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพได้

1.4.2 เพื่อช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมในส่วนที่เกิดจากการใช้พลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้

1.4.3 เป็นแนวทางในการปรับปรุงกระบวนการผลิตที่ช่วยลดต้นทุนการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับทรัพยากรชีวมวลในภาคเกษตรกรรม

1.4.4 เพื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพและเป็นแนวทางในการพัฒนาต่อยอดในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพลาสติก

พลาสติกเป็นสารประกอบอินทรีย์จำพวกสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ที่เกิดการเชื่อมต่อของโมเลกุลของคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน และคลอรีน ด้วยการนำมาสังเคราะห์ผ่านกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization) พลาสติกที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่ได้จากปฏิกิริยาสังเคราะห์ทางเคมีซึ่งจะมีคุณลักษณะที่มีความแข็งแรง มีความเหนียว ทนต่อการกัดกร่อน และเป็นฉนวนไฟฟ้า เป็นต้น ส่วนพลาสติกที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติและใช้มาก คือ เซลแล็ก (Shellac) เป็นสารธรรมชาติที่ได้จากการแปรรูปจากเรซิน หรือสารคัดหลั่งที่ได้จากแมลงครั่ง (อัมทิกา เมืองวงษ์, 2553) สามารถนำมาหล่อเป็นรูปต่าง ๆ ตามแบบ โดยใช้ความร้อนและแรงอัดเพียงเล็กน้อย มีจุดหลอมเหลวระหว่าง 80-350 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของพลาสติก (นิทัศน์ จิระอรุณ, 2543) โดยพลาสติกสามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ

2.1.1 เทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic)

เป็นพลาสติกที่ใช้กันแพร่หลายที่สุด เป็นพลาสติกที่แข็งตัวโดยไม่อาศัยปฏิกิริยาทางเคมีแต่อาศัยคุณสมบัติทางกายภาพ เมื่อได้รับความร้อนจะอ่อนตัว เมื่อเย็นจะแข็งตัวคงรูปอยู่ได้ และสามารถเปลี่ยนรูปได้อีก โครงสร้างโมเลกุลพลาสติกประเภทนี้จะเป็นโซ่ตรงยาวที่มีการเชื่อมต่อระหว่างพอลิเมอร์น้อยมาก จึงสามารถนำมาหลอมเหลว หรือเมื่อผ่านการอัดแรงมากจะไม่เกิดการทำลายโครงสร้างเดิม และมีคุณสมบัติที่ทนต่อแรงดึงได้สูง เมื่อหลอมเหลวแล้วสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่พลาสติกประเภทนี้มีข้อเสียและขีดจำกัดของการใช้งาน คือไม่สามารถใช้งานที่อุณหภูมิสูง ๆ ได้ เพราะอาจเกิดการบิดเบี้ยวหรือเสียรูปทรงไป พลาสติกในกลุ่มของเทอร์โมพลาสติก ได้แก่ โพลีเอทิลีน (Polyethylene : PE) โพลีเอทิลีนเทอร์ฟทาเลต (Polyethylene terephthalate : PET) โพลีสไตรีน (Polystyrene : PS) โพลีโพรพิลีน (Polypropylene : PP) โพลีไวนิลคลอไรด์ (Polyvinyl chloride : PVC) โพลีเมทิลเมทาคริเลต (Polymethylmethacrylates : PMMA) โพลีเอไมด์ (Polyamides : PA) หรือไนลอน (Nylon) พวกลูออโรคาร์บอนโพลีเมอร์ (Fluorocarbon polymers) เช่น โพลีเตตระฟลูออโรเอทิลีนเรซิน (Polytetrafluoro Ethylene Resins : PTFE) หรือเทฟลอน (Teflon)

2.1.2 เทอร์โมเซตติงพลาสติก (Thermosetting plastic)

เป็นพลาสติกที่แข็งตัวด้วยปฏิกิริยาทางเคมีโดยอาศัยความร้อนและความดัน ภายหลังจากเกิดปฏิกิริยาพลาสติกจะแข็งตัวและไม่สามารถเปลี่ยนรูปได้อีก เนื่องจากพอลิเมอร์ประเภทนี้จะมีโครงสร้างเป็นแบบร่างแห แต่จะสามารถหลอมเหลวได้ในขั้นตอนการขึ้นรูปครั้งแรกเท่านั้น ซึ่งในขั้นตอนนี้จะมีปฏิกิริยาเคมีเกิดขึ้นทำให้เกิดพันธะเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุล ทำให้พอลิเมอร์มีรูปร่างถาวร จึงทำให้ไม่สามารถหลอมเหลวได้อีกเมื่อได้รับความร้อน และหากได้รับความร้อนสูงเกินไป จะทำให้พันธะระหว่างอะตอมในโมเลกุลแตกออกและได้สารที่ไม่มีคุณสมบัติของการเป็นพอลิเมอร์อีกต่อไป พลาสติกในกลุ่มของเทอร์โมเซตติงพลาสติก ได้แก่ ฟีนอลฟอร์มัลดีไฮด์เรซิน (Phenol-formaldehyde resin : PF) พอลิเอสเทอร์ชนิดไม่อิ่มตัว (Unsaturated polyesters : UP) อีพอกซีเรซิน (Epoxy resins) โพลียูรีเทน (Polyurethane : PU) ยูเรีย-ฟอร์มัลดีไฮด์ (Urea-formaldehyde : UF) และเมลามีน (Melamine : MF)

2.2 พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastic)

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพเป็นพลาสติกที่สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีภายใต้สภาวะแวดล้อมที่จำเพาะ ผลที่เกิดขึ้นจะทำให้คุณสมบัติบางประการสูญเสียไป ซึ่งวัดได้จากวิธีทดสอบมาตรฐานที่เหมาะสมกับพลาสติกและการนำไปใช้ในระยะเวลาหนึ่ง พลาสติกชีวภาพเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้จากกลไกการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และแบคทีเรียในธรรมชาติ โดยพลาสติกจะถูกเอนไซม์ย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือไฮโดรไลซิส ทำให้พลาสติกที่มีโมเลกุลใหญ่ลดขนาดลง จากนั้นเมื่อย่อยสลายแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำ มวลชีวภาพแก๊สมีเทน และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต จึงไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อตามาหลังการใช้งานเช่นเดียวกับพลาสติกทั่วไปที่ผลิตขึ้นจากปิโตรเคมี หรืออนุพันธ์ของปิโตรเคมี ซึ่งไม่สามารถย่อยสลายได้ ทำให้เกิดปัญหาในการจัดการอย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากปริมาณของขยะเหล่านี้มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในทุก ๆ ปี และเพื่อเป็นการลดปัญหาที่เกิดจากขยะพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้เหล่านี้ พลาสติกชีวภาพจึงเข้ามามีบทบาทมากขึ้นเพื่อทดแทนการใช้พลาสติกที่ผลิตได้จากปิโตรเคมี พลาสติกชีวภาพแบ่งตามลักษณะการย่อยสลายออกเป็น 3 ชนิด คือ ชนิดย่อยสลายโดยอาศัยแสง (Photodegradable) ชนิดที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Semi-biodegradable) และชนิดย่อยสลายทางชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ (Completely biodegradable) (Reddy, Ghai, and Rashmi, 2003)

2.2.1 พลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายโดยอาศัยแสง (Photodegradable)

พลาสติกประเภทนี้จะมีหมู่ฟังก์ชันที่ไวต่อแสง เช่น หมู่คาร์บอนิล เอทิลลีนิก หรือ

อะโรมาติก (Ethylenic or Aromatic group) ซึ่งหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้จะมีความไวต่อแสงอาทิตย์ โดยจะทำการดูดกลืนรังสียูวีภายใต้ปฏิกิริยาเคมีที่มีแสงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดการแตกออกของโครงสร้างพอลิเมอร์และมีน้ำหนักโมเลกุลลดลง และย่อยสลายได้ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากการย่อยขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของพลาสติก ความหนาของชิ้นส่วนพลาสติกและปริมาณของสารประกอบอื่นในพลาสติก พลาสติกที่สามารถทำลายโดยวิธีนี้ได้แก่ พอลิเอทิลีน (Polyethylene : PE) พอลิสไตรีน (Polystyrene : PS) พอลิโพรพิลีน (Polypropylene : PP) พอลิบิวทีน (Polybutene) พอลิบิวทาไดอิน (Polybutadiene) พอลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinyl chloride : PVC) และอะซิลโลไนไตรล์-บิวทาไดเอน-สไตรีน (Aceloinitrile-butadiene-styrene : ABS) ซึ่งได้ผสมสาร Photoactivator ลงไป (Harper and Mc Kallar, 1972)

2.2.2 พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Semi-biodegradable)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีแป้งและอนุพันธ์ของแป้งเป็นสารเติมแต่งในผลิตภัณฑ์พลาสติก กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในที่ ๆ มีความชื้น หรือ มีน้ำย่อยที่สามารถสลายอนุภาคสารดังกล่าว ทำให้พลาสติกมีความพรุนมากขึ้น และช่วยในการทำลายร่างแหของพลาสติก แต่ยังคงเหลือส่วนที่ไม่ใช่สารพอลิเมอร์ธรรมชาติ ซึ่งไม่สามารถย่อยสลายได้

2.2.3 พลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ (Completely biodegradable)

พลาสติกในกลุ่มนี้ แบคทีเรียสามารถใช้และสลายให้เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และสารชีวมวล ซึ่งพลาสติกชนิดนี้จะถูกสร้างและเก็บสะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด พลาสติกในกลุ่มนี้มีหลายชนิด ได้แก่ พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate : PHA) โพลีแลคติกแอซิด (Polylactic acid : PLA) โพลีคาร์โพลแลคโตน (ε-Polycaprolactone) เป็นต้น

2.3 พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate : PHA)

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate : PHA) เป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ ภายใต้สภาวะที่ไม่สมดุล คือ มีปริมาณสารอาหารที่จำเป็น (Essential nutrient) เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือแมกนีเซียม เป็นต้น อยู่ในปริมาณน้อย แต่มีปริมาณสารอาหารจำพวกคาร์บอนในปริมาณมากเกินไป (Sato, Tajima, Tannai, and Munekata, 1998; Reddy et al., 2003) จึงเกิดการสะสมสารพลังงานสำรองอยู่ในรูปพอลิเมอร์ ซึ่งเทียบได้กับไกลโคเจนที่สะสมในสัตว์ชั้นสูง หรือแป้งที่สะสมในพืช (Bloembergen, Holden, Hamer, Bluhm, and Marchessault, 1986) โดย PHA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะถูกเก็บไว้อยู่ในรูปของแกรนูลภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ ซึ่งจำนวนและขนาดของแกรนูลในแต่ละเซลล์จะแตกต่างกัน ตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น *Ralstonia eutropha* จะมีแกรนูล 8-13 แกรนูลต่อเซลล์ และ

มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.2-0.5 ไมครอน (Doi, 1990) PHA ชนิดแรกที่ถูกค้นพบและถูกนำมาศึกษากันอย่างแพร่หลาย คือ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate) หรือ PHB ซึ่งจัดเป็น PHA สายสั้นที่เรียกว่า short chain length PHA (scl-PHA) โดยพบในเซลล์ของ *Bacillus megaterium* โดย Lemoigne (1926) นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศส ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและสังเกตการสร้าง PHB ของ *Bacillus megaterium* พบว่าเกี่ยวข้องกับ การเกิดสปอร์ (Sporulation) ที่มีการสะสมของก้อนไขมัน (Lipid inclusion) ในช่วงการเจริญของแบคทีเรียเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานภายในเซลล์ ซึ่งเกิดจากการถูกจำกัดสารอาหารที่จำเป็น โดยองค์ประกอบของ PHA ประกอบด้วยมอนอเมอร์หลัก คือ กรดไฮดรอกซีแอลคานอยิก (Hydroxyalkanoic acid) ซึ่งจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปตามชนิดของมอนอเมอร์ เช่น PHA ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีความยาวของสายโซ่หมู่แทนที่สั้นจะเป็นเทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic) คือ สามารถนำมาขึ้นรูปได้เมื่อได้รับความร้อน และทำให้เป็นฟิล์ม ชีท หรือไฟเบอร์ได้ ซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเทียบเคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์โพลีโพรพิลีน (Polypropylene : PP) (Khanna and Srivastava, 2005) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่มีเอนไซม์เอสเตอเรส (Esterase) และเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เอส (Depolymerase) ได้สารที่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานของจุลินทรีย์ต่อไป จึงจัดเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ (Evans and Sikdar, 1990; Brandl, Gross, Lenz, and Fuller, 1990) ขณะที่ PHA ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ที่มีความยาวของสายโซ่หมู่แทนที่ปานกลางจะมีคุณสมบัติเป็นอีลาสโตเมอร์ (Elastomer) และ ยาง (Rubber) (Suriyamongkol, Weselake, Narine, Moloney, and Shah, 2007) นอกจากนี้หมู่ฟังก์ชันและระดับความอิมิตัวของพันธะยังมีผลต่อคุณสมบัติของพอลิเมอร์ด้วย

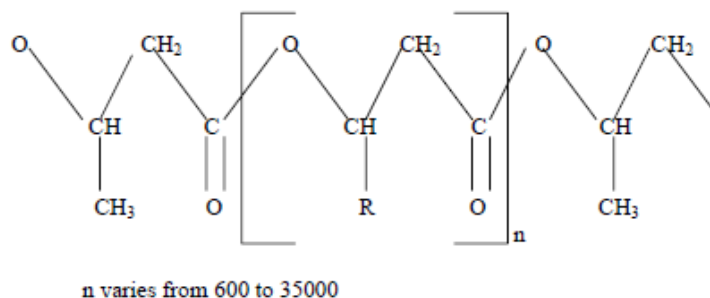
ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติเชิงกลของ PHB และ Polypropylene

คุณสมบัติ	พอลิเมอร์	
	PHB	Polypropylene
Melting Point, T_m (°C)	175	176
Density (g.cm ⁻¹)	1.25	0.905
Glass transition temperature (°C)	-4	-10
Molecular weight, MW (*10 ⁻⁵)	1-8	2-7
Tensile Strength (Mpa)	40	38
Extension to break (%)	6	400
UV resistance	Good	Poor
Solvent resistance	Poor	Good
Oxygen permeability (cm ³ m ⁻² atm ⁻¹ d ⁻¹)	45	1700
Biodegradability	+	-

ที่มา : (Sasikala and Ramana, 1996; Hocking and Marchessault, 1994)

2.3.1 โครงสร้างของ PHA

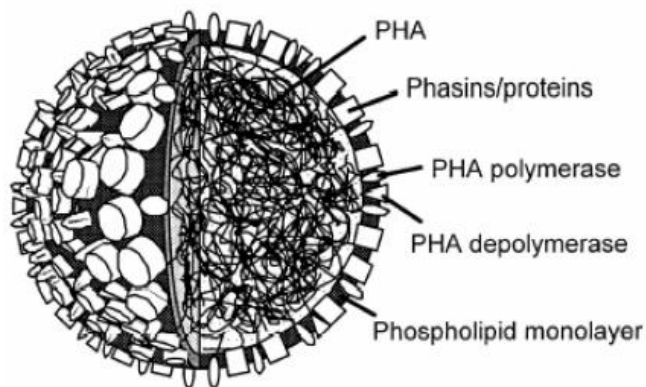
PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (Linear polyester) ซึ่งประกอบด้วยมอนอเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีแอลคานอยิกจำนวนคาร์บอน 3-14 อะตอม ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซีที่เป็นแบบอะลิฟาติก และอะโรมาติก (Doi, Kanesawa, and Tanahashi, 1992) โดยมอนอเมอร์จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของมอนอเมอร์ตัวหนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของมอนอเมอร์อีกตัวหนึ่ง ตรงตำแหน่งปีต้าคาร์บอนซึ่งจะเป็นไครัลคาร์บอน (Chiral carbon) แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration แต่ละมอนอเมอร์จะเชื่อมต่อกันแบบหัวต่อหาง (Head to tail configuration) เช่นเดียวกับ โพลีโพรพิลีน Polypropylene (PP) (Brandl et al., 1990) หมู่อัลคิล (R) อาจเป็นแบบพันธะไม่อิ่มตัว (Unsaturated) แบบอะโรมาติก (Aromatic) แบบฮาโลจีนิต (Halogen) หรือแบบแตกกิ่งก้าน (Branched) ได้ (Madison and Huisman, 1999) ทำให้สามารถพอลิเมอร์ไรซ์เป็นได้ทั้ง โฮโมพอลิเมอร์ (Homopolymer) และเฮเทอโรพอลิเมอร์ (Heteropolymer) ทำให้ PHA มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน (Reddy et al., 2003) สูตรโครงสร้างทั่วไปแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทั่วไปของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Khanna and Srivastava, 2005)

เมื่อ	n = 1	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนต : P(3HP))
		R = เมทิล (CH ₃)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต : P(3HB))
		R = เอทิล (C ₂ H ₅)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีวาลเอร์เรต : P(3HV))
		R = โพรพิล (C ₃ H ₇)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต : P(3HHx))
		R = บิวทิล (C ₄ H ₉)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอต : P(3HH))
		R = เพนทิล (C ₅ H ₁₁)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอต : P(3HO))
		R = เฮกซิล (C ₆ H ₁₃)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโนนาโนเอต ; P(3HN))
		R = เฮปทิล (C ₇ H ₁₅)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีเดคาโนเอต : P(3HD))
		R = ออกทิล (C ₈ H ₁₇)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีอันเดคาโนเอต : P(3HUD))
		R = โนทิล (C ₉ H ₁₉)	สารนี้คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีโดเดคาโนเอต : P(3HDD))
เมื่อ	n = 2	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ(4-ไฮดรอกซีบิวทีเรต : P(4HB))
เมื่อ	n = 3	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ พอลิ(5-ไฮดรอกซีวาลเอร์เรต : P(5HV))

น้ำหนักโมเลกุลของ PHA จะอยู่ในช่วงระหว่าง 2×10^4 - 3×10^6 ดาลตัน (Anderson and Dawes, 1990; Muller and Seebach, 1993; Chen, 2010) โดย PHA ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์จะอยู่ในรูปของ Discrete granules จำนวนและขนาดของแกรนูล จะขึ้นอยู่กับชนิดและสภาวะในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Sudesh, Abe, and Doi, 2000) เช่น *Ralstonia eutropha* จะมีแกรนูล 8-13 แกรนูลต่อเซลล์ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.2-0.5 ไมครอน (Doi, 1990) ซึ่งภายในแกรนูลจะมี PHA สะสมอยู่ตรงกลางของแกรนูล ซึ่งล้อมรอบด้วย Lipid monolayer และ Integrated protein โดย Lipid monolayer จะหันเอาด้านที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) เข้าหาแกนของแกรนูล ส่วน Integrated protein จะประกอบไปด้วย PHA polymerase, PHA depolymerase และ Phasin รวมทั้งโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ทราบหน้าที่ ลักษณะของ PHA granules แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 องค์ประกอบของ PHA granules (Zinn, Witholt, and Egli, 2001)

PHA ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์นั้นถูกสร้างขึ้นเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำรองให้กับเซลล์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนแหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์จะสลาย PHA เพื่อดึงคาร์บอนที่สำรองไว้กลับไปใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เป็นการบ่งชี้อย่างชัดเจนว่า PHA มีคุณสมบัติเป็นพอลิเอสเทอร์ที่สามารถย่อยสลายด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Biodegradation polymer) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ตรงตามความต้องการด้านพอลิเมอร์สำหรับอุตสาหกรรมยุคใหม่ (ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล, 2552) ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน รวมทั้งด้านการแพทย์และเกษตรกรรม (Steinbuechel and Hein, 2001)

2.3.2 การจำแนกชนิดของ PHA

แบ่งเป็น 2 ประเภท (Luengo, Garcia, Sandoval, Noharro, and Olivera, 2003; Taguchi and Doi, 2004) ดังนี้

2.3.2.1 จำแนกตามชนิดของมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์

แบ่งเป็น 4 ประเภทดังนี้

1) โฮโมพอลิเมอร์ (Homopolymer)

โฮโมพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ชนิดเดียวมาต่อรวมกัน เช่น พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-β-hydroxybutyrate) หรือ PHB เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ของ PHA ซึ่งอยู่ในกลุ่ม โฮโมพอลิเมอร์ที่มีสายสั้นและมีโครงสร้างง่ายที่สุด ทำเป็นผลึกได้ถึงร้อยละ 50 มีหมู่ R หรือ Side chain คือหมู่เมทิลมาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่ง β หรือตำแหน่งที่ 3 และมีคุณสมบัติคล้ายพอลิเมอร์สังเคราะห์ คือ โพลีโพรพิลีน

2) เฮเทอโรพอลิเมอร์ (Heteropolymer)

โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของพอลิเมอร์หลายชนิด

มาต่อรวมกันเป็นสายพอลิเมอร์ โดยเรียกชื่อตามจำนวนของมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบดังนี้

3) โคพอลิเมอร์ (Copolymer)

ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) [Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) หรือ PHBV] พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB-co-4HB)] เป็นต้น

4) เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer)

ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 3 ชนิดต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) [Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB-co-3HV-co-4HB)] เป็นต้น

2.3.2.2 จำแนกโดยแบ่งตามจำนวนคาร์บอนในหน่วยมอนอเมอร์

แบ่งออกเป็น 2 ประเภท (Chee, Tan, Samain, and Sudesh, 2010; Anjum, Zuber, Zai, Noreen, Anjum, and Tabasum, 2016) ดังนี้

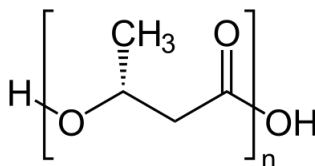
1) PHA สายสั้น (Short chain length-PHA, scl-PHA) เป็น PHA ที่ประกอบไปด้วยคาร์บอนจำนวน 3-5 อะตอม โดยตำแหน่งมอนอเมอร์ที่ถูกออกซิไดซ์อาจไม่ใช่ตำแหน่งที่ 3 แต่เป็นตำแหน่งอื่น เช่น 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (4C) (Kunioka, Nakamura, and Doi, 1988) และ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต (5C) (Valentin, Schoebaum, and Steinbuchel, 1992) ส่วนใหญ่มีโครงสร้างเป็นรูปผลึกและมีสมบัติที่เป็นพลาสติกที่ทนอุณหภูมิสูง (ทนร้อน) (Thermoplastic properties) ได้เป็นอย่างดี

2) PHA สายกลาง (Medium chain length-PHA, mcl-PHA) ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 6-14 อะตอม โดยมีการค้นพบ mcl-PHA ที่มีความแตกต่างของมอนอเมอร์ประมาณ 100 ชนิด โดยตำแหน่งที่มอนอเมอร์ถูกออกซิไดซ์จะเป็นตำแหน่งที่ 3 ทั้งหมด ยกเว้น 3-ไฮดรอกซีเฮกซาโนเอต โดยทั่วไป PHA สายกลาง มีความยืดหยุ่นได้ในธรรมชาติ (Elastomer และ Rubber)

PHA สายสั้นและสายกลางมักถูกสังเคราะห์โดยแบคทีเรียหลายชนิด และบางชนิดสามารถสังเคราะห์ได้ทั้ง PHA สายสั้นและสายกลางสะสมอยู่ในรูปแกรนูลภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ โดยความหนาแน่นของ scl-PHA granule จะสูงกว่า mcl-PHA granule เนื่องจาก mcl-PHA มีโครงสร้างสายอะตอมที่ยาวทำให้เกิดช่องว่างของพอลิเมอร์ในแกรนูล (Chee et al., 2010)

2.3.3 พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate : PHB)

พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ [Poly-(3-hydroxybutyrate) : P(3HB)] เป็น PHA ชนิดแรกที่ถูกค้นพบ จัดเป็น PHA ชนิดโฮโมพอลิเมอร์สายตรงที่มีมอนอเมอร์คือกรดไฮดรอกซีบิวทิริกมีโครงสร้างดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างทั่วไปของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Byrom, 1993)

PHB เป็นเทอร์โมพลาสติก สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีลักษณะไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) และมีการซึมผ่านของออกซิเจนต่ำ (Sudesh et al., 2000; Chang, Chang, and Tsai, 2012) และมีคุณสมบัติทางกายภาพที่คล้ายคลึงกับพลาสติกสังเคราะห์ เช่น พอลิโพรพิลีน (Polypropylene) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติที่ต้านทานต่อรังสียูวีได้ดี แต่ไม่ทนต่อสารละลาย เนื่องจาก PHB มีการแพร่ผ่านของแก๊สออกซิเจนต่ำ จึงสามารถนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ไวต่อออกซิเจนได้ดี PHB เป็นพอลิเมอร์ที่มีปริมาณผลึกในโครงสร้างสูงถึงร้อยละ 60-80 จึงทำให้พอลิเมอร์ดังกล่าวมีความแข็งแรงต้านทานต่อตัวทำละลายได้ดีมาก และมีความต้านทานต่อไขมันและน้ำมันปานกลางถึงดี มีความหนาแน่น 1.23-1.25 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มีจุดหลอมเหลวประมาณ 175 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วอยู่ในช่วง -5-5 องศาเซลเซียส (Reis, Serafim, Lemos, Ramos, Aguiar, and van Loosdrecht, 2003) ซึ่งเข้าใกล้กับอุณหภูมิการสลายตัว ดังนั้นคุณสมบัติทางความร้อนของ PHB อาจทำให้เพิ่มความเปราะและแตกง่ายของพอลิเมอร์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าร้อยละการยืดตัวก่อนขาด (Elongation at break) ของ PHB จะอยู่ที่ประมาณร้อยละ 2-10 ขณะที่ค่าร้อยละการยืดตัวก่อนขาดของพอลิโอสเตฟินมีค่าสูงถึงร้อยละ 400 (Albuquerque, Eiroa, Torres, Nunes, and Reis, 2007) ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวก่อนขาดเป็นค่าที่บอกคุณสมบัติของการยืดหยุ่นของพอลิเมอร์หากมีค่าต่ำ หมายถึงพอลิเมอร์นั้นจะมีคุณสมบัติการยืดหยุ่นต่ำ แข็งและเปราะแตกง่าย จึงเป็นข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม (Ojumu, Yu, and Salomon, 2004; Chang et al., 2012)

2.4 จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์และสะสม PHA

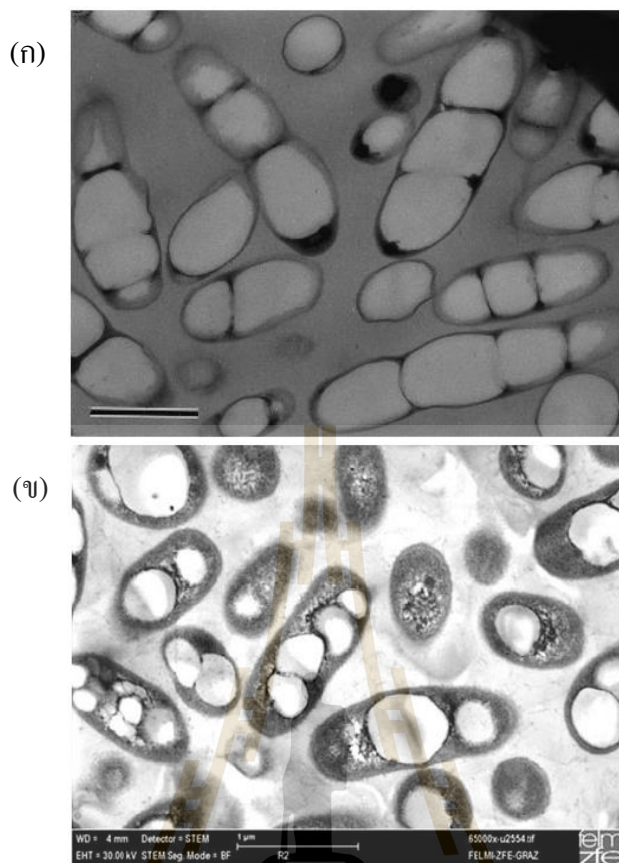
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต PHA สามารถจำแนกตามการเพาะเชื้อ (Culture) ได้ 2 กลุ่มคือ

- 1) กลุ่มที่มีความต้องการสารอาหารที่จำเป็นในปริมาณที่จำกัด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ ได้แก่ *Ralstonia eutrophus*, *Protomonas extorquens* เป็นต้น
- 2) กลุ่มที่ไม่ต้องการสารอาหารที่จำเป็นในปริมาณที่จำกัดและสามารถสะสมพอลิเมอร์ระหว่างการเจริญเติบโต เช่น *Alcaligenes latus*, mutant *Azotobacter vinelandii* เป็นต้น (Lui, Marsh,

and Forney, 1998)

นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่า แบคทีเรียมากกว่า 300 สายพันธุ์ ถูกระบุว่าสามารถผลิต PHA ได้ (Nubia et al., 2007; Volova, Kalacheva, Kozhevnikov, and Steinbüchel, 2007) ซึ่งจะสังเคราะห์ PHA ขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้สภาวะที่ถูกจำกัดสารอาหารบางชนิด แต่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป โดย PHA ที่สังเคราะห์ขึ้นจะถูกเก็บสะสมไว้ภายในไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ในรูปของแกรนูล ซึ่งปริมาณ PHA ที่สังเคราะห์ได้จะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและแหล่งคาร์บอนที่ใช้ โดยแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHA ได้มีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Alcaligenes* sp., *Acinetobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Corynebacterium* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Paracoccus* sp., *Rhodobacter* sp., *Rhodococcus* sp., *Rhodospseudomonas* sp., และ *Thermus* sp. เป็นต้น (Lu, Zhang, Wu, and Chen, 2003) ซึ่ง PHA ที่สร้างขึ้นจะสะสมอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์ (รูปที่ 2.4)

ทั้งนี้แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะสามารถผลิต PHA ได้ต่างชนิดกัน ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งมอนอเมอร์หรือโฮโมพอลิเมอร์ ขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะผลิต PHA ได้ในอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ในอัตราที่สูง โดย PHA ที่พบมากชนิดหนึ่งคือ พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Polyhydroxybutyrate : PHB) ซึ่งแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตได้ในปริมาณมากถึงร้อยละ 90 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดย Chen และคณะ (1991) รายงานว่า *Alcaligenes latus* สามารถสะสม PHB ได้สูงถึงร้อยละ 90 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและสามารถใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมในการผลิต PHB และได้มีการนำแบคทีเรียดังกล่าวไปใช้ในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรมของบริษัท Chemie Linz ประเทศออสเตรีย โดยมีปริมาณในการผลิต 1000 กิโลกรัมต่อสัปดาห์ ในถังหมักขนาด 15 ตารางเมตร (Harbak, 1992)



รูปที่ 2.4 (ก) Transmission electron microscope (TEM) ของ *R. eutropha*. (Sudesh et al., 2000)
 (ข) Scanning transmission electron microscope (STEM) ของ *Cupriavidus necator* ที่มีการสะสม
 PHA granule ภายในเซลล์ (Koller et al., 2013)

การสะสม PHA ของจุลินทรีย์เกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล โดยจุลินทรีย์จะสะสม PHA ได้ในปริมาณที่สูง เมื่อการเจริญของจุลินทรีย์เข้าสู่ช่วงระยะปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (Log phase) (Dawes and Senior, 1973) นอกจากความเข้มข้นของสารอาหาร ปัจจัยอื่นที่มีผลกระทบต่อปริมาณพอลิเมอร์ของเซลล์ ได้แก่ อัตราการเจริญซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราการละลายของออกซิเจน และช่วงอายุของเซลล์ที่นำมาวิเคราะห์ปริมาณพอลิเมอร์ (Haywood, 1958) และเมื่อมีการจำกัดไนโตรเจนในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (Log phase) แต่มีแหล่งคาร์บอนและพลังงานมากเกินไป ปริมาณ PHA ที่ผลิตได้เพิ่มเป็น 4 เท่าของปริมาณ PHA ที่ผลิตได้จากเดิมที่ไม่จำกัดปริมาณไนโตรเจน (Macrae and Wilkinson, 1958) โดยรูปร่างของเซลล์เมื่อมีการสะสม PHA จะเปลี่ยนเป็นค่อนข้างกลม และภายในแกรนูลจะมีการสะสม PHA ประมาณร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก และ โปรตีนร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ส่วนที่เหลือเป็นไขมันจำพวกกรดฟอสฟาติดิก

(Phosphotidic acid) และสารประกอบที่ละลายในอะซิโตนปริมาณเล็กน้อย และพบว่าการสะสม PHA จะหยุด เมื่อปริมาณ PHA มีประมาณร้อยละ 80 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง แม้ว่าจะยังคงมีเอนไซม์ และสับสเตรทที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHA อยู่ก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ไม่สามารถเก็บ PHA ที่ได้มากกว่านี้ภายใต้ปริมาณผนังเซลล์ที่จำกัด (Ballard, Holmes, and Snior, 1987) นอกจากนี้ยังมี การศึกษาถึงการผลิตสาร PHB จากจุลินทรีย์หลายชนิด พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ต่างกัน และในปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ เพื่อพัฒนาศักยภาพในการผลิตพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์

2.5 เมตาบอลิซึมและระบบพลังงานของเซลล์

เมื่อสิ่งมีชีวิตกินอาหารเข้าไปแล้วผ่านกระบวนการย่อยสลาย เมื่อได้สารอาหารโมเลกุลเล็ก แล้วจึงแพร่เข้าสู่เซลล์ ในเซลล์มีการสลายสารอาหารโมเลกุลเล็กเหล่านั้น เพื่อเปลี่ยนพลังงานของพันธะเคมีในสารอาหารให้อยู่ในรูปสารประกอบพลังงานสูง เช่น ATP (Adenosine triphosphate) ซึ่งเป็นสารเก็บพลังงานหมุนเวียนของเซลล์ในการสลายโมเลกุลของสารอาหาร ที่ได้ จากอเล็กตรอนที่คายออกมาในขณะที่มีการเคลื่อนย้ายจากโมเลกุลของกลูโคสเพียงโมเลกุลเดียว สามารถนำไปสังเคราะห์ ATP ได้ถึง 36 หรือ 38 โมเลกุล แล้วแต่ชนิดของเนื้อเยื่อ ทำให้ได้พลังงาน ที่นำไปใช้ในการดำรงชีวิต พลังงานจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทั้งปวง เช่น การเคลื่อนไหว การทำงานของเซลล์ประสาท การหายใจ การดูดซึมสารอาหาร การสังเคราะห์ โปรตีนหรือเอนไซม์ ตลอดจนการสังเคราะห์แสง ส่วนเกี่ยวข้องกับการใช้ การเก็บและการ เปลี่ยนแปลงพลังงานของสิ่งมีชีวิตทั้งสิ้น สิ่งมีชีวิตนั้นจำเป็นต้องดำรงอยู่ในสภาวะที่ระดับอุณหภูมิ เกือบคงที่ตลอด พลังงานส่วนใหญ่จึงอยู่ในรูปของพลังงานเคมีซึ่งเป็นรากฐานของกระบวนการ เมตาบอลิซึมในร่างกาย พลังงานในสิ่งมีชีวิตได้มาจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ซึ่ง หมายถึง ปฏิกริยาเคมีต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในเซลล์ โดยมีเอนไซม์เข้าร่วมปฏิกริยาเมตาบอลิซึมแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

1) แอนาบอลิซึม (Anabolism) เป็นกระบวนการสร้างสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่จาก สารโมเลกุลเล็ก โดยใช้พลังงานจากเซลล์ เช่น การสร้างโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ ซึ่งเป็นผลให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโต

2) แคทาบอลิซึม (Catabolism) เป็นกระบวนการสลายสารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นสาร โมเลกุลเล็ก เช่น การย่อยอาหาร การหายใจ โดยเฉพาะการหายใจจะทำให้ได้พลังงานในรูปของ ATP (Adenosine triphosphate) เป็นส่วนใหญ่ และได้สมมูลรีดิวซ์ (Reducing equivalent) แก่เซลล์ ซึ่งสารพลังงานสูงทั้ง 2 ชนิด สามารถนำไปใช้ในกระบวนการแอนาบอลิซึมต่อไป

กระบวนการสลายสารอาหารของเซลล์นี้เรียกว่า การหายใจระดับเซลล์ (Cellular respiration) หรือการสลายสารอาหารระดับเซลล์ บางครั้งการสลายสารอาหารของเซลล์บางชนิดไม่ต้องใช้แก๊สออกซิเจน ทำให้แบ่งแยกกระบวนการสลายโมเลกุลของสารอาหารในเซลล์ออกเป็น 2 แบบคือ การสลายโมเลกุลของสารอาหารแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic respiration) และการสลายโมเลกุลของสารอาหารแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic respiration)

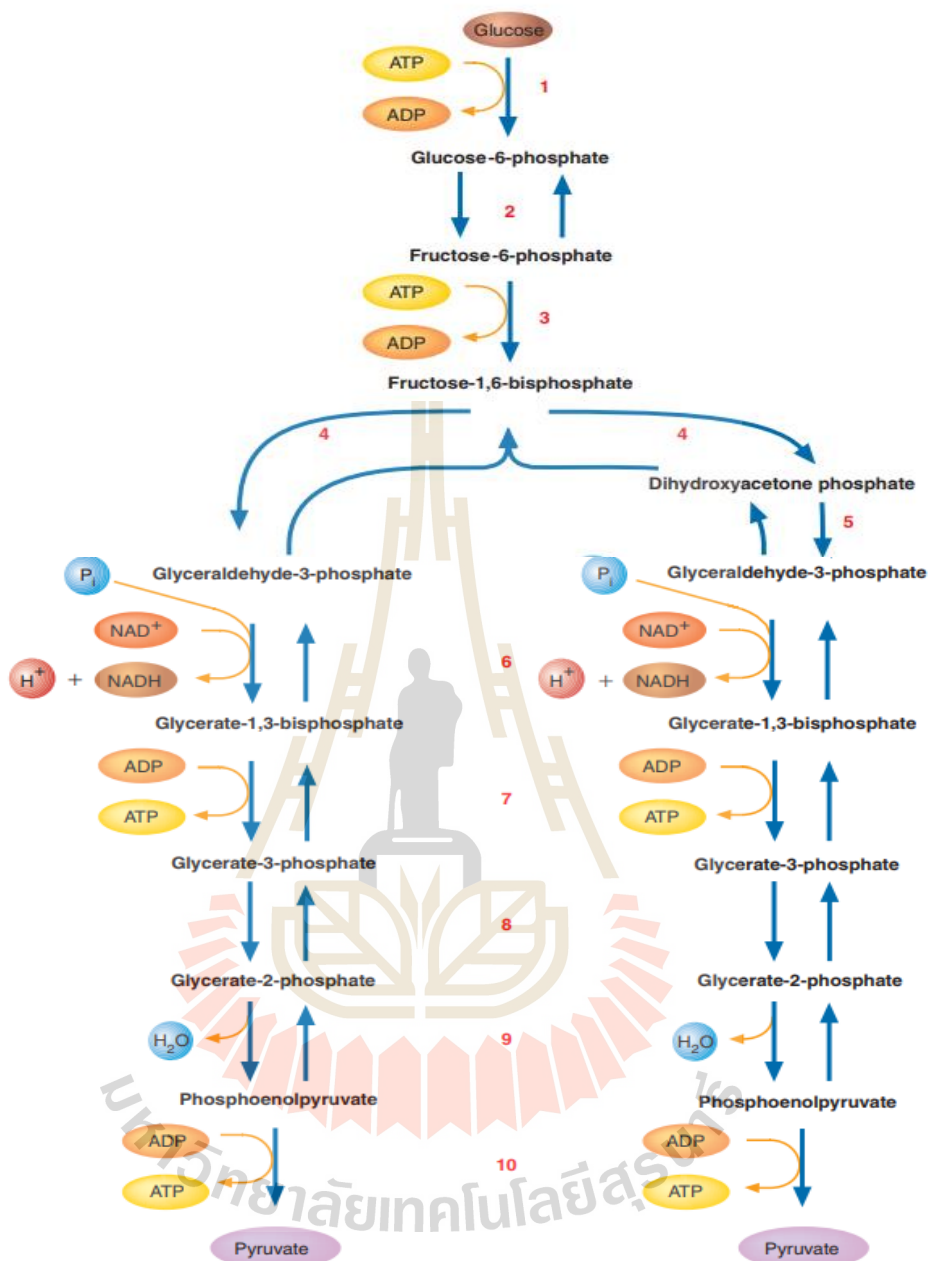
2.5.1 การสลายโมเลกุลของสารอาหารแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic respiration)

สารอาหารที่ให้พลังงาน คือ สารอาหารที่มีไฮโดรคาร์บอนเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน แต่สารอาหารหลักที่เซลล์นำไปสลายเพื่อให้ได้พลังงานนั้นคือ คาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะกลูโคส การสลายกลูโคส ซึ่งเป็นสารประกอบพลังงานสูง เพื่อให้ได้พลังงานออกมาพร้อมกับไดคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีพลังงานต่ำ แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ ไกลโคไลซิส ขั้นตอนการสร้างแอสिटิลโคเอนไซม์เอ ขั้นตอนวัฏจักรเครบส์และการถ่ายทอดอิเล็กตรอน ซึ่งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจะเกิดพร้อมกันไปกับกระบวนการ 3 ขั้นแรก ดังนี้

2.5.1.1 กระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway)

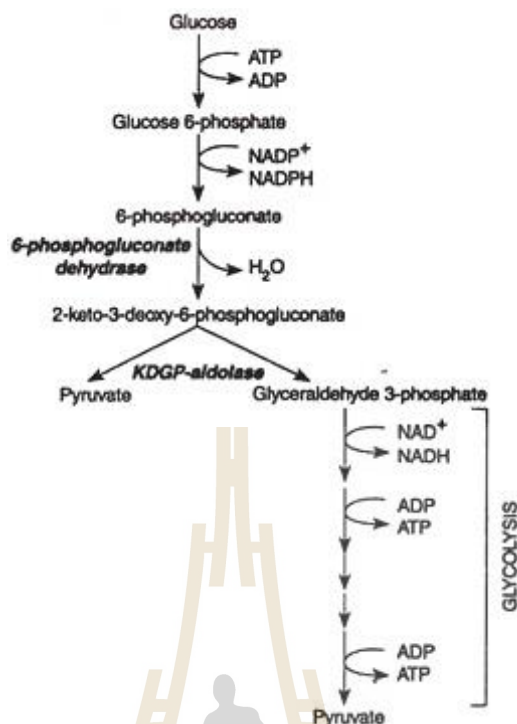
กระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis หรือ Embden-Meyerhof Parnas pathway) เป็นกระบวนการที่เกิดอยู่ในไซโทพลาซึม แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะแรกต้องใช้พลังงาน และระยะที่สองจะได้พลังงานออกมาระยะที่ใช้พลังงานจะใช้ ATP เพื่อเพิ่มหมู่ฟอสเฟตให้สารอาหาร เป็นขั้นตอนแรกของการสลายน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เมื่อผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส แล้วจะได้กรดไพรูวิก (Pyruvic acid) 2 โมเลกุล ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอนอยู่ในโมเลกุล 3 อะตอม ปฏิกิริยาช่วงนี้มีหลายขั้นตอนย่อย ๆ โดยมีเอนไซม์ต่างชนิดเป็นตัวกระตุ้นในแต่ละขั้นตอนเหล่านั้น ส่วนระยะที่ได้พลังงาน พลังงาน ATP จะเกิดขึ้นโดยวิธีสับสเตรตฟอสโฟริเลชัน (Substrat-level phosphorylation) และสารประกอบ NAD^+ ถูกรีดิวซ์กลายเป็น NADH ผลผลิตรวมที่ได้จากกระบวนการไกลโคไลซิส คือ ATP 2 โมเลกุล NADH_2 โมเลกุล และกรดไพรูวิก 2 โมเลกุล น้ำ 2 โมเลกุล อิเล็กตรอน 2 คู่ ซึ่งจะมี NAD^+ มารับไปเข้าระบบลูกโซ่การหายใจ (หรือกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน) และได้ ATP 4 โมเลกุล แต่มีการใช้ ATP ไป 2 โมเลกุล จึงได้จริงเพียง 2 โมเลกุล โดยไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นในกระบวนการไกลโคไลซิส และกระบวนการนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ สำหรับการสลายตัวของสารประกอบคาร์บอน 6 อะตอม (กลูโคส) เป็นกรดไพรูวิก ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอน 3 อะตอม (รูปที่ 2.5) ปฏิกิริยารวมเป็นดังนี้





รูปที่ 2.5 สรุปขั้นตอนการสลายกลูโคส 1 โมเลกุล

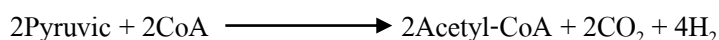
วิถี Entner-Doudoroff (ED หรือ Pentose phosphate) เป็นวิถีของการสลายน้ำตาลกลูโคสที่พบเฉพาะในแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas saccharophila*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, และแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด (Gottschalk, 1985; Boundless microbiology, 2018) โดยย่อยสลายกลูโคส 1 โมเลกุล และได้สารตัวกลาง (Intermediate) ไพรูเวตเกิดขึ้น 2 โมเลกุล และให้ ATP 1 โมเลกุล ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการสลายกลูโคส 1 โมเลกุล โดยวิถี Entner-Doudoroff ของแบคทีเรีย (Boundless microbiology, 2018)

2.5.1.2 การสร้างแอสิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl Coenzyme A)

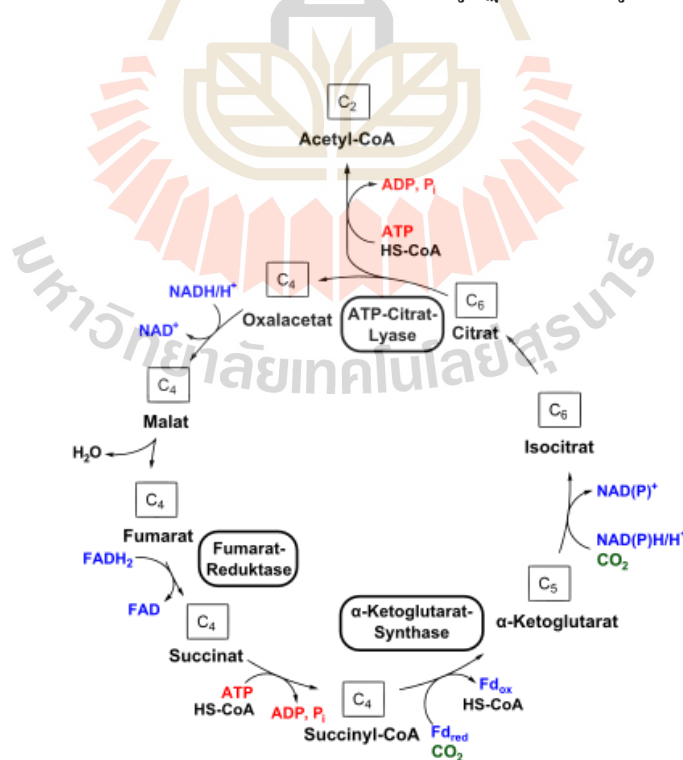
กรดไพรูวิกแต่ละโมเลกุลจะทำปฏิกิริยากับโคเอนไซม์เอ (Coenzyme A : CoA) เกิดเป็นแอสิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl Coenzyme A) ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอน 2 อะตอม การเปลี่ยนแปลงของกรดไพรูวิก 1 โมเลกุล จะได้คาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมเลกุล กับไฮโดรเจน 2 อะตอมซึ่งจะมีสารมารับไฮโดรเจนไปเข้าสู่กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน เช่นเดียวกับไฮโดรเจนซึ่งเกิดในไกลโคไลซิส เนื่องจากการสร้างแอสิติลโคเอนไซม์เอ จะมีการดึงคาร์บอนไดออกไซด์ออก กระบวนการช่วงนี้จึงเรียกว่ากระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) สมการรวมช่วงนี้คือ



2.5.1.3 วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle หรือ Tricarboxylic acid cycle : TCA cycle)

วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle หรือ Tricarboxylic acid cycle : TCA cycle) เป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องกัน เพื่อให้ได้พลังงาน ATP, NADH, H⁺ และ FADH₂ และได้สารตัวกลาง

(Intermediate) หลายชนิด เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้น (Precursor) ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน พิวรีน และพิริมิดีน เช่น กรดออกซาลิโคแอซิดิกและกรดแอลฟาคีโตกลูตาริกเป็นสารตั้งต้นของกรดอะมิโน บางตัว จากแอซิติลโคเอนไซม์เอ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 2 อะตอมปล่อยโคเอนไซม์เอให้เป็นอิสระ ส่วนที่เหลือจะรวมกับสารประกอบกรดออกซาลิโคแอซิดิกที่มีคาร์บอน 4 อะตอม ได้สารประกอบที่มีคาร์บอน 6 อะตอม คือ กรดซิตริก สารนี้ 2 โมเลกุลจะให้คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุลพร้อมกับปล่อยไฮโดรเจน 4 อะตอม ให้ตัวรับไฮโดรเจน คือ NAD จึงเหลือสารประกอบคาร์บอนที่มีคาร์บอน 5 อะตอม คือ กรดแอลฟาคีโตกลูตาริก (α -ketoglutaric acid) สารนี้ 2 โมเลกุลปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกไป 2 โมเลกุล พร้อมกับเปลี่ยน 2 ADP ให้เป็น 2 ATP และยังปล่อยไฮโดรเจนอีก 4 อะตอมให้กับ NAD เมื่อสารนี้รับน้ำเข้าไป 2 โมเลกุล จะกลายเป็นกรดซักซินิก (Succinic acid) 2 โมเลกุล ซึ่งเป็นสารประกอบมีคาร์บอน 4 อะตอม กรดนี้จะให้ไฮโดรเจนออกมา 4 อะตอม โดยมี FAD (Flavin adenine dinucleotide) เป็นตัวรับไฮโดรเจนเข้ากระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนแทน NAD ทำให้ได้สารประกอบใหม่ ซึ่งยังมีคาร์บอน 4 อะตอม เช่นกัน คือ กรดฟูมาริก (Fumaric acid) กรดฟูมาริก 2 โมเลกุลรับน้ำ จะได้สารประกอบที่มีคาร์บอน 4 อะตอม คือ กรดมาลิก (Malic acid) กรดมาลิก 2 โมเลกุล จะให้ไฮโดรเจน 4 อะตอม กับ NAD เข้าสู่กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน กลายเป็นกรดออกซาลิโคแอซิดิกเข้าสู่วัฏจักรใหม่ (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle หรือ Tricarboxylic acid cycle; TCA cycle)

2.5.1.4 การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Electron transfer)

การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Electron transfer) หรือ กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (Electron transport system, ETS) หรือลูกโซ่การหายใจ (Respiratory chain) หรือระบบไซโตโครม (Cytochrome system) เป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ที่เกิดขึ้นเป็นลูกโซ่อย่างต่อเนื่อง เพื่อนำอิเล็กตรอนและโปรตรอนในรูปของอะตอมไฮโดรเจนจาก NADH, H⁺ และ FADH₂ ส่งไปยังตัวรับอิเล็กตรอนอื่น ๆ ซึ่งรับเฉพาะอิเล็กตรอน ตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย คือ ออกซิเจน ในขณะที่เดียวกันมีจะพลังงานเกิดขึ้น ซึ่งบางปฏิกิริยามีพลังงานเกิดขึ้นมากพอที่จะสร้าง ATP จาก ADP และ Pi การสร้างพลังงานที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันนั้นเรียกว่า ออกซิเดทีฟ ฟอสโฟริเลชัน (Oxidative phosphorylation) หรืออิเล็กตรอนทรานสปอร์ต ฟอสโฟริเลชัน (Electron transport phosphorylation) ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน ประกอบด้วยเอนไซม์และโคเอนไซม์หลายชนิดทำหน้าที่รับและส่งอิเล็กตรอนและโปรตรอน



2.5.2 การหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน

การหายใจแบบนี้จะไม่ใช่แก๊สออกซิเจนเข้าร่วมปฏิกิริยาทำให้เกิดการสลายโมเลกุลอาหารได้ไม่สมบูรณ์ โดยตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้ายคือ กรดไพรูวิก (Pyruvic acid) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ไกลโคไลซิส (Glycolysis) และการหมัก (Fermentation) การสลายน้ำตาลกลูโคสแบบไม่ใช้ออกซิเจนมีขั้นตอนดังนี้

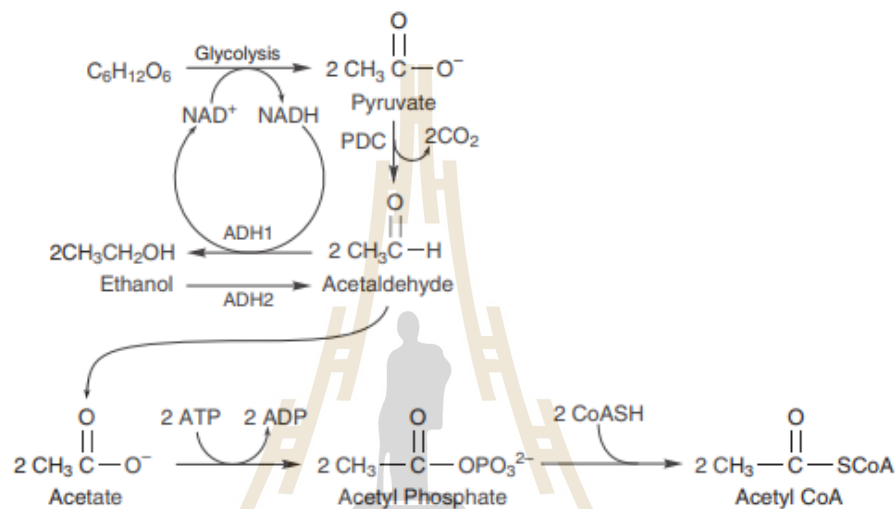
2.5.2.1 กระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis)

กระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis หรือ Embden-Meyerhof Parnas pathway) ดังกล่าวไว้ในกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน

2.5.2.2 การหมัก (Fermentation)

ในสถานะที่ไม่มีแก๊สออกซิเจนหรือแก๊สออกซิเจนไม่เพียงพอจะทำให้ NADH และ FADH₂ ถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับตัวรับอิเล็กตรอนต่าง ๆ ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียได้ เนื่องจากขาดแก๊สออกซิเจนซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในขั้นตอนสุดท้าย จึงไม่สามารถสร้าง ATP ได้ และมีการสะสม NADH และ FADH₂ มากขึ้นจึงทำให้ขาดแคลน NAD⁺ และ FAD มีผลให้ปฏิกิริยาไกลโคไลซิส วัฏจักรเครบส์ และการถ่ายทอดอิเล็กตรอนดำเนินต่อไปไม่ได้ และยังทำให้เซลล์ขาด ATP เซลล์จึงมีกระบวนการผันกลับให้ NADH กลายเป็น NAD⁺ เพื่อให้กระบวนการไกลโคไลซิสไม่หยุดชะงัก และสามารถสร้าง ATP ต่อไปได้ กระบวนการนี้เรียกว่า กระบวนการหมัก (Fermentation) กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ (Alcoholic fermentation)

โดยเริ่มจากไกลโคไลซิส เช่นเดียวกับการสลายกลูโคสโดยใช้ออกซิเจน และได้กรดไพรูวิก 2 โมเลกุล พร้อมปล่อย ATP 2 โมเลกุล และ 4 ไฮโดรเจน อะตอม เช่นกัน แต่ $\text{NADH} + \text{H}^+$ จะถ่ายทอดอะตอมของไฮโดรเจน ไปยัง Acetaldehyde ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 2 อะตอม ทำให้ไม่สามารถใช้พลังงานจากอิเล็กตรอนที่มีอยู่ในอะตอมของไฮโดรเจนมาสร้าง ATP ได้อีก ดังนั้นการสลายกลูโคส 1 โมเลกุลจึงได้ ATP เพียง 2 โมเลกุล (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.8 กระบวนการหมักเอทานอลจากกลูโคส 1 โมเลกุล

2.6 วิธีการสังเคราะห์ PHA

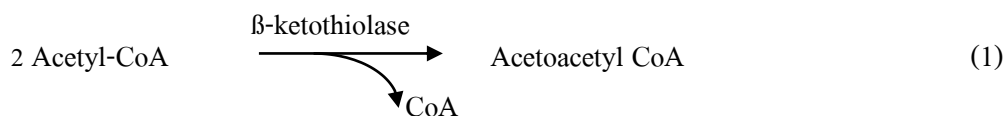
วิธีการสังเคราะห์ PHA จากจุลินทรีย์มีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางในวัฏจักรเครปส์ (Krebs' cycle หรือ Tricarboxylic acid cycle : TCA cycle) ซึ่งมีการศึกษาพบว่าแอซิติล โคเอนไซม์ เอ (Acetyl-CoA) เป็นส่วนประกอบสำคัญที่จะทำให้เกิด 3-ไฮดรอกซีแอลคาโนอิล โคเอนไซม์ เอ (3-hydroxyalkanoyl-CoA) ที่มีความยาวต่างกันขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นและเอนไซม์ที่จำเพาะในการสังเคราะห์ PHA โดยมีปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้อง รวมถึงเอนไซม์ 3 ชนิด (Braunegg, Lefebvre, and Gecser, 1998 ; Anderson and Dawes, 1990 ; Yamane, 1993; Paul and Liu, 2012) ดังนี้

1. β -ketothiolase (acetyl-CoA acetyl transferase)
2. Acetoacetyl CoA reductase
3. PHA synthase (or Poly(3-hydroxyalkanoate) synthase)

ปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนที่เกิดขึ้นในการสังเคราะห์ PHA ของ *R. eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียต้นแบบที่ใช้ในการศึกษากระบวนการสังเคราะห์และการสะสม PHA

ภายในเซลล์จากการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

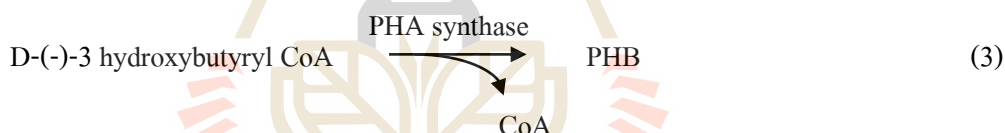
ขั้นที่ 1 2 โมเลกุลของ Acetyl CoA ถูกควบแน่นรวมกันกลายเป็น Acetoacetyl CoA โดยเอนไซม์ β -ketothiolase ดังสมการที่ 1



ขั้นที่ 2 NADPH รีดิวซ์ Acetoacetyl CoA ให้กลายเป็น D-(-)-3 hydroxybutyryl CoA โดยเอนไซม์ Acetoacetyl CoA reductase ดังสมการที่ 2

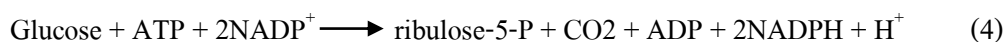


ขั้นที่ 3 เกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization) D-(-)-3 hydroxybutyryl CoA โดยเอนไซม์ Poly(3-hydroxybutyrate) synthase ดังสมการที่ 3



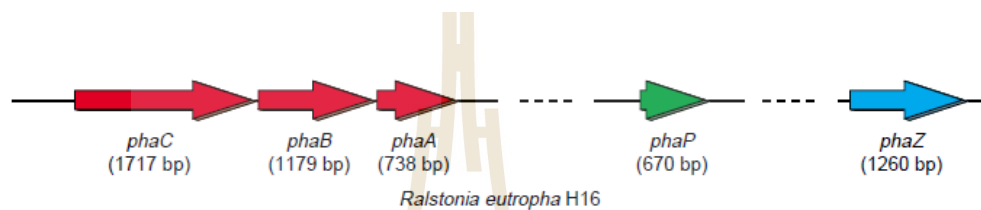
ในวิธีการสังเคราะห์ PHB โคเอนไซม์เอ (CoA) เป็นสารที่มีความสำคัญในการควบคุมการสังเคราะห์ PHB โดยอะซิetyl โคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) สามารถถูกออกซิไดซ์ผ่านทาง TCA cycle หรือสามารถทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น สำหรับสังเคราะห์ PHB ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะทางสิ่งแวดล้อมของเซลล์ ถ้าสัดส่วนของ NADPH/NADP เพิ่มขึ้น บางเอนไซม์ของ TCA cycle จะถูกยับยั้งโดยอะซิetyl โคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) ส่วนหนึ่งจะถูกเปลี่ยนไปสังเคราะห์ PHB อีกทั้งโคเอนไซม์เออิสระ (CoASH) ที่ความเข้มข้นสูง ๆ ทำให้เกิดการแข่งกันยับยั้งเอนไซม์ β -ketothiolase ดังนั้นจึงขัดขวางการสังเคราะห์ PHB ซึ่ง PHB นอกจากเป็นแหล่งคาร์บอนสำรองยังเป็นแหล่งรีดิวซ์ซึ่งพาวเวอร์อีกด้วย ดังนั้นจึงสามารถพิจารณาว่าเป็นตัวควบคุมการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์สำหรับเซลล์ ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ อาจจะนำมาอธิบายการเพิ่มขึ้นของสัดส่วน NADPH/NADP หรือการลดลงของสัดส่วน CoA/Acetyl-CoA ภายในเซลล์ (Morgunov, Solodovnikova, Sharyshev, Kamzolova, and Finogenova, 2004; Poblete-Castro et al., 2012) รีดิวซ์ซึ่งพาวเวอร์ (NADPH, H⁺) เป็นที่ต้องการสำหรับการสังเคราะห์ PHB โดยให้ผ่านทาง Entner-Doudoroff pathway (มักถูก

เรียกว่า Pentose phosphate pathway) ดังแสดงในสมการที่ 4 และผ่านทางกิจกรรมของ NADP ที่ขึ้นอยู่กับเอนไซม์ คือ Isocitrate dehydrogenase activity ดังแสดงในสมการที่ 5 หรือ Malic enzyme activity

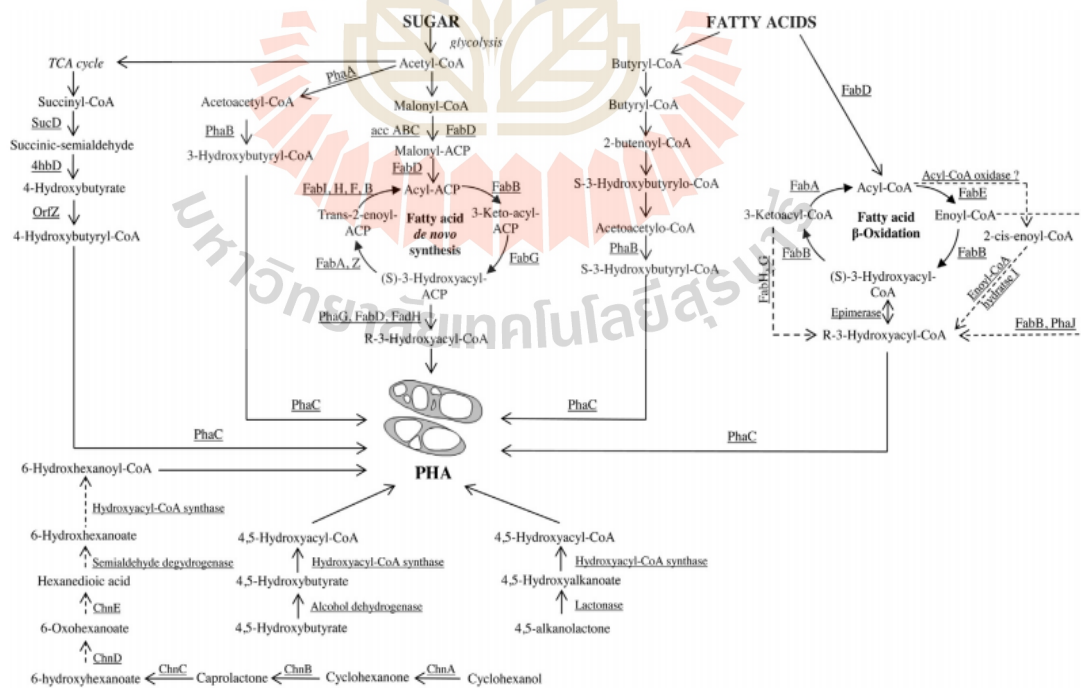


เมื่อจุลินทรีย์เจริญเติบโตอยู่ในสภาวะที่ไม่สมดุล (Unbalanced growth) หรือการเจริญถูกยับยั้ง (Growth suppressed condition) เช่น ขาดไนโตรเจน หรือมีการเจริญเติบโตเข้าสู่สภาวะคงที่ (Stationary phase) หรืออาจเกิดจากปริมาณธาตุอาหารไม่สมดุล ระหว่างปริมาณคาร์บอนที่สูงกับปริมาณไนโตรเจนที่ต่ำ จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างและการสะสม PHB ของ *Ralstonia eutropha* เมื่อมีสภาวะเหล่านี้เกิดขึ้น จะทำให้เกิดการทำงานของกระบวนการ TCA cycle และ Oxygen respiration ลดลง ส่งผลให้เกิดการสะสม NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) ที่สามารถยับยั้งการเข้าสู่ TCA cycle ของอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) ทำให้มีอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) ในปริมาณมาก ดังนั้นเมื่อมีอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) ปริมาณมาก กระบวนการสังเคราะห์ PHB จะเกิดขึ้น โดยอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) 2 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนให้เป็นอะซิโธแอสติลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) ด้วยเอนไซม์เบต้า-คีโธไอเลส (β-ketothiolase) จากนั้นอะซิโธแอสติลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) จะถูกเปลี่ยนให้เป็นไฮดรอกซีบิวทิลโคเอนไซม์เอ (D-(-)-3hydroxybutyryl-CoA) ด้วยเอนไซม์แอสติลโคเอรีดักเตส (Acetoacetyl CoA reductase) หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization) ของไฮดรอกซีบิวทิลโคเอนไซม์เอ (R-3hydroxybutyryl-CoA) ไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB ซินเทส (PHB synthase) ซึ่งมีลักษณะเป็นแกรนูลสะสมอยู่ภายในเซลล์โดยมี Monolayer phospholipid membrane ห่อหุ้มอยู่โดยอาจพบว่ามีโปรตีนบางชนิดสำหรับสังเคราะห์และย่อยสลายแทรกกระจายอยู่โดยรอบ และการควบคุมการผลิต PHB นั้นพบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสะสม PHB ที่เรียกว่า *phbCBA* cluster ซึ่งจะประกอบด้วย *phbA*, *phbB* และ *phbC* โดย *phbA* เป็นส่วนที่ควบคุมสำหรับการผลิต β-ketothiolase โดยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลงอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) ไปเป็นแอสติลโคเอรีดักเตสโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) สำหรับ *phbB* เป็นส่วนที่ควบคุมการผลิตหรือการสร้างเอนไซม์ NADPH-oxidoreductase ซึ่ง จะทำการเปลี่ยนอะซิโธแอสติลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) ให้เป็นไฮดรอกซีบิวทิลโคเอนไซม์เอ (R-3hydroxybutyryl-CoA) และสำหรับ *phaC* เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์

PHB ซินเทส (PHB synthase) โดยจะทำการสังเคราะห์พอลิเมอร์จากมอนอเมอร์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนอะซิโตแอซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) ให้เป็นไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ (R-3hydroxybutyryl-CoA) สำหรับ *phaP* เป็นยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์ฟาซิน (Phasins) ซึ่งทำหน้าที่ในการกระตุ้นการสะสม PHB โดยฟาซิน (Phasins) ที่ได้จะไปจับกับ PHB polymer เช่นกัน เพื่อกระตุ้นการสะสม PHB ภายในเซลล์ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลาย PHB ประกอบด้วยยีน *phaZ* ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์เอนไซม์ PHB depolymerase สำหรับลักษณะของ *phbCBA* cluster และวิธีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต แสดงดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ลักษณะของ *phbCBA* cluster ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ PHB ของ *Ralstonia eutropha* (Luengo et al., 2003; Mozejko-Ciesielska and Kiewisz, 2016)



รูปที่ 2.10 วิธีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีแอลคานอยด์ (Mozejko-Ciesielska and Kiewisz, 2016)

ในสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ คาร์โบไฮเดรตจะถูกคatabolize โดยวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis หรือ Embden-Meyerhof Parnas pathway) ได้เป็นไพรูเวท (Pyruvate) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน (Hydrogenation) เปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) และเข้าสู่วิถี TCA cycle ซึ่งถูกออกซิไดซ์ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ATP FADH₂ NADH และ NAHPH ซึ่งเป็นพลังงานและสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ปริมาณอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) ที่จะเข้าสู่วิถี TCA cycle ขึ้นกับปริมาณแร่ธาตุบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โดยในสภาวะที่ขาดแคลนแร่ธาตุ จะส่งผลทำให้ไม่เกิดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้ NADH และ NADPH เพิ่มปริมาณมากขึ้นและไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซิเตรทซินเทส (Citrate synthase) และเอนไซม์ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจิเนส (Isocitrate dehydrogenase) (Morgunov et al., 2004; Poblete-Castro et al., 2012) ทำให้อะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) เข้าสู่วิถี TCA cycle ได้น้อยลงและเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ PHB มากขึ้น (Doi, 1990; Braunegg et al., 1998)

อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาถึงวิถีการสังเคราะห์ PHA ของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่แตกต่างไปจากกระบวนการข้างต้น (รูปที่ 2.10) พอลิเมอร์หลายชนิดสามารถถูกสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์และชนิดของสารอาหาร โดยทั่วไปจะยอมรับกันว่าพอลิเมอร์หลายชนิดถูกสร้างขึ้นเพื่อให้เซลล์สมดุลกับ Redox equivalents ที่ถูกผลิตออกมา เพื่อเปลี่ยนสารอาหารไปเป็น PHA (Paul and Liu, 2012) เช่น *Pseudomonas oleovorans* จะมีกระบวนการแตกต่างไปจากกระบวนการดังกล่าว คือ ตัวกลางที่ได้จากกระบวนการเบต้าออกซิเดชัน (β -oxidation) ของกรดไขมันจะถูกนำเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ mcl-PHA (Medium chain length) โดยตรงซึ่งจะมี 3-hydroxyoctanoate (3HO) และ 3-hydroxyhexanoate (3HHx) เป็นองค์ประกอบหลักเมื่อใช้ออกเทน ออกทานอลหรือออกทานโนเอต เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการ ส่วนสายพันธุ์อื่น ๆ ในจีส *Pseudomonas* ยกเว้น *Pseudomonas oleovorans* จะมีความแตกต่างเล็กน้อยในกระบวนการสังเคราะห์ PHA คือ โคพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นจะถูกสังเคราะห์มาจากอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA)

เมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอน โมเลกุลของ Propionyl-CoA 1 โมเลกุล จะรวมตัวกับ 1 โมเลกุลของ Acetyl-CoA เกิดเป็น 3-ketovaleryl-CoA โมเลกุลนี้จะถูกรีดิวซ์ไปเป็น 3-hydroxyvalerate ซึ่งสามารถรวมอยู่ในพอลิเมอร์โดย PHA syntase ถ้ามี Acetyl-CoA หรือสร้างมาจาก Propionyl-CoA ที่ถูกย่อยสลาย HB มักจะถูกสร้างขึ้นมาเพราะเหตุนี้ทั้ง HB และ HV มักจะถูกผลิตออกมาจากกรดโพรพิโอนิกแต่สัดส่วนของ HB:HV จะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับของกรดโพรพิโอนิกที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับ Acetyl-CoA โคพอลิเมอร์ของ P(3HB:3HV) (60:40) ได้มาจากการใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว เมื่อ Propionyl-CoA 2 โมเลกุลรวมตัวกันจะผลิต

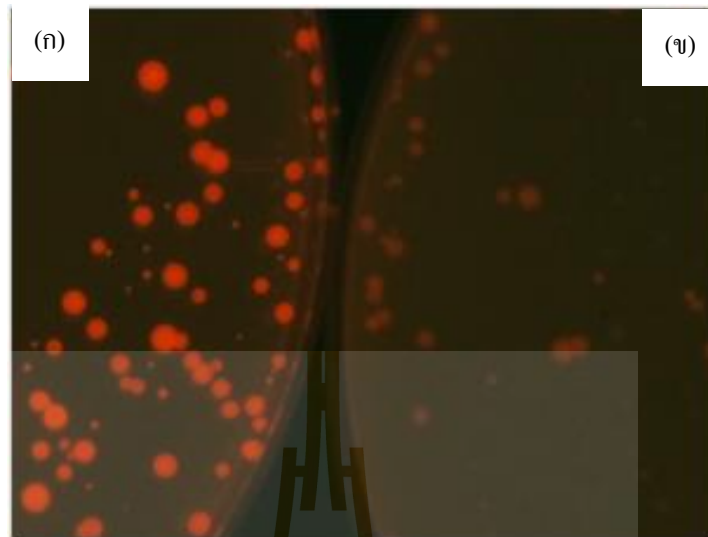
3-hydroxy-2-methylvaleryl-CoA ออกมา ทำให้เกิด Poly(3-hydroxy-2-methylvalerate) (Paul and Liu, 2012) เมื่อใช้กรดบิวทิริกและกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนโดยบิวทิเรตจะทำให้เกิดการผลิต PHB ในขณะที่วาเลอริกถูกเปลี่ยนไปเป็นทั้ง PHB และ PHV เมื่อใช้วาเลอริกเป็นสารตั้งต้นแทนกรดโพธิโอนิก เปอร์เซ็นต์ของ HV ในพอลิเมอร์จะเพิ่มขึ้น ยกตัวอย่างเช่นเมื่อใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว *Ralstonia eutropha* สามารถสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ที่มี HV monomer มากถึงร้อยละ 90 โดยโมล (Paul and Liu, 2012) โดย Metabolic pathway ที่เป็นไปได้สำหรับการสังเคราะห์พอลิเมอร์จากบิวทิเรตและวาเลอริก คือ กรดบิวทิริกจะถูกเปลี่ยนไปเป็น Butyryl-CoA หลังจากนั้น Butyryl-CoA จะเปลี่ยนไปเป็น Hydroxybutyryl-CoA ให้ Acetyl-CoA ออกมา 2 หน่วยที่อาจถูกนำมาใช้ใน TCA cycle โดยส่วนของ Hydroxybutyryl-CoA จะถูกนำไปผลิต HB วาเลอริกจะถูกเปลี่ยนไปเป็น Valeryl-CoA ต่อจากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็น Hydroxyvaleryl-CoA สำหรับผลิต HV (Lemos, Serafim, and Reis, 2006)

2.7 วิธีการทดสอบการผลิต PHA ของเซลล์ (Methods for the detection of PHA granules in bacterial cells)

การตรวจสอบความสามารถในการผลิต PHA ของเซลล์จุลินทรีย์ สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการย้อมสีของสารประเภทไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ เนื่องจากเกรนูลที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ได้เป็นสารประเภทไขมันชนิดหนึ่ง ด้วยการเติมสีย้อมที่เป็น Lipophilic dye

2.7.1 การทดสอบการสังเคราะห์ PHA บนโคโลนี (Detection of PHA synthesized on colonies)

การตรวจสอบความสามารถในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ ด้วยการตรวจวัดการสังเคราะห์ PHA บนโคโลนีของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นการตรวจวัดการสังเคราะห์ PHA เบื้องต้นเนื่องจาก PHA เป็นพอลิเอสเทอร์ชนิดหนึ่งจึงสามารถตรวจวัดการสังเคราะห์ PHA ด้วยการเติมสีย้อมที่เป็น Lipophilic dye เช่น Nile red ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้โคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่บนอาหารดูดซึมเข้าไปในเซลล์ โดยสามารถตรวจวัดเซลล์ที่มีการสังเคราะห์หรือไม่มีการสังเคราะห์ PHA ได้ภายใต้แสง UV (Ultraviolet light) ที่ความยาวคลื่น (Wavelength) 312 นาโนเมตร เพื่อดูการเรืองแสงของโคโลนี โดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA โคโลนีจะมีลักษณะเรืองแสงสีส้ม หรือชมพู (Shakeri, Ronhanian, and Emtiazi, 2011; Belal, 2013) (รูปที่ 2.11)



รูปที่ 2.11 โคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารแข็งที่มีการเติม Nile red 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้แสง UV (Ultraviolet light) ที่ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร (ก) โคโลนีที่มีการสังเคราะห์ PHA, (ข) โคโลนีที่ไม่มีการสังเคราะห์ PHA

(ที่มา : http://2012.igem.org/Team:Tokyo_Tech/Projects/PHAs/index.htm)



รูปที่ 2.12 ลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ที่ย้อมด้วยวิธี Nile blue A dyeing technique ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร (ก) เซลล์ที่มีการสะสม PHA, (ข) เซลล์ที่ไม่มีการสะสม PHA

(ที่มา : http://2012.igem.org/Team:Tokyo_Tech/Projects/PHAs/index.htm)

2.7.2 การทดสอบการสะสม PHA ภายในเซลล์ (Detection of PHA accumulation in cells)

เป็นการตรวจวัดการสังเคราะห์ PHA ด้วยการย้อมสีเซลล์ โดยใช้สีที่เป็น Lipophilic dye เช่น Nile blue A หรือ Sudan black B ซึ่งการย้อมด้วย Sudan black B เป็นการทดสอบเบื้องต้นที่สามารถส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั่วไปได้ โดยจะเห็นแกรนูลเป็นจุดสีดำภายในเซลล์ ส่วนการย้อมด้วย Nile blue A จะเห็นแกรนูลเป็นจุดสีแดงหรือสีส้มเหลืองภายในเซลล์ โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร (Berlaga et al., 2006; Rodtong et al., 2008; Khardenavis et al., 2009) เพื่อศึกษาปริมาณการสะสม PHA ในหน่วยของเปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่เซลล์ (รูปที่ 2.12)

2.8 แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์

สารตั้งต้นที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถนำมาใช้ในการผลิต PHA ได้นั้นมีอยู่หลายประเภทขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ โดยจำแนกออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

1. คาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส น้ำตาลทราย แป้งมันสำปะหลัง ลำปะหลัง
2. แอลกอฮอล์ เช่น เมธานอล กลีเซอรอล
3. อัลเคน เช่น เฮกเซน
4. กรดอินทรีย์ เช่น กรดบิวทิริก

ในปัจจุบันได้มีการผลิต PHA มาใช้แทนพลาสติกที่ผลิตมาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีเพิ่มมากขึ้น แต่ปัญหาสำคัญที่ตามมาคือ ต้นทุนในการผลิต PHA ที่มีราคาค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นทุนในการผลิตพลาสติกที่ผลิตมาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี (Lee and Choi, 1998) โดยพบว่าร้อยละ 40 ของต้นทุนในการผลิต PHA เป็นต้นทุนของวัตถุดิบในการผลิต PHA ซึ่งมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิต PHA ได้จากวัตถุดิบเหล่านี้ซึ่งมีราคาสูง (Song, Jeon, Choi, Yoon, and Park, 2008) ในอนาคตการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรมจะเพิ่มขึ้นจึงได้มีการลดต้นทุนในการผลิต PHA โดยนำของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ นำกลับมาใช้ใหม่เพื่อเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ในการผลิต PHA (Braunegg, Bona, and Koller, 2004) และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิต (ตารางที่ 2.2) โดยในธรรมชาติมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์ PHA ได้ และใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน โดยที่แหล่งคาร์บอนที่สำคัญที่แบคทีเรียนำมาใช้สังเคราะห์ PHA แต่ละชนิดจะมีผลต่อองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ได้แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.2 วัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ในการผลิต PHA (Braunegg et al., 2004)

แหล่งคาร์บอน	ประเภท
คาร์โบไฮเดรต	กากน้ำตาล (Molass) แป้ง และแป้งที่ผ่านการแตกตัวได้เป็นน้ำตาลมอลโตส (Maltose) น้ำตาลแลคโตสจากหางนม (Lactose from whey) เซลลูโลสที่ผ่านการแตกตัวแล้ว เช่น เส้นใยที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษหลังจากผ่านการไฮโดรไลซิสและการแลกเปลี่ยนไอออนเพื่อดึงเอาโลหะหนักออก
แอลกอฮอล์	ของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยมีเมทานอลและกลีเซอรอลผสมอยู่
ไขมันและน้ำมัน	ของเหลือทิ้งจากพืชและสัตว์
กรดอินทรีย์	กรดแลกติกจากอุตสาหกรรมนม

ตารางที่ 2.3 การผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์จุลินทรีย์	PHA มอนอเมอร์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)	PHA (g/l)	ปริมาณ PHA (wt%)	อ้างอิง
Hydrolyzed corn oil	<i>Pseudomonas putida</i>	mcl-PHAs	103	28	27.2	Shang et al., 2008
Whey	<i>P.hydrogenovora</i>	PHB	5	1.27	-	Koller et al., 2008
Sugar cane molasses	Mixed bacteria	PHBV	-	-	30	Albuquerque et al., 2007
Soy molasses	<i>P.corrugate</i>	P(HDD-HO-HTDE)	3.6	-	5-17	Solaiman et al., 2006
Enzymatic extruded starch	<i>Haloferax mediterranei</i>	PHBV	39.4	20	50.8	Chen et al., 2006
Petrochemical plastic waste	<i>P.putida</i> CA-3		1.14	0.84	43	Goff et al., 2007
Paper mill wastewater	Activated sludge	PHBV	-	-	48.2	Bengtsson et al., 2008
Bagasse hydrolysates	<i>Ralstonia eutropha</i>	PHB	11.1±0.4		56.5±0.5	Yu et al., 2008
Waste tomato starch	<i>R.eutropha</i> NCIMB 11599	PHB	179	94	55	Haas et al., 2008
Crude glycerol	<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134	PHB	50	-	48	Mothes et al., 2007
Palm kernel oil	<i>C.necator</i> PHB-4	P(HB-HV-HHx)	7.9	-	79	Bhubalan et al., 2008
Plant oils	<i>C.necator</i> H16	PHBV	4.4-5.6	6.8	80	Lee et al., 2008
Wheat bran	<i>P.aeruginosa</i> MTCC 7925	P(3HB-co-3HV-co-3HHD-co-3HOD)	0.168	-	12.5	Singh et al., 2009

2.9 การย่อยสลาย PHA ในธรรมชาติ

PHA เป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์และถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ที่อยู่ในธรรมชาติ โดยทั่วไปพบว่าปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของพลาสติก จะขึ้นกับประชากรของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม อุณหภูมิและคุณสมบัติของพลาสติก โดยอัตราเร็วของการย่อยสลายพลาสติกทางชีวภาพขึ้นกับปัจจัยดังนี้

1. ชนิดของพลาสติก พลาสติกที่จะย่อยสลายได้ด้วยวิธีนี้ต้องมีพันธะที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือไฮโดรไลซิสได้ หากเกิดปฏิกิริยาได้ง่ายการย่อยสลายก็จะเกิดขึ้นได้ง่าย
2. ชนิดของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดจะย่อยสลายสารได้ต่างกัน ดังนั้นถ้าชนิดของเอนไซม์ไม่เหมาะสมกับชนิดของพลาสติก การย่อยสลายจะเกิดขึ้นได้ยาก
3. สภาวะแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณออกซิเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต้องเหมาะสมกับเอนไซม์ กระบวนการย่อยสลายในธรรมชาติพบว่าสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Holmes, 1985) โดยมีกลไกการย่อยสลาย PHA แบ่งออกเป็นดังนี้

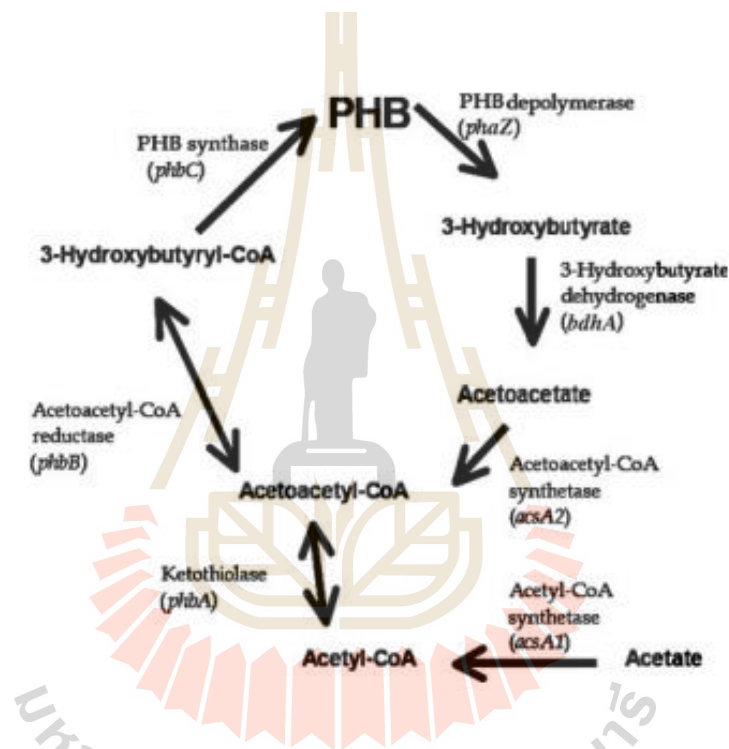
2.9.1 ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

PHA จะถูกย่อยสลายโดยกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะที่พีเอช (pH) สูง การย่อยสลายแบบนี้มีความสำคัญต่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น นำ PHA มาทำเป็นพาหะของตัวยาและก้อน ๆ ปล่อยออกมา หรือใช้เป็นไหมเย็บแผล เป็นต้น

2.9.2 ภายใต้สภาวะการย่อยสลายในธรรมชาติ

PHA จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เรส (Depolymerase) หรือเอนไซม์เอสเตอเรส (Esterases) จากการศึกษการย่อยสลาย PHB ซึ่งเป็นพอลิเอสเทอร์ในกลุ่ม PHA ที่สังเคราะห์และเกิดจากการย่อยสลายของ *R. eutropha* พบว่า PHB มีโครงสร้างอยู่ 2 รูปแบบ (Two biophysical conformation) คือ PHB ภายในเซลล์ที่ชั้นพื้นผิว (Surface layer) ของ PHB ไม่ถูกทำลาย เรียกว่า native PHB (nPHB) และภายนอกเซลล์ที่ชั้นผิวของ PHB ถูกทำลาย เรียกว่า denature PHB (dPHB) ซึ่งแต่ละรูปของ PHB (nPHB หรือ dPHB) สามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับแต่ละรูป ทำให้เกิดการสลาย PHB ซึ่งสามารถเกิดได้ 2 แนวทาง คือ การสลาย PHB ภายในเซลล์ และการสลาย PHB ภายนอกเซลล์ การสลาย PHB ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (Intracellular degradation) ของ *R. eutropha* จะเกิดขึ้นในสภาวะที่ขาดอาหาร (Starvation) ซึ่งเกิดจากกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) PHB ภายในเซลล์ (Intracellular PHB) โดยเอนไซม์ Intracellular PHB depolymerase ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ Intracellular PHB depolymerase สามารถสลาย PHB ในรูปของ nPHB เท่านั้น และไม่สามารถสลาย PHB ในรูปของ dPHB ได้

การสลาย PHB ที่เกิดภายนอกเซลล์ (Extracellular degradation) ของ *R. eutropha* จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์มีการปลดปล่อย PHB ออกจากเซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์ตาย เซลล์แตกหรือเกิดจากการสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) ทำให้ PHB อยู่ในรูปของ dPHB ที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้นภายนอกเซลล์ (Extracellular PHB hydrolysis) จากการทำงานของเอนไซม์ Extracellular PHB depolymerase ที่สังเคราะห์โดยแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถสลาย PHB (PHB-degrading bacteria) เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มาจากภายนอกเซลล์ (Braunegg et al., 1998) ดังแสดงในรูปที่ 2.13



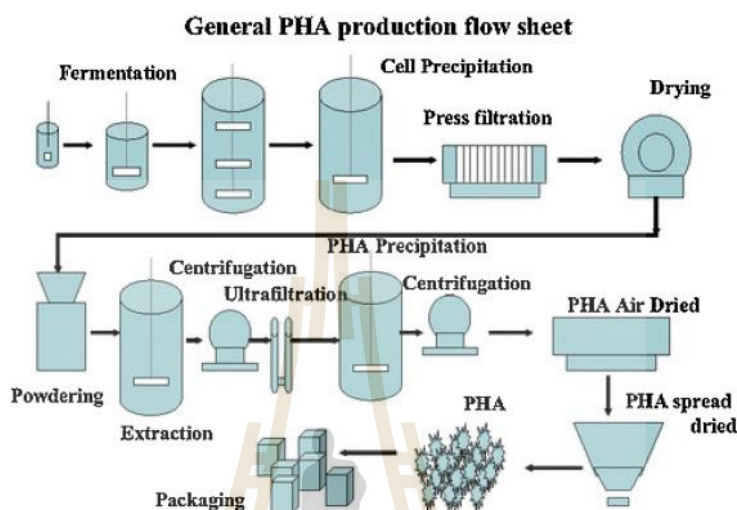
รูปที่ 2.13 กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมและการสลายพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของ *Ralstonia eutropha* (Trainer and Charles, 2006)

2.10 การผลิต PHA ในภาคอุตสาหกรรม

แม้ว่าจะมีการค้นพบ PHA ชนิดต่าง ๆ แล้ว แต่ PHA ที่ถูกผลิตในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ยังมีเพียง 4 ชนิด คือ

- 1) Poly [(R)-3-hydroxybutyrate] (PHB)
- 2) Poly [(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate] (PHBV)
- 3) Poly [(R)-3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate] (P3HB4HB)
- 4) Poly [(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate] (PHBHHx)

โดยทั่วไปกระบวนการผลิต PHA ในภาคอุตสาหกรรมประกอบด้วย หลายขั้นตอน เช่น ขั้นตอนการหมัก ขั้นตอนการแยกจุลินทรีย์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ขั้นตอนการทำให้เซลล์แห้ง ขั้นตอนการสกัด PHA ขั้นตอนการทำ PHA ให้แห้ง และการผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 กระบวนการผลิตและสกัด PHA โดยทั่วไปในภาคอุตสาหกรรม (Chen, 2010)

2.11 การนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

เนื่องจาก PHA เป็นกลุ่มพอลิเอสเทอร์จึงมีสมบัติทางกายภาพในวงกว้าง ซึ่งมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพอย่างสมบูรณ์และมีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์ อีกทั้งยังสามารถสังเคราะห์ได้จากการนำเอาของเสียกลับมาใช้ใหม่ เช่น ของเสียจากการเกษตรหรือของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ (Braunegg et al., 1998) จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ซึ่งการผลิต PHA ในเชิงพาณิชย์ผู้ผลิตต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

1) แบคทีเรียที่นำมาเพาะเลี้ยงต้องเป็นชนิดที่เพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว และต้องสะสม PHA ในสัดส่วนเมื่อเทียบกับน้ำหนักแห้งได้สูงรวมทั้งผลิตได้ภายในระยะเวลาที่สั้น

2) สารอาหารที่ใช้ต้องนำมาพิจารณาร่วมกับการเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย เนื่องจากสารอาหารเป็นค่าใช้จ่ายหลักในกระบวนการผลิต PHA แบคทีเรียที่นำมาใช้ควรเป็นสายพันธุ์ที่ให้อัตราการผลิต PHA สูง เมื่อเทียบกับปริมาณสารอาหารที่ให้

โดย PHA นั้นถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์เนื่องจากมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่โดดเด่นคือ สามารถเข้ากันได้ดีกับระบบชีวภาพ (Biocompatible) เนื่องจากมีองค์ประกอบคล้ายกับผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและความสามารถถูกดูดซึม (Bioresorbable) ในกระบวนการชีวภาพ

(Biological system) ในร่างกาย และยังสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ จึงมีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นวัสดุปลูกถ่ายที่มีสมบัติการเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดกลไกการต่อต้านระหว่างวัสดุปลูกถ่ายและเซลล์เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติเด่นของ PHA ที่นำไปสู่การประดิษฐ์วัสดุทางการแพทย์ นอกจากนี้ PHA ยังถูกนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ดังนี้

1) การเกษตร โดยนำมาใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยปุ๋ย ยากำจัดวัชพืช ตามระยะเวลาที่กำหนด (Brandl et al., 1990)

2) บรรจุภัณฑ์ทางอุตสาหกรรม สามารถนำมาผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง เช่น ฟิล์มห่อหุ้มวัสดุ กระเป๋าและถุงบรรจุภัณฑ์ (Brandl et al., 1990)

3) ด้านอิเล็กทรอนิกส์และการสื่อสาร ถูกนำมาประดิษฐ์เป็นชิ้นส่วนประกอบในโทรศัพท์เคลื่อนที่ ชิ้นส่วนประกอบในคอมพิวเตอร์

4) อุตสาหกรรมสิ่งทอ นำมาผลิตเส้นใยและแผ่นผ้าชนิด Non-woven เช่น ผ้าอ้อมสำเร็จรูป ผลิตภัณฑ์อนามัย หรือนำไปผ่านกระบวนการผลิตเป็นไฟเบอร์ในอุตสาหกรรมสิ่งทอเช่นเดียวกับไนลอน (Chen, 2009)

5) อุตสาหกรรมเคมี ถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีพิเศษ (Special chemicals) เช่น Solvent และ Coalescing solvent, Polyurethane intermediate และ Dispersant precursor (Chen and Wu, 2005)

6) อุตสาหกรรมยา เฉพาะ PHB ที่มีโครงสร้างเป็น R-configuration มีคุณสมบัติรักษาโรคอัลไซเมอร์และโรคพาคินสัน (Alzheimer's และ Parkinson's disease) (Kashiwaya, Takeshima, Mori, Nakashima, Clarke, and Veech, 2000) โรคข้อกระดูกอักเสบ

7) ใช้ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ (Protein purification) โดยให้แกรนูลของ PHA จับกับ Phasin protein (PHA granule binding protein phasin : PhaP) ทำให้ Recombinant proteins บริสุทธิ์ (Wang, Wu, Chen, Zhang, and Chen, 2008)

ตารางที่ 2.4 บริษัทที่ทำการผลิต PHA ในเชิงอุตสาหกรรม (Chen, 2010)

บริษัทผู้ผลิต	ชนิดของ PHA	ขนาดการผลิต (ตัน/ปี)	ระยะเวลา	การนำไปใช้งาน
Biomers, Germany	PHB	ไม่ระบุ	1990 ถึงปัจจุบัน	บรรจุภัณฑ์ และ ระบบนำส่งยา
BASF, Germany	PHB, PHBV	การผลิตระดับ Pilot scale	1980-2005	ส่วนผสมในผลิตภัณฑ์
Metabolix, USA	PHA	ไม่ระบุ	1980 ถึงปัจจุบัน	บรรจุภัณฑ์
ADM, USA (with Metabolix)	PHA	50,000	2005 ถึงปัจจุบัน	วัตถุดิบ
P&G, USA	PHA	การผลิตตามสัญญา (Contract Manufacturing)	1980-2005	บรรจุภัณฑ์
Meredian, USA	PHA	10,000	2007 ถึงปัจจุบัน	วัตถุดิบ
Kaneka, Japan (with P&G)	PHA	ไม่ระบุ	1990 ถึงปัจจุบัน	บรรจุภัณฑ์
Biocycles, Brazil	PHB	100	1990 ถึงปัจจุบัน	วัตถุดิบ
Bio-On, Italy	PHA	10,000	2008 ถึงปัจจุบัน	วัตถุดิบ
Zhejiang Tian An, China	PHBV	2,000	1990 ถึงปัจจุบัน	วัตถุดิบ
Shantou Lianyi Biotech, China	PHA	การผลิตระดับ Pilot scale	1990-2005	บรรจุภัณฑ์ และ การแพทย์

2.12 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHA ของจุลินทรีย์

การผลิตพอลิเมอร์โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพนั้นต้องมีการคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่จะส่งผลต่อชนิดและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ โดยมีปัจจัยสำคัญดังนี้

2.12.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ต้องการผลิต เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันแต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์ในการผลิต พบว่า ส่งผลทำให้พอลิเมอร์ที่

ผลิตได้แตกต่างกันออกไปด้วย กล่าวคือ จุลินทรีย์บางสายพันธุ์อาจผลิตพอลิเมอร์ในรูปของโฮโมพอลิเมอร์ ในขณะที่เดียวกันจุลินทรีย์อีกชนิดอาจผลิตพอลิเมอร์ที่เป็นโคพอลิเมอร์ เช่น เมื่อใช้ฟรุกโตส เป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่ *Alcaligenes eutrophus* R3 พบว่า มีการผลิตพอลิเมอร์ในรูปโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) แต่เมื่อมีการใช้แหล่งคาร์บอนเดิมให้แก่ *Alcaligenes eutrophus* ATCC17697 พบว่า มีการผลิตพอลิเบตาไฮดรอกซีบิวทิเรตซึ่งเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (Anderson and Wynn, 1995) แม้ว่า PHA จะสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด แต่พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ในปริมาณและองค์ประกอบที่แตกต่างกัน และในปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการพัฒนาศักยภาพในการผลิตพอลิเมอร์ โดยการ Over expression ของยีน *pha* ชนิดต่างๆ เช่น recombinant *E.coli* จากการตัดต่อยีน *phaC* ของ *Pseudomonas* sp. ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต mcl-PHA synthase เพื่อเกิดการสังเคราะห์ PHA สายโซ่กลาง เป็นต้น (Suriyamongkol et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ใช้กลุ่มจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียในการผลิต PHA (Dionisi et al., 2005; Kasemsap and Wantawin, 2007) โดยพบว่า การสะสม PHA ของจุลินทรีย์มักเกิดในกระบวนการแอนแอโรบิก-แอโรบิก เป็นต้น

2.12.2 แหล่งคาร์บอน

ในธรรมชาติมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์ PHA ได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน โดยที่แหล่งคาร์บอนที่สำคัญที่แบคทีเรียนำมาใช้สังเคราะห์ PHA มีหลายชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส กรดซิตริก อะซิเตท โพรพิโอเนต บิวทิเรต แลคเตท เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำเสียเป็นวัตถุดิบได้ และแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดที่ใช้มีผลต่อองค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ได้ ดังนั้น ในการผลิตจึงต้องศึกษาถึงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จากงานวิจัยของ Lemos และคณะ (2006) ศึกษาการสังเคราะห์ PHA จากกลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบตะกอนร่งแบบ SBR ในอาหารสังเคราะห์เปรียบเทียบกับระหว่าง การเติมอะซิเตทและโพรพิโอเนตในอาหารสังเคราะห์ พบว่า กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการเลี้ยงโดยการเติมอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนจะผลิตโฮโมพอลิเมอร์ชนิด HB ส่วนกลุ่มจุลินทรีย์ที่เลี้ยงโดยเติมโพรพิโอเนตจะผลิตโคพอลิเมอร์ชนิด HB และ HV เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนอะซิเตทร่วมกับโพรพิโอเนตจะได้โคพอลิเมอร์คือ HB, HV และ HM (Hydroxyl-methylvalerate) แต่ผลผลิตและอัตราการผลิตพอลิเมอร์จากการใช้อะซิเตทเป็นสารอาหารจะสูงกว่าการใช้โพรพิโอเนต ทั้งนี้เนื่องจากอะซิเตทประกอบด้วยคาร์บอนสายสั้นกว่าทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ จากงานวิจัยของ Wang และคณะ (2007) ศึกษาองค์ประกอบของพอลิเมอร์ของเชื้อผสมจากตะกอนร่งที่เลี้ยงในของเสียจากมอลต์ (Malt waste) และของเสียจากถั่วเหลือง (Soya waste) พบว่า องค์ประกอบของพอลิเมอร์ที่ได้มีสัดส่วน HB:HV เท่ากับ 90:10 และ 75:25 % โมล ตามลำดับ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสและฟรุกโตส

เป็นแหล่งคาร์บอน จะได้พอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของ HB:HV เท่ากับ 55:45 และ 20:80 %โมลตามลำดับ

2.12.3 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก จุลินทรีย์สามารถใช้ไนโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เคซีน เปปโตน และยีสต์สกัด รวมถึงสามารถใช้ในรูปของสารประกอบอนินทรีย์ในไนโตรเจน ได้แก่ แกลือแอมโมเนียม (NH_4^+) ต่าง ๆ โดยไนโตรเจนจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ซึ่งจุลินทรีย์จะสามารถผลิต PHA เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปแต่มีปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างจำกัด กล่าวคือ อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับไนโตรเจนมีค่าสูงจากการศึกษาของ Grothe และคณะ (1999) ศึกษาเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนของ *Alcaligenes latus* ATCC 29714 โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรีย พบว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.4 กรัมต่อลิตร (โมลคาร์บอนต่อโมลไนโตรเจน เท่ากับ 28.3) ส่งผลให้มีการผลให้มีการผลิต PHB ได้มากถึง 4.6 กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาของ Kumar และคณะ (2004) ศึกษาการผลิต PHB จากกลุ่มจุลินทรีย์ระบบตะกอนเร่งโรงงานผลิตอาหาร ที่ความเข้มข้นตะกอนเริ่มต้นเท่ากับ 3.15 กรัมต่อลิตร โดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 500-3000 มิลลิกรัมต่อลิตร ศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 24 96 120 144 และ 168 โมลต่อโมล ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า เมื่ออัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ปริมาณการสะสม PHB ต่อปริมาณเซลล์จะเพิ่มสูงขึ้น โดยชุดที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 144 มีการสะสม PHB สูงสุดเท่ากับ ร้อยละ 33 เช่นเดียวกับการศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 20 40 60 80 100 120 และ 140 โมลต่อโมล ของ Wang และคณะ (2007) พบว่า ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 100 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุด 30.3 กรัมต่อกรัมเซลล์ เมื่อใช้ตะกอนสลัดจ์ในระบบ SBR และใช้บิฟริกและวาเรอริกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร

2.12.4 แหล่งฟอสฟอรัสและอาหารเสริมเกลือแร่

จุลินทรีย์จะสามารถผลิต PHA เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปแต่มีปริมาณฟอสฟอรัสและธาตุอาหารรองค่อนข้างจำกัด Ryu และคณะ (1997) ทำการศึกษาการผลิต PHB โดยเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ในสภาวะกึ่งกะที่มีปริมาณฟอสเฟตจำกัด มีการควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.8 โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริก อุณหภูมิในการหมัก 34 องศาเซลเซียส มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการศึกษาที่ความเข้มข้นเริ่มต้น KH_2PO_4

เท่ากับ 2.2 3.1 4.3 และ 5.5 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้นสูงขึ้นสามารถผลิต เซลล์และ PHB ได้สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นฟอสเฟตเริ่มต้น 5.5 กรัมต่อลิตร จะให้ความเข้มข้นของ เซลล์และ PHB สูงที่สุดภายใน 72 ชั่วโมง เท่ากับ 281 และ 232 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่ Grothe และคณะ (1999) ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่มีการเติมธาตุอาหารรอง ต่อการเจริญและการผลิต PHB ของ *Alcaligenes latus* เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การเติมธาตุอาหารรอง ได้แก่ $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $NiSO_4$, $CaCl_2$, H_3BO_3 , Na_2MoO_4 , $CoCl_2$, $MnCl_2$ และ Ammonium ferrous citrate มีผลทำให้ความเข้มข้นของเซลล์และ PHB สูงขึ้นเป็น 6.8 และ 3.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.12.5 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อปริมาณการผลิต PHA เนื่องจากสถานะที่มีออกซิเจนจำกัด เอนไซม์ซีเตรทซินเทสและไอโอซิเตรทดีไฮโดรจีเนสจะถูกยับยั้งการทำงาน โดย NADH ทำให้ Acetyl CoA ไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็น Acetyl CoA เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHA โดยเอนไซม์เบต้าคีโตไซโอเลส (Luengo et al., 2003) จากการศึกษาของ ธงชัย วงศ์สุวรรณ (2550) ได้ศึกษาการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์มสำหรับการผลิต PHA โดยใช้ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 พบว่าการให้อากาศที่ 2 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที (v/v/m) ทำให้เกิดการเจริญของจุลินทรีย์สูงกว่า แต่มีการสะสมของ PHA ได้น้อยกว่าที่อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที (v/v/m)

2.12.6 พีเอช

พีเอชเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตพอลิเมอร์ โดยพบว่า หากต้องการผลิต PHA ควรทำการควบคุมพีเอชไม่ให้ต่ำกว่า 7 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าพีเอชลดลงอยู่ในสถานะที่เป็นกรดมากเกินไป (Kinoshita, Kulprecha, and Chao, 1991) ในสถานะที่พีเอชต่ำ จะขาดความสมดุลระหว่างปริมาณไอออนของไฮโดรเจนและไฮดรอกไซด์ ส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหารและเซลล์จะไม่สามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความเป็นพิษเนื่องจากมีปริมาณกรดในระบบมากเกินไป (Luli and Strohl, 1990) การปรับพีเอชเป็น 7 เป็นการปรับปริมาณไฮโดรเจนอิสระที่แสดงประจุเป็นบวกให้ลดลงด้วยไฮดรอกไซด์ซึ่งมีประจุเป็นลบ ทำให้ไฮโดรเจนไอออนไม่สามารถส่งผลกระทบต่อเซลล์ (Du, Chen, Yu, and Lun, 2001) จากรายงานของ Kasemsap and Wantawin (2007) ได้ศึกษาผลของพีเอชต่อศักยภาพในการสังเคราะห์ PHA โดยใช้ชุดทดลองในสถานะไร้อากาศและใช้กรดอะซิติกเป็นสารอาหาร เปรียบเทียบการสะสม PHA จากสไลด์จำนวน 2 กลุ่ม คือ RP5 และ RP15 ที่มีปริมาณพอลิฟอสเฟตในเซลล์เท่ากับร้อยละ 2 และร้อยละ 6 ตามลำดับ ปริมาณไกลโคเจนภายในเซลล์เท่ากับร้อยละ 12

และร้อยละ 15 ตามลำดับ และพบว่า การสลายสารที่เป็นแหล่งพลังงาน ได้แก่ ไกลโคเจนและ พอลิฟอสเฟตที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6 จะน้อยที่สุด และมากขึ้นตามลำดับเมื่อค่าพีเอชสูงขึ้น มีผลทำให้ การสะสม PHA ที่พีเอช 6 มากที่สุดคือร้อยละ 16 และร้อยละ 25 ในรูปคาร์บอนสำหรับ RP5 และ RP15 ตามลำดับ แต่การใช้พลังงานมากขึ้น และเป็นพลังงานจากการสลายไกลโคเจนในการดั่ง สารอาหารเข้าสู่เซลล์ที่พีเอชสูงขึ้นมีผลให้สัดส่วน HV ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของพลาสติกประเภทนี้ มีค่าสูงขึ้น ดังนั้น สลัดจ์ RP5 จะมีสัดส่วน HV/PHA ที่พีเอช 8 สูงกว่าที่สะสมที่พีเอช 6 ขณะที่ สลัดจ์ดังกล่าวค่อนข้างคงที่สำหรับ RP15 และจากการศึกษาของ ศิริวรรณ ระเบิดนอหมัด (2551) ศึกษาการผลิต PHA จากจุลินทรีย์ผสมของ *Achmobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achmobacter* spp. PSU-M และงานวิจัยของ เขมรัฐ เขมวงศ์ (2550) ศึกษาการผลิต PHA จาก *Rhodobacter sphaeroides* U7 พบว่า การปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 และ 6 จะทำให้มีการผลิต PHA ได้น้อยมาก ขณะที่การปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 และ 8 จะทำให้มีการผลิต PHA ที่ใกล้เคียงกัน

2.12.7 อุณหภูมิ

Aslim และคณะ (1998) ศึกษาการผลิต PHA ด้วยจุลินทรีย์กลุ่ม Lactic acid bacteria พบว่าอุณหภูมิที่จีน่าส *Lactobacillus* สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ในขณะที่จีน่าส *Pediococcus* เจริญได้ดีที่ 37 องศาเซลเซียส แต่ *Streptococcus* เจริญได้ดีที่ 40 องศาเซลเซียส ขณะที่ โสภกา ชินเวทกิจวานิชย์ (2547) ได้ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHA ด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ จากระบบบำบัดน้ำเสียโดยอุณหภูมิที่ใช้ศึกษาได้แก่ 10 20 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิ ส่งผลต่ออัตราการผลิต PHA อย่างเห็นได้ชัด คือ อัตราการผลิตและผลผลิต PHA จะเพิ่มสูงขึ้น ที่อุณหภูมิต่ำ โดยชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส กับการจำกัดธาตุอาหารเฉพาะ ในโตรเจน มีค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับร้อยละ 40 โดยค่าความเข้มข้นของ PHA ในระบบคือ 2.83 กรัมต่อลิตร ในการทดลองที่จำกัดธาตุอาหารเฉพาะฟอสฟอรัสที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับร้อยละ 52 ค่าความเข้มข้นของ ระบบคือ 1.491 กรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองจำกัดธาตุอาหารทั้งในโตรเจนและฟอสฟอรัส ผลผลิต PHA ในการทดลองที่ 10 และ 20 องศาเซลเซียสไม่แตกต่างกัน โดยค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับร้อยละ 45 และค่าความเข้มข้นของ PHA เท่ากับ 2.133 กรัมต่อลิตร

2.13 การสกัดแยก PHA และทำให้บริสุทธิ์

PHA จะสะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ การแยกพอลิเมอร์ออกมาทำได้โดยการทำให้เซลล์แตก ด้วยการทำลายผนังเซลล์ ซึ่งในกระบวนการสกัดต้องระมัดระวังไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง คุณสมบัติของพอลิเมอร์ จากการตรวจสอบคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของ PHA ที่แยกได้จากจุลินทรีย์

หลายสายพันธุ์ พบว่ามีค่าของมวลโมเลกุลแปรปรวนแตกต่างกันไป ซึ่งอิทธิพลที่มีผลต่อมวลโมเลกุล คือ วิธีการที่ใช้ในการสกัด PHA ออกจากเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งวิธีการสกัดแยก PHA แบ่งได้ 3 วิธี ดังนี้

2.13.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีที่ทำให้ผลผลิตของพอลิเมอร์ที่สกัดออกมา มีมวลโมเลกุลสูง การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม เมทิลีนคลอไรด์ 1-2 ไคคลอโรอีเทน 1,1-2 ไตรคลอโรอีเทน หรือ โพรพิลีนคาร์บอนेट เป็นต้น PHA ที่สกัดได้จากวิธีนี้มีสีขาว สามารถทำเป็นผลึกได้และมีมวลโมเลกุลสูง วิธีนี้จะใช้เมื่อต้องการความบริสุทธิ์ของพอลิเมอร์สูง แต่ไม่เหมาะสมที่จะใช้ปฏิบัติในระดับอุตสาหกรรม เพราะต้องใช้สารสกัดในปริมาณมาก แต่มีข้อดีคือ สามารถสกัดได้ง่าย (Lee, 1996)

2.13.2 การสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์

การสกัดด้วยวิธีนี้เป็นวิธีการสกัดที่ Williamson และ Wikinson (1958) ใช้ในการแยกพอลิเมอร์ ชนิด PHB จากเชื้อ *Bacillus cereus* โดยย่อยสลายผนังเซลล์นาน 30-60 นาที ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ พอลิเมอร์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการล้างด้วยไดเอทิลอีเทอร์ หรือเมทานอล เพื่อแยกไขมันออก การใช้สภาวะในการสกัดที่มีความเป็นด่างสูงมีผลทำให้สายพอลิเมอร์ถูกทำลาย มีคุณสมบัติต่อพื้นผิวและ โมเลกุลของสายพอลิเมอร์ ระยะเวลาการสกัดด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 30-60 นาที การใช้เวลาเกินกว่า 60 นาที อาจมีผลทำให้พอลิเมอร์ถูกทำลายได้ สำหรับการแยก PHB ให้ได้ความบริสุทธิ์ถึงร้อยละ 95 พบว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวก่อนทำการสกัดจะช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลของสารที่แยกได้สูงขึ้น ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะได้รับการพัฒนาแล้ว แต่ปัญหาที่เกิดจากวิธีนี้ คือ การกำจัดโซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่เหลือติดอยู่กับพอลิเมอร์ที่สกัดได้ทำได้ยาก และโซเดียมไฮโปคลอไรด์เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Doi, 1990)

2.13.3 การสกัดด้วยเอนไซม์

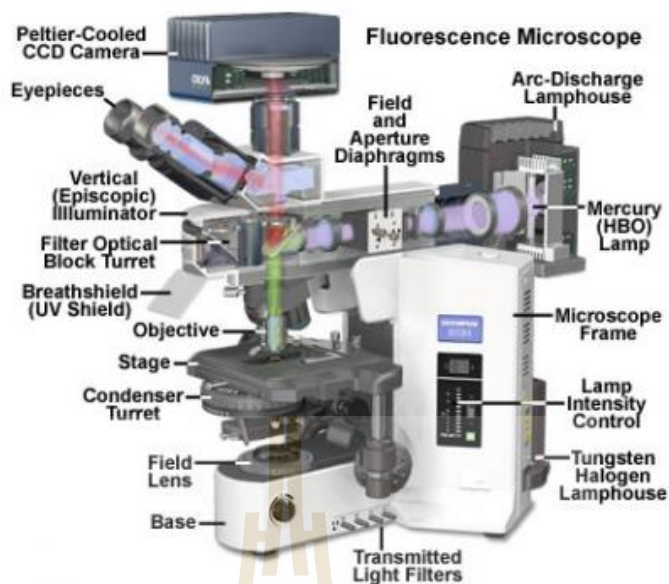
การพัฒนากระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ทำการศึกษาโดย Holmes และคณะ (1988) ซึ่งเป็นกระบวนการที่นิยมใช้กันในอุตสาหกรรม เป้าหมายของกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิต PHA ในปริมาณสูง โดยดูจากค่าร้อยละของน้ำหนัก PHA ต่อน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ การสกัดแยกด้วยเอนไซม์มักใช้เอนไซม์หลายชนิดรวมกัน โดยเอนไซม์ที่ใช้ต้องไม่รบกวนการทำปฏิกิริยาระหว่างกันของเอนไซม์อีกชนิดเมื่อนำมาใช้งานร่วมกัน เช่น อัลคาเลส (Alcalase) ฟอสโฟไลเปส (Phospholipase) แลคซิเตด (Lacitase) และไลโซไซม์ (Lysozyme) เป็นต้น (Hocking and Merchessault, 1994)

2.14 เครื่องมือวิเคราะห์

2.14.1 เครื่องมือวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์

2.14.1.1 กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope)

กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่อาศัยแสงอัลตราไวโอเล็ต (Ultra violet light) ส่องผ่านไปยังตัวอย่างที่สามารถเรืองแสงได้ ตัวอย่างจะดูดกลืนแสงและจะปลดปล่อยพลังงานออกมาเป็นแสงที่ตามองเห็นได้ โดยใช้หลักการของ Photoluminescence ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่อะตอมส่งพลังงานแสงออกมา หลังจากได้รับพลังงานเข้าไปจนอยู่ในสถานะ Excited state พลังงานที่ได้รับเข้าไป อาจเป็นพลังงานแสง พลังงานกล เช่น การเสียดสีหรือพลังงานจากปฏิกิริยาเคมี เป็นต้น ปรากฏการณ์นี้แบ่งออกเป็นสองประเภท คือ Fluorescence และ Phosphorescence โดยปรากฏการณ์ Fluorescence เกิดจากการที่อะตอม ดูดกลืนพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่นหนึ่ง และส่งพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่นยาวกว่าออกมาหลังจากช่วงเวลาสั้น ๆ ส่วน Phosphorescence จะเกิดคล้าย ๆ กัน แต่มีช่วงที่อะตอมอยู่ใน Excited state นานกว่า หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ทำงานโดยให้แสงกระตุ้น (Excitation light) ซึ่งปกติเป็นแสง UV ส่องไปที่ตัวอย่าง และจากนั้นแยกแสงที่ตัวอย่างปล่อยออกมา (Emission light) ไปสู่ตาผู้สังเกต โดยแสงจากแหล่งกำเนิดแสง (Mercury Lamp) จะผ่านเลนส์รวบรวมแสงและ Aperture diaphragm และ Field diaphragm และผ่าน Excitation filter ซึ่งสามารถเลือกได้ว่าจะยอมให้แสงความยาวคลื่นเท่าใดผ่าน จากรูปที่ 2.15 หลังผ่านฟิลเตอร์ แสงสีม่วงจะถูกกรองและให้สีเขียวเท่านั้นผ่าน คลื่นแสงที่ผ่านจะผ่านกระจกพิเศษ เรียกว่า Dichromatic beamsplitting mirror วางทำมุม 45 องศา ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษที่จะสะท้อนคลื่นที่มีความยาวคลื่นสั้น แต่ยอมให้แสงที่มีความยาวคลื่นยาวผ่าน ดังนั้นแสง UV จะถูกสะท้อนไปที่วัตถุทำมุม 90 องศา ส่วนแสงที่ตัวอย่างปล่อยออกมาจะกระจายไปทุกทิศทาง โดยแสงที่เกิดขึ้นจะสะท้อนขึ้นด้านบนจะผ่านกระจก Dichromatic beamsplitting mirror เข้าสู่กล้องและตาผู้สังเกต หรือถูกบันทึกไว้ด้วยกล้องถ่ายภาพ CCD โดยภาพที่ได้จะเป็นสีต่างๆ ตามสีย้อม และมีพื้นหลังสีดำ แต่แสง UV บางส่วนที่สะท้อนกลับมาในทิศทางพุ่งขึ้นจะถูกกระจกสะท้อนกลับไปในทิศทางเดิม (ไปสู่แหล่งกำเนิดแสง)



รูปที่ 2.15 แสดงแผนผังการทำงานของกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์และการเดินทางของแสงจากแหล่งกำเนิด (Olympus America, 2018)

กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์จึงถูกนำไปใช้เพื่อศึกษาสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ที่มีคุณสมบัติสามารถเรืองแสงหรือเปล่งแสงเองได้ หรือตัวอย่างที่ต้องย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ก่อนนำมาดูกล้องจุลทรรศน์ เมื่อได้รับพลังงานแสงจากแหล่งกำเนิดที่มีพลังงานสูง เช่น แสง UV ซึ่งเป็นแสงที่มีความยาวคลื่นต่ำทำให้เป็นแสงที่มีพลังงานสูง เมื่อถูกยิงไปยังกระทบกับวัตถุที่มีความสามารถดูดกลืนแสง วัตถุนั้นก็จะปลดปล่อยพลังงานออกมาเป็นแสงที่ตาเราสามารถมองเห็นได้ (Visible light) โดยภาพที่เห็นเป็นผลมาจากลำแสงธรรมดากระตุ้นขึ้นตัวอย่างที่เรืองแสงให้ปล่อย Ultraviolet light ออกมา สิ่งที่เรืองแสงซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ด้วยกล้องชนิดนี้มี 2 ชนิด

1) Natural fluorescence (Auto-fluorescence) เป็นสารที่เรืองแสงเองได้ เช่น Vitamin A, Thiamine, Riboflavin, some neurotransmitters และ ส่วนประกอบของเซลล์บางชนิด เช่น Mitochondria และ Lipofuscin

2) Secondary fluorescence เป็นสารที่เรืองแสงเองไม่ได้ แต่ถูกเคลือบหรือย้อมด้วยสีเรืองแสงเรียกว่า Fluorochromes เช่นการศึกษา Antigens หรือ Antibodies ในงาน Immunology

Fluorochromes คือ สีย้อมที่มีคุณสมบัติเปล่งแสงได้ สีย้อมนี้มีคุณสมบัติที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับเซลล์หรือองค์ประกอบย่อยของเซลล์อย่างจำเพาะ เช่น การใช้สี Nile red หรือ Nile blue A ย้อมเซลล์ของจุลินทรีย์ เพื่อตรวจวัดการสะสม PHA ภายในเซลล์ ซึ่งเป็นสีย้อมที่ละลาย

ได้คืนในไขมัน โดยทำปฏิกิริยากับไขมัน ไตรกลีเซอไรด์และไลโปโปรตีนบางชนิด เมื่อให้แสงกระตุ้น (Excitation light) ที่ความยาวคลื่น 549 นาโนเมตร จากแหล่งกำเนิดแสงผ่าน Exciter filter Cy3 ซึ่งเป็น Exciter filter มีความยาวคลื่นแสงกระตุ้นจำเพาะกับช่วงกระตุ้นของสี Nile blue A ส่องไปที่ตัวอย่าง และจากนั้นแยกแสงที่ตัวอย่างปล่อยออกมา (Emission light) เป็นแสงสีแดงที่มีความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ออกจากแสงกระตุ้นซึ่งมีความเข้มมากกว่า (รูปที่ 2.16) และให้แสงที่ตัวอย่างปล่อยออกไปสู่ตาผู้สังเกต ซึ่งจะต้องมีการกรอง UV ออกไปโดย Barrier filter และให้เฉพาะแสงสีแดงที่อ่อนกว่ามากผ่านไปเท่านั้น ดังนั้นสีข้อมันนับว่ามีส่วนสำคัญในการทำให้มองเห็นวัตถุเป็นสีต่าง ๆ เช่น สีเหลือง สีแดง สีนํ้าเงิน สีเขียว แต่สีที่นิยมใช้มากที่สุด ได้แก่ Fluorescein isothiocyanate (FITC) ซึ่งเปล่งแสงสีเขียว และ 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) จะทำปฏิกิริยากับกรดนิวคลีอิก Nucleic acids โดยจับกับบริเวณ A-T base pair ของ DNA จึงเป็นที่นิยมใช้ในการบ่งบอกตำแหน่งของนิวคลีอิกโดยมีความไวและความแม่นยำสูง และใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์

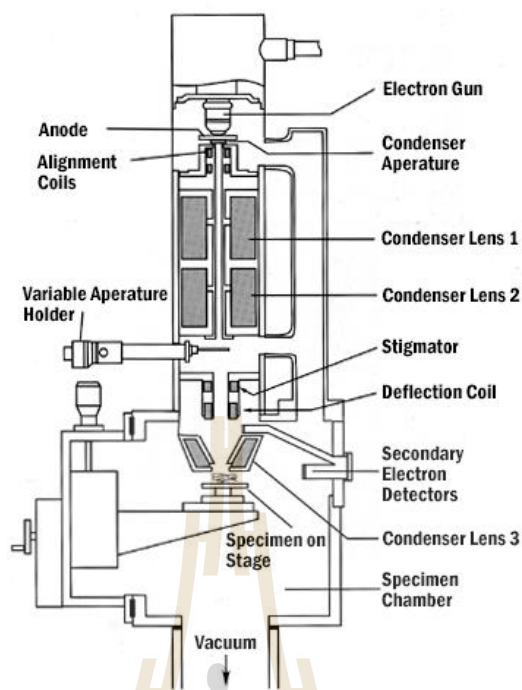


รูปที่ 2.16 แถบสเปกตรัมของสีข้อมัน Nile blue A เมื่อให้แสงกระตุ้น (Excitation light) จากแหล่งกำเนิดแสงผ่าน Exciter filter Cy3 เพื่อตรวจวัดการสะสม PHA ภายในเซลล์ (Carl Zeiss Microscopy, LLC, 2018)

2.14.1.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ Electron เป็นแหล่งกำเนิดแสง เป็นเครื่องมือที่ใช้ศึกษาลักษณะพื้นฐานของวัสดุในระดับจุลภาค เนื่องจากความสามารถในการแยกชัดและกำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาที่มีค่าต่ำ ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบรายละเอียดของวัตถุที่มีขนาดเล็กมาก ๆ ได้ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีกำลังขยายสูงมีความสามารถในการแยกชัดเจน เนื่องจากมีความยาวคลื่นสั้น เพื่อช่วยในการวิเคราะห์ลักษณะพื้นฐานของวัสดุ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดมีกำลังขยายมากกว่า 3000 เท่า จนถึงระดับมากกว่า 100,000 เท่า และสามารถแจกแจงรายละเอียดของภาพ ซึ่งขึ้นกับลักษณะตัวอย่างได้ตั้งแต่ 3-100 นาโนเมตร อีกทั้งยังสามารถใช้งานร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์อื่น เช่น Energy Dispersive Spectrometry (EDS) และ Wavelength Dispersive Spectrometry (WDS) ที่เป็นข้อมูลทางเคมีจึงทำให้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในปัจจุบัน

การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดตรวจสอบพื้นผิวของตัวอย่าง โดยชิ้นงานที่จะตรวจสอบควรรีดยึดเข้ากับตัวจับชิ้นงานอย่างแน่นหนา เพื่อป้องกันชิ้นงานหลุดระหว่างการตรวจสอบในระบบสุญญากาศ และวัสดุที่จะตรวจสอบต้องมีสภาพการนำไฟฟ้า หากวัสดุที่นำมาตรวจสอบไม่สามารถนำไฟฟ้าได้จะต้องทำการเคลือบผิวด้วยวัสดุนำไฟฟ้า (Sputtering) โดยนิยมเคลือบผิวด้วยทอง หลักการตรวจสอบพื้นผิวและลักษณะของจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จะใช้อิเล็กตรอนเป็นตัวที่ทำให้เกิดการสร้างเป็นภาพขึ้นมา โดยมี Electron gun ทำหน้าที่ผลิตลำอิเล็กตรอน (Electron beam) ออกมาและลำอิเล็กตรอนจะเดินทางผ่าน Electromagnetic field และ Electromagnetic lenses ซึ่งทำหน้าที่บีบให้ลำอิเล็กตรอนถูกโฟกัสและตกกระทบบนผิวของชิ้นงานทดสอบ หลังจากนั้นจะเกิดการกระเจิงของลำอิเล็กตรอนทำให้เกิด X-ray, Primary Backscattered Electron, Secondary Electron และ Auger Electron ตามลำดับ ในระบบสุญญากาศจะมีอุปกรณ์จับสัญญาณต่าง ๆ เพื่อแปลงเป็นข้อมูลหรือภาพเพื่อประกอบการวิเคราะห์ลักษณะพื้นฐานวิทยาของวัสดุ ดังแสดงในรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (กอบวูฒิ รุจิจนากุล, 2549)

2.14.2 เครื่องมือวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของ PHA

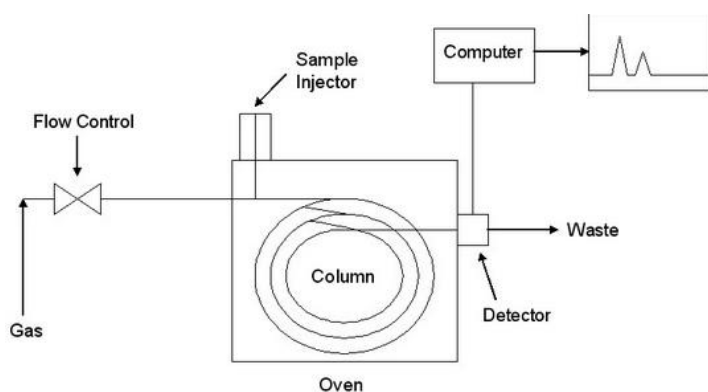
2.14.2.1 แก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography : GC)

เป็นเทคนิคสำหรับแยกสารตัวอย่างที่เป็นสารผสมโดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอ ที่อุณหภูมิหนึ่ง แล้วให้ไอของสารเหล่านั้นผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (Stationary phase) โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) หรือแก๊สตัวพา องค์ประกอบของสารผสมที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่และกระจายตัวผ่านเฟสคงที่ต่างกันจะแยกออกจากกัน โดยองค์ประกอบภายในเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (รูปที่ 2.18) ในการวิเคราะห์สารผสม ตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าที่ช่องฉีดตัวอย่าง (Injection port) สารผสมจะถูกให้ความร้อนจนกลายเป็นไอ แล้วถูกพาเข้าไปในคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบของสารผสมจะแยกออกจากกันเมื่อเคลื่อนผ่านคอลัมน์และถูกตรวจวัดด้วยดีเทคเตอร์ (Detector) สัญญาณการตรวจวัดที่ได้จากดีเทคเตอร์ (Detector) จะถูกบันทึกและแสดงออกมาในรูปแบบโครมาโตแกรม เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

1) Sample injection system อุณหภูมิของ Injector จะสูงกว่าใน Oven ประมาณ 50 องศาเซลเซียส สารตัวอย่างจะถูกทำให้เป็นไอและส่งผ่านสู่ Chamber ปริมาณสารที่ฉีด

เข้าสู่ระบบประมาณ 1 ไมโครลิตร คอลัมน์ที่ใช้เป็นแคพิลลารีคอลัมน์ (Capillary column) เส้นผ่านศูนย์กลางภายในประมาณ 0.2 มิลลิเมตร ประกอบด้วย Wall coated open tubular จะเคลือบภายในด้วยเฟสของเหลวคงที่ (Liquid stationary phase) และสารเคลือบค้ำจุน (Support coated tubular) เคลือบผนังภายในด้วยเฟสของแข็งคงที่ (Solid stationary phase) ประสิทธิภาพของคอลัมน์สองชนิดนี้ดีกว่าคอลัมน์แบบแพ็ค (Packed column)

2) Oven จะเป็นส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ เพื่อให้ได้งานที่มีความแม่นยำ การควบคุมอุณหภูมิจะต้องมีความละเอียดถึง 0.1 องศาเซลเซียส การตั้งค่าอุณหภูมินั้นจะขึ้นอยู่กับจุดเดือดของตัวอย่าง โดยปกติแล้วอุณหภูมิของคอลัมน์จะถูกตั้งไว้สูงกว่าจุดเดือดของตัวอย่าง ขณะที่ตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่อุณหภูมิต่ำจะให้ค่าความละเอียดของการวัดสูง แต่ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น ถ้าสารประกอบแต่ละชนิดในตัวอย่างมีจุดเดือดใกล้เคียงกัน จะตั้งค่าอุณหภูมิเพียงค่าเดียว (Isothermal) ถ้าสารประกอบแต่ละชนิดในตัวอย่างมีจุดเดือดช่วงกว้าง จะใช้โปรแกรมอุณหภูมิในการแยกสาร คือ อุณหภูมิของคอลัมน์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งการแยกเสร็จสิ้น ส่วน Detector และ Recorder ที่ใช้เป็นแบบไม่จำเพาะเพื่อให้ใช้งานได้หลากหลาย เมื่อสารถูกแยกและทำการวิเคราะห์แล้ว หน่วยประมวลผลจะแสดงผลการวิเคราะห์ออกมาในรูปโครมาโตแกรมซึ่งจะแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ Abundance และเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (Retention time) เครื่องสามารถวิเคราะห์หาความสูงของพีคและพื้นที่ใต้พีคเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารด้วยการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis) ด้วยวิธีสารมาตรฐานภายในเป็นวิธีการที่ใช้หาปริมาณของสารได้ถูกต้องที่สุด แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารมาตรฐานภายในต้องมีคุณสมบัติดังนี้ สารนั้นต้องมีคุณสมบัติคล้ายสารที่จะวิเคราะห์ ต้องถูกชะออกจากคอลัมน์หมด และต้องให้พีคที่แยกอยู่ต่างหากโดยพีคจะไม่ซ้ำหรือเหลื่อมทับพีคอื่น ๆ หรืออยู่ใกล้พีคที่ต้องการหา และสารนั้นต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

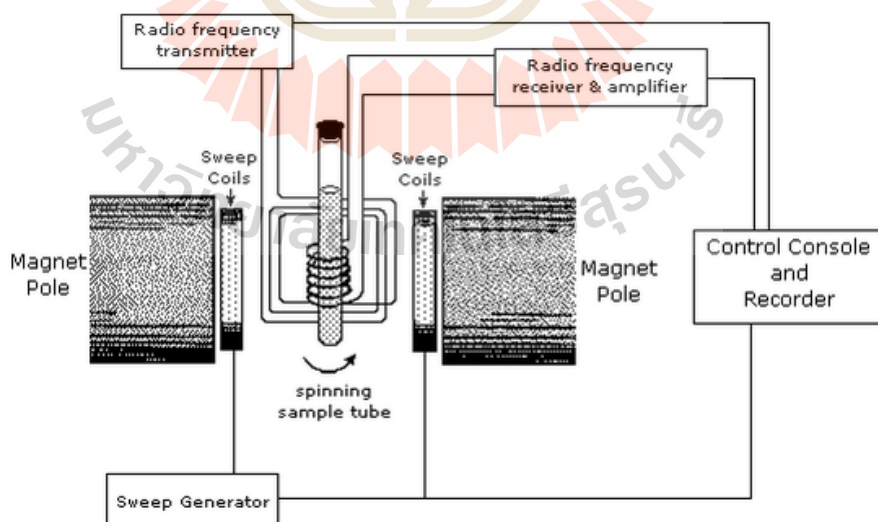


รูปที่ 2.18 องค์ประกอบของเครื่อง Gas chromatography

2.14.2.2 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy : NMR)

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี หรือที่เรียกโดยย่อว่า เอ็นเอ็มอาร์ (NMR) เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกันของนิวเคลียสที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก มีประโยชน์มากในการศึกษาเกี่ยวกับสูตรโครงสร้างของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการหาปริมาณวิเคราะห์ได้ด้วย หลักการทำงานของ NMR นิวเคลียสเป็นอนุภาคที่มีประจุ ในนิวเคลียสของธาตุบางชนิดประจุนี้จะหมุนหรือสปิน (Spin) เป็นวงรอบแกนนิวเคลียส (Nuclear axis) (Field and Sternhell, 1989) การสปินของนิวเคลียสนี้จะก่อให้เกิดโมเมนต์แม่เหล็ก (Magnetic moment) เมื่อสนามแม่เหล็กภายนอกกระทำกับนิวเคลียสจะไปทำให้นิวเคลียสที่จำเพาะเจาะจงเกิดการหันไปในทิศทางที่แน่นอนเมื่อเทียบกับทิศทางของสนามแม่เหล็ก ทิศทางการจัดตัวที่ต่างกันจะมีค่าพลังงานที่ต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถนำข้อมูลของค่าพลังงานที่วัดได้มาบ่งบอกถึงทิศทางการจัดตัวของนิวเคลียสต่าง ๆ ได้ ในการวัดสัญญาณ NMR จะต้องนำตัวอย่างที่ละลายได้ในตัวทำละลายที่เหมาะสม (ซึ่งจะต้องปราศจากนิวเคลียสชนิดเดียวกับตัวอย่างที่กำลังจะตรวจวัดสัญญาณ NMR เช่น หากจะวัดสัญญาณของโปรตรอนในสารตัวอย่าง ตัวทำละลายจะต้องไม่มีโปรตรอน เช่น CCl_4 หรือต้องเป็นตัวทำละลายที่มีควิที่เรียมแทน เช่น CDCl_3) อยู่ในหลอดแก้วยาว ไปวางไว้ในสนามแม่เหล็กที่มีความแรงมาก ซึ่งในยุคแรก ๆ จะใช้แม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งสามารถเพิ่มความแรงได้อย่างจำกัด ในปัจจุบันจะนิยมใช้แม่เหล็กแบบซูเปอร์คอนดักเตอร์ ซึ่งจะต้องหล่อเย็นด้วยฮีเลียมเหลวตลอดเวลาจึงจะทำงานได้ แม่เหล็กแบบนี้จะสร้างสนามแม่เหล็กที่เข้มกว่าแบบแม่เหล็กไฟฟ้าปกติมาก และความแรงสนามแม่เหล็กนี้จะเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพของเครื่อง NMR โดยมักเปรียบเทียบด้วยตัวเลขสัญญาณความถี่ของโปรตรอน เช่น เครื่อง 500 MHz, 200 MHz หรือ 60 MHz โดยยังมีตัวเลขมาก ประสิทธิภาพของเครื่องจะสูงกว่าทั้งในแง่ของความไว (Sensitivity) และความละเอียดของการวัด (Resolution) อย่างไรก็ตาม ราคาของเครื่องและค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาจะสูงตามไปด้วย โดยเครื่องที่ใช้ในห้องปฏิบัติการวิจัยทั่วไป ปัจจุบันจะใช้ทำงานที่ความถี่ 200-500 MHz ส่วนประกอบที่สำคัญอีกส่วนหนึ่งนอกจากแม่เหล็ก คือ ตัวส่ง (Radiofrequency generator) และตัวรับสัญญาณคลื่นวิทยุ (Detector and amplifier) ซึ่งจะทำหน้าที่ส่งสัญญาณคลื่นวิทยุไปยังตัวอย่างและตรวจวัดสัญญาณ ที่ถูกดูดกลืนหรือปลดปล่อยออกมา ในยุคแรกการวัดสัญญาณ NMR จะทำในลักษณะที่เรียกว่า คลื่นต่อเนื่อง (Continuous wave : CW) โดยเครื่องส่งสัญญาณคลื่นวิทยุจะต้องแปรความถี่ของคลื่นวิทยุที่ส่งผ่านเข้าไปในตัวอย่างไปเรื่อย ๆ และตรวจวัดสัญญาณหลังผ่านตัวอย่างเปรียบเทียบกับสัญญาณที่ส่งเข้าไปที่ความถี่เดียวกัน หากความเข้มของสัญญาณลดลงแสดงว่ามีการ

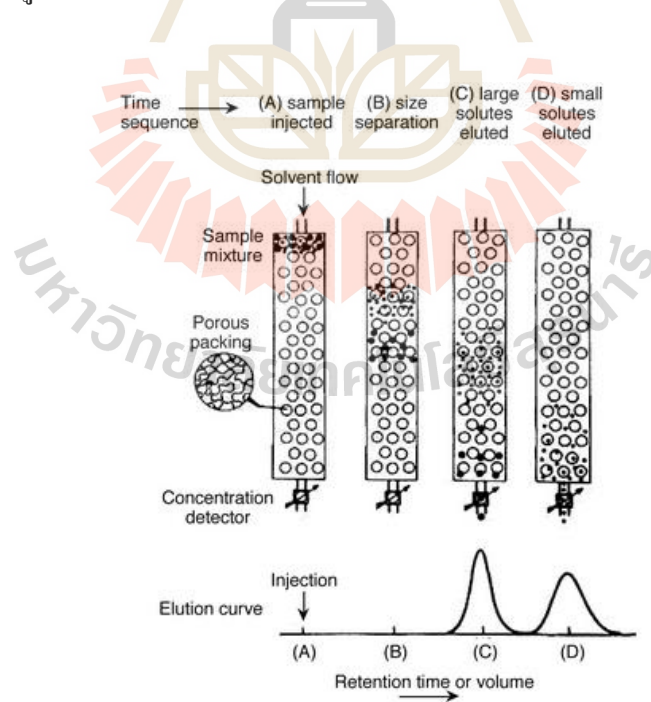
คูคกิ้นเกิดขึ้น ลักษณะการคูคกิ้นจะเป็นพีคซึ่งจะนำมาพล็อตเทียบกับความถี่คล้ายกับในกรณีของอินฟราเรดสเปกตรัม อย่างไรก็ตามการทำลักษณะนี้จะใช้เวลามากและไม่ค่อยมีประสิทธิภาพนัก เครื่อง NMR สมัยใหม่ที่เรียกว่า Pulsed NMR ซึ่งจะเป็นการส่งสัญญาณคลื่นวิทยุที่ทุกความถี่ในช่วงที่สนใจเข้าไปยังตัวอย่างพร้อม ๆ กันซึ่งจะทำให้เกิดการพลิกของสปินทั้งหมดอย่างทันทีทันใด เรียกว่าอยู่ในสถานะถูกกระตุ้น (Excited state) จากนั้นนิวเคลียสก็จะกลับเข้าสู่สถานะเดิม (Ground state) พร้อมทั้งปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปของคลื่นวิทยุ เฉพาะความถี่ที่เกิดการคูคกิ้น ซึ่งอาจมีมากกว่า 1 ค่าก็ได้ ความถี่ของคลื่นที่ปลดปล่อยออกมานี้จะอยู่ในรูปของคลื่นที่ซ้อนกันเรียกว่า สัญญาณ FID (Free induction decay) ซึ่งสามารถแยกออกเป็นแต่ละความถี่ โดยที่แต่ละความถี่จะมีความเข้มของสัญญาณที่แตกต่างกันได้ โดยกระบวนการทางคณิตศาสตร์ที่เรียกว่า ฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม (Fourier transform) ดังนั้น เครื่อง NMR สมัยใหม่จึงมักเรียกว่า FT-NMR การทำฟูเรียร์ทรานสฟอร์มจะต้องใช้การคำนวณที่ซับซ้อน คอมพิวเตอร์สำหรับเก็บข้อมูลและประมวลผลจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งสำหรับ FT-NMR ในขณะที่อาจไม่ใช่สิ่งจำเป็นสำหรับ CW-NMR ข้อดีประการสำคัญของ FT NMR คือสามารถเก็บสัญญาณ FID รวมกันหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำมาทำฟูเรียร์ทรานสฟอร์มเพียงครั้งเดียว ซึ่งจะทำให้ได้สัญญาณที่ชัดเจนขึ้น โดยเฉพาะกับสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยหรือเมื่อบันทึก NMR สเปกตรัมของนิวเคลียสที่มีปริมาณน้อยในธรรมชาติ เช่น ^{13}C ^{15}N เป็นต้น องค์ประกอบของเครื่อง NMR ดังแสดงในรูปที่ 2.19



รูปที่ 2.19 องค์ประกอบของเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy : NMR)

2.14.2.3 เจลเพอร์มิเอชันโครมาโตกราฟี (Gel permeation chromatography : GPC)

เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เพื่อศึกษาการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ หรืออาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Size Exclusion Chromatography (SEC) เป็นวิธีแยกและตรวจหาสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง คอลัมน์ที่ใช้บรรจุด้วยอนุภาคที่มีขนาดของรูพรุน การเลือกขนาดของรูพรุนของตัว Packing ขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของโมเลกุลของตัวถูกละลายที่ต้องการแยก GPC เป็นวิธีการแยกโดยอาศัยขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์ การแยกเกิดขึ้นในคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่บรรจุเม็ด (Bead) ของแข็งที่มีรูพรุนหรือเจล (Gel) โดยทั่วไปมักใช้เม็ดพอลิสไตรีนที่ผ่านการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลหรือแก้วที่มีรูพรุน โดยตัวอย่างของสารละลายพอลิเมอร์เจือจางจะถูกส่งลงไป ในคอลัมน์ และชะด้วยกระแสของตัวทำละลาย โมเลกุลของพอลิเมอร์จะสามารถแพร่เข้าไปในช่องว่างของรูพรุน ซึ่งลักษณะการแพร่ขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของพอลิเมอร์และขนาดของรูพรุน โมเลกุลขนาดต่าง ๆ จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ตามลำดับขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนได้จะผ่านคอลัมน์ออกมาก่อนเป็นอันดับแรก ส่วนโมเลกุลขนาดเล็กจะติดอยู่ในรูพรุนของเจลและใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นานกว่าและถูกชะออกมาภายหลัง (รูปที่ 2.20)



รูปที่ 2.20 กลไกการทำงานของเครื่องเจลเพอร์มิเอชันโครมาโตกราฟี (Gel permeation chromatography : GPC)

2.14.2.4 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์วัสดุที่เป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์ วิธีนี้เป็นวิธีการทาง Spectroscopy ชนิดหนึ่ง ที่ศึกษาการดูดกลืนแสงของสารในย่านความถี่ของแสง โดยการวิเคราะห์โครงสร้างสารจะอาศัยการดูดกลืนที่แตกต่างกันของแต่ละโมเลกุล ซึ่งโมเลกุลแต่ละชนิดจะมีการดูดกลืนช่วงคลื่นอินฟราเรดที่แตกต่างกันโดยช่วง Wave numbers 4000-1500 จะเป็นช่วงที่บ่งบอกถึงหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุล เช่น -OH, C=O, N-H, CH₃ เป็นต้น และในช่วง Wave numbers 1500-4000 เป็นช่วง The Fingerprint Region ซึ่งจะมีลักษณะของสเปกตรัมที่เฉพาะเจาะจงของสารแต่ละตัว แต่เนื่องจากจะมีพีคเกิดค่อนข้างมาก ดังนั้นการวิเคราะห์สเปกตรัมช่วงนี้จึงค่อนข้างยาก เทคนิคนี้จะนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับด้านวัสดุศาสตร์ เช่น ใช้ในการจำแนกชนิดของพอลิเมอร์ และในด้านอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เนื่องจากเทคนิคนี้มีค่าใช้จ่ายน้อยรวมไปถึงชนิดของตัวอย่างสามารถวิเคราะห์ได้เกือบทุกชนิด ดังนั้นจึงนิยมใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวิเคราะห์หาโครงสร้างและองค์ประกอบของโมเลกุลร่วมกับเทคนิคอื่น ๆ

2.15 วัสดุชีวมวล (Biomass)

ชีวมวล (Biomass) คือ สารทุกรูปแบบที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิต โดยไม่นับการกลายเป็นเชื้อเพลิงฟอสซิลไปแล้ว เช่น สิ่งที่ได้หรือเหลือใช้จากการเกษตร ซึ่งพลังงานชีวมวลนี้มีสัดส่วนการใช้คิดเป็นร้อยละ 14.7 ของพลังงานรวมของโลก (สุวิมล กาญจนสุธา, 2552) ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่อุดมสมบูรณ์ด้วยวัตถุดิบมวลชีวภาพหรือผลผลิตจากการเกษตร ได้แก่ ข้าว ข้าว อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวโพด ปาล์ม น้ำมัน เป็นต้น โดยผลผลิตจากการเกษตรที่มีส่วนประกอบของแป้ง (คาร์โบไฮเดรต) น้ำตาล (กลูโคส) หรือเส้นใย (เซลลูโลส) เหล่านี้สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ แต่เมื่อพิจารณาความสามารถในการแข่งขันด้านราคาและความสามารถในการเพาะปลูกของประเทศไทยแล้ว อาจจัดได้ว่ามันสำปะหลังเป็นพืชที่มีความเป็นไปได้ และมีความเหมาะสมมากชนิดหนึ่ง เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่สามารถส่งออกผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลังเป็นอันดับ 1 ของโลก

2.15.1 มันสำปะหลัง (cassava)

มันสำปะหลังเป็นพืชในตระกูล Euphorbiaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculentacrantz* มีชื่อทางการค้าว่า Cassava หรือ Tapioca มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ ต่อมาได้ขยายไปสู่แหล่งอื่น ๆ ของโลก สำหรับประเทศไทยมีการนำมันสำปะหลังเข้ามาปลูกในพื้นที่ภาคใต้เป็นครั้งแรกเพื่อใช้ทำแป้ง และสาเก ต่อมาได้ขยายพื้นที่ปลูกไปยังภาคตะวันออก ได้แก่ ชลบุรี ระยอง และจังหวัดใกล้เคียง เนื่องจากมีสภาพภูมิอากาศและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

ต่อการปลูก ดังนั้นจึงมีการขยายพื้นที่ปลูกอย่างรวดเร็วไปสู่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งในปัจจุบันกลายเป็นแหล่งปลูกที่ใหญ่ที่สุดของประเทศไทย (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

2.15.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นไม้พุ่มขนาดเล็กประกอบด้วยลำต้นที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-6 เซนติเมตร สูงประมาณ 1-4 เมตร สีของลำต้นจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ โดยส่วนที่อยู่ใกล้ยอดมีสีเขียว ส่วนแก่ที่ต่ำลงมาอาจมีสีน้ำเงิน สีเหลืองหรือสีน้ำตาล ใบของต้นมันสำปะหลังจะมีลักษณะเป็นแฉก ๆ ตั้งแต่ 5-9 แฉก รากของลำต้นจะเป็นแบบรากฝอย รากเหล่านี้เป็นคลังสะสมอาหารที่มีขนาดใหญ่ เรียกว่า “หัว” หัวของมันสำปะหลังจะมีประมาณ 5-15 หัว มีความยาว 15-100 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-15 เซนติเมตร โดยมีแบ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ



รูปที่ 2.21 ลักษณะของต้นและหัวมันสำปะหลัง

2.15.3 กากมันสำปะหลัง

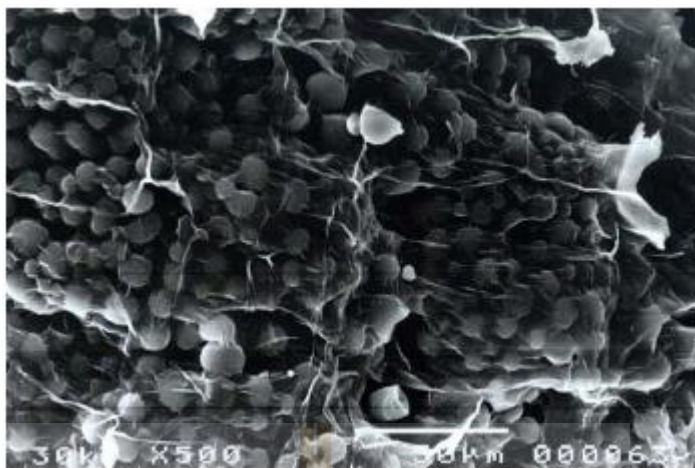
กากมันสำปะหลังเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง และเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่เป็นของแข็งจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง โดยในกระบวนการผลิตแต่ละครั้ง จะก่อให้เกิดกากมันสำปะหลังร้อยละ 27 ของปริมาณมันสำปะหลังที่ใช้ หรือมีปริมาณ 0.33 ตันต่อการแปรรูปหัวมันสำปะหลัง 1 ตัน (Chavalparit and Ongwandee, 2009) และจากสถิติข้อมูลการ

ส่งออกในปี พ.ศ. 2546-2553 ของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2554) พบว่า ปริมาณกากมันสำปะหลังเฉลี่ยต่อปีประมาณ 300,000-400,000 ตัน และมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554)

การลดปริมาณกากมันสำปะหลัง คือ การตากแดดให้แห้ง และจำหน่ายในราคาถูกเพื่อผสมใช้เป็นแหล่งพลังงานในอาหารสัตว์ (สุนีย์ โชคินิรนาท, 2539; Sriroth, Piyachomkwan, Wanlapatit, and Oates, 2000) แต่ในการลดปริมาณกากมันสำปะหลังด้วยการตากแดดให้แห้งจะต้องใช้พื้นที่มาก ใช้เวลานานเพราะกากมันสำปะหลังที่ได้มีความชื้นสูงประมาณร้อยละ 60-75 ทั้งนี้อาจเกิดกลิ่นอันไม่พึงประสงค์จากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติ (สุกัญญา จัตตุพรพงษ์ และ ผกาพรรณ สุกุลมัน, 2545; Balagopalan, Ray, Sheriff, and Rajalekshmy, 1994; Panichnumsin, Nopharatana, Ahring, and Chairprasert, 2011) ดังนั้นจึงควรรหาแนวทางใช้กากมันสำปะหลังเพิ่มขึ้นเพื่อลดปริมาณและเพิ่มมูลค่าของกากมันสำปะหลัง

2.15.4 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบของกากมันสำปะหลังแตกต่างกันตามคุณภาพของวัตถุดิบ (หัวมันสำปะหลัง) และประสิทธิภาพในการสกัดแป้งในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังของแต่ละโรงงาน (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2540) โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากมันสำปะหลังแห้งคือ แป้ง มีปริมาณเฉลี่ยร้อยละ 60-75 โดยน้ำหนัก รองลงมา คือ เส้นใย (เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน) ประมาณร้อยละ 20-30 โดยน้ำหนัก โดยมีโปรตีน ไขมัน และเถ้าในปริมาณต่ำ (Grace, 1977; Balagopalan et al., 1994; Panichnumsin et al., 2010) ดังรูปที่ 2.22 แสดงโครงสร้างของกากมันสำปะหลังจากกลั่นจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งมีเม็ดแป้งสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก ด้วยมีองค์ประกอบของแป้งและเส้นใย สูงทำให้กากมันสำปะหลังได้รับความสนใจเพื่อนำมาใช้ประโยชน์เป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจและลดกากมันสำปะหลัง เช่น การใช้กากมันสำปะหลังเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ทดแทนการนำเข้าอาหารเสริมที่มีราคาแพง (เสริมศักดิ์ มานะเลิศสกุล, 2546; ชาคร วิชกุล, 2548) เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ (ธีระพงษ์ สุขสว่าง, 2550) และกรดอินทรีย์ (กฤติกา กาบพลอย, 2551; Carta, Soccol, Ramos, and Fontana, 1999) เป็นวัสดุปรับปรุงดิน (กิตติศักดิ์ พนิกรณ, 2551) และใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอล (Kosugi, Kondo, Ueda, Murata, Vaithanomsat, Thanapase, Arai, and Mori, 2009) นอกจากนี้กากมันสำปะหลังยังมีศักยภาพในการปลดปล่อยน้ำตาลเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตพลังงานหรือผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพ เนื่องจากกากมันสำปะหลังมีลักษณะทางเคมีที่เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์และสามารถย่อยสลายได้ง่าย (สุวิมล, 2551)



รูปที่ 2.22 โครงสร้างของกากมันสำปะหลังจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงเม็ดแป้งที่ถูกกักในโครงสร้างเส้นใยของผนังเซลล์ (Sriroth et al., 2000)

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

แหล่งข้อมูล	องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ)				
	แป้ง	เส้นใย	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
ชลดา ซือสตัซ (2546)	61.84	14.35	2.03	-	2.38
ชั้นยาภรณ์ นาวิรวรรณ (2542)	67.46	11.58	4.18	1.85	3.30
Kosugi et al., (2009)	60.6	29	0.4	-	-
Rattanachomsri et al., (2009)	60.10	23.04	-	-	-

2.15.5 โครงสร้างของแป้ง

แป้ง (Starch) เป็นพอลิแซคคาไรด์ ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (Glycosidic linkage) เป็น โมเลกุลขนาดใหญ่ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายพอลิเมอร์มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (Aldehyde group) เรียกว่า Reducing end group โมเลกุลของแป้งมี 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (อะไมเลส) และพอลิเมอร์ เชิงกิ่ง (อะไมโลเพคติน) โดยอัตราส่วนของอะไมโลส และอะไมโลเพคตินเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติของแป้ง (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะขวัญ, 2550)

1) อะไมโลส (Amylose) อะไมโลสประกอบไปด้วยหน่วยของ D(+) กลูโคส ประมาณ 500-2,000 มาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ α -1,4 glycosidic linkage น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปตั้งแต่ 2,000-500,000 ในแป้งมีอะไมโลสอยู่ประมาณร้อยละ 20-25

2) อะไมโลเพคติน (Amylopectin) อะไมโลเพคตินเป็นแป้งที่มีโครงสร้างแตกแขนง แต่ละแขนงประกอบด้วยหน่วยกลูโคสประมาณ 12 หน่วย แขนงของอะไมโลเพคตินจะยึดกันด้วยพันธะ α -1,4 glycosidic linkage จุดที่มีการแตกแขนงจะยึดกันด้วยพันธะ α -1,6 glycosidic linkage โดยทั่วไปอะไมโลเพคตินจะไม่ละลายน้ำ เมื่อรวมตัวกับไอโอดีนจะให้สีม่วงแดง น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1,000,000 มีอยู่ประมาณร้อยละ 75-85 ของแป้งทั้งหมด

2.15.6 โครงสร้างของเส้นใย

เส้นใยเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของพืช โดยประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

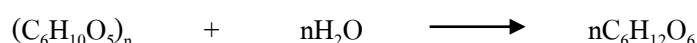
1) เซลลูโลส (Cellulose) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในผนังเซลล์ของพืช เป็นสารประกอบไฮโมพอลิแซคคาไรด์ ไม่มีกิ่งก้าน ประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ น้ำตาลกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (Glucosidic linkage) โดยจะจับกันที่ตำแหน่งพันธะ β -1(4) ซึ่งสามารถพบได้ในพืชชั้นสูง สาหร่ายและเป็นองค์ประกอบในทรัพยากรหมุนเวียน (Renewable resource) หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว แกลบ ชี้อ้อย ชานอ้อย กระดาษใช้แล้ว กากมันสำปะหลัง เป็นต้น (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 2551; Prasad, Singh, Jain, and Joshi, 2007)

2) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มักพบร่วมกับเซลลูโลส ในผนังเซลล์พืช และมีขนาดเล็กกว่าเซลลูโลส โดยทั่วไปจะเป็นพอลิเมอร์ผสมของโมโนแซคคาไรด์ ได้แก่ ไซโลส กลูโคส แมนโนส และกาแลกโตส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (Glucosidic linkage) ชนิด β (1-4) พบมากในไม้ประเภทเนื้อแข็ง พืชจำพวกหญ้า และฟางจะพบไซแลน (Xylan) เฮมิเซลลูโลสจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าเซลลูโลส และละลายในสารละลายต่าง ๆ ได้ดี

3) ลิกนิน (Lignin) เป็นพอลิเมอร์ของสารประกอบอะโรมาติก (Aromatic compound) ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล เมทอกซิล และหน่วยฟีนิลโพรเพน มีโมเลกุลที่แข็งแรง ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด ลิกนินเป็นองค์ประกอบหนึ่งในโครงสร้างของเซลล์พืชบริเวณรอบ ๆ เซลลูโลส โดยเป็นตัวยึดเกาะระหว่างเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เพื่อป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์

2.15.7 การย่อยหรือไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

การย่อยหรือไฮโดรไลซิสเป็นกระบวนการที่เปลี่ยนพอลิแซคคาไรด์ (แป้งและเซลลูโลส) เป็นน้ำตาล โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยอย่างสมบูรณ์ คือ กลูโคส ดังสมการ (กล้าณรงค์ และเกื้อกุล, 2550)



การย่อยสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การย่อยด้วยสารเคมีและการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยกากมันสำปะหลัง จะมีลักษณะคล้ายกับกระบวนการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (พัทธ์ประไพ ประจำเมือง, 2546)

2.15.7.1 การย่อยด้วยสารเคมี (Chemical hydrolysis)

การย่อยด้วยสารเคมี เช่น สารละลายกรดหรือด่างจะเกิดปฏิกิริยาทำลายพันธะไกลโคซิดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจนภายใต้สภาวะที่รุนแรง โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยอย่างสมบูรณ์ คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส

2.15.7.2 การย่อยด้วยกรด (Acid hydrolysis)

อาจแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการ คือ

1) กระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟูริกเข้มข้น ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ข้อเสีย คือ จะต้องมีการแยกกรดออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้และการนำกรดกลับมาใช้ใหม่ รวมทั้งปัญหาการสูญเสียกรดไปกับส่วนที่ไม่ถูกย่อยสลาย และการฟุกร่อนของเครื่องมือจากการใช้กรดแก่

2) กระบวนการที่ใช้กรดอ่อน เป็นการใช้อกรดอ่อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 180 องศาเซลเซียส ผลที่ได้จากการย่อย คือ เซลลูโลสยังมีโครงสร้างเป็นเส้นใยอยู่ และวิธีการนี้จะไม่สามารถนำกรดกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่จะถูกทำให้เป็นกลางด้วยปูนขาว หรือแคลเซียมคาร์บอเนต

2.15.7.3 การย่อยด้วยด่าง (Alkaline hydrolysis)

สารเคมีที่นิยมใช้ในการย่อย คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เอทิลีน ไดเอมีน และแอมโมเนีย เป็นต้น ซึ่งจะมีผลทำให้สายของพอลิแซคคาไรด์สั้นลง ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 160-180 องศาเซลเซียส และต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อย

2.15.8 การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymetic hydrolysis)

การย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยทั่วไปจะผลิตจากเชื้อราและแบคทีเรีย เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สิ่งมีชีวิต สร้างขึ้น เพื่อทำปฏิกิริยาภายในเซลล์และมีความเฉพาะต่อสับสเตรท จึงทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยมีผลผลิตข้างเคียงน้อยทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงและไม่ทำให้เกิดการฟุกร่อนของเครื่องมือ ซึ่งกากมันสำปะหลังเป็นวัสดุที่มีแป้งและเส้นใยเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่โดยเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการย่อยเพื่อเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล คือ เอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส (พัทธ์ประไพ, 2546)

2.15.8.1 เอนไซม์อะไมเลส (Amylase)

เอนไซม์อะไมเลส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะไกลโคซิดิกชนิด

1,4- α -D ในโอลิโกแซกคาไรด์หรือพอลิแซกคาไรด์ เช่น แป้งและไกลโคเจน เมื่อพิจารณากลไกการเร่งปฏิกิริยาดำเนินการตัดพันธะ สามารถแบ่งได้ 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1) เอนโดอะไมเลส

ทำหน้าที่ตัดพันธะ 1,4 ของอะไมโลสหรืออะไมโลเพคตินแบบสุ่มและจะปล่อยพันธะกลูโคซิดิกแอลฟา 1,6 ของอะไมโลเพคติน ผลผลิตที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้เป็นสารผสมของโอลิโกแซกคาไรด์ (Oligosaccharide) เช่น กลูโคส มอลโทส โดยเอนไซม์ในประเภทนี้ ได้แก่ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในสกุลอะไมเลสที่มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมมากที่สุด โดยใช้ในอุตสาหกรรมแป้ง สารซักฟอก และสิ่งทอ ซึ่งเป็นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย เช่น *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* และเชื้อรา กลุ่ม *Aspergillus* ได้แก่ *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*.

2) เอกโซอะไมเลส

ทำหน้าที่ตัดพันธะกลูโคซิดิกจากปลายสาย และทำให้เกิดผลิตภัณฑ์กลูโคสหรือมอลโทส ซึ่งมีการสลับโครงสร้างที่คาร์บอนตัวที่ 1 ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ประเภทนี้มี 2 ชนิด คือ เบต้าอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส

2.1) เบต้าอะไมเลส (β -amylase) ย่อยจากด้านปลายโมเลกุล ครั้งละ 2 โมเลกุลกลูโคส ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทสเป็นผลผลิต ซึ่งส่งผลกระทบต่อพันธะแอลฟา (1,4) และเมื่อย่อยมาถึงพันธะแอลฟา (1,6) กิจกรรมเอนไซม์จะหยุดลง เอนไซม์นี้ต้องการแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เป็นโคแฟกเตอร์

2.2) กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) หรือเรียกว่า อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในเชื้อราบางชนิด เช่น *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus* spp. นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ออกมาเพื่อย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ (มณชัย เดชสังกรานนท์, 2546; Saelim, Dissara, and Kittikun, 2008) เอนไซม์นี้จัดเป็นแอลฟาอะไมเลสชนิดหนึ่งที่ย่อยจากปลายโมเลกุล (Exo-hydrolase) ด้านไม่มีหมูรีดิวซ์เข้าสู่ภายในโมเลกุลทีละ 1 หน่วยของกลูโคสอย่างเป็นระเบียบ โดยสามารถตัดทั้งพันธะแอลฟา(1,4) และแอลฟา(1,6) แต่จะตัดพันธะแอลฟา(1,4) ได้เร็วกว่าแอลฟา(1,6) เอนไซม์นี้ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (Cofactor)

2.15.8.2 เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยสลายประกอบเซลลูโลส (Cellulytic enzyme) ทำหน้าที่ตัดพันธะกลูโคซิดิกในเซลลูโลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่มหลัก (เปี่ยมสุข, 2551) ดังนี้

1) เอนโดกลูคาเนส (Endoglucanase)

เอนโดกลูคาเนส (Endoglucanase) หรือ 1,4-β-D-glucaneglucanohydrolase ทำหน้าที่ตัดพันธะเบต้า 1,4 ภายในเซลลูโลสอย่างสุ่ม โดยจะย่อยในบริเวณออสันฐาน (Amorphous) ทำให้เกิดปลายอิสระ ผลผลิตที่ได้ คือ โอลิโกแซคคาไรด์

2) เอกโซกลูคาเนส (Exoglucanase)

เอกโซกลูคาเนส (Exoglucanase) หรือ เซลโลไบโอไฮโดรเลส ทำหน้าที่ย่อยโดยการตัดโมเลกุลจากปลายสายทั้ง 2 ด้าน โดยย่อยทีละ 2 หน่วยกลูโคสในบริเวณที่เป็นผลึก ผลิตภัณฑ์หลักคือ เซลโลไบเอส (กลูโคส เบต้า-1,4-กลูโคส)

3) เบต้า-กลูคาเนส (β-glucanase)

เบต้า-กลูคาเนส (β-glucanase) หรือ เซลโลไบเอส (Cellobiase) ทำหน้าที่ย่อยโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นที่เกิดจากการย่อยของเอนโดกลูคาเนส และเซลโลไบเอสที่เกิดจากเอกโซกลูคาเนสให้ได้กลูโคส เพื่อเป็นพลังงานต่อไป

2.15.9 การย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์

ยีสต์ที่มีความสามารถย่อยแป้งที่สำคัญ คือ *Saccharomycopsis fibuligera* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสออกมาเพื่อย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ (มณชัย, 2546; Saelim et al., 2008; จิราภรณ์ ยอดเดือน, วลัยรัตน์ จันทพรานนท์ และ หทัยรัตน์ ริมศิริ, 2558) Sukhumavasi และคณะ (1975) ได้ทดลองคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยแป้งได้จากลูกแป้งในประเทศไทย พบว่า จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งสูงสุด คือ ยีสต์ในสกุล *Endomycopsis* (*Saccharomycopsis fibuligera*) และพบว่าสามารถสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ดี และ *Rhizopus* และ *Endomycopsis* ก็สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพื่อไฮโดรไลซ์แป้งแล้วให้ผลผลิตส่วนใหญ่คือกลูโคส ส่วนยีสต์อื่นที่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ ได้แก่ *E. hordei*, *E. lindneri* และ *E. javanensis* นอกจากนี้เข็รายังสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ ได้แก่ *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. เป็นต้น (Windish and Mhatre, 1965) ได้ศึกษา

ปัจจุบันมีการศึกษาอย่างกว้างขวางในการพัฒนากระบวนการย่อยด้วยจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสในวัสดุเหลือทิ้งต่าง ๆ ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ผู้วิจัยจึงสนใจในการศึกษาการใช้ยีสต์ ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ออกมาเพื่อย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ (มณชัย, 2546; Saelim et al., 2008) เพื่อนำไปใช้ในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังให้ได้เป็นน้ำตาลรีดิวิซ์เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตพลาสติกชีวภาพต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate : PHA) โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิตของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง รวมทั้งศึกษาหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์เพื่อเปรียบเทียบชนิดของ PHA ที่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้ ซึ่งแบ่งขั้นตอนดำเนินการวิจัยออกเป็น 5 ขั้นตอนดังนี้

การทดลองช่วงที่ 1 ศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถในการผลิต PHA จากระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง และแบคทีเรียที่มีข้อมูลการคัดแยกและเก็บรักษา ณ ห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองช่วงที่ 2 ศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยกากมันสำปะหลังของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA

การทดลองช่วงที่ 3 ศึกษาความสามารถในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของพอลิเมอร์เบื้องต้น โดยการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน (Functional group) ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

การทดลองช่วงที่ 4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA ได้ปริมาณสูงจากการทดลองช่วงที่ 3 มาใช้ในการศึกษาด้วยการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งอาหาร ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต และแปรผันอัตราการเขย่า และพิสูจน์เอกลักษณ์ของพอลิเมอร์โดยการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน (Functional group) ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย (Instruments)

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
1) เครื่องอ่างน้ำ (Water bath) ยี่ห้อ Daihans รุ่น WEB-6	Daihan scientific, Korea
2) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น IN 260	Memmert, Germany
3) ตู้ควบคุมความชื้นอัตโนมัติ (Auto dry) ยี่ห้อ Eureka รุ่น DX-126	Taiwan Dry Tech, Taiwan
4) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) ยี่ห้อ ScanLaf รุ่น Mars 1500	Labogene Aps, Denmark
5) เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler toledo รุ่น AG 285	Mettler Toledo, USA
6) เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler toledo รุ่น ML3002	Mettler Toledo, USA
7) เครื่องกวนสารละลาย ยี่ห้อ Heidolph รุ่น MR Hei-Standard	Heidolph, Germany
8) ตู้อบแห้ง (Hot air oven) ยี่ห้อ Binder รุ่น FED	Binder, Germany
9) เครื่องกลั่นในโตรเจน (Distilling unit) ยี่ห้อ FOSS รุ่น Kjeltech 8420	Foss Tecator, Sweden
10) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Analytikjena รุ่น 50 plus	Analytikjena, Germany
11) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ยี่ห้อ Hiclave รุ่น HV-50	Amerex instruments, USA
12) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Jenway รุ่น 3510	Keison, England
13) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ยี่ห้อ Innova 43 รุ่น New Brunswick	Eppendorf, England
14) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuges) ยี่ห้อ Hettich รุ่น Universal 32	Hettich, Germany
15) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)	Nikon, Japan
16) กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ยี่ห้อ Carl Zeiss รุ่น Axio scopy A 1	Carl Zeiss, Germany
17) กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Field Emission Scanning Electron Microscope; FE-SEM) ยี่ห้อ Zeiss รุ่น Auriga	Carl Zeiss, Germany
18) เครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) ยี่ห้อ Bruker รุ่น Tensor 27	Bruker, USA
19) เครื่องเคลือบผิวตัวอย่าง (Vacuum sputter coater) ยี่ห้อ Leica รุ่น EM ACE600	Leica, Germany
20) เครื่องทำตัวอย่างแห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical dry point) ยี่ห้อ Leica EMCPD300	Leica, Germany

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (Chemicals)

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
1) Sodium hydroxide (NaOH)	Ajax Finechem, Australia
2) Sodium tetraborate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)	Ajax Finechem, Australia
3) Sulfuric acid (H_2SO_4)	E. Merck Damstadt, Germany
4) Boric acid (H_3BO_3)	Ajax Finechem, Australia
5) Methyl red ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$)	Rankem, India
6) Methylene blue ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{SCl}$)	Fluka, Germany
7) Ethyl alcohol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)	E. Merck Damstadt, Germany
8) Phenolphthalein ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$)	Rankem, India
9) Sodium chloride (NaCl)	Ajax Finechem, Australia
10) Molybdenum trioxide (MoO_3)	Ajax Finechem, Australia
11) Magnesium chloride ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem, Australia
12) Ferrous ammonium citrate ($(\text{NH}_4)_3\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem, Australia
13) Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Ajax Finechem, Australia
14) Calcium chloride (CaCl_2)	Ajax Finechem, Australia
15) Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem, Australia
16) di-Sodium Hydrogen Orthophosphate (Na_2HPO_4)	Ajax Finechem, Australia
17) Cobalt (II) Chloride ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem, Australia
18) Manganise (II) Chloride ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem, Australia
19) Nickle chloride ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem, Australia
20) Copper (II) Sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem, Australia
21) D-glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	Ajax Finechem, Australia
22) Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	E. Merck Damstadt, Germany
23) Zinc sulfate (ZnSO_4)	Ajax Finechem, Australia
24) Ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Ajax Finechem, Australia
25) 1,2 Dichloroethane ($\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$)	Sigma-Aldrich, USA
25) Crystal violet ($\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClN}_3$)	Sigma-Aldrich, USA
26) Ammonium oxalate ($\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$)	Sigma-Aldrich, USA
27) Safranin O ($\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{ClN}_4$)	E. Merck Damstadt, Germany

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (Chemicals)

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
28) Iodine (I)	DBH, England
29) Potassiumiodide (KI)	Ajax Finechem, Australia
30) Nile Blue A (C ₂₀ H ₂₀ ClN ₃ O)	Sigma-Aldrich, USA
31) Nile red (C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, USA
32) Yeast extrset	Difco, USA
33) Polypeptone	Difco, USA
34) Tryptone	Difco, USA
35) Peptone	Difco, USA
36) Agar	Difco, USA

3.3 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 Complex medium (broth) 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	5.0	กรัม
Polypeptone	5.0	กรัม
Tryptone	5.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3.2 Complex medium agar

เตรียมส่วนผสมของ Complex medium และเติม agar 15.0 กรัมต่อลิตร ละลายส่วนผสม โดยให้ความร้อน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3.3 Minimal medium (broth) 1 ลิตร ประกอบด้วย

CaCl ₂ .2H ₂ O	0.01	กรัม
Ferrous ammonium citrate	0.05	กรัม
Glucose	10.0	กรัม

KH_2PO_4	1.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	3.0	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0	กรัม
Trace element	1.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับพีเอช (pH) เท่ากับ 7 ± 0.2 นำไปนึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Trace element 1 มิลลิลิตร ซึ่งในน้ำกลั่น 1 ลิตรประกอบด้วย

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2	กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.56	กรัม
H_3BO_3	0.3	กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.03	กรัม
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.03	กรัม
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม

3.3.4 Minimal medium agar

เตรียมส่วนผสมของ Minimal medium และเติม agar 15.0 กรัมต่อลิตร ละลายส่วนผสมโดยให้ความร้อน นำไปนึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3.5 Yeast peptone cassava (broth) 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	0.5	กรัม
Peptone	0.5	กรัม
Cassava starch	10	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับพีเอช (pH) เท่ากับ 7 ± 0.2 นำไปนึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3.6 Yeast peptone cassava agar

เตรียมส่วนผสมของ Yeast peptone cassava และเติม agar 15.0 กรัมต่อลิตร ละลายส่วนผสม ปรับพีเอช (pH) เท่ากับ 7 ± 0.2 และหลอม Agar โดยให้ความร้อน นำไปนึ่งมาเชื้อ

ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4 วัสดุชีวมวล

3.4.1 กากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังที่ใช้ตลอดการวิจัยนี้ได้จากอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง นำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างแห้ง บดให้มีขนาด 10-100 mesh (2 มิลลิเมตร-150 ไมโครเมตร) เก็บในโถสุญญากาศเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ และนำตัวอย่างกากมันสำปะหลังส่งวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง โดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.5 วิธีดำเนินการทดลอง

3.5.1 การทดลองช่วงที่ 1 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA เป็นการคัดเลือกจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง และจากแบคทีเรียที่มีข้อมูลการคัดแยกของเชื้อและเก็บรักษาอยู่ ณ ห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.5.1.1 แหล่งที่มาของจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างจุลินทรีย์แบบจ้วงตัก (Grab sampling) จากระบบผลิตก๊าซชีวภาพ (Biofuel-reactor) ซึ่งเป็นระบบบำบัดน้ำเสียแบบถังหมักไร้อากาศของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง ได้แก่บริเวณจุดรวบรวมน้ำเสียจากระบบการผลิตแป้งมันสำปะหลังก่อนเข้าระบบบำบัด บริเวณจุดปล่อยน้ำทิ้งผ่านการบำบัด และเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์จากกากมันสำปะหลัง รวมถึงแบคทีเรียที่มีข้อมูลการคัดแยกและเก็บรักษาอยู่ ณ ห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้แก่ *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1, *Pseudomonas* sp. SUTS 2 (Potivichayanon and Kitlerpompairoat, 2010) และ *Delftia* sp. SUTR 3 (Katramee, Toensakes, and Potivichayanon, 2015)

3.5.1.2 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA ตามวิธีของ Chansatein และคณะ (2012) โดยนำตัวอย่างจุลินทรีย์จากแหล่งต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium เพื่อกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการดังนี้

1) ตัวอย่างจุลินทรีย์จากน้ำเสีย

นำตัวอย่างน้ำเสียเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium ในสัดส่วน

ปริมาณตัวอย่างน้ำเสียต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในขวดทดลอง (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมทุก 7 วัน ทำซ้ำ 3 ครั้ง

2) ตัวอย่างจุลินทรีย์จากกากมันสำปะหลัง

นำกากมันสำปะหลัง 5 กรัม เติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมทุก 7 วัน

3) แบคทีเรียที่เก็บรักษาอยู่ ณ ห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นำตัวอย่างแบคทีเรียที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาขีด (Streak plate) บนอาหารแข็ง Complex medium agar ทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ จุลินทรีย์ จากนั้นใช้หลอดเขี่ยเชื้อ เขี่ยโคโลนีของจุลินทรีย์ 1 ลูบใส่ลงในขวดทดลอง (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Complex medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงที่ อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม ทุก 7 วัน ทำซ้ำ 3 ครั้ง

จากนั้นทำการคัดแยกจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงที่มีความจำเพาะเจาะจง ต่อการผลิต PHA โดยนำจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในอาหาร Complex medium ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่เติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณตัวอย่างต่ออาหารเลี้ยง เชื้อเท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตร ทำการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จนกระทั่งอาหารเริ่มขุ่น ถ่ายเชื้อลงในอาหาร เลี้ยงเชื้อสูตรเดิมทุก 7 วัน ทำซ้ำ 3 ครั้ง

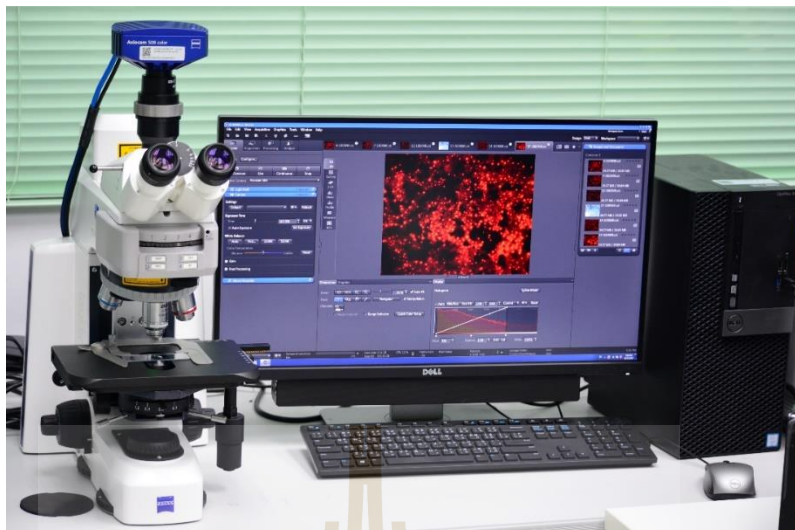
3.5.1.3 การคัดเลือกลายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA

จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว Minimal medium จะถูกแยกด้วยวิธี Spreading plate technique โดยทำการเจือจางตัวอย่างลง 10 เท่า (Ten-fold dilution) ใน 0.85% (w/v) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ จากนั้นกระจายเชื้อ (Spread) บนอาหารแข็ง Minimal medium agar ที่เติม Nile red 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ละลาย Nile red 0.25 มิลลิกรัม ใน Dimethylsulfoxide 1 มิลลิลิตร) ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ภายใต้แสง Ultra violet ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นว่าจุลินทรีย์สามารถผลิต PHA ได้หรือไม่ โดยสังเกตลักษณะโคโลนี ของจุลินทรีย์ที่มีการเรืองแสงออกมาเป็นสีชมพูจากการติดสีของ Nile red กับส่วนไขมันซึ่งอาจเป็น

PHA ที่อยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ จากนั้นคัดแยกโคโลนีเดี่ยวของจุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกและทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธี Streak plate บนอาหารแข็ง Minimal medium agar ทำซ้ำ 2 ครั้งเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อ เขี่ยโคโลนีของจุลินทรีย์ 1 ลูกปลงในขวดทดลอง (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมทุก 7 วัน เพื่อนำไปศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการสะสม PHA ภายในเซลล์ด้วยการย้อมสี Nile blue A ตามขั้นตอนที่ 3.5.1.4

3.5.1.4 การศึกษาการสะสม PHA ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์

ศึกษาการสะสม PHA ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ตามวิธีของ Berlaga และคณะ (2006); Rodtong และคณะ (2008); Khardenavis และคณะ (2009) โดยนำจุลินทรีย์ที่ได้จากการศึกษาความสามารถในการผลิต PHA ขั้นต้น ในขั้นตอนที่ 3.5.1.3 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Minimal medium agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาเตรียมรอย Smear ของเซลล์จุลินทรีย์บนแผ่นกระจกสไลด์ (Microscope slide) และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน (Heat-fixed) จากนั้นย้อมด้วย 1% Nile blue A เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) นำไปตรวจสอบแกรนูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ด้วยฟิลเตอร์ Cy3 (Excitation wavelength 546 nm และ Emission wavelength 562) ซึ่งเป็น Exciter filter ที่มีความยาวคลื่นแสงกระตุ้นจำเพาะกับช่วงกระตุ้นของสี Nile blue A ที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร ด้วยกำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ (Objective lens) 100 เท่า เพื่อศึกษาการสะสม PHA ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่มีการผลิตและสะสม PHA จะปรากฏแกรนูลสีส้มหรือแดงอยู่ภายในเซลล์ จากการติดสีย้อม Nile blue A กับแกรนูล PHA ภายในเซลล์ ศึกษาพื้นที่ของ PHA granule โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มของการเรืองแสงสีย้อม (Intensity mean value) ต่อพื้นที่ของเซลล์ทั้งหมดโดยใช้โปรแกรม Zen 2 ของกล้องจุลทรรศน์ เพื่อประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นในการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด



รูปที่ 3.1 กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope)

3.5.1.5 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

นำเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ได้จากการคัดแยก ในหัวข้อที่ 3.5.1.3 ในอาหารเหลว Yeast-Peptide Cassava medium (YPC medium) คัดส่วนปริมาณตัวอย่างต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPC agar ด้วยการทำเทคนิค Spreading plate technique นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการใส่เชื้อแบบ Point inoculum โดยใช้เข็มเย็บปลายตรง (Needle) ลงบนผิวอาหาร YPC agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้ง โดยหยด Iodine solution ลงบนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร YPC agar อ่านผลภายใน 2 นาที จากบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของจุลินทรีย์ เนื่องจากแป้งถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ พร้อมทั้งตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของจุลินทรีย์และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone จากนั้นคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มี Clear zone กว้าง ซึ่งแสดงถึงศักยภาพในการย่อยแป้งมันสำปะหลังของจุลินทรีย์ (Saelim et al, 2008)

3.5.1.6 การศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในข้อ 3.5.1.3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่เติมกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน ด้วยวิธีการนับโคโลนี (Colony count technique) โดยทำการเจือจางตัวอย่างจากการศึกษาครั้งละ 10 เท่า (Ten-fold dilution) ใน 0.85% (w/v) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ หลังจากนั้นนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium agar

ด้วยการทำเทคนิค Spreading plate technique นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วสังเกตงานเพาะเชื้อจากแต่ละตัวอย่างที่ถูกเจือจาง (Dilution) ที่มีจำนวนโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี นำมาคำนวณเป็นจำนวนเซลล์ (Colony forming units/ml หรือ CFU/ml) โดยจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถอ้างอิงถึงจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ (APHA, AWWA, WPCF, 2005) แล้วนำผลที่ได้ไปทำกราฟการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาระยะเวลาในการทวีคูณหรือ Generation time และอัตราการเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate : μ) จากนั้นนำจุลินทรีย์ในระยะที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการศึกษาการผลิต PHA ต่อไป

การคำนวณ

$$\text{จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/ml)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนี} \times \text{สัดส่วนเจือจาง}}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง}}$$

3.5.1.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกในข้อ 3.5.1.3 ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Minimal medium agar สำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผลิต PHA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีและการเจริญบนอาหาร เช่น รูปร่าง สี ผิวหน้าและขอบของโคโลนี

1) การศึกษา Gram staining ด้วยการย้อมติดสีแกรมของเซลล์จุลินทรีย์

การศึกษา Gram staining ด้วยการย้อมติดสีแกรมของเซลล์จุลินทรีย์ มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมรอย Smear ของเซลล์จุลินทรีย์บนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด
2. ตรึงเซลล์ให้ติดแผ่นสไลด์ด้วยความร้อน (Heat-fixed)
3. หยดสี Crystal violet ให้ทั่วรอย Smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำ
4. หยด Gram's iodine ให้ทั่วรอย Smear เป็นเวลา 1 นาที
5. ล้างด้วย 95% Ethyl alcohol ประมาณ 5 วินาที และล้างด้วยน้ำ
6. หยดสี Safranin ให้ทั่วรอย Smear เป็นเวลา 1 นาที และล้างด้วยน้ำ
7. นำไปตรวจดูรูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) กำลังขยาย 100 เท่า

2) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Field emission scanning electron microscope : FE-SEM)

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic) ด้วยการเขียนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA ที่เจริญบนอาหารแข็ง Minimal medium นำมาเตรียมรอย Smear ของเซลล์จุลินทรีย์บนกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) และตรึงเซลล์ด้วยความ

ร้อน (Heat-fixed) เก็บในตู้ดูดความชื้น (Desiccator) จากนั้นทำตัวอย่างให้แห้ง (Drying) ด้วยเทคนิคการทำให้ตัวอย่างแห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical point drying) โดยนำเข้าเครื่อง Critical point dryer ซึ่งให้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวเข้าไปแทนที่สารอินทรีย์ที่ใช้ดึงน้ำออกจากตัวอย่างจนกระทั่งแทนที่อย่างสมบูรณ์ จึงให้ความร้อนทำให้อุณหภูมิและความดันภายในช่องใส่ตัวอย่าง (Specimen chamber) เพิ่มขึ้นจนถึงจุดวิกฤตของคาร์บอนไดออกไซด์ (อุณหภูมิ 31.1 °C และความดัน 1,073 psi) เมื่อถึงจุดนี้ ของเหลวและก๊าซจะมีความหนาแน่นเท่ากันทำให้กลายเป็นไอ จึงได้ตัวอย่างที่แห้งและคงลักษณะรูปร่าง จากนั้นนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปติดบนแท่นวางตัวอย่าง (SEM stub) โดยใช้ Double slide carbon tape ในการเชื่อมติดตัวอย่างกับแท่นวาง แล้วฉาบ (Coating) ด้วยโลหะทองคำ 99% เพื่อทำให้เกิดการนำไฟฟ้า ด้วยเครื่อง Vacuum sputter coater ความหนาของชั้นโลหะที่ฉาบลงบนตัวอย่างมีความหนาประมาณ 3-5 นาโนเมตร การฉาบโลหะหากบางเกินไปอาจทำให้เกิดการสะสมของประจุบนผิวตัวอย่าง (Charging effect) และหากหนาเกินไปอาจทำให้บังรายละเอียดของพื้นผิวตัวอย่างได้ จากนั้นนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Field Emission Scanning Electron Microscope : FE-SEM) ที่กำลังขยาย 1,000-10,000 เท่า ค่าความต่างศักย์เร่ง (Accelerating voltage) 10-15 กิโลโวลต์ (kV)



รูปที่ 3.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Field Emission Scanning Electron Microscope : FE-SEM)

3.5.1.8 การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์

เตรียมเซลล์จุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกด้วยวิธี Streak plate บนอาหารแข็ง Complex medium agar ให้ได้โคโลนีเดียวเพื่อตรวจเช็คความบริสุทธิ์ของเชื้อ และส่งวิเคราะห์ที่หน่วยความร่วมมือการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งมหาวิทยาลัยมหิดลและมหาวิทยาลัยโอซาก้า คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อวิเคราะห์บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ในส่วนของยีน 16S rRNA และ 18S rRNA นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

3.5.1.9 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ Complex medium ในขวดทดลอง (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ในสัดส่วนปริมาณตัวอย่างต่ออาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บจุลินทรีย์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตอยู่ในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (Log phase) ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.5.1.6 ลงในหลอดเยือกแข็ง (Cryotube) โดยใส่กลีเซอรอล 60% ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรตัวอย่างต่อปริมาตรกลีเซอรอล) เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ของจุลินทรีย์แตกและนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.5.2 การทดลองช่วงที่ 2 ศึกษาปริมาณกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์

การทดสอบความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังและศึกษาความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ได้จากการคัดแยกในหัวข้อที่ 3.5.1.3 เพื่อใช้ในการย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA ในขั้นตอนเดียวของจุลินทรีย์ และศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในข้อ 3.5.1 โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.5.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

เตรียมกล้าเชื้อ โดยเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ในขวดทดลอง (Flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร ในสัดส่วนปริมาณตัวอย่างต่ออาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำจุลินทรีย์ในระยะที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา

ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.5.1.6 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่เติมกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลและการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ โดยใช้ช่วงการเจริญเติบโตในระยะเวลาดังกล่าวเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นตลอดการทดลอง

3.5.2.2 ศึกษาปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

ศึกษาปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้แต่ละชนิดและยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* เพื่อนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ โดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์และยีสต์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง โดยนำกล้าเชื้อจากข้อ 3.5.2.1 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่เติมกากมันสำปะหลังแทนแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกลูโคส ทำการเพาะเลี้ยงในขวดทดลอง (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณตัวอย่างต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตร โดยแปรผันปริมาณของกากมันสำปะหลัง 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลสูงสุด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทุก 6 ชั่วโมง ด้วยวิธีการนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuges) ที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใส 5 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Denitrosalicylic colorimetric method (Chaplin and Kennedy, 1994)

3.5.3 การทดลองช่วงที่ 3 การทดสอบความสามารถในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์

ขั้นตอนนี้เป็นกรนำจุลินทรีย์ได้จากกระบวนการทดสอบการสะสม PHA ในเซลล์ของจุลินทรีย์ด้วย 1% Nile blue A มาทดสอบความสามารถในการผลิต PHA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิต มีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

3.5.3.1 ทดสอบความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลและผลิต PHA ในขั้นตอนเดียวของจุลินทรีย์

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.5.2.1 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium โดยใช้ปริมาณกากมันสำปะหลังจากสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการย่อยกากมันสำปะหลังให้ได้น้ำตาลสูงสุดจากการทดสอบในข้อ 3.5.2.2 ปริมาณตัวอย่างต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในขวดทดลอง (Flask) ขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธีการนับโคโลนี (Colony count technique) จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกจากของเหลว เทส่วนใสออก เก็บตัวอย่างส่วนใส เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Denitrosalicylic colorimetric method (Chaplin and Kennedy, 1994) และไนโตรเจนที่เหลือในรูปของแอมโมเนียไนโตรเจน ($\text{NH}_3^+ - \text{N}$) ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Distillation Nesslerization (APHA, AWWA, WPCF, 2005) ล้างส่วนที่เป็นตะกอนด้วยน้ำกลั่น และปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนที่เป็นตะกอนไปสกัดแยก PHA ด้วย 1,2 ไดคลอโรอีเทน (1,2 Dichloroethane) และวิเคราะห์ปริมาณและหมู่ฟังก์ชันของ PHA ที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

3.5.3.2 ทดสอบความสามารถในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ด้วยน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังของยีสต์

นำกล้าเชื้อจากข้อ 3.5.2.1 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium โดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5118 ในปริมาณจุลินทรีย์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อต่อน้ำตาลเท่ากับ 10:20:80 โดยปริมาตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธีการนับโคโลนี (Colony count technique) จากนั้นเก็บเซลล์จุลินทรีย์โดยปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสออก เก็บตัวอย่างส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Denitrosalicylic colorimetric method (Chaplin and Kennedy, 1994) และไนโตรเจนที่เหลือในรูปของแอมโมเนียไนโตรเจน ($\text{NH}_3^+ - \text{N}$) ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Distillation Nesslerization (APHA, AWWA, WPCF, 2005) ล้างส่วนที่เป็นตะกอนด้วยน้ำกลั่น และปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนที่เป็นตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าเซลล์แห้ง (Aremu, Layokun, and Solomon, 2010) จากนั้นชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำไปสกัดด้วย 1,2 ไดคลอโรอีเทน (1,2 Dichloroethane) วิเคราะห์ปริมาณและหมู่ฟังก์ชันของ PHA ที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

3.5.4 การทดลองช่วงที่ 4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต PHA ในขั้นตอนที่ 3.5.3 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของจุลินทรีย์ โดยทำการแปรผันสภาวะการทดลองดังนี้ คือ ความเข้มข้นแหล่งอาหารไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) และแปรผันอัตราการเขย่า

3.5.4.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นแหล่งอาหารไนโตรเจน

นำจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิต PHA จากการทดลองในขั้นตอนที่ 3.5.3

จากนั้นนำกล้าเชื้อที่อยู่ในช่วงเวลาที่มียัตราการเจริญเติบโตสูงสุด จากข้อ 3.5.2.1 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium โดยใช้ปริมาณกากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร ในสัดส่วนปริมาณจุลินทรีย์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในขวดทดลอง (Flask) ขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที ทำการแปรผันสภาวะการทดลองดังนี้ คือ แปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจน ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ร้อยละ 1, 2 และ 3 โดยปริมาตร และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันที่ไม่เติมไนโตรเจน

ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยวิธีการนับโคโลนี (Colony count technique) ศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Denitrosalicylic colorimetric method (Chaplin and Kennedy, 1994) และไนโตรเจนที่เหลือในรูปของแอมโมเนียไนโตรเจน $(\text{NH}_3^+ - \text{N})$ ตรวจวิเคราะห์ห้ด้วยวิธี Distillation Nesslerization (APHA, AWWA, WPCF, 2005) เก็บเกี่ยวเซลล์นำไปสกัดด้วย 1,2 ไดคลอโรอีเทน (1,2 Dichloroethane) และวิเคราะห์ปริมาณและหมู่ฟังก์ชันของ PHA ที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

3.5.4.2 การศึกษาผลของอัตราการเขย่า

นำสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA จากการทดลองในขั้นตอนที่ 3.5.4.1 มาศึกษาอัตราการเขย่า โดยเปรียบเทียบการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 150 และ 200 รอบต่อนาที โดยนำกล้าเชื้อที่เจริญอยู่ในช่วงที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด จากข้อ 3.5.2.1 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium โดยใช้ปริมาณกากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร ในสัดส่วนปริมาณตัวอย่างต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับร้อยละ 10 โดยปริมาตร ในขวดทดลอง (Flask) ขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อที่ 3.5.4.1

3.6 วิธีการวิเคราะห์

3.6.1 การสกัด PHA ออกจากเซลล์จุลินทรีย์

นำเซลล์จุลินทรีย์มาทำการย่อยเซลล์ (Cell lytic pretreatment) โดยเติมเอทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนนำไปสกัดอย่างต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลาย คือ 1,2 ไดคลอโรอีเทน (1,2 Dichloroethane) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองสารสกัดที่ได้ผ่านกระดาษกรอง Glass fiber filter (GF/C) จากนั้นนำไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องระเหย นำไปสกัดซ้ำ

และตกผลึกด้วยเอทานอลเย็น จะได้ผลึกโพลีเมอร์ PHA ทำให้แห้งแล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณและหมู่ฟังก์ชันของ PHA

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณ PHA (g/l)} = \frac{(B-A) \times 1000}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (ml)}}$$

เมื่อ A = น้ำหนักของกระจกนาฟิกาเปล่า (g)

B = น้ำหนักของกระจกนาฟิกาที่มี PHA (g)

3.6.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพอลิเมอร์โดยการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน (Functional group)

การวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันของผลึกโพลีเมอร์ PHA ที่สกัดได้จากข้อ 3.6.1 ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) โหมด ATR โดยการบันทึก FT-IR spectrum ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรมิเตอร์ และทำการบันทึกค่าตั้งแต่ความยาวคลื่น $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ กำหนดค่า Resolution เท่ากับ 4 cm^{-1} , Scan time เท่ากับ 64 วินาที (Arumugam, Sandhya, and Ponnusami, 2014) เปรียบเทียบอินฟราเรดสเปคตรัมกับสารมาตรฐานพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate : P(3HB), Sigma-Aldrich)



รูปที่ 3.3 เครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาล Reducing sugar ที่มีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 5-500 ไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส โดยดูตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลจำนวน 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง สำหรับหลอดที่ไม่มีสารตัวอย่าง (Blank) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium เติม DNS solution ลงไปในแต่ละหลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว โดยการนำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมน้ำให้ครบ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอน

การคำนวณ

$$\text{น้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)} = \text{ค่าที่ได้จากการแทนค่าในกราฟมาตรฐาน} \times \text{อัตราส่วนเจือจาง}$$

3.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย (NH₃-N)

ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Distillation Nesslerization (APHA, AWWA, WPCF, 2005) โดยตวงตัวอย่างของเหลวที่แยกได้จากขั้นตอนการปั่นแยก (Centrifuge) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Digestion tube หากตัวอย่างเป็นกรดหรือด่าง ต้องปรับให้เป็นกลางก่อนด้วย NaOH 1 M หรือ H₂SO₄ 0.5 N จากนั้นเติมสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 25 มิลลิลิตร หยด Phenolphthalein indicator 2-3 หยด เติม NaOH 6 M จนได้สีชมพู แล้วนำไปกลั่น นำส่วนที่กลั่นออกมาได้จากขวดรูปชมพู่ที่มี Indicating boric acid อยู่ 50 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรรวมประมาณ 200 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก 0.01 N

การคำนวณ

$$\text{แอมโมเนีย-ไนโตรเจน (mg/l)} = \frac{(A-B) \times 1000 \times M \times 28}{\text{ตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการกลั่น (ml)}}$$

เมื่อ A = มิลลิลิตรของกรดซัลฟิวริกมาตรฐานที่ใช้ไทเทรตกับตัวอย่างน้ำ

B = มิลลิลิตรของกรดซัลฟิวริกมาตรฐานที่ใช้ไทเทรตกับแบลงค์

M = ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกมาตรฐานที่ใช้ (โมล/ลิตร)

3.6.5 การคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์ (Kinetic parameter)

การคำนวณค่าจลนพลศาสตร์ตามวิธีของ Karbasi, Ardjmand, Younesi, Safe kordi, and Yaghmaei, (2012); Gumel, Annuar, and Heidelberg, (2014); Khardenavis et al., (2009) ดังนี้

3.6.5.1 อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: μ) คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ หรือมวลชีวภาพ (Biomass) ของประชากรต่อหนึ่งหน่วยเวลา
คำนวณได้ดังสมการ

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = \mu t \quad (1)$$

เมื่อ x คือ จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ ณ เวลาใด ๆ (CFU/ml)
 x_0 คือ จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์เริ่มต้น (CFU/ml)
 t คือ เวลาที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ (ชั่วโมง)

3.6.5.2 ค่าสัมประสิทธิ์การผลิต PHB ต่อเซลล์ ($Y_{p/x}$, PHB yield coefficient, $\mu\text{g-PHB/cell}$)

$$Y_{p/x} = \frac{[P]}{x}$$

เมื่อ $[P]$ คือ ปริมาณพอลิเมอร์ ณ เวลาใด ๆ (กรัมต่อลิตร)
 x คือ จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ ณ เวลาใด ๆ (CFU/ml)

3.6.5.3 ค่าสัมประสิทธิ์การผลิต PHB จากหนึ่งกรัมไนโตรเจน ($Y_{p/s}$, PHB yield coefficient, g-PHB/g-N)

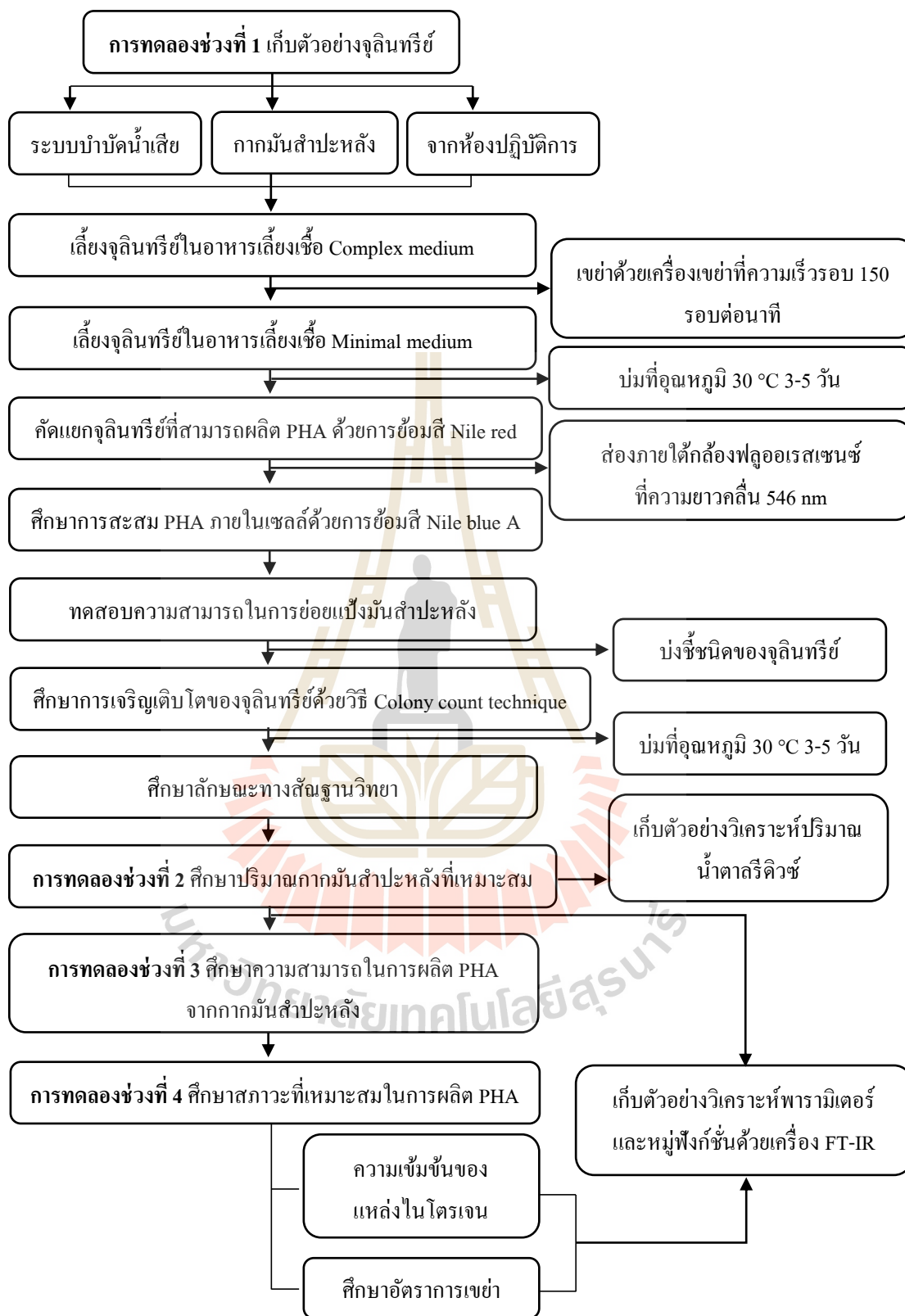
$$Y_{p/s} = \frac{[P]}{\Delta S} \quad (2)$$

เมื่อ $[P]$ คือ ปริมาณพอลิเมอร์ ณ เวลาใด ๆ (กรัมต่อลิตร)
 ΔS คือ ปริมาณสับสเตรท (กรัมต่อลิตร)

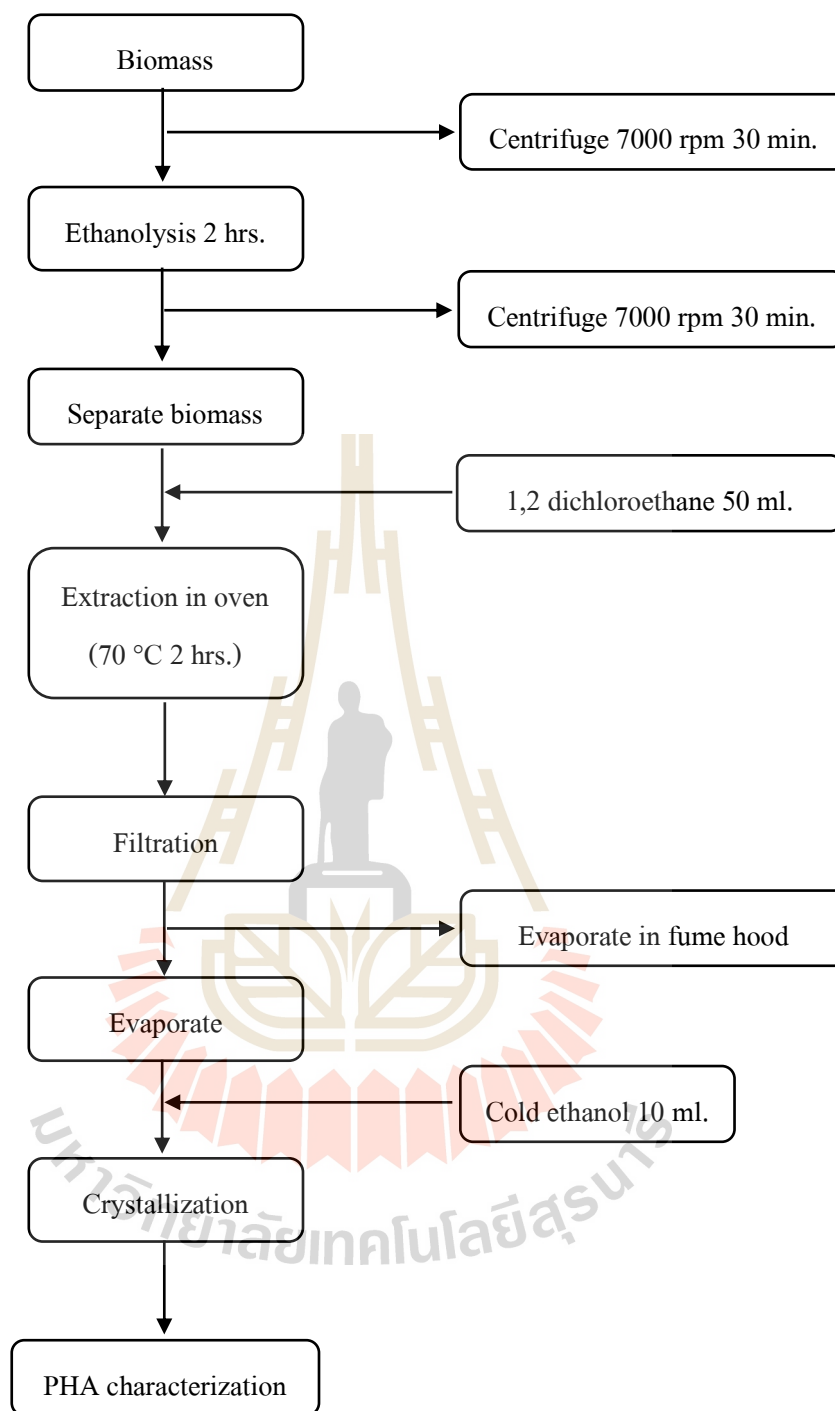
3.6.5.4 ค่าประสิทธิภาพการผลิต (Q_p , Volumetric productivity, g-PHB/l/h)

$$Q_p = \frac{[P]}{\Delta t} \quad (3)$$

เมื่อ P_{max} คือ ปริมาณพอลิเมอร์ ณ เวลาใด ๆ (กรัมต่อลิตร)
 Δt คือ เวลาที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ (ชั่วโมง)



รูปที่ 3.4 สรุปขั้นตอนการดำเนินการทดลอง



รูปที่ 3.5 สรุปขั้นตอนการสกัด PHA จากเซลล์จุลินทรีย์

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate : PHA) จัดเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิเอสเทอร์ ที่จุลินทรีย์หลายชนิดในธรรมชาติสามารถสังเคราะห์และสะสมในรูปแบบของแกรนูล (Granule) ภายในไซโทพลาสซึม เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการผลิต PHA ศึกษาการสะสม PHA ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ รวมถึงคุณลักษณะของพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดผลิตได้

4.1 การคัดเลือกรจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA

การคัดเลือกรจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA ขึ้นต้นจากระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง โดยทำการเก็บตัวอย่างแบบจ้วงจากน้ำเสียในกระบวนการผลิตและน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสีย รวมทั้งแบคทีเรียที่ถูกเก็บรักษาอยู่ ณ ห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ด้วยการคัดเลือกจากจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต (Living cells) โดยนำงานเพาะเชื้อที่มีจุลินทรีย์เจริญอยู่บนอาหาร Minimal medium agar ที่เติมสีย้อม Nile red 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงแสง UV ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร เพื่อดูการเรืองแสงของโคโลนีที่มีลักษณะโคโลนีเป็นสีชมพู (Spickermann, Rehm, Kalscheuer, Baumeister, and Steinbuechel, 1999) หากมีโคโลนีของจุลินทรีย์เรืองแสงภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร คาดว่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีการสะสม PHA อยู่ภายในเซลล์ ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่ามีจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังจำนวน 1 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติเบื้องต้นสามารถผลิต PHA ได้ คือ SUTR 1 จากจำนวน 4 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง Minimal medium agar และแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อม จำนวน 2 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น ได้แก่ SUTR 3 และ SUTS 1 จากจำนวนทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารจะมีการดูดซึมสารอาหารและสีย้อมเข้าสู่เซลล์ หากมีการสะสม PHA สีย้อมจะเข้าไปจับกับ PHA ภายในไซโทพลาสซึม เมื่อส่อง

ภายใต้แสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าว โคลีนีของจุลินทรีย์จึงมีการเรืองแสงเกิดขึ้น นอกจากนี้ PHA จัดเป็นพอลิเอสเทอร์ชนิดหนึ่งจึงสามารถตรวจวัดการสังเคราะห์ PHA เบื้องต้นด้วยการเติมสีย้อมที่เป็น Lipophilic dye (Shakeri et al., 2011; Beral, 2013) สีย้อมดังกล่าวมีคุณสมบัติในการย้อมติดกับส่วนไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ (Greenspan, Mayer, and Fowler, 1985) โดยไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Spickermann et al., 1999) และเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA ได้เป็นอย่างดี (Neissa, Kelly, Jeffrey, and Lawrence, 2011; Aarthi and Ramana, 2011) เนื่องจากสามารถแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA ออกจากจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถผลิต PHA ได้ (Spickermann et al., 1999; Koller and Contreras, 2015) จากการศึกษาของ Lopez-Cortes และคณะ (2008) พบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHB ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ประเภทหลักที่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้ โดยส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนจากของเสียที่ถูกปล่อยออกจากโรงงานอุตสาหกรรม เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีสารอินทรีย์ปนเปื้อนสูงมาก และมีไซยาโนแบคทีเรียเจริญอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งไซยาโนแบคทีเรียจะใช้สารอาหารปริมาณสูง ส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลของสารอาหารจึงทำให้พบจุลินทรีย์ที่สะสม PHA เจริญในบริเวณดังกล่าวมากกว่าบริเวณอื่นๆ และการศึกษาของ Ceyhan and Ozdemir (2011) ได้แยกแบคทีเรียที่ผลิต PHB จากน้ำทิ้งจากบ้านเรือน พบว่า *Enterobacter aerogenes* สายพันธุ์ 12Bi ผลิต PHB ได้ถึงร้อยละ 96.25 โดยน้ำหนักที่เวลา 18 ชั่วโมง

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic) และการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ในส่วนของยีน 16S rRNA สำหรับสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต (Prokaryotic cell) และส่วนของยีน 18S rRNA สำหรับสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต (Eukaryotic cell) ซึ่งเป็นเทคนิคการจำแนกจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมและให้ความแม่นยำสูง (Nishimura, Ohmori, and Kawaguchi, 2002) โดยนำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับความคล้ายกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic local alignment search tools) ของ The national center for biotechnology information ; NCBI เพื่อใช้ในการหาค่าร้อยละความเหมือน (% Identity) หรือความคล้าย (% Similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะช่วยให้ทราบ Genus และ Species ของจุลินทรีย์ได้ โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง คือ SUTR 1 พบว่า มีความคล้ายกับฐานข้อมูลของ GenBank ระบุว่า เป็น *Candida rugosa* มีความเหมือนกับฐานข้อมูล (%Identity) 99% ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของยีสต์ (ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวแสดงภาพที่ ข.1) มีโครงสร้างเป็นเซลล์เดี่ยว เจริญได้ในอุณหภูมิช่วง 20-30 องศาเซลเซียส และสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ ขณะที่แบคทีเรียที่ถูกเก็บรักษาอยู่ ณ ห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัย

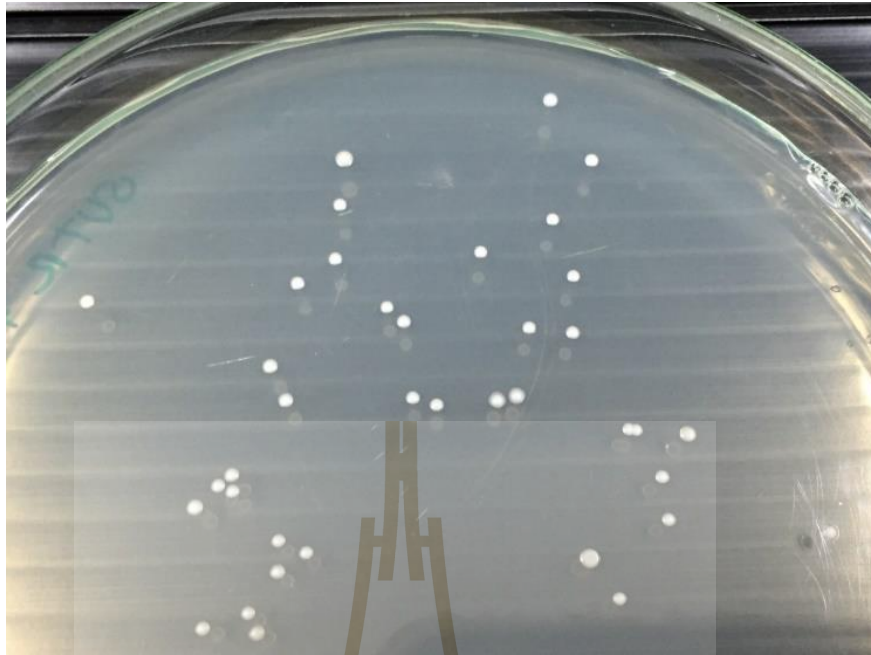
เทคโนโลยีสุรนารี ได้แก่ SUTS 1 และ SUTR 3 ซึ่งได้มีการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์แล้วนั้น ระบุว่า SUTS 1 เป็น *Agrobacterium tumefaciens* มีความเหมือนกับฐานข้อมูล (%Identity) 100% (Potivichayanon and Kitlerpornpairot, 2010) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ *Rhizobiaceae* มีรูปร่างแบบแท่งตรง มีขนาดเซลล์ 0.6-1.0 ไมโครเมตร ไม่สร้างเอนโดสปอร์ เจริญได้ในสภาวะมีออกซิเจน และ SUTR 3 (Katramee, Toensakes, and Potivichayanon, 2015) ระบุว่า เป็น *Delftia* sp. มีความเหมือนกับฐานข้อมูล (%Identity) 99% เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา (Flagella) สามารถย่อยสลายสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (Aromatic hydrocarbon) ได้ดี (Preiswerk et al., 2011) (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิต PHA

ชนิดของจุลินทรีย์	ขนาดของ โคโลนี (มม.)	ลักษณะภายนอกของ โคโลนี *	รูปร่าง **	%Identity
<i>Candida rugosa</i> SUTR 1	2-2.5	เล็ก กลมมนูน ผิวหน้า เรียบ สีขาว ขอบเรียบ	กลม (Spherical)	99%
<i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> SUTS 1	5-7.5	ใหญ่ กลมมนูน ผิวหน้า เรียบ ใส สีน้ำตาลอ่อน	แท่ง (Rod shaped)	100%
<i>Delftia</i> sp. SUTR 3	2-2.5	เล็ก กลมมนูน สีขาว ผิวหน้านูน ขอบหยัก	แท่ง (Short-rod-shaped)	99%

หมายเหตุ * หมายถึง ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar
** หมายถึง รูปร่างของจุลินทรีย์จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

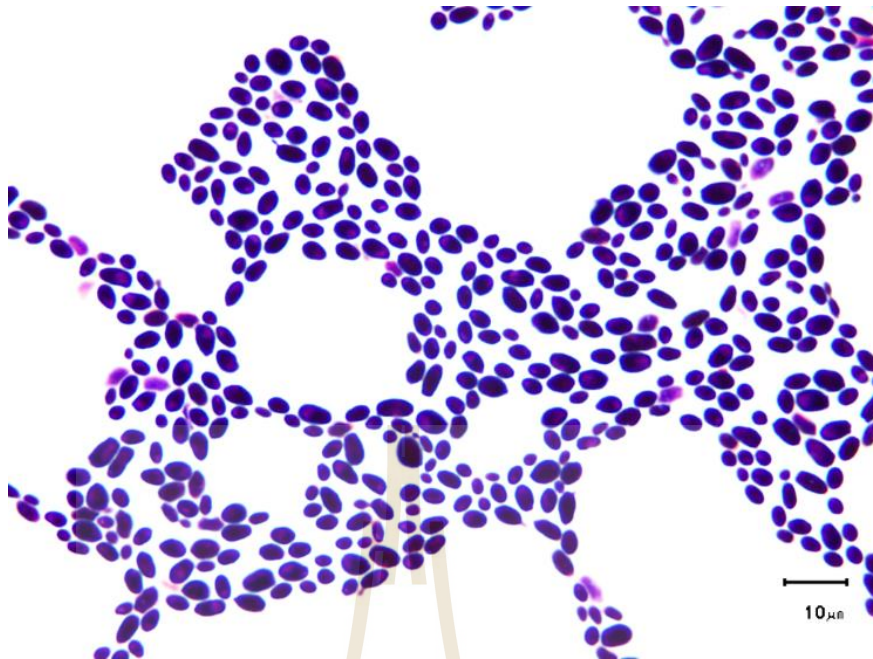
อิเล็กทรอนิกส์แบบส่องกราด Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM)



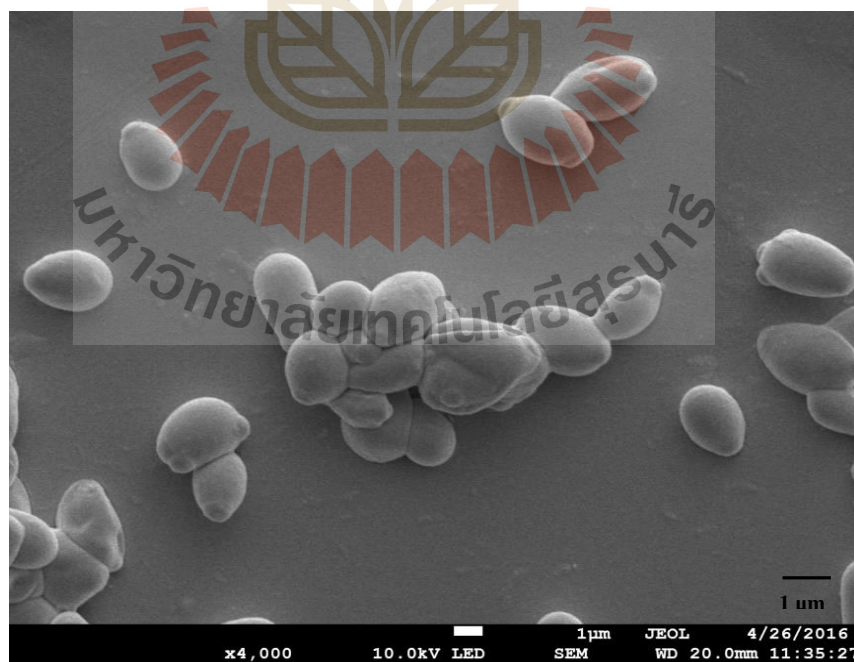
รูปที่ 4.1 ลักษณะ โคลินิจของ *Candida rugosa* SUTR 1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium agar



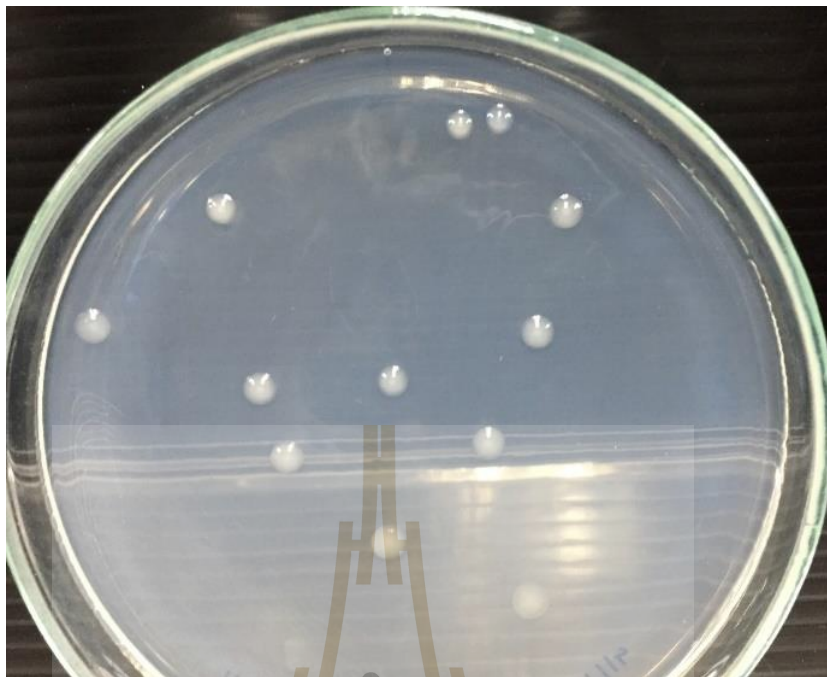
รูปที่ 4.2 ลักษณะการเรืองแสงของโคโลนี *Candida rugosa* SUTR 1 ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร



รูปที่ 4.3 ลักษณะเซลล์ *Candida rugosa* SUTR 1 ด้วยการย้อมติดสี Crystal violet ที่กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 4.4 รูปร่างของ *Candida rugosa* SUTR 1 จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) ที่กำลังขยาย 4,000 เท่า



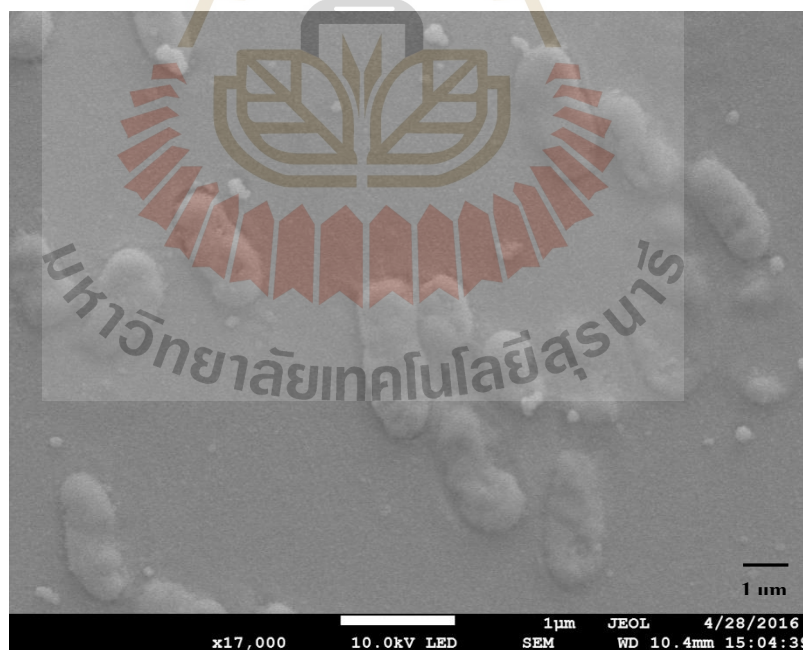
รูปที่ 4.5 ลักษณะโคโลนีของ *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium agar



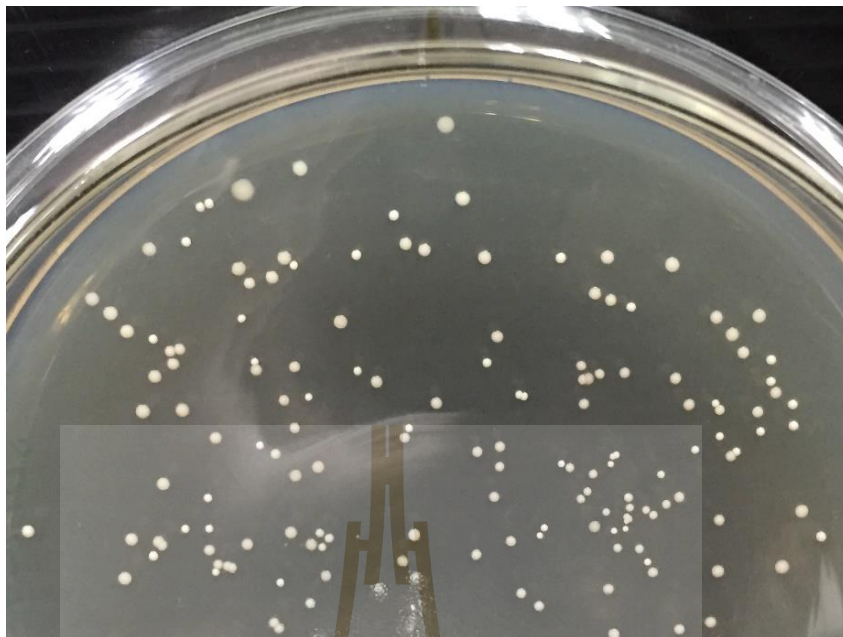
รูปที่ 4.6 ลักษณะการเรืองแสงของโคโลนี *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1 ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร



รูปที่ 4.7 ลักษณะของเซลล์ *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1 ด้วยการย้อมติดสีแกรม (Gram staining) ที่กำลังขยาย 100 เท่า



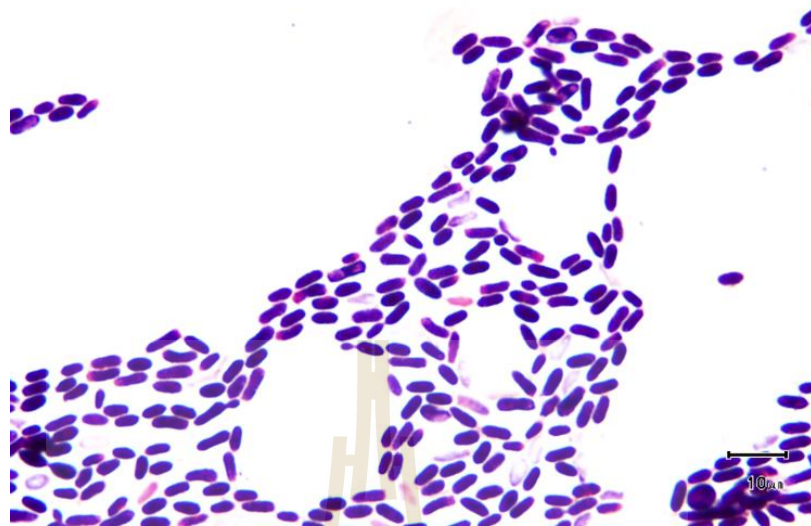
รูปที่ 4.8 รูปร่างของ *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1 จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) ที่กำลังขยาย 17,000 เท่า



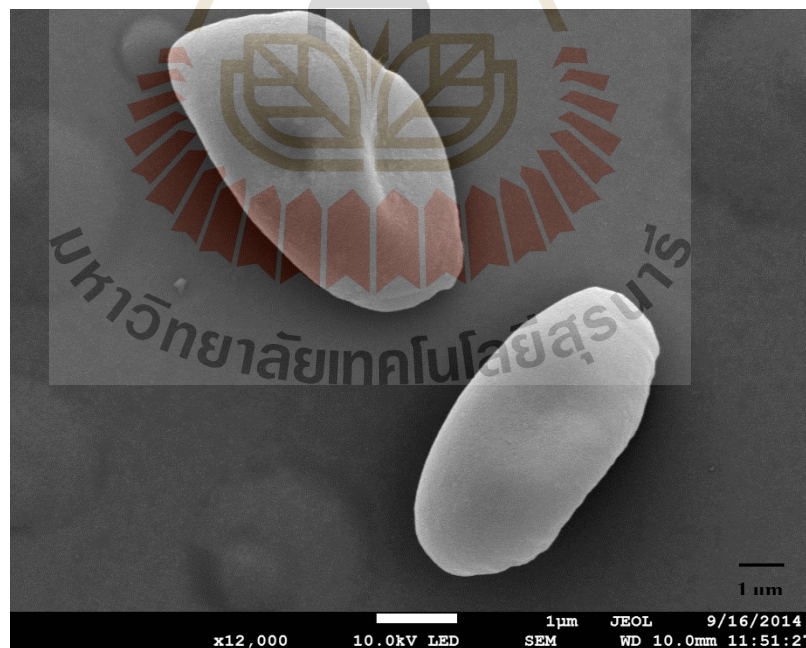
รูปที่ 4.9 ลักษณะโคโลนีของ *Delftia* sp. SUTR 3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium agar



รูปที่ 4.10 ลักษณะการเรืองแสงของโคโลนี *Delftia* sp. SUTR 3 ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร



รูปที่ 4.11 ลักษณะของเซลล์ *Delftia* sp. SUTR 3 ด้วยการย้อมติดสีแกรม (Gram staining) ที่กำลังขยาย 100 เท่า



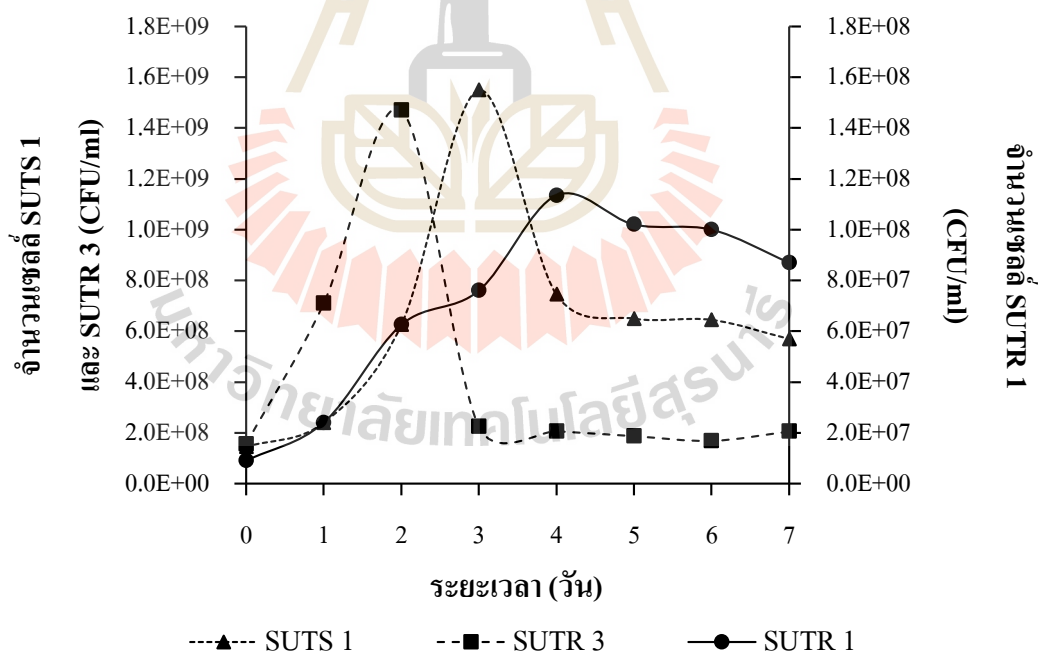
รูปที่ 4.12 รูปร่างของ *Delftia* sp. SUTR 3 จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) ที่กำลังขยาย 12,000 เท่า

4.2 การศึกษาการเจริญเติบโต (Growth curve) ของจุลินทรีย์

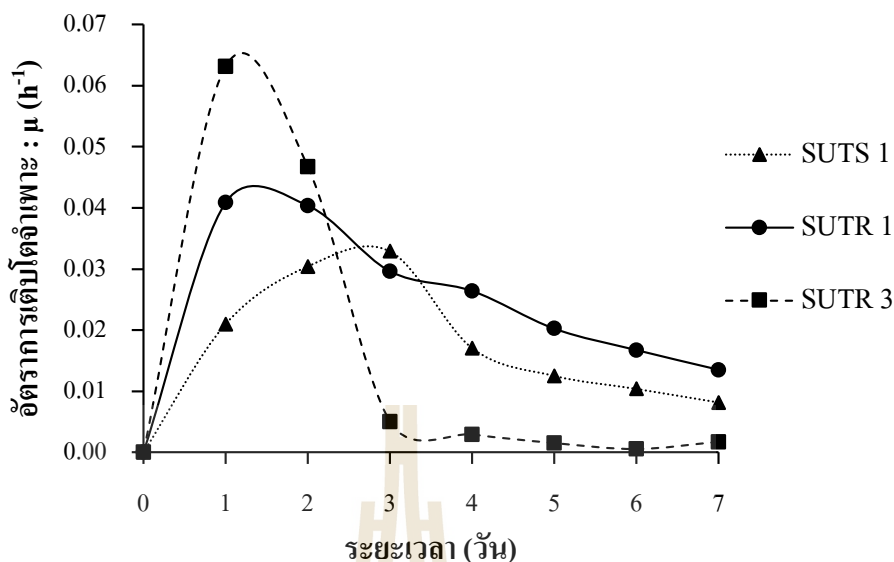
ศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA ได้แก่ *A. tumefaciens* SUTS 1, *C. rugosa* SUTR 1 และ *Delftia* sp. SUTR 3 ซึ่งได้จากการคัดแยกในขั้นต้น ทำการศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium agar ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต ด้วยวิธีการนับโคโลนี (Colony count technique) โดยการทำเทคนิค Spreading plate technique ซึ่งเป็นการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Viable plate count) เป็นระยะเวลา 7 วัน (ตารางที่ 4.2) พบว่าจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีระยะเวลาในการทวีคูณหรือ Generation time และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate : μ) แตกต่างกัน คือ *A. tumefaciens* SUTS 1 สามารถเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ดีกว่า *C. rugosa* SUTR 1 และ *Delftia* sp. SUTR 3 โดย *A. tumefaciens* SUTS 1 สามารถเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้สูงที่สุดในวันที่ 3 โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.03 ต่อชั่วโมง และมีจำนวนโคโลนีมากที่สุดประมาณ 1.55×10^9 CFU/มล. และ *Delftia* sp. SUTR 3 สามารถแบ่งเซลล์ได้สูงที่สุดในวันที่ 2 ของการศึกษา มีจำนวนโคโลนีสูงสุดประมาณ 7.10×10^8 CFU/มล. มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.05 ต่อชั่วโมง เมื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตแบบที่เรีย *A. tumefaciens* SUTS 1 และ *Delftia* sp. SUTR 3 พบว่าแบบที่เรียทั้ง 2 ชนิด จะมีการเจริญเติบโตในระยะการแบ่งตัวแบบทวีคูณ (Log phase หรือ Exponential phase) อยู่ในช่วงวันที่ 1 และวันที่ 2 ของการศึกษา และมีการเจริญเติบโตในระยะคงที่ (Stationary phase) ในวันที่ 4-7 ของการศึกษา ขณะที่ยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 มีการเจริญเติบโตในระยะการแบ่งตัวแบบทวีคูณ (Log phase หรือ Exponential phase) ในวันที่ 1-3 ของการศึกษา โดยมีการเจริญเติบโตและแบ่งจำนวนเซลล์สูงที่สุดในวันที่ 4 ของการศึกษา (รูปที่ 4.13) ซึ่งสามารถเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้สูงที่สุด 2.07×10^8 CFU/มล. มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด 0.03 ต่อชั่วโมง (รูปที่ 4.14) ดังนั้นการศึกษานี้จึงนำจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตในระยะที่มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุดของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ไปใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นเพื่อการผลิต PHA ตลอดการวิจัยนี้ เนื่องจากเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีการแบ่งตัวในอัตราคงที่ ซึ่งการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาเท่า ๆ กัน และเป็นระยะที่อยู่ในระยะที่จะเจริญเติบโตเข้าสู่สภาวะคงที่ (Stationary phase) ซึ่งการผลิต PHA จะเกิดขึ้นควบคู่กับการเจริญอันเป็นผลมาจาก PHA ที่จัดเป็นสารกลุ่ม Primary metabolite จึงมีการสะสมควบคู่กับการเจริญของจุลินทรีย์นั้น ๆ โดยการสะสม PHA จะเกิดขึ้นสูงสุดเมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญเข้าสู่สภาวะคงที่ (Stationary phase) (Harbak, 1992)

ตารางที่ 4.2 จำนวนเซลล์และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate : μ) ของจุลินทรีย์

ระยะเวลา (วัน)	จำนวนเซลล์ (CFU/มล.)			อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ : μ (ชั่วโมง ⁻¹)		
	SUTS 1	SUTR 3	SUTR 1	SUTS 1	SUTR 3	SUTR 1
0	1.45×10^8	1.56×10^8	9.00×10^6	0.00	0.00	0.00
1	2.40×10^8	7.01×10^8	2.40×10^7	0.02	0.06	0.04
2	6.25×10^8	7.10×10^8	6.25×10^7	0.03	0.05	0.04
3	1.55×10^9	2.24×10^8	7.60×10^7	0.03	0.01	0.03
4	7.45×10^8	2.07×10^8	1.14×10^8	0.02	0.00	0.03
5	6.50×10^8	1.87×10^8	1.02×10^8	0.01	0.00	0.02
6	6.65×10^8	1.69×10^8	1.00×10^8	0.01	0.00	0.02
7	5.70×10^8	2.05×10^8	8.70×10^7	0.01	0.00	0.01



รูปที่ 4.13 การเจริญเติบโต (Growth curve) ของจุลินทรีย์



รูปที่ 4.14 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate : μ) ของจุลินทรีย์

4.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังของจุลินทรีย์

การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังของจุลินทรีย์ SUTS 1, SUTR 1 และ SUTR 3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast-Peptone-Cassava agar (YPC agar) โดยเติมแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ด้วยการทำเทคนิค Point inoculum บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งพบได้ในพืช สัตว์และจุลินทรีย์หลายชนิด โดยสามารถย่อยสารตั้งต้นจำพวกแป้งและไกลโคเจนให้เป็นน้ำตาลได้ (เบญจพร บัวบาน, 2542) สามารถตรวจสอบได้โดยสังเกตบริเวณใสรอบโคโลนีของจุลินทรีย์ หลังจากการหยด Iodine solution ลงบนผิวหน้าอาหาร YPC agar เนื่องจากเกิดการย่อยสลายแป้งทำให้เกิดบริเวณใส จากการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังของจุลินทรีย์ พบว่า ยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 และแบคทีเรีย *A. tumefaciens* SUTS 1 มีความสามารถในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ (รูปที่ 4.16 และรูปที่ 4.17) โดยโคโลนีของ *C. rugosa* SUTR 1 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.5 มิลลิเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone มีขนาดเฉลี่ย 4-5 มิลลิเมตร จากเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ขณะที่ *A. tumefaciens* SUTS 1 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2 มิลลิเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone มีขนาดเฉลี่ย 3-4 มิลลิเมตร จากเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี และไม่พบบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของ *Delftia* sp. SUTR 3 ซึ่งลักษณะของ Clear zone ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีดังกล่าวแสดงถึงศักยภาพในการย่อยแป้งมันสำปะหลังของจุลินทรีย์ (Saelim et al., 2008) เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสและ

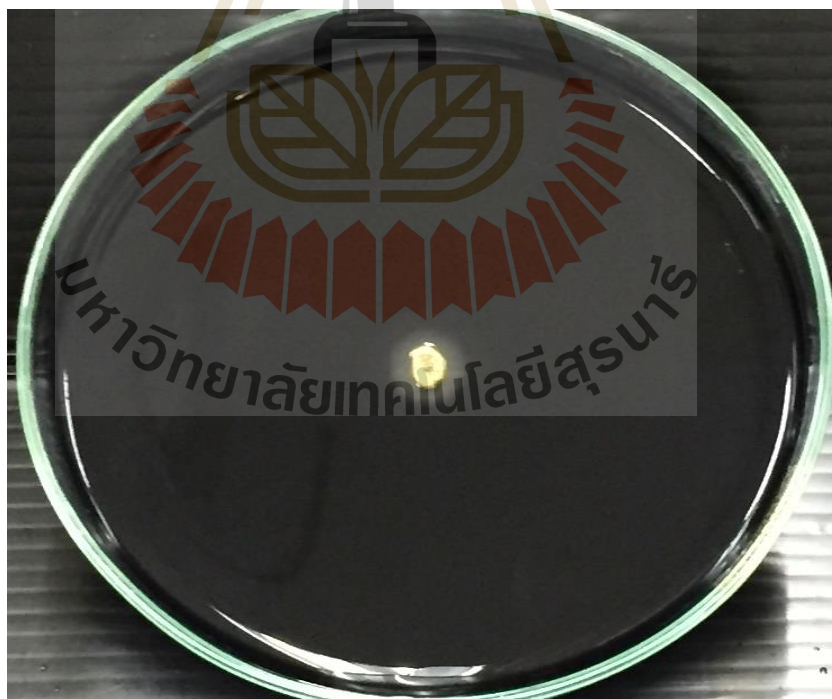
ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ไปย่อยสลายแป้งจึงไม่เกิดปฏิกิริยาของแป้งกับสารละลายไอโอดีน (Iodine solution) ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสได้ เช่น *Candida antarctica*, *Filobasidium capsuligenum*, *Lipomeces kononenkoae*, *Saccharomycopsis capsularis*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Schwaniomyces occidentalis* (Mot, 1990) *Saccharomysis alluvius* และ *Saccharomysis cerevisiae* (Wilson and Ingleedew, 1982) นอกจากนี้ Charoenchai และคณะ (1997) ได้ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เพกตินเอส ไลเปส เบต้ากลูโคซิเดส ของ ยีสต์ *Candida*, *Debraromyces*, *Hanseniaspora*, *Hansemula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces* และ *Torulaspora* พบว่า *Candida* spp. และ *Hanseniaspora uvarum* บางสายพันธุ์ สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส หรือเอนไซม์ไลเปสได้ ซึ่งยีสต์ส่วนใหญ่สามารถแสดงกิจกรรมของ เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส เช่น *P. anomala* และ *K. apiculata* ทั้งนี้ความสามารถในการย่อยแป้งของ จุลินทรีย์แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (สมพร สนิธธรา, 2544) คือ

1. จุลินทรีย์ที่ย่อยแป้งได้ดีสร้างบริเวณใส (Clear zone) กว้างกว่าขนาดของโคโลนี
2. จุลินทรีย์ที่ย่อยแป้งได้น้อย คือเกิดบริเวณใสเท่ากับขนาดของโคโลนี
3. จุลินทรีย์ที่ไม่ย่อยแป้ง คือไม่เกิดบริเวณใสเลย

อย่างไรก็ตาม ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนี ที่เกิดขึ้น เป็นการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์เท่านั้น ไม่มีความสัมพันธ์ กับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่จุลินทรีย์ย่อยได้จากแป้งหรือกากมันสำปะหลัง (Saelim et al., 2008)



รูปที่ 4.15 ลักษณะของโคโลนี *C. rugosa* SUTR 1 ที่นำมาทดสอบการย่อยแป้งมันสำปะหลัง



รูปที่ 4.16 ลักษณะของโคโลนี *A. tumefaciens* SUTS 1 ที่นำมาทดสอบการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

4.4 การศึกษาองค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังเป็นของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งในกระบวนการผลิตแต่ละครั้ง จะก่อให้เกิดกากมันสำปะหลังร้อยละ 27 ของปริมาณมันสำปะหลังที่ใช้ และจากสถิติข้อมูลการส่งออกในปี พ.ศ. 2546-2553 ของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2554) พบว่า ปริมาณกากมันสำปะหลังเฉลี่ยต่อปีประมาณ 300,000-400,000 ตัน และมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) เมื่อศึกษาองค์ประกอบของกากมันสำปะหลังแห่งที่นำมาใช้ในการศึกษา พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังตัวอย่างน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4.3) มีส่วนประกอบที่เป็นแป้งสูงสุด คือร้อยละ 74.82 รองลงมา คือ เส้นใย มีปริมาณร้อยละ 13.51 โปรตีนมีปริมาณร้อยละ 1.68 ไขมันร้อยละ 0.29 ความชื้นร้อยละ 7.44 และเถ้าร้อยละ 2.26 ใกล้เคียงกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังของ Djuma และคณะ (2011) พบว่ามีส่วนประกอบเป็นแป้งสูงสุดร้อยละ 65.6 รองลงมาคือ เส้นใย ปริมาณร้อยละ 20.1 โปรตีนร้อยละ 3.1 และไขมันร้อยละ 0.2 ของกากมันสำปะหลังแห่ง

ตารางที่ 4.3 คุณสมบัติของกากมันสำปะหลัง

คุณสมบัติ	องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ)	วิธีการทดสอบ
1. Carbohydrate	74.82	Calculate by difference*
2. Protein	1.68	Protein analysis
3. Fat	0.29	Crude fat analysis
4. Fiber	13.51	Crude fiber analysis
5. Moisture	7.44	Ash and moisture analysis
6. Ash	2.26	Ash and moisture analysis

หมายเหตุ * หมายถึง $100 - (\% \text{Moisture} + \% \text{Ash} + \% \text{Protein} + \% \text{Fat} + \% \text{Fiber})$

อย่างไรก็ตามปริมาณขององค์ประกอบต่าง ๆ ในมันสำปะหลังจะมีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ และสภาพแวดล้อมที่ปลูก ฤดูกาลหรือสถานที่เพาะปลูกรวมถึงประสิทธิภาพในการสกัดแป้งในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังของแต่ละโรงงาน (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2540) โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากมันสำปะหลังแห้ง คือ แป้ง มีปริมาณเฉลี่ยร้อยละ 60-75 โดยน้ำหนัก รองลงมา คือ เส้นใย (เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน) ประมาณร้อยละ 20-30 โดยน้ำหนัก มีโปรตีน ไขมัน และเถ้าในปริมาณต่ำ ด้วยคุณสมบัติที่มีองค์ประกอบของแป้งและเส้นใยสูงทำให้กากมันสำปะหลังได้รับความสนใจและนำมาใช้ประโยชน์เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าทาง

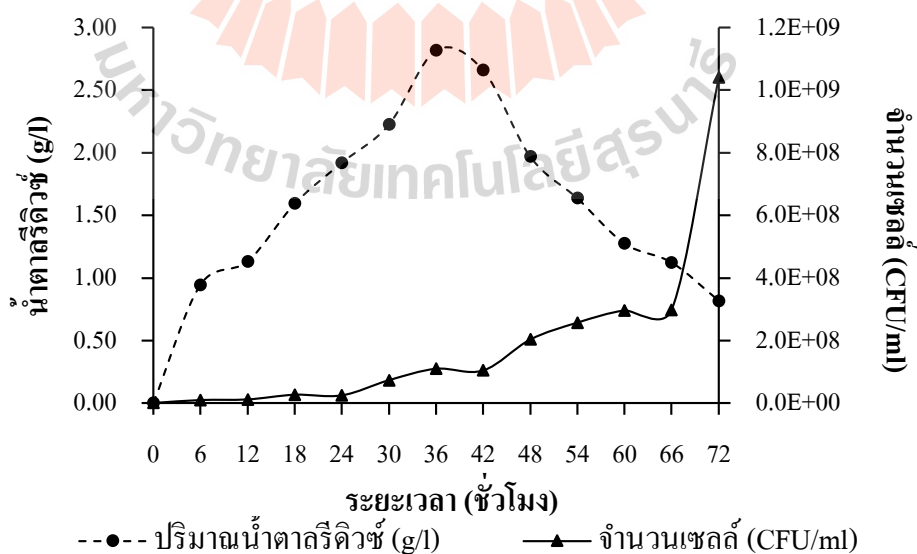
เศรษฐกิจ และลดของเสียที่เกิดขึ้น เช่น การใช้กากมันสำปะหลังเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ทดแทนการนำเข้าอาหารเสริมที่มีราคาแพง (เสริมศักดิ์, 2546; ชาคร, 2548) เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ และกรดอินทรีย์ (ธีระพงษ์, 2550) เป็นวัสดุปรับปรุงดิน และการใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอล เนื่องจากกากมันสำปะหลังมีลักษณะทางเคมีที่เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์และสามารถย่อยสลายได้ง่าย นอกจากนี้กากมันสำปะหลังยังมีศักยภาพในการปลดปล่อยน้ำตาล โดยการย่อยแป้งและเซลลูโลสที่เหลือตกค้างในกากมันสำปะหลังให้ได้น้ำตาลกลูโคส และนำน้ำตาลกลูโคสที่ได้ใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตพลังงานหรือผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพ ดังนั้นหากจะนำกากมันสำปะหลังมาใช้ประโยชน์ ควรทำการสุ่มตัวอย่างกากมันสำปะหลังมาวิเคราะห์ปริมาณแป้งและเซลลูโลสในกากมันสำปะหลังก่อน โดยแป้งและเซลลูโลสควรมีปริมาณรวมกันไม่น้อยกว่าร้อยละ 61 หากต่ำกว่านี้การเตรียมสารละลายน้ำตาลอาจทำได้ยาก และทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ข้อย่อยได้จากกากมันสำปะหลังน้อยกว่าที่ต้องการ เนื่องจากคุณภาพของกากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้เป็นอย่างมาก และทำให้ขีดขวางการจับกันของเอนไซม์กับสับสเตรทและการกวนผสมทำได้ยาก

4.5 การศึกษาความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังของแบคทีเรียและยีสต์

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลังแห้งที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบ พบว่ามีส่วนประกอบเป็นแป้งมากถึงร้อยละ 74.82 รองลงมาคือเส้นใยร้อยละ 13.51 จึงมีความเป็นไปได้ในการนำกากมันสำปะหลังดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ โดยการย่อยแป้งและเซลลูโลสที่ตกค้างในกากมันสำปะหลังให้ได้น้ำตาลกลูโคสเพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ จึงทำการศึกษ ปริมาณกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสร้างน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA ของ *C. rugosa* SUTR 1, *Delftia* sp. SUTR 3 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 เนื่องจากแหล่งคาร์บอนนับเป็นองค์ประกอบสำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จุลินทรีย์จะนำไปสร้างพลังงานและเซลล์เพื่อการเจริญเติบโตและนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์และยีสต์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการทดสอบ ในอาหาร YPC agar โดยแปรผันปริมาณของกากมันสำปะหลัง 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลสูงสุด โดยทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Denitrosalicylic colorimetric method (Chaplin and Kennedy, 1994) ผลการศึกษาแสดงดังนี้

4.5.1 ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังของยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1

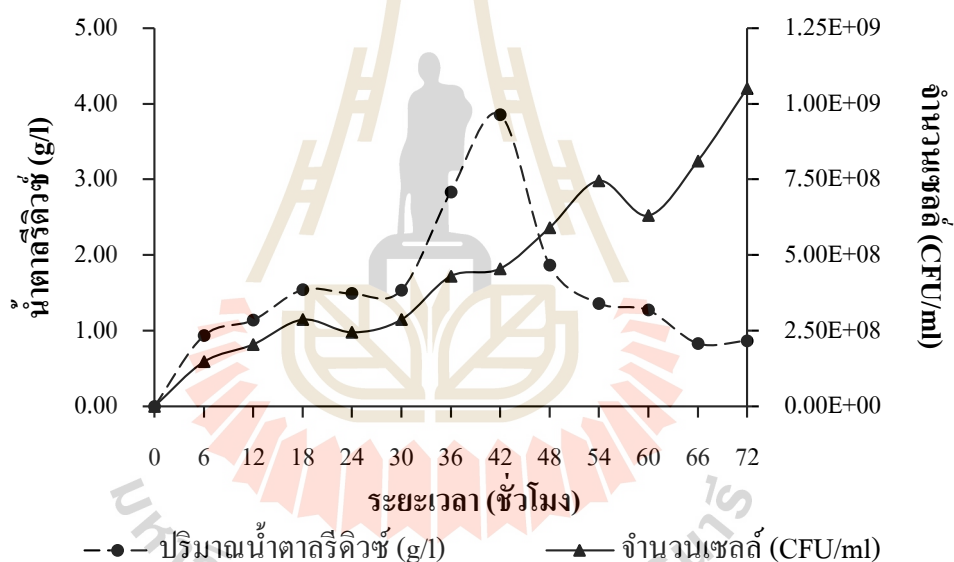
การย่อยกากมันสำปะหลังของ *C. rugosa* SUTR 1 ที่ปริมาณกากมันสำปะหลัง 10 กรัม (10% w/v) พบว่าความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยในช่วงแรกของระยะเวลาการทดสอบ คือชั่วโมงที่ 0-12 ของการศึกษา เนื่องจากเป็นช่วงระยะพักตัว (Lag phase) ของจุลินทรีย์ และในชั่วโมงที่ 18-36 ความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยสามารถย่อยกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณสูงสุด 2.82 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 สัมพันธ์กับการเจริญของยีสต์ซึ่งอยู่ในช่วงระยะการเจริญแบบทวีคูณ (Log phase หรือ Exponential phase) ทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ขณะที่จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยของจุลินทรีย์มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องในชั่วโมงที่ 42-72 ของการศึกษา โดยลดลงเหลือ 2.66 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 42 และลดลงเป็น 0.82 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 ของการศึกษา ขณะที่จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจาก 9.50×10^6 CFU/มล. ในชั่วโมงที่ 6 และมีการเจริญเพิ่มขึ้นเป็น 1.1×10^8 CFU/มล. ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และมีจำนวนเซลล์สูงสุด 1.04×10^9 CFU/มล. ในชั่วโมงที่ 72 ของการศึกษา จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์นำน้ำตาลไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตและอาจนำไปใช้ในการสะสม PHA ภายในเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยกากมันสำปะหลังของยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 ดังรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของ *C. rugosa* SUTR 1 จากการย่อยกากมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร

4.5.2 ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังของ *A. tumefaciens* SUTS 1

การย่อยกากมันสำปะหลังของ *A. tumefaciens* SUTS 1 พบว่าสามารถย่อยกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามเพิ่มจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาที่ 36-42 ของการศึกษาซึ่งมีปริมาณสูงสุด 3.86 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 42 และจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 4.55×10^8 CFU/มล. หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลมีแนวโน้มลดลงเหลือเพียง 0.83 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 66 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 0.87 กรัมต่อลิตร ขณะที่จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีแนวโน้มการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีการเจริญเติบโตสูงสุด 1.05×10^9 CFU/มล. ในช่วงเวลาที่ 72 ของการศึกษา (รูปที่ 4.18)

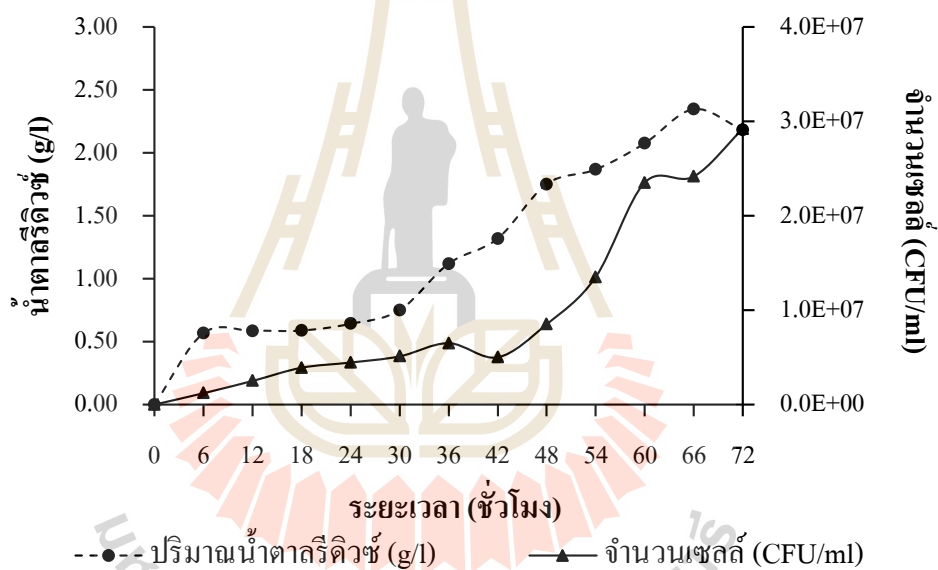


รูปที่ 4.18 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของ *A. tumefaciens* SUTS 1 จากการย่อยกากมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร

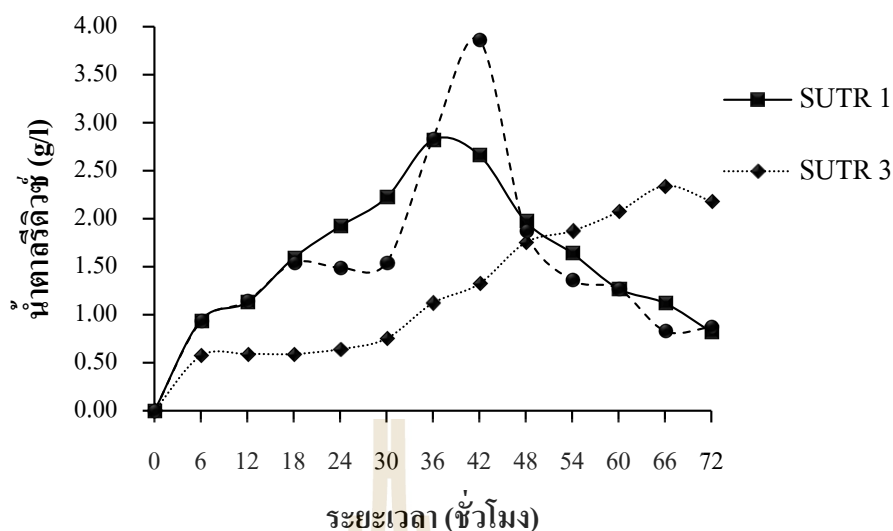
4.5.3 ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังของ *Delftia* sp. SUTR 3

การย่อยกากมันสำปะหลังของ *Delftia* sp. SUTR 3 พบว่าสามารถย่อยกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณสูงสุด 2.34 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 66 ขณะที่จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 2.42×10^7 CFU/มล. (รูปที่ 4.19) จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยกากมันสำปะหลังยังคงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

และมีปริมาณสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 66 ของการศึกษา ขณะที่จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ยังคงมีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่องสัมพันธ์กับการศึกษาการเจริญ (Growth study) ของจุลินทรีย์ โดยพบว่ามีการเจริญแบบทวีคูณ (Log-phase หรือ Exponential phase) อยู่ในช่วงวันที่ 2 หรือชั่วโมงที่ 48 ของการศึกษา ซึ่งจุลินทรีย์ชนิดนี้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำโดยมีการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุดประมาณ 10^7 CFU/มล. ซึ่งต่ำกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่นำมาทำการศึกษา จึงทำให้ปริมาณเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์นั้นมีปริมาณน้อย กระบวนการย่อยสลายแป้งและเซลลูโลสในกากมันสำปะหลังจึงเกิดได้ช้า ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีปริมาณค่อนข้างต่ำกว่าปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังของ *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1



รูปที่ 4.19 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของ *Delftia* sp. SUTR 3 จากการย่อยกากมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยกากมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจากการย่อยกากมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ชนิดของจุลินทรีย์					
	<i>C. rugosa</i> SUTR 1		<i>Delftia</i> sp. SUTR 3		<i>A. tumefaciens</i> SUTS 1	
	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ (CFU/ml)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ (CFU/ml)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ (CFU/ml)
0	0.11±0.000	9.00×10^6	0.11±0.000	1.15×10^6	0.11±0.000	1.47×10^8
6	0.94±0.004	9.50×10^6	0.57±0.004	1.20×10^6	0.93±0.004	1.47×10^8
12	1.13±0.008	1.15×10^7	0.59±0.011	2.50×10^6	1.14±0.005	2.05×10^8
18	1.59±0.016	2.65×10^7	0.59±0.017	3.90×10^6	1.54±0.030	2.87×10^8
24	1.92±0.015	2.45×10^7	0.64±0.013	4.45×10^6	1.49±0.014	2.45×10^8
30	2.22±0.014	7.30×10^7	0.75±0.005	5.10×10^6	1.54±0.036	2.87×10^8
36	2.82±0.006	1.10×10^8	1.12±0.007	6.50×10^6	2.83±0.052	4.30×10^8
42	2.66±0.006	1.04×10^8	1.32±0.006	5.00×10^6	3.86±0.034	4.55×10^8
48	1.97±0.009	2.03×10^8	1.75±0.017	8.50×10^6	1.87±0.003	5.90×10^8
54	1.64±0.037	2.57×10^8	1.87±0.012	1.35×10^7	1.36±0.036	7.45×10^8
60	1.27±0.005	2.96×10^8	2.07±0.015	2.35×10^7	1.27±0.015	6.30×10^8
66	1.12±0.003	2.98×10^8	2.34±0.019	2.42×10^7	0.83±0.032	8.10×10^8
72	0.82±0.001	1.04×10^9	2.18±0.017	2.92×10^7	0.87±0.000	1.05×10^9

จากการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงค่าสูงสุดค่าหนึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะมีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์มีการนำน้ำตาลไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างต่อเนื่อง (ตารางที่ 4.4) เนื่องจากแป้งเป็นองค์ประกอบหลักในกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นสารตั้งต้นนั้นถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ให้เป็นน้ำตาลซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็ก และเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและนำไปใช้ได้ง่ายกว่าแป้ง จุลินทรีย์จึงมีการเจริญอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดพบว่า *A. tumefaciens* SUTS 1 สามารถย่อยสลายกากมันสำปะหลังและให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่า *C. rugosa* SUTR 1 และ *Delftia* sp. SUTR 3 ตามลำดับ (รูปที่ 4.20) จึงทำการศึกษาความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ของ *A. tumefaciens* SUTS 1 โดยเพิ่มปริมาณกากมันสำปะหลังเป็น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร เพื่อหาปริมาณกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลสูงสุด

เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ของ *A. tumefaciens* SUTS 1 โดยเพิ่มปริมาณกากมันสำปะหลัง 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ปริมาณกากมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร สามารถย่อยกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณสูงสุด 4.49 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 และจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 1.05×10^9 CFU/มล. และในชั่วโมงที่ 72 ของการศึกษามีปริมาณลดลงเหลือ 3.55 กรัมต่อลิตร ขณะที่จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 2.25×10^9 CFU/มล. เมื่อเพิ่มปริมาณกากมันสำปะหลังเป็น 50 กรัมต่อลิตร พบว่า *A. tumefaciens* SUTS 1 สามารถย่อยกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณสูงสุด 8.27 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 66 และจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 1.90×10^{10} CFU/มล. และลดลงเหลือ 8.24 กรัมต่อลิตร ขณะที่จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเป็น 8.40×10^9 CFU/มล. ในชั่วโมงที่ 72 ของการศึกษา (ตารางที่ 4.5) ทั้งนี้กากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบหลักเป็นพวกแป้งและเส้นใย โดยแป้งจะเกาะอยู่กับโครงสร้างของผนังเซลล์พืชหรือเซลล์ลูโลส ซึ่งเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยแป้ง คือ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ส่วนเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยเส้นใย คือ เอนไซม์เซลลูเลส จากการศึกษารายงานของ Rattanachomsri และคณะ (2009) ที่พบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพียงอย่างเดียวจะสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 206 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แต่เมื่อเติมเอนไซม์เซลลูเลส แพคตินเนส และเฮมิเซลลูเลสก่อนทำการย่อยร่วมกับการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จะสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้

571 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เนื่องจากการเติมเอนไซม์ย่อยเส้นใยเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลัง โดยเอนไซม์จะย่อยเส้นใยทำให้แป้งที่อาจติดอยู่ในโครงสร้างของเส้นใยเป็นอิสระมากขึ้น (Prasad et al., 2007) ทำให้เอนไซม์ย่อยแป้งสามารถย่อยและเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากขึ้น

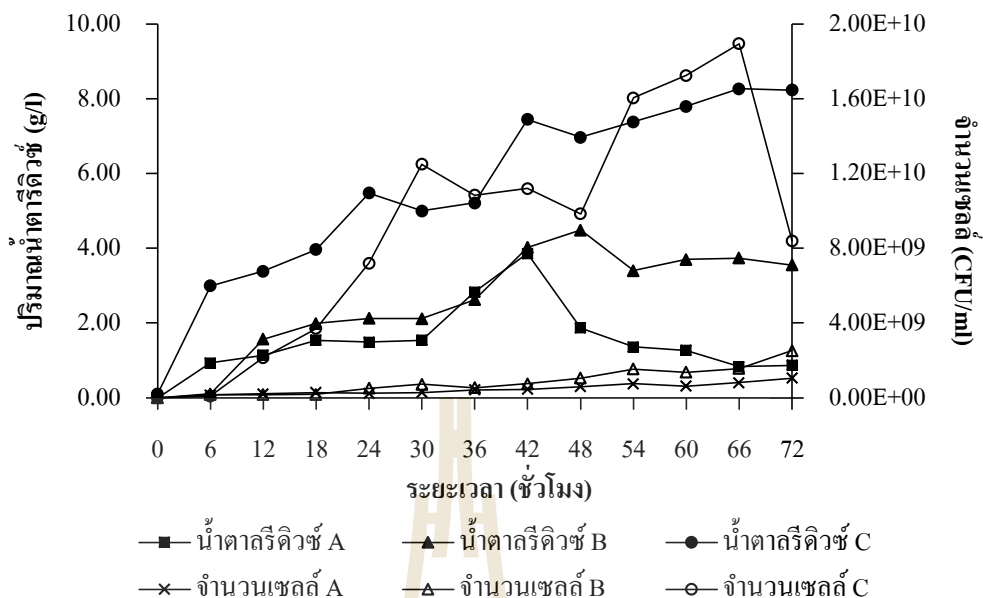
ตารางที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของ *A. tumefaciens* SUTS 1

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณกากมันสำปะหลัง					
	10 กรัมต่อลิตร		30 กรัมต่อลิตร		50 กรัมต่อลิตร	
	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ (CFU/มล.)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ (CFU/มล.)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ (CFU/มล.)
0	0.11±0.000	1.47×10^8	0.8±0.004	3.85×10^7	1.95±0.004	6.65×10^7
6	0.93±0.004	1.47×10^8	0.11±0.027	1.68×10^8	2.99±0.077	9.7×10^7
12	1.14±0.005	2.05×10^8	1.56±0.109	1.68×10^8	3.39±0.286	2.15×10^9
18	1.54±0.030	2.87×10^8	1.99±0.039	1.74×10^8	3.97±0.186	3.70×10^9
24	1.49±0.014	2.45×10^8	2.13±0.063	5.05×10^8	5.48±0.571	7.20×10^9
30	1.54±0.036	2.87×10^8	2.12±0.055	7.20×10^8	5.00±0.142	1.25×10^{10}
36	2.83±0.052	4.30×10^8	2.63±0.128	5.35×10^8	5.21±0.091	1.09×10^{10}
42	3.86±0.034	4.55×10^8	4.03±0.019	7.50×10^8	7.45±0.387	1.12×10^{10}
48	1.87±0.003	5.90×10^8	4.49±0.086	1.05×10^9	6.97±0.375	9.85×10^9
54	1.36±0.036	7.45×10^8	3.40±0.062	1.54×10^9	7.39±0.531	1.61×10^{10}
60	1.27±0.015	6.30×10^8	3.70±0.025	1.36×10^9	7.80±0.311	1.73×10^{10}
66	0.83±0.032	8.10×10^8	3.74±0.047	1.56×10^9	8.27±0.186	1.90×10^{10}
72	0.87±0.000	1.05×10^9	3.55±0.133	2.52×10^9	8.24±0.419	8.40×10^9

ทั้งนี้การนำกากมันสำปะหลังมาใช้ประโยชน์มีความจำเป็นต้องนำกากมันสำปะหลังมาผ่านกระบวนการปรับสภาพทางกายภาพให้มีขนาดเล็กลงเพื่อให้ง่ายต่อการย่อยสลายแป้งและเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงของจุลินทรีย์ ให้เป็นเด็กซ์ทรีนและกลายเป็นน้ำตาลกลูโคสในที่สุด โดยเอนไซม์อะไมเลส จะย่อยสับสเตรทจำพวกแป้งและไกลโคเจนให้เป็นน้ำตาลได้ แบ่งเป็น 2 ประเภทคือ เอนโดอะไมเลส (Endoamylase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยแป้งแบบสุ่ม เอนไซม์ประเภทนี้หากเกิดการย่อยไม่สมบูรณ์จะมีกลูโคส มอลโทส และเด็กซ์ทรีนเกิดขึ้น หากเกิดกระบวนการย่อยที่สมบูรณ์จะได้น้ำตาลมอลโทสและกลูโคสเท่านั้น โดยเอนไซม์ในประเภทนี้ได้แก่ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในสกุลอะไมเลสที่มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

มากที่สุด และเอนไซม์เอ็กซ์โซอะไมเลส (Exoamylase) เอนไซม์ประเภทนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ เบต้าอะไมเลส (β -amylase) ผลที่ได้จากการย่อยสลายของเอนไซม์ชนิดนี้คือ น้ำตาลมอลโทสและ เด็กซ์ทรินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ในพืช เช่น ธัญพืช มันเทศ เป็นต้น รวมทั้งใน แบคทีเรียบางชนิด และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบได้ในจุลินทรีย์ประเภทรา ยีสต์และแบคทีเรีย สามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งผลจากการย่อยที่สมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสได้ เช่น *Candida antarctica*, *Filobasidium capsuligenum*, *Lipomeces kononenkoae*, *Saccharomycopsis capsularis*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Schwaniomyces occidentalis* (De-Mot, 1990) และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย เช่น *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* *Bacillus stearothermophilus* และเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ได้แก่ *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*. เป็นต้น (Sundarram and Murthy, 2014; Parmar and Pandya, 2012)

อย่างไรก็ตามปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ในกากมันสำปะหลังภายหลังจากผ่านกระบวนการทางอุตสาหกรรม ขนาดของกากมันสำปะหลังมีผลต่อการย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลของ จุลินทรีย์ เนื่องจากขนาดของอนุภาคสับสเตรทจะเป็นตัวกำหนดพื้นที่ว่างกักเก็บอากาศ ซึ่งอัตราการ ผ่านของออกซิเจนเข้าไปในพื้นที่ว่างนี้มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นสับสเตรทที่ใช้ ควรมีความเหมาะสม เพื่อส่งเสริมการถ่ายเทมวลสารซึ่งมีผลต่อการนำไปใช้ผลิตเอนไซม์ สับสเตรทที่มีขนาดเล็กจะมีพื้นที่ผิวมากสำหรับให้จุลินทรีย์มายึดเกาะ แต่ถ้าขนาดอนุภาคมีขนาดเล็กเกินไปจะทำให้สับสเตรทเกาะติดกัน อาจมีผลรบกวนต่อการถ่ายเทอากาศ เป็นผลให้จุลินทรีย์ เจริญได้ไม่ดีอัตราการย่อยสลายจึงลดลง ในทางกลับกันหากขนาดอนุภาคของสับสเตรทมีขนาด ใหญ่พื้นที่ว่างระหว่างอนุภาคจะเพิ่มมากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพของการหายใจและการใช้อากาศ ของจุลินทรีย์ดีกว่า แต่มีพื้นที่ผิวสัมผัสต่ำกว่าอนุภาคขนาดเล็ก นอกจากนี้กากมันสำปะหลังที่ใช้ เป็นสับสเตรท เมื่อนำไปอบฆ่าเชื้อจะเกิดการรวมตัวกันเป็นเจล (Gelatinization) ทำให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสับสเตรท ทำให้มีความเหนียวมากขึ้นจึงมีผลต่อการถ่ายเทออกซิเจน และลดความสามารถในการละลายน้ำของสารอาหารในสับสเตรท (Ramadas, Holst, and Maltison, 1996) ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายแป้งได้ทั้งหมด จึงให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ไม่สูงมากนัก ดังนั้นเพื่อให้มีปริมาณสารตั้งต้นเพียงพอต่อการเจริญเติบโตและการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร ตลอดจนการดำเนินการ ศึกษา เนื่องจากเป็นช่วงความเข้มข้นที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากถึง 8.27 กรัมต่อลิตร และ จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตประมาณ 10^{10} CFU/มล. ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นของกากมัน สำปะหลังที่ 10 และ 30 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.21)



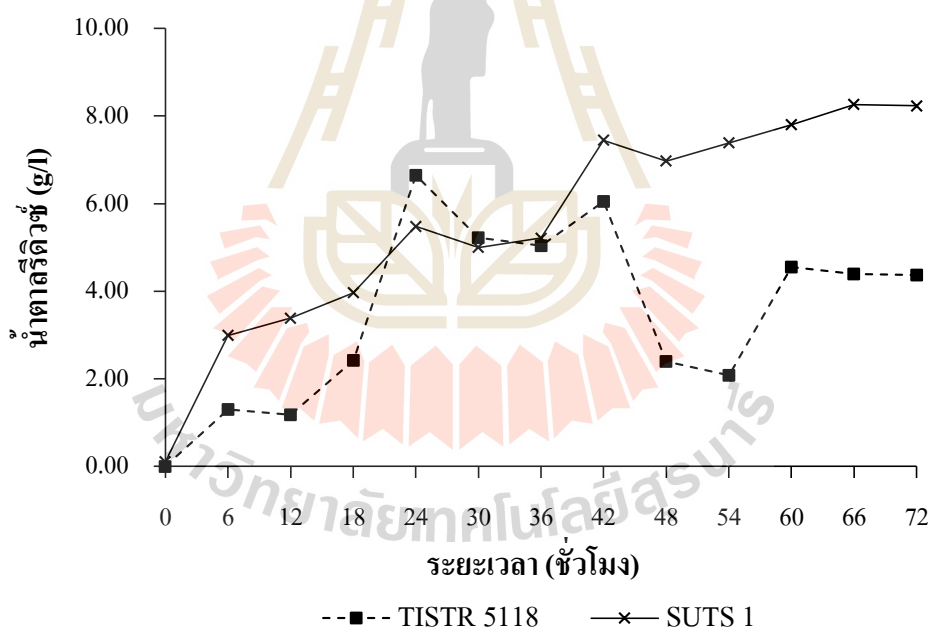
- หมายเหตุ**
- A ปริมาณกากมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร
 - B ปริมาณกากมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร
 - C ปริมาณกากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร

รูปที่ 4.21 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และการเจริญเติบโตของ *A. tumefaciens* SUTS 1 จากการย่อยกากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร

4.5.4 ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5118

การศึกษาความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5118 เพื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยของยีสต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ที่ทำการคัดเลือกได้ในข้อ 4.1 ผลการศึกษาพบว่าในช่วงเวลาแรกของการศึกษา คือ ชั่วโมงที่ 0-12 ของการศึกษา น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณน้อยมาก เนื่องจากเป็นช่วงระยะปรับตัว (Lag phase) ยีสต์มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำอย่างอาจยังไม่สามารถผลิตเอนไซม์ จึงมีการเปลี่ยนแปลงน้อย ซึ่งสามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพียง 1.30 และ 1.18 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 6 และชั่วโมงที่ 12 ตามลำดับ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 18-24 ของการศึกษา โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการศึกษา คือ 6.64 กรัมต่อลิตร เนื่องจากยีสต์มีอัตราการสร้างเอนไซม์ได้อย่างรวดเร็ว โดยพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มสูงขึ้น จากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงเป็น 5.22 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 30 และลดลง

อย่างต่อเนืองเหลือเพียง 4.36 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ยีสต์ *S. fibuligera* TISTR 5118 เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์อะไมเลส ประเภทเอ็กซ์โซอะไมเลส และเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งผลจากการย่อยที่สมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว (Saelim et al., 2008) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ของ *A. tumefaciens* SUTS 1 พบว่า จุลินทรีย์ดังกล่าวมีความสามารถในการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีกว่ายีสต์ *S. fibuligera* TISTR 5118 กล่าวคือ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดตามช่วงเวลา โดยการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ของแบคทีเรียเริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ของการศึกษา คือ 2.99 กรัมต่อลิตร และมีการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดช่วงเวลาของการศึกษา โดยพบว่าการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากถึง 8.27 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 66 ของการศึกษา ขณะที่ยีสต์มีการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เพียง 6.64 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.22)



รูปที่ 4.22 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของ *S. fibuligera* TISTR 5118 และ *A. tumefaciens* SUTS 1

ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและก่อให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลของยีสต์และแบคทีเรานั้นสามารถเกิดได้ดีในสภาวะที่แตกต่างกัน เช่น สารอาหาร ซึ่งจุลินทรีย์ทุกชนิดต้องการสารอาหารในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะสารประกอบคาร์บอนเพื่อใช้เป็น

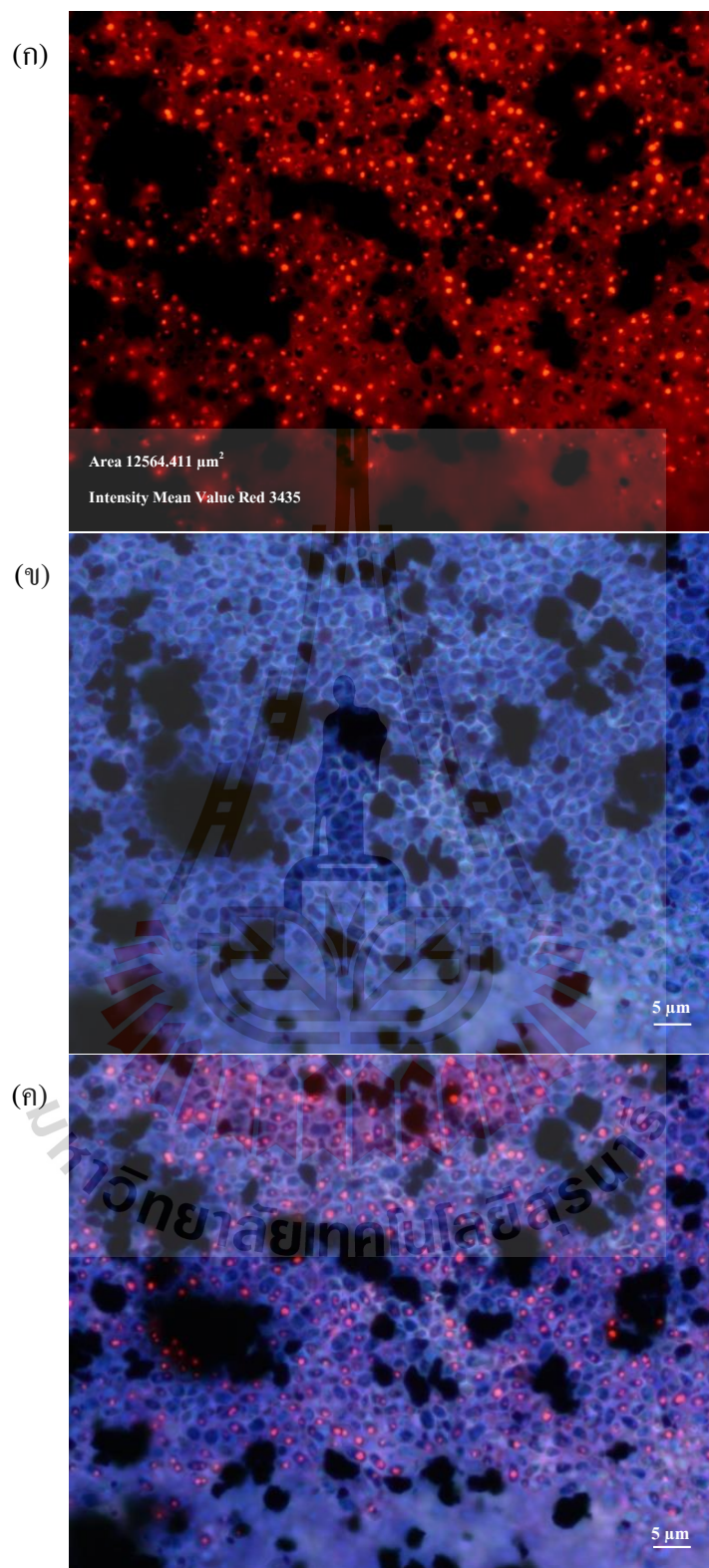
แหล่งพลังงาน ในโตรเจนใช้สังเคราะห์โปรตีน วิตามินและแร่ธาตุใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ อาหารจึงเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญและการทวีจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีความจำเป็นต้องให้ ในปริมาณที่พอเหมาะ ไม่มากหรือน้อยจนเกินไป นอกจากนี้ พีเอช อุณหภูมิ และออกซิเจนยังมีผล ต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยออกซิเจนในอาหารจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญเติบโต และการผลิตสารเมตาบอไลต์เพื่อใช้ในการเผาผลาญอาหาร เป็นต้น เมื่อพิจารณาจากความสามารถ ในการปลดปล่อยน้ำตาลของจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มซึ่งพบว่าแบคทีเรีย *A. tumefaciens* SUTS 1 มีความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังได้ดีกว่ายีสต์ *S. fibuligera* TISTR 5118 ดังนั้น การศึกษานี้จึงใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ได้แก่ *A. tumefaciens* SUTS 1 และ *C. rugosa* SUTR 1 เพื่อ ใช้ในการ ศึกษาความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลและผลิต PHA ในขั้นตอน เดียว ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ต่อไป

4.6 การสะสม PHA ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์

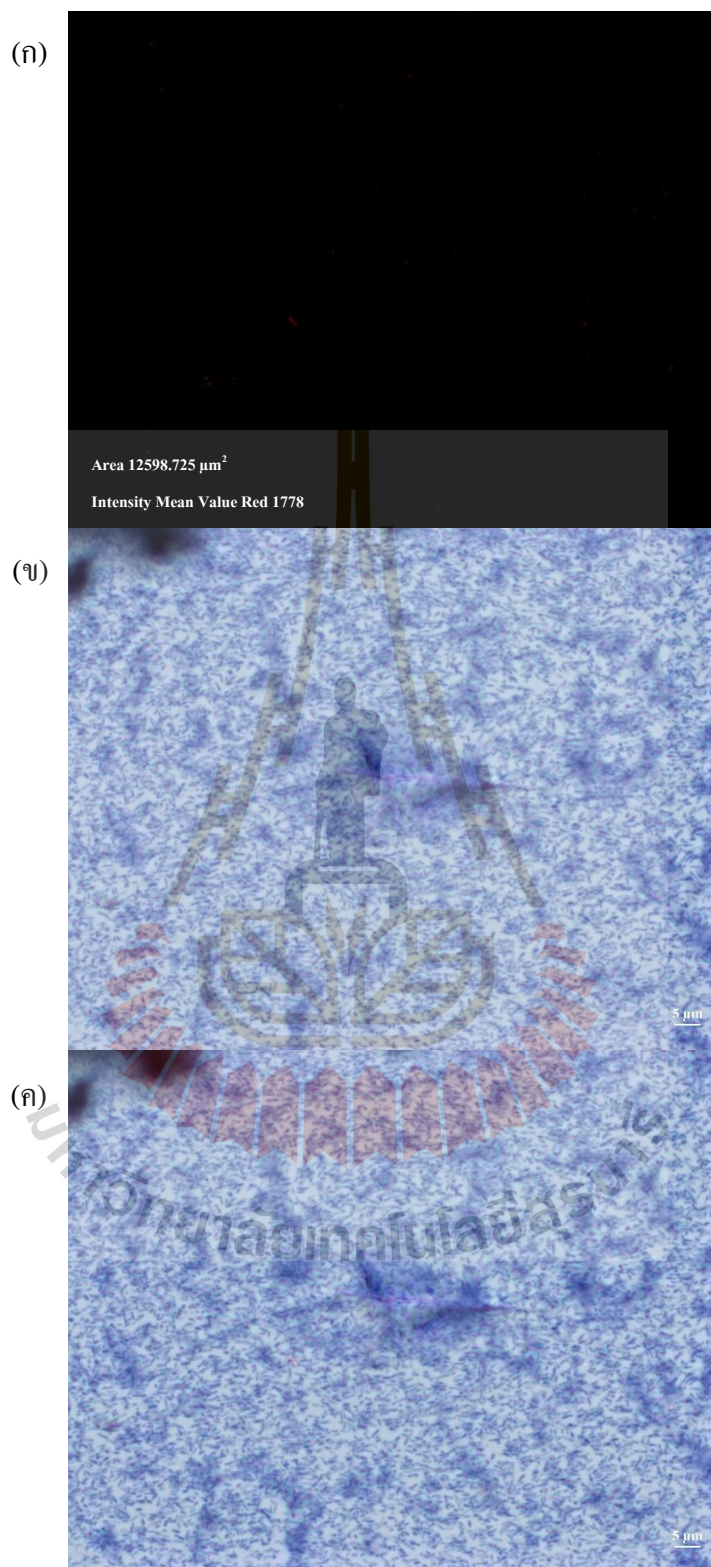
การศึกษากการสะสม PHA ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในขั้นต้น เพื่อพิจารณา การสะสม PHA ซึ่งมีลักษณะเป็นแกรนูลที่สะสมอยู่ภายในเซลล์จัดอยู่ในกลุ่มของ Lipophilic material จากการศึกษาการสะสม PHA ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ด้วยการย้อมติดสี 1% Nile blue A และนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Fluorescence microscope) ที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร (Berlanga et al., 2006; Rodtong et al., 2008; Khardenavis et al., 2009) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเรือง แสงของสีย้อม เมื่อจุลินทรีย์มีการผลิตและสะสมสาร PHA จะปรากฏแกรนูลสีส้มแดงภายในเซลล์ จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 ปรากฏแกรนูลสีส้ม แดงภายในเซลล์จากการย้อมติดสีดังกล่าว พบว่ามีแกรนูลสีส้มแดงขนาดใหญ่ปรากฏภายในเซลล์ ของ *C. rugosa* SUTR 1 อย่างชัดเจน โดยพบว่ามีจำนวน 1-3 แกรนูลต่อหนึ่งเซลล์ (รูปที่ 4.23ก) ขณะที่ *A. tumefaciens* SUTS 1 มีจุดสีส้มแดงขนาดเล็กมาก (รูปที่ 4.24ก) อาจเนื่องมาจากยีสต์ มีขนาดของเซลล์ใหญ่กว่าแบคทีเรีย และเมตาบอไลซึมของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันจึงทำให้เกิดการ สะสม PHA ภายในเซลล์ต่างกัน (Breuer, Terentiev, Kunze, and Babel, 2002; Ostle and Holt, 1982; Serafim et al., 2002) อย่างไรก็ตามได้มีการประยุกต์ใช้วิธีการถ่ายภาพแบบ Multichannel เพื่อ ทวน สอบการปรากฏขึ้นของแกรนูลดังกล่าวว่ามีการสะสมขึ้นภายในเซลล์ โดยการใช้ภาพถ่ายจากกล้อง จุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์นำมาซ้อนทับ (Overlay) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Bright-field) (รูปที่ 4.23B และรูปที่ 4.24B) ซึ่งเป็นภาพถ่ายจากบริเวณเดียวกับภาพถ่ายจากกล้อง จุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าแกรนูลที่เกิดขึ้นมีการสะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด

(รูปที่ 4.23ค และรูปที่ 4.24ค) เนื่องจาก PHA จัดเป็นพอลิเอสเทอร์ชนิดหนึ่ง จึงสามารถตรวจวัดแนวโน้มการสังเคราะห์ PHA ของแบคทีเรียภายในเซลล์เบื้องต้นด้วยการใช้สีย้อมที่เป็น Lipophilic dye (Shakeri et al., 2011; Beral, 2013) ซึ่ง Nile Blue A เป็นสีย้อมที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้ว ละลายได้ในไขมัน ทำให้ติดไขมันได้สูงจึงมีการใช้เพื่อย้อมทดสอบลิพิด ไตรกลีเซอไรด์และไลโปโปรตีนบางชนิด ที่มีความจำเพาะ จึงสามารถย้อมติดแกรนูลของ PHA ที่เป็นสารจำพวกไขมันได้เช่นเดียวกัน (Loo and Suddesh, 2007) และเป็นสีย้อมที่สามารถย้อมได้ทั้งจุลินทรีย์แกรมบวกและจุลินทรีย์แกรมลบ แต่สามารถย้อมติดจุลินทรีย์แกรมบวกได้ดีกว่า เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์จุลินทรีย์แกรมบวกมีองค์ประกอบเป็น Peptidoglycan ถึงร้อยละ 90 และมีเมมเบรนชั้นนอก (Outer membrane) ซึ่งมีไขมันเป็นองค์ประกอบมากถึงร้อยละ 11-22 ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ล้อมรอบ Peptidoglycan ไว้ ส่งผลให้สีย้อม Nile Blue A ซึ่งเป็นสีย้อมที่ละลายได้ดีในไขมันถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่า (Bhuwal, Singh, Aggarwal, Goyal, and Yadav, 2013; Koller and Kotreras, 2015)

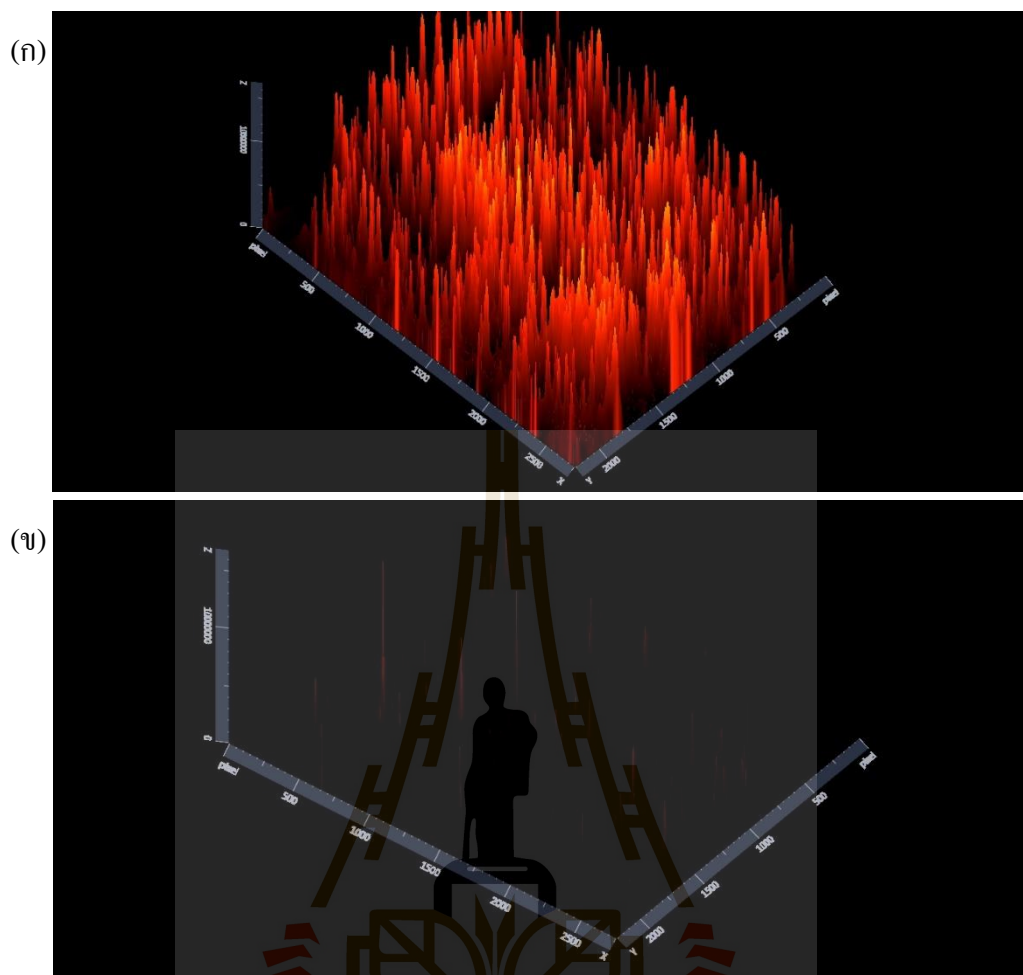
อย่างไรก็ตามการติดสีย้อมและขนาดของแกรนูลภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกันมาก จึงประยุกต์ใช้ค่าความเข้มของการเรืองแสงสีย้อม (Fluorescence intensity spectrum) ในการเปรียบเทียบการสะสม PHA granule ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยวัดค่าเฉลี่ยความเข้มของการเรืองแสงสีย้อม (Fluorescence intensity mean value) ของแกรนูลต่อพื้นที่ทั้งหมดพบว่า *C. rugosa* SUTR 1 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยความเข้มของการเรืองแสงสีย้อมเท่ากับ 3435 ขณะที่ *A. tumefaciens* SUTS 1 มีค่าเฉลี่ยความเข้มของการเรืองแสงสีย้อมเท่ากับ 1778 ทั้งนี้ค่าความเข้มของการเรืองแสงสีย้อม (Fluorescence intensity spectrum) ที่ประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาการสะสม PHA granule ภายในเซลล์เบื้องต้น จะแสดงผลเป็นค่าสเปกตรัมของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์แต่ละจุดในลักษณะพีคสเปกตรัมสามมิติ โดยความสูงของพีคแสดงถึงความเข้มของการเรืองแสงสีย้อม (รูปที่ 4.25) ซึ่งหากค่าความเข้มของการเรืองแสงสีย้อมเฉลี่ยมีค่ามากแสดงถึงแนวโน้มการสะสม PHA granule ภายในเซลล์ที่มีมากเช่นเดียวกัน (Spiekermann et al., 1999; Berlanga et al., 2006; Goh and Tan, 2012; Bhuwal et al., 2013) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดสามารถผลิต PHA granule ซึ่งมี PHA สะสมอยู่ภายในเซลล์ได้ เนื่องจากมีการติดสีย้อมของ Nile blue A (Alias and Tan, 2005) อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวไม่สามารถบอกถึงชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ จึงต้องใช้วิธีการสกัดพอลิเมอร์จากเซลล์เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณและคุณลักษณะของพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้ต่อไป



รูปที่ 4.23 ลักษณะการสะสม PHA granule ภายในเซลล์ของ *C. rugosa* SUTR 1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ก) Fluorescence microscope, (ข) Bright-field microscope, (ค) Fluorescence microscope overlay with bright-field microscope



รูปที่ 4.24 ลักษณะการสะสม PHA granule ภายในเซลล์ของ *A. tumefaciens* SUTS 1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ก) Fluorescence microscope, (ข) Bright-field microscope, (ค) Fluorescence microscope overlay with bright-field microscope

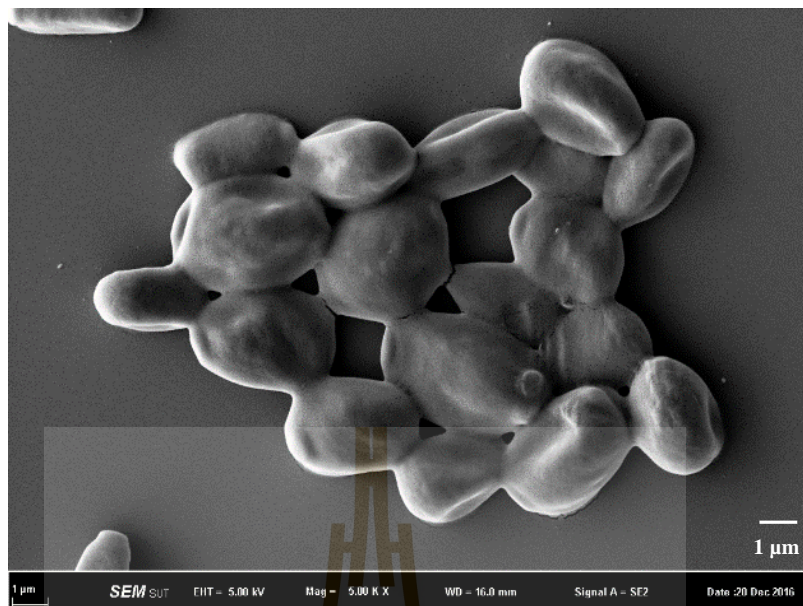


รูปที่ 4.25 ค่าความเข้มของการเรืองแสงสีเขียวอม (fluorescence intensity spectrum) ของจุลินทรีย์ (ก) *C. rugosa* SUTR 1, (ข) *A. tumefaciens* SUTS 1

4.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์เมื่อมีการสะสม PHA

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด Field-Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM) เพื่อให้เห็นลักษณะเซลล์ของจุลินทรีย์ขณะมีการสะสม PHA ภายในเซลล์ของ *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 โดยพบว่ารูปร่างของเซลล์ *C. rugosa* SUTR 1 เมื่อมีการสะสม PHA ลักษณะของเซลล์จะเปลี่ยนเป็นค่อนข้างกลม และมีรูปร่างเซลล์คงที่ (รูปที่ 4.27) สอดคล้องกับการศึกษาการสะสม PHA ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ขณะที่เซลล์ของ *A. tumefaciens* SUTS 1 พบก้อนกลมซึ่งเป็นลักษณะคล้ายแกรนูลที่สะสมอยู่ภายในเซลล์อย่างชัดเจน โดยพบแกรนูลอยู่ภายในเซลล์จำนวน 2-3 แกรนูลต่อเซลล์ และรูปร่างของเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น (รูปที่ 4.29) ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลง

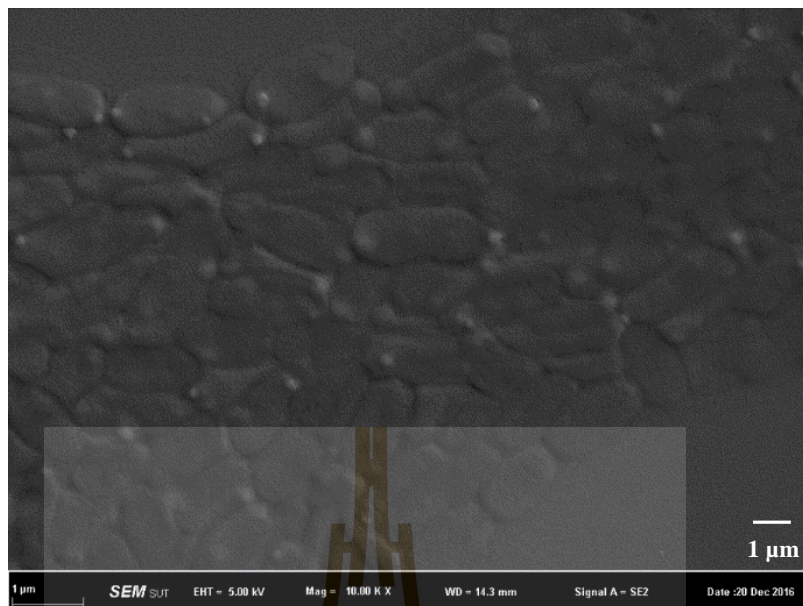
ของเซลล์จุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับจำนวนและขนาดแกรนูลที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ (Anderson and Dawes, 1990; Ha and Cho, 2002; Ostle and Holt, 1982) เนื่องจากมีการสะสมพอลิเมอร์อยู่ภายในเซลล์ภายใต้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์ได้รับสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์จะทำการสลายแหล่งคาร์บอนภายในที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ เพื่อให้ได้พลังงานในการนำมาเปลี่ยนรูปคาร์บอนภายนอกเข้ามาสะสมภายในเซลล์ในรูปของไบโอพอลิเมอร์ คือ PHA โดยทั่วไปแกรนูลภายในเซลล์มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ± 0.5 ไมโครเมตร และพบได้ 8-12 แกรนูลต่อเซลล์ ขึ้นอยู่กับชนิดและสภาวะในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นพอลิเอสเทอร์ร้อยละ 97.7 โปรตีนร้อยละ 1.87 (PHA synthase depolymerase structural protein และ regulator protein) และลิปิดหรือฟอสโฟลิปิดร้อยละ 0.46 (Reddy et al., 2003; Ojumu et al., 2004; Khanna and Srivastava, 2005; Loo and Suddesh, 2007; Suriyamongkol et al., 2007; Bernard, 2014) และการสะสมจะหยุดเมื่อมีปริมาณ PHA ประมาณร้อยละ 80 ต่อพื้นที่เซลล์ แม้ว่า จะยังคงมีเอนไซม์และสารตั้งต้น (Substrate) ที่เกี่ยวข้องกับสังเคราะห์ PHA เหลืออยู่เนื่องจาก เซลล์ไม่สามารถเก็บ PHA ได้ภายใต้ผนังเซลล์ที่จำกัด (Ballard et al., 1987) อย่างไรก็ตามการศึกษา ลักษณะภายนอกของเซลล์ *C. rugosa* SUTR 1 ไม่สามารถสังเกตเห็นแกรนูลของ PHA ได้ ด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดเช่นเดียวกับเซลล์ของ *A. tumefaciens* SUTS 1 เนื่องจากโครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์จะประกอบด้วย ไมโครไฟบริลเรียงขนานไปตามแกนยาวของเซลล์และ ผนังเซลล์มีสารพวกไคตินซึ่งมีหน่วยย่อยคือ กลูโคซามีน (Glucosamine) และมีเซลล์ulosอยู่ด้วย จึงทำให้ผนังเซลล์มีความหนาและคงรูปมากกว่าเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งมีองค์ประกอบของผนัง เซลล์เป็นสารจำพวกพอลิแซคคาไรด์ที่มีความหนาเพียง 100-200 อังสตรอม (Cooper and Hausman, 2004)



รูปที่ 4.26 ลักษณะของเซลล์ *C. rugosa* SUTR 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่ไม่เติมแหล่งอาหารไนโตรเจน ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) กำลังขยาย 5,000 เท่า



รูปที่ 4.27 ลักษณะของเซลล์ *C. rugosa* SUTR 1 ที่มีการสะสม PHA granule ภายในเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) กำลังขยาย 5,000 เท่า



รูปที่ 4.28 ลักษณะของเซลล์ *A. tumefaciens* SUTS 1 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่ไม่เติมแหล่งอาหารไนโตรเจน ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) กำลังขยาย 5,000 เท่า



รูปที่ 4.29 ลักษณะของเซลล์ *A. tumefaciens* SUTS 1 1 ที่มีการสะสม PHA granule ภายในเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) กำลังขยาย 5,000 เท่า

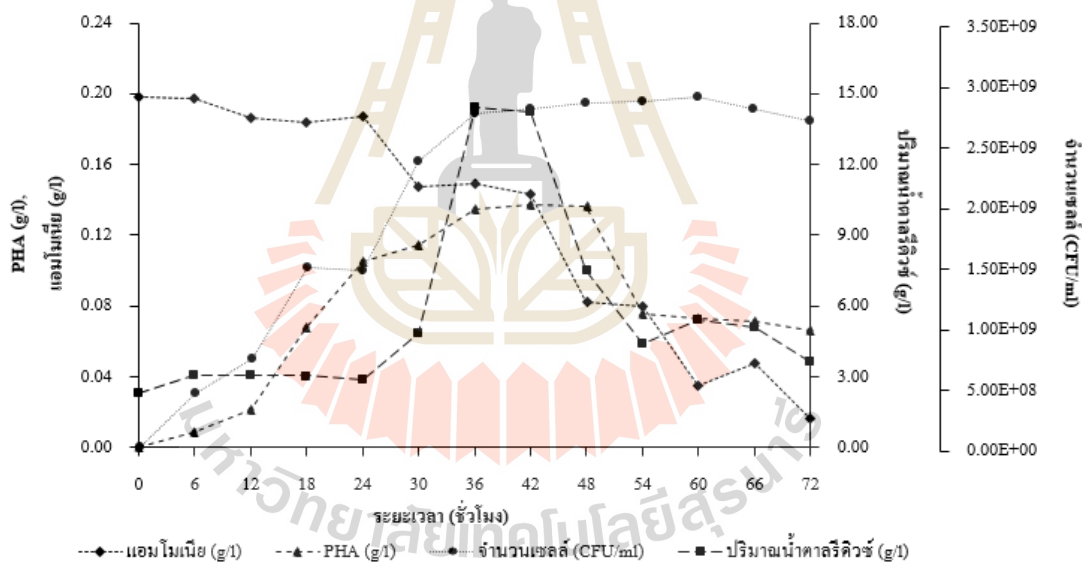
4.8 การผลิต PHA จากกากมันสำปะหลัง

การศึกษาความสามารถในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ ได้แก่ *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 จากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายกากมันสำปะหลังของจุลินทรีย์แต่ละชนิด และคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ PHA ได้ในปริมาณสูงเพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ PHA ของจุลินทรีย์ชนิดดังกล่าวในลำดับต่อไป โดยงานวิจัยนี้มุ่งเน้นวิเคราะห์ PHA ในรูปของ Polyhydroxybutyrate (PHB) เนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์จึงทำให้ได้ PHB เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของจุลินทรีย์

4.8.1 การผลิต PHA ของ *C. rugosa* SUTR 1

จากการศึกษาการผลิต PHA โดยเลี้ยง *C. rugosa* SUTR 1 (ตารางที่ 4.6) ในสารอาหาร Minimal medium ที่เติมกากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้นในการย่อยของจุลินทรีย์ให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อเป็นธาตุอาหารคาร์บอนหลักที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสังเคราะห์ PHA พบว่าเซลล์ของ SUTR 1 เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยสามารถย่อยกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณสูงสุด 14.44 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.29 กรัมน้ำตาลต่อกรัมกากมันสำปะหลังที่ใช้ หรือคิดเป็นร้อยละ 29 ของสารชีวมวลเริ่มต้น ในชั่วโมงที่ 36 ขณะที่จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 2.77×10^9 CFU/มล. ซึ่งจุลินทรีย์มีการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์ 0.1343 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุด 0.1368 และ 0.1367 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 47.9 นาโนกรัมต่อเซลล์ ในชั่วโมงที่ 42 และ 48 ของการศึกษาโดยมีจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 2.80×10^9 CFU/มล. และ 2.86×10^9 CFU/มล. จากนั้นจำนวนของเซลล์และปริมาณการสะสม PHA ภายในเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด รวมถึงปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องจากช่วงเวลาที่มีการปลดปล่อยน้ำตาลได้สูงสุด ในชั่วโมงที่ 36 ของการศึกษา สัมพันธ์กับการเจริญและการสังเคราะห์พอลิเมอร์หลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการศึกษา โดยมีการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์เพียง 0.066 กรัมต่อลิตร และมีจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์เจริญเติบโตลดลงเป็น 2.70×10^9 CFU/มล. ขณะที่น้ำตาลรีดิวซ์เหลือเพียง 3.64 กรัมต่อลิตร และปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียลดลงเหลือ 0.02 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 ของการศึกษา ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นอัตราการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้น แสดงถึงความสามารถในการนำน้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้เพื่อการสร้างเซลล์และสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากนั้นการเจริญและการสะสมพอลิเมอร์จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลลดลง

(รูปที่ 4.30) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจาก เมื่อเซลล์มีการสังเคราะห์พอลิเมอร์จนถึงจุดที่มีการสะสมภายในเซลล์ในปริมาณสูงสุดแล้ว จุลินทรีย์จะไม่สามารถสะสมพอลิเมอร์ได้อีก เนื่องจากขนาดของเซลล์ ที่มีความจำกัด รวมถึงสารอาหารภายในระบบถูกใช้จนมีปริมาณน้อย เช่นเดียวกับอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ลดลงจึงส่งผลให้ความสามารถในการผลิต PHA เนื่องจากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนลดลง อาจไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตส่งผลให้เซลล์ของจุลินทรีย์มีจำนวนลดลง จึงไม่เกิดการสังเคราะห์ PHA นอกจากนี้ภายในเซลล์จุลินทรีย์จะเกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอร์ไรซ์โดยเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เรส เพื่อนำพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาใช้เพื่อเป็นสารอาหารในการเจริญเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kedia และคณะ (2014) พบว่าปริมาณ PHB ที่สังเคราะห์โดย *Cupriavidus necata* ภายหลังจากที่ได้ปริมาณ PHB สูงสุดจะมีการสะสม PHB ลดลงอย่างรวดเร็วอันเป็นผลมาจากการย่อยสลาย PHB ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์เพื่อนำมาใช้ในการเจริญเติบโตและอยู่รอดของเซลล์



รูปที่ 4.30 การเจริญเติบโตและการสะสม PHA ของ *C. rugosa* SUTR 1 เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

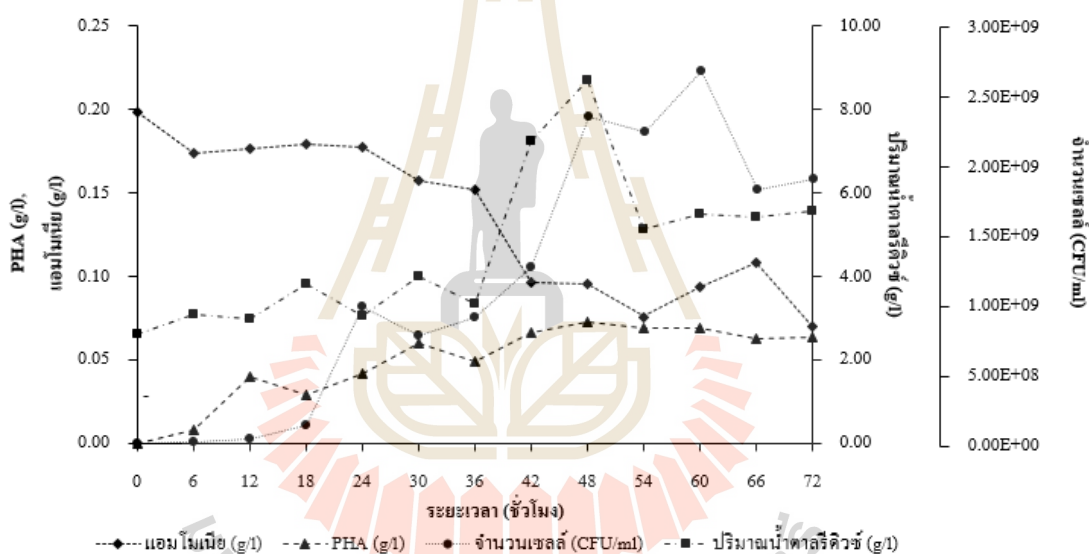
ตารางที่ 4.6 การสะสมพอลิเมอร์ของ *C. rugosa* SUTR 1 เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

ระยะเวลา (h)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-cassava)	แอมโมเนีย (g/l)	จำนวนเซลล์ (CFU/ml.)	ปริมาณ PHA (g/l)	ปริมาณ PHA (ng/cell)
0	2.30±0.013	0.05	0.20±0.000	9.00×10^6	0.0000	0.00
6	3.08±0.010	0.06	0.20±0.000	4.55×10^8	0.0083	18.3
12	3.08±0.010	0.06	0.19±0.000	7.45×10^8	0.0210	28.2
18	3.02±0.014	0.06	0.18±0.002	1.49×10^9	0.0675	45.3
24	2.84±0.003	0.06	0.19±0.000	1.47×10^9	0.1048	71.6
30	4.86±0.008	0.10	0.15±0.000	2.38×10^9	0.1142	48.1
36	14.44±0.016	0.29	0.15±0.000	2.77×10^9	0.1343	48.6
42	14.21±0.010	0.28	0.14±0.000	2.80×10^9	0.1368	49.0
48	7.52±0.020	0.15	0.08±0.018	2.86×10^9	0.1367	47.9
54	4.38±0.048	0.09	0.08±0.000	2.86×10^9	0.0758	26.5
60	5.41±0.109	0.11	0.03±0.000	2.90×10^9	0.0725	25.0
66	5.10±0.028	0.10	0.05±0.000	2.80×10^9	0.0708	25.3
72	3.64±0.060	0.07	0.02±0.000	2.70×10^9	0.0660	24.4

4.8.2 การผลิต PHA ของ *A. tumefaciens* SUTS 1

การศึกษาความสามารถในการผลิต PHA จากการย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลเพื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการผลิต PHA โดยตรงของแบคทีเรีย *A. tumefaciens* SUTS 1 พบว่าสามารถย่อยแป้งและให้น้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด 8.70 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.17 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง หรือคิดเป็นร้อยละ 17 ของสารชีวมวลเริ่มต้น ในชั่วโมงที่ 48 ของการศึกษา ขณะที่ความสามารถในการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์สามารถสะสมได้ 0.0727 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 30.9 นาโนกรัมต่อเซลล์ โดยมีจำนวนเซลล์เจริญเติบโตสูงสุดในช่วง เวลาเดียวกัน คือประมาณ 2.35×10^9 CFU/ml. และมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียลดลงเหลือ 0.09 กรัมต่อลิตร โดยไนโตรเจนจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ซึ่งจุลินทรีย์จะสามารถผลิต PHA เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากพอแต่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด เมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก และปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการสะสม PHA ภายในเซลล์ โดยทั่วไปการผลิต PHA

จะเกิดขึ้นควบคู่กับการเจริญอันเป็นผลมาจาก PHA เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำรอง จัดเป็นสารกลุ่ม Primary metabolite หรือ Growth-associated substance จึงมีการสะสมควบคู่กับการเจริญของจุลินทรีย์นั้น ๆ โดยการสะสม PHA จะเกิดขึ้นสูงสุดเมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญเข้าสู่สภาวะคงที่ (Stationary phase) (Hrabak, 1992) และอาจเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือคงที่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการเตรียมจุลินทรีย์ขั้นต้นก่อนเข้าสู่กระบวนการทดสอบความสามารถในการสะสมพอลิเมอร์ จึงต้องนำเซลล์ในช่วงระยะคงที่ (SUTR 1 ประมาณ 96 ชั่วโมง SUTS 1 ประมาณ 72 ชั่วโมง) เข้าสู่ขวดปฏิกิริยซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal salt medium ผสมอยู่กับกากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการสะสม PHA ไปพร้อม ๆ กับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดังรูปที่ 4.31 และตารางที่ 4.7



รูปที่ 4.31 การเจริญเติบโตและการสะสม PHA ของ *A. tumefaciens* SUTS 1 เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวัชจากกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.7 การสะสมพอลิเมอร์ของ *A. tumefaciens* SUTS 1 เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

ระยะเวลา (h)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-cassava)	แอมโมเนีย (g/l)	จำนวนเซลล์ (CFU/ml.)	ปริมาณ PHA (g/l)	ปริมาณ PHA (ng/cell)
0	2.61±0.013	0.05	0.20±0.000	1.45 × 10 ⁸	0.0000	0.00
6	3.08±0.019	0.06	0.17±0.000	2.90 × 10 ⁷	0.0080	275.9
12	2.96±0.016	0.06	0.18±0.000	4.70 × 10 ⁷	0.0395	840.4
18	3.82±0.009	0.08	0.18±0.000	1.43 × 10 ⁸	0.0290	203.3
24	3.03±0.014	0.06	0.18±0.000	9.90 × 10 ⁸	0.0412	41.6
30	4.00±0.004	0.08	0.16±0.000	7.90 × 10 ⁸	0.0595	75.3
36	3.34±0.003	0.07	0.15±0.000	9.15 × 10 ⁸	0.0487	53.2
42	7.24±0.050	0.14	0.10±0.000	1.27 × 10 ⁹	0.0662	52.1
48	8.70±0.003	0.17	0.09±0.000	2.35 × 10 ⁹	0.0727	30.9
54	5.11±0.054	0.10	0.08±0.000	2.24 × 10 ⁹	0.0690	30.9
60	5.49±0.013	0.11	0.09±0.000	2.67 × 10 ⁹	0.0690	25.8
66	5.41±0.049	0.11	0.11±0.000	1.83 × 10 ⁹	0.0628	34.4
72	5.57±0.007	0.11	0.07±0.000	1.91 × 10 ⁹	0.0637	33.4

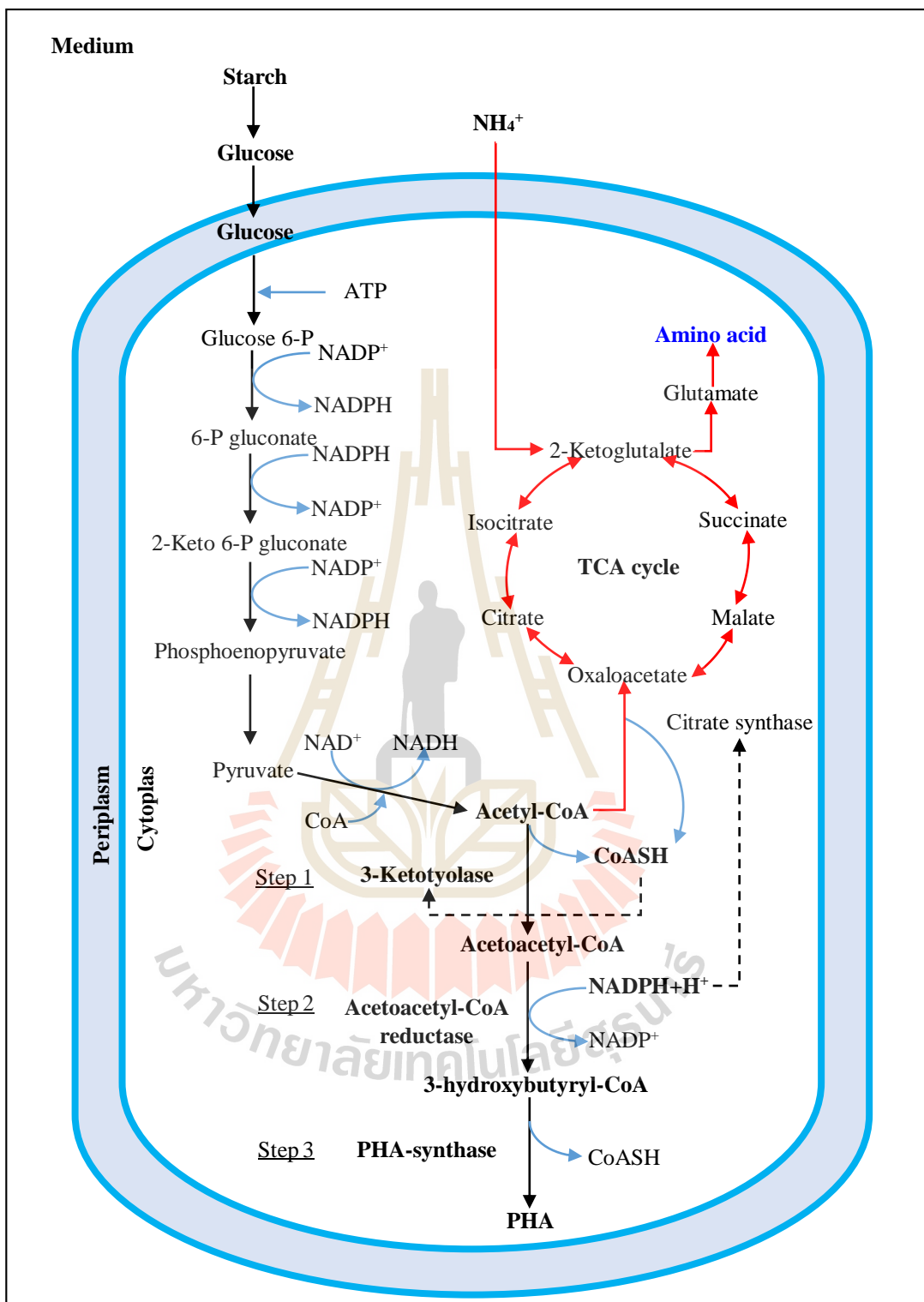
จากการศึกษาความสามารถในการผลิต PHA ของ *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ คือ เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นและความเข้มข้นของไนโตรเจนมีปริมาณจำกัด ทำให้จุลินทรีย์มีการผลิต PHA เพิ่มขึ้น โดยจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์อะไมเลสและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์เพื่อย่อยสลายแป้ง ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ฟรุกโตส เข้าสู่เซลล์เพื่อเป็นพลังงานและสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน โดยกระบวนการไกลโคลิซิส (Glycolysis หรือ Embden-Meyerhof Parnas pathway) ได้เป็นไพรูเวท (Pyruvate) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน (Hydrogenation) เปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) เข้าสู่วัฏจักร TCA cycle และถูกออกซิไดซ์ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ATP, FADH₂, NADH และ NADPH ในขณะที่จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโต NADPH ภายในเซลล์จะถูกออกซิไดซ์อย่างรวดเร็วเป็นผลให้มีความเข้มข้นของโคแฟกเตอร์ต่ำและมีกิจกรรมภายในวัฏจักร TCA cycle สูง อะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) ส่วนใหญ่จะผ่านเข้าสู่

วัฏจักร TCA cycle เพื่อสร้างพลังงานและสารที่จำเป็นในกระบวนการสร้างส่วนประกอบของเซลล์ (Anabolism) ปฏิกริยาของเอนไซม์ซิเตรตซินเทส (Citrate synthase) ในวัฏจักรส่งผลให้เกิดโคเอนไซม์เออีสระ (CoASH) จำนวนมากถูกปล่อยออกมา ทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกริยาการรวมกันของ 2 โมเลกุลอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) จึงไม่เกิดการสังเคราะห์ PHA ขึ้นภายในเซลล์ แต่ในสภาวะที่มีการจำกัดสารอาหารจะเกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้ NADH และ NADPH เพิ่มปริมาณมากขึ้นและไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซิเตรตซินเทส (Citrate synthase) และเอนไซม์ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจิเนส (Isocitrate dehydrogenase) (Morgunov, Kamzolova, Sokolov, and Finogenova, 2004; Poblete-Castro et al., 2012) ทำให้อะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) เข้าสู่วัฏจักร TCA cycle น้อยลง (Doi, 1990; Braunegg et al., 1998) เนื่องจาก อะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) ที่จะเข้าสู่วัฏจักร TCA cycle ขึ้นอยู่กับปริมาณแร่ธาตุบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส เป็นต้น เมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตในสภาวะที่ถูกจำกัดสารอาหารและมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป กระบวนการเมตาบอลิซึมจะเปลี่ยนรูปแบบโดยไม่ได้นำสารอาหารดังกล่าวไปสร้างเซลล์ และไม่เกิดการสังเคราะห์โปรตีน อะซิติลโคเอนไซม์เอ จึงไม่ถูกดูดซึมเข้าสู่วัฏจักร TCA เป็นผลให้อะซิติลโคเอนไซม์เอ มีความเข้มข้นสูงในขณะที่โคเอนไซม์เออีสระ (CoASH) มีปริมาณน้อย เนื่องจากไม่ถูกปล่อยออกมาในขั้นตอนของวัฏจักร TCA ส่งผลให้เอนไซม์เบตาคีโดไทโอเลส (β-ketothiolase) ไม่ถูกยับยั้งจากโคเอนไซม์เออีสระ (CoASH) และเกิดการสร้างเม็ดแกรนูลในรูปของ PHA โดยมีเอนไซม์ที่สำคัญในการสะสมพอลิเมอร์เกี่ยวข้องกับ 3 ชนิดคือ เบตาคีโดไทโอเลส (β-ketothiolase) กระตุ้นให้เกิดการรวมของอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) 2 โมเลกุลกลายเป็นอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) อะซิโตอะซิติลโคเอรีดักเตส (Acetoacetyl-CoA reductase) จะเปลี่ยนอะซิโตอะซิติลโคเอนไซม์เอให้กลายเป็น 3-ไฮดรอกซีบิวทิลริลโคเอนไซม์เอ (R-3-hydroxybutyryl-CoA) หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization) ของไฮดรอกซีบิวทิลริลโคเอนไซม์เอ (R-3-hydroxybutyryl-CoA) ไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB ซินเทส (PHB synthase) (รูปที่ 4.32)

โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะมีการสร้างและสะสม PHB ไปพร้อม ๆ กับการเจริญของเซลล์แต่ในช่วงที่เกิดกระบวนการสังเคราะห์ PHB จุลินทรีย์จะมีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างต่ำ (Hanggi, 1990; Osman, Elrazak, Khater, Nashy, and Mohamadeen, 2015) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณเซลล์จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHB ด้วย ซึ่งการสังเคราะห์ PHB ของจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นสูงหลังจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เข้าสู่สภาวะคงที่ (Lafferty, Korsatko, and Korstako, 1988) เมื่อเซลล์มีการสังเคราะห์พอลิเมอร์จนถึงค่าหนึ่งที่มีความเข้มข้นสูงสุดแล้วรวมทั้งสารอาหารในระบบถูกใช้จนลดน้อยลง ภายในเซลล์จะเกิดปฏิกริยาคีพอลิเมอร์ไรซ์โดย

เอนไซม์ดีพอลิเมอร์เรส (Depolymerase) เพื่อนำพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาใช้ในการอยู่รอด สอดคล้องกับ Kedia และคณะ (2014) ศึกษาการผลิต P(3HB) โดยเชื้อ *Cupriavidus necator* พบว่า ภายหลังจากชั่วโมงที่ได้ค่า P(3HB) สูงสุดแล้วประสิทธิภาพในการผลิตจะลดลงอย่างรวดเร็ว เป็นผลมาจากการย่อยสลาย P(3HB) ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์เพื่อนำมาใช้ในการเจริญเติบโต และการอยู่รอดของเซลล์ นอกจากนี้หากในกระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์มีการดูดซึ่มคาร์บอน มากกว่า 1 ชนิดในเวลาเดียวกัน จุลินทรีย์จะมีกลไกภายในซึ่งเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของโคพอลิเมอร์ ชนิดต่าง ๆ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นที่ใช้ (Nurbas and Kutsal, 2004; Steinbuechel, 1991)





รูปที่ 4.32 วิธีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากกลูโคส ดัดแปลงจาก Pena, Castillo, Nunez, and Segura, (2011); Borrero-de Acuna et al., (2014) และ Poblete-Castro et al., 2012

อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาการผลิต PHA จากแหล่งคาร์บอนที่มีองค์ประกอบหลักเป็น ชูโครส เช่น น้ำอ้อยและกากน้ำตาล เปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลบริสุทธิ์ ซึ่งพบว่าสามารถผลิต PHA ได้ความเข้มข้นที่สูงและเป็นส่วนหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิตได้ Suwannasing และคณะ (2015) ได้ศึกษาการผลิต PHA จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลชูโครสและน้ำอ้อย ทำการแปรผันองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 11 สูตร เมื่อเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนระหว่าง น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลชูโครส และน้ำอ้อย พบว่าการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิต PHA ได้เท่ากับ 1.525 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือการใช้น้ำตาลชูโครสและน้ำตาลกลูโคสที่ได้ความเข้มข้นของ PHA เท่ากับ 0.115 และ 0.111 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาของ Samrot และคณะ (2011) ศึกษาการสะสม PHB ของแบคทีเรีย *Enterobacter cloacae* SU-1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 2 ชนิด คือกลูโคสและแลคโตส พบว่า สามารถผลิต PHB ได้ 8 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 94 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้น้ำตาลกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ซึ่งประกอบด้วยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมต่อลิตร โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร Rodriguez-Contreras และคณะ (2013) ได้ศึกษาการผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทีเรต : P(3HB)) จาก *Bacillus megaterium* พบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 28.59 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ P(3HB) เท่ากับ 8.50 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับ Nair และคณะ (2014) ซึ่งศึกษาการใช้กากน้ำตาลเพื่อลดต้นทุนการผลิต PHA ของ *Bacillus subtilis* โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลในกากน้ำตาลในช่วงร้อยละ 10-100 พบว่าการใช้น้ำตาลรวมในกากน้ำตาลร้อยละ 10 มีความเหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHA โดยมีความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 20.9 กรัมต่อลิตร มีความเข้มข้นของ PHA เท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 75.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง Naheed และ Jamil (2014) ได้ศึกษาการผลิต P(3HB) ของ *Enterobacter* sp. SEL2 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 2 สามารถผลิต PHA ร้อยละ 47.36 ซึ่งความเข้มข้นของเซลล์และปริมาณพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ใช้ ทั้งนี้การใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถส่งเสริมการเจริญและการสังเคราะห์ P(3HB) ได้ดี เพราะในกากน้ำตาลมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลชูโครส กลูโคส และฟรักโทส อีกทั้งประกอบด้วยวิตามินแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ เช่น ไทอามีน ไรโบฟลาวิน ไบโอติน โพแทสเซียม ฟอสเฟต แคลเซียม แมกนีเซียม คอปเปอร์ และเหล็ก เป็นต้น ซึ่งสารดังกล่าวสามารถส่งเสริมการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 เบื้องต้น

ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) พบว่าค่าสเปกตรัมของพอลิเมอร์ในตำแหน่งความถี่เท่ากับ 3223.9386 และ 3338.2647 เป็นตำแหน่งของอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group; $3200-3500\text{ cm}^{-1}$) (Ma, Zhang, Liu, Chen, Zhang, and Chen, 2009; Weng, Wang, and Wang, 2011) ตำแหน่งความถี่เท่ากับ 2921.3187 และ 2924.4380 เป็นตำแหน่งของหมู่เมทิลีน (-CH₂ methylene group : 2925 cm^{-1}) ตำแหน่งความถี่เท่ากับ 2852.7473 และ 2851.3416 เป็นตำแหน่งของหมู่เมทิล (-CH₃ methyl group : 2962 cm^{-1}) ตำแหน่งความถี่เท่ากับ 1721.3187 และ 1736.6207 เป็นตำแหน่งของอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่คาร์บอนิลในกลุ่มเอสเทอร์ (R-C=O group : $1600-1850\text{ cm}^{-1}$) (Hong, Sun, Tian, Chen, and Huang, 1999; Andrew et al., 1994) และที่ตำแหน่งความถี่เท่ากับ 1278.2418 และ 1164.9021 เป็นตำแหน่งของอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่คาร์บอกซิล ในกลุ่มอีเทอร์ (C-O-C group : $100-1300\text{ cm}^{-1}$) (Silverstein, Webster, and Kiemle, 2005) โดยสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นมีความคล้ายคลึงกับพอลิเมอร์มาตรฐานพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต [Poly-3-hydroxybutyrate : P(3HB)] ซึ่งหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวเป็นหมู่ฟังก์ชันเฉพาะที่แสดงถึงความเป็นพอลิเมอร์ในกลุ่มของพอลิเอสเทอร์ ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) หมู่คาร์บอนิลในกลุ่มเอสเทอร์ (R-C=O group) หมู่คาร์บอกซิลในกลุ่มอีเทอร์ (C-O-C group) และหมู่อัลเคน (C-H group) (Gumel et al., 2014; Mohapatra, Sumantaray, Sumantaray, 2014; Kumar, Gupta, and Thakur, 2016)

ทั้งนี้เมื่อพิจารณาความสามารถในการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดสามารถผลิต P(3HB) ได้ปริมาณแตกต่างกัน ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโต สารอาหาร คาร์บอน และสภาวะการจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส หรือออกซิเจน และยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการผลิต PHB ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ผลิตได้แตกต่างกัน หรือ PHB ในแกรนูลที่อยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีขนาดไม่เท่ากันจึงส่งผลให้ปริมาณของ PHB แตกต่างกันด้วย จากการศึกษาจะพบว่า *C. rugosa* SUTR 1 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของยีสต์ เมื่อพิจารณาทั้งด้านการเจริญเติบโตและความสามารถในการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์ จึงมีคุณสมบัติที่เหมาะสมเพื่อนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ P(3HB) เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ดังกล่าวในลำดับต่อไป

4.9 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต P(3HB) ของ *C. rugosa* SUTR 1

ในกระบวนการสังเคราะห์ PHB ของจุลินทรีย์ จำเป็นต้องควบคุมสภาวะการผลิตให้เหมาะสมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการผลิตสูงสุด จึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต P(3HB) ของยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 โดยทำการแปรผันสภาวะการทดลองดังนี้ คือ ความเข้มข้น

แหล่งอาหารไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และแปรผันอัตราการเข่า ซึ่งมีผลการศึกษาดังนี้

4.9.1 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตและการสะสมพอลิเมอร์

ไนโตรเจนจัดเป็น Growth factor ที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและเป็นปัจจัยสำคัญต่อการสังเคราะห์พอลิเมอร์ชีวภาพ (Biopolymer) ของจุลินทรีย์บางชนิด (Beaulieu, Beaulieu, Melinard, Pandian, and Goulet, 1995; Yehia, Ahmed-Abd, and Wesam, 2016) ซึ่งจุลินทรีย์จะสามารถผลิต PHA เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปแต่มีปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างจำกัด โดยจุลินทรีย์บางชนิดจะสามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ควบคู่ไปกับการเจริญเติบโต (Yehia et al., 2016) ทั้งนี้ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสารอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่นเกลือแอมโมเนีย ดังนั้นเพื่อให้เกิดการผลิตพอลิเมอร์อย่างมีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ของยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1 2 และ 3 กรัมต่อลิตร และวิเคราะห์ไนโตรเจนที่เหลือจากการนำไนโตรเจนจากสารประกอบดังกล่าวไปใช้ในรูปของแอมโมเนียไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) (APHA, 2005) เนื่องจากจุลินทรีย์จะดูดซึมสารอนินทรีย์ไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลเฟต) ในรูปของแอมโมเนียเข้าสู่เซลล์และถูกออกซิไดซ์ให้เป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อเป็นสารตั้งต้น (Precursor) ของกระบวนการชีวสังเคราะห์ (Biosynthetic precursor) ที่ถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น เอนไซม์ วิตามิน กรดอะมิโนและการสังเคราะห์โปรตีน เพื่อสร้างเซลล์และเพิ่มจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ (Moat, Foster, and Spector, 2002) ผลการศึกษาพบว่า เมื่อนำยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นชุดควบคุม พบว่าจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำและมีการสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณน้อย โดยมีการสะสมพอลิเมอร์สูงสุดเพียง 0.0993 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) ต่อกากมันสำปะหลังเท่ากับ 0.002 กรัมต่อกรัม กากมันสำปะหลัง ในช่วงเวลาที่ 48 ของการศึกษา และมีจำนวนเซลล์เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นประมาณ 2.12×10^9 CFU/มล. โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.06 ต่อชั่วโมง ขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 10.08 กรัมต่อลิตร จากนั้นการสะสม P(3HB) มีแนวโน้มลดลงสัมพันธ์กับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ลดลงเช่นเดียวกัน (รูปที่ 4.33 และตารางที่ 4.8)

เมื่อมีการเพิ่มแหล่งอาหารไนโตรเจนลงไปในการเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์จุลินทรีย์ เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1

ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร โดยมีความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นเท่ากับ 0.20 กรัมต่อลิตร พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงแรกของการศึกษา แต่แหล่งอาหารไนโตรเจนมีความเข้มข้นลดลง ขณะที่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว สัมพันธ์กับการสะสม P(3HB) ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 14.44 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับปริมาณการสะสมของ P(3HB) ที่เพิ่มขึ้นเป็น 0.1343 กรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนเซลล์เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นประมาณ 2.77×10^9 CFU/มล. ขณะที่แหล่งไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมีความเข้มข้นลดลงเหลือ 0.14 กรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือเพียง 7.52 กรัมต่อลิตร ยีสต์มีการสะสม P(3HB) เพิ่มขึ้นเป็น 0.1367 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.0027 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง ในชั่วโมงที่ 48 ของการศึกษา ซึ่งเป็นช่วงที่มีการสะสม P(3HB) ภายในเซลล์สูงสุด สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น มีจำนวนเซลล์ประมาณ 2.86×10^9 CFU/มล. โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.12 ต่อชั่วโมง ขณะที่แหล่งไนโตรเจนมีความเข้มข้นลดลงเหลือ 0.15 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์มีการนำสารอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์และสังเคราะห์ P(3HB) ภายในเซลล์ ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าวไนโตรเจนถูกนำไปใช้เพียง 0.05 กรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณการสะสม P(3HB) ลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 60 สอดคล้องกับการลดลงของแหล่งสารอาหาร คือน้ำตาลรีดิวซ์และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเป็น 5.41 และ 3.64 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนลดลงเหลือเพียง 0.08 และ 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.34)

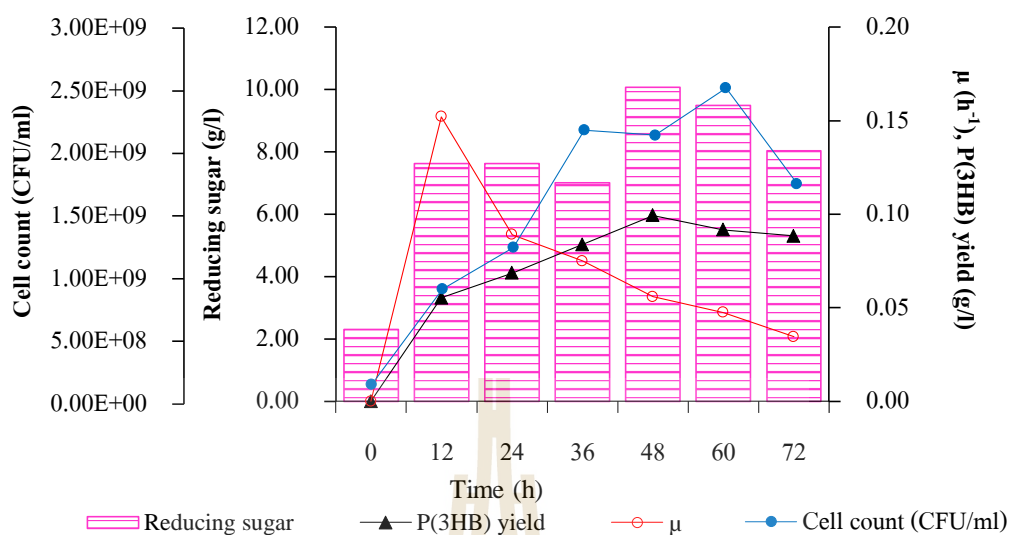
ในขณะที่การเพาะเลี้ยงยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 2 กรัมต่อลิตร พบว่ามีผลทำให้จุลินทรีย์มีการสังเคราะห์และเกิดการสะสมพอลิเมอร์ได้สูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Grothe และคณะ (1999) พบว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้มีการสะสม PHA เพิ่มมากขึ้น และจุลินทรีย์จะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (Osman et al., 2016) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า *C. rugosa* SUTR 1 เริ่มมีการสะสม P(3HB) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ประมาณ 0.1477 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีการสะสม P(3HB) ได้มากกว่าการศึกษาที่ผ่านมา และมีจำนวนเซลล์เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 1.75×10^8 CFU/มล. จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 9.0×10^6 CFU/มล. และการสะสม P(3HB) มีปริมาณลดลงเล็กน้อย ในชั่วโมงที่ 24 ขณะที่น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นวัดได้เท่ากับ 14.08 กรัมต่อลิตร และแหล่งอาหารไนโตรเจนมีความเข้มข้นเท่ากับชั่วโมงก่อนหน้า คือเท่ากับ 0.41 กรัมต่อลิตร จากนั้นการสะสม P(3HB) มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเพิ่มขึ้นเป็น 0.3912 กรัมต่อลิตร หรือคิดปริมาณการผลิตเป็น 0.0079 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง ในชั่วโมงที่ 36 ของ

การศึกษา ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีการสะสมพอลิเมอร์ได้สูงสุด โดยน้ำตาลรีดิคซ์มีปริมาณลดลงเหลือ 11.46 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตสูงสุดเป็น 2.90×10^9 CFU/มล. โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.16 ต่อชั่วโมง ขณะที่ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียถูกนำไปใช้ในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์และการสังเคราะห์ P(3HB) โดยมีความเข้มข้นของแอมโมเนียลดลงเหลือ 0.28 กรัมต่อลิตร จากความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นเท่ากับ 0.45 กรัมต่อลิตร และในชั่วโมงที่ 48 การสะสม P(3HB) มีแนวโน้มลดลงเป็น 0.3212 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์ที่มีปริมาณลดลงเป็น 10.23 กรัมต่อลิตร ขณะที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลงอย่างรวดเร็ว โดยลดลงเหลือเพียง 0.10 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับจำนวนเซลล์ที่ลดลง ทั้งนี้จากการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์และปริมาณ P(3HB) แสดงให้เห็นว่าปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในช่วงเวลาดังกล่าวมีปริมาณเพียงพอต่อการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ ซึ่งจากตารางที่ 4.8 พบว่าในช่วงที่เกิดการสังเคราะห์ P(3HB) ได้สูงสุดจะเป็นช่วงเวลาที่ไนโตรเจนมีอัตราการนำไปใช้สูงเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาก่อนหน้า จุลินทรีย์จึงมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ไปพร้อมกับการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์ เนื่องจากสารตั้งต้นถูกนำไปใช้สร้างเซลล์และสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งเซลล์เริ่มต้นที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นช่วงที่ยีสต์มีการเจริญเติบโตสูงสุดและกำลังเจริญเติบโตเข้าสู่สภาวะที่มีอัตราการเจริญเติบโตคงที่ (Stationary phase) ดังนั้นในการที่เซลล์จะมีการสะสมพอลิเมอร์เกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโต นั้นเกิดจากการที่เซลล์เริ่มต้นของยีสต์จำนวนหนึ่ง เมื่อทำการขยายปริมาณ เซลล์เหล่านี้ยังสามารถที่จะเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ จึงดูดซึมเอาสารอาหารไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อไป ในขณะที่เซลล์อีกจำนวนหนึ่งที่ไม่เจริญเติบโตจึงมีกลไกที่จะดูดซึมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เพื่อสะสมเป็นพอลิเมอร์ต่อไป แต่เมื่อความเข้มข้นของแหล่งอาหารลดลง พบว่าการสะสม P(3HB) มีแนวโน้มลดลง โดยลดลงเหลือ 0.2398 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตลดลงเป็น 2.68×10^9 CFU/มล. ในชั่วโมงที่ 60 และลดลงเหลือเพียง 0.1588 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 สัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์และไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นลดลง เช่นเดียวกัน (รูปที่ 4.35) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากในช่วงท้ายของการศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์ ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งอาหารไนโตรเจนเหลือน้อย เนื่องจากจุลินทรีย์มีการนำคาร์บอนและไนโตรเจนไปใช้ในการสร้างเซลล์และใช้เพื่อการสังเคราะห์ PHB โดยจะเห็นว่าในช่วงแรกของการศึกษาจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์และมีการสะสมพอลิเมอร์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่เมื่อคาร์บอนและไนโตรเจนถูกนำไปใช้จึงไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ PHB จุลินทรีย์จึงนำ PHB กลับมาใช้ใหม่ โดยเปลี่ยน PHB เป็น D(-)-3-hydroxybutyrate และเปลี่ยนเป็นอะซิติล โคอเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) โดยเอนไซม์ดีพอลิเมอร์เรส (Depolymerase)

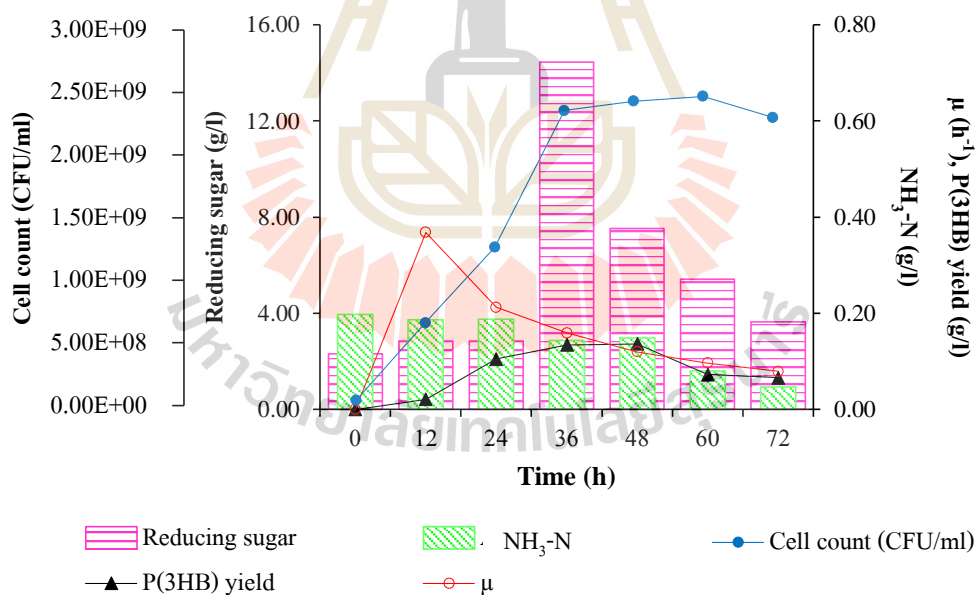
เพื่อเข้าสู่วิถี TCA cycle เพื่อสร้างเซลล์ใหม่ทำให้ PHB มีปริมาณลดลง (Khanna and Srivastava, 2005) (รูปที่ 4.37) อย่างไรก็ตาม Ramadas และคณะ (2009) ได้ศึกษาการผลิต PHB ของ *Bacillus sphaericus* 5149 โดยใช้ น้ำตาลรีดิคซ์จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Alpha amylase) และกลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 0.161 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 6.4 กรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่ El-Sayed, Abdel Hafez, Hemmat, Abdelhady, and Khodair, (2009) ได้ศึกษาการผลิต P(3HB) ของ *Alcaligenes latus* โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติมอาหารใหม่ที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน พบว่าการเลี้ยง *Alcaligenes latus* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 7.01 กรัมต่อลิตรและผลิต P(3HB) ได้ 0.66 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเก็บเซลล์และเติมอาหารใหม่ที่มีการจำกัดไนโตรเจน พบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 12.56 กรัมต่อลิตร และผลิต P(3HB) เท่ากับ 7.04 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงเชื้อเพียงขั้นตอนเดียวที่ไม่มีการเติมสารอาหารซึ่งได้ความเข้มข้นของเซลล์และ P(3HB) ที่น้อยกว่า

แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 3 กรัมต่อลิตร โดยมีความเข้มข้นของแอมโมเนียเริ่มต้นเท่ากับ 0.57 กรัมต่อลิตร พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์ที่เกิดจากการย่อยกากมันสำปะหลังของยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 มีความเข้มข้นโดยเฉลี่ยลดลงและการสะสมพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพลดลงเช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณไนโตรเจน 1 และ 2 กรัมต่อลิตร โดยจุลินทรีย์สามารถผลิตพอลิเมอร์ได้เพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์ที่เพิ่มขึ้น ขณะที่สารอาหารไนโตรเจนมีความเข้มข้นลดลง และสามารถผลิต P(3HB) ได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของการศึกษา มีปริมาณเท่ากับ 0.1222 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) ต่อสารตั้งต้น 0.0024 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์เท่ากับ 7.96 กรัมต่อลิตร ขณะที่จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตสูงสุดเป็น 2.89×10^9 CFU/มล. โดยมีอัตราการใช้ในไนโตรเจนมากถึง 0.47 กรัมต่อลิตร โดยมีไนโตรเจนเหลืออยู่ในรูปของแอมโมเนียเพียง 0.1 กรัมต่อลิตร จากนั้นประมาณ P(3HB) ลดลงเหลือ 0.0917 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์และไนโตรเจนที่ลดลงเหลือ 6.19 และ 0.09 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับจำนวนเซลล์ที่ลดลงเป็น 2.14×10^9 CFU/มล. ในชั่วโมงที่ 60 หลังจากนั้นปริมาณการสะสม P(3HB) เพิ่มขึ้นเป็น 0.1068 กรัมต่อลิตร สัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์ที่เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 72 ของการศึกษา (รูปที่ 4.36) ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของไนโตรเจนสูงเกินไปอาจจะยับยั้งการผลิต PHB ได้เช่นเดียวกัน (Beyatli, 2002) โดยจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตได้มากขึ้นแต่จะไม่มีการสะสม PHB (Wang and Lee, 1997; Reddy and Mohan, 2012) รวมทั้งมีแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการผลิต

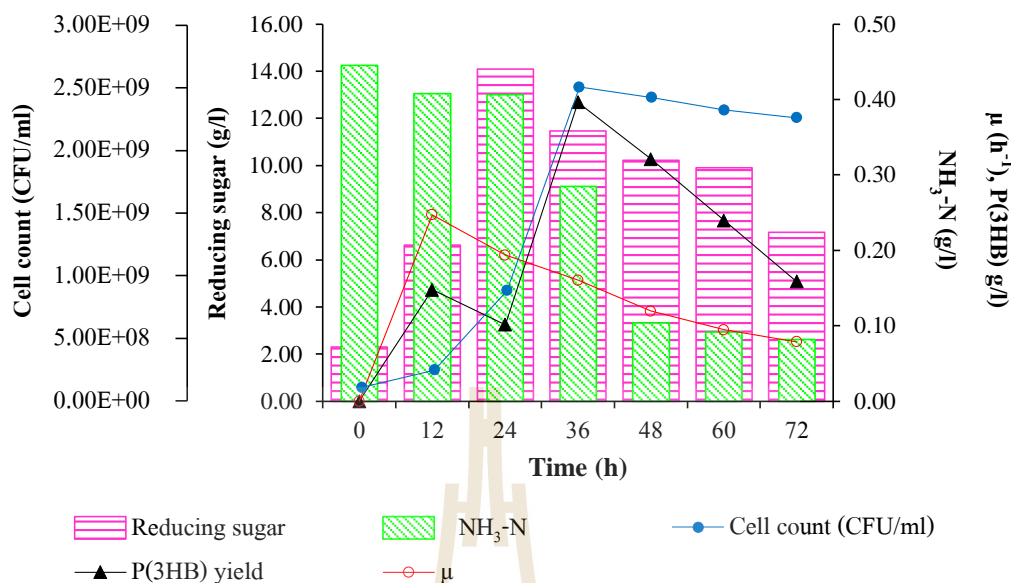
PHB เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือจากการบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของ *C. rugosa* SUTR 1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามแอมโมเนียมซัลเฟตนับเป็นแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก เนื่องจากไนโตรเจนของแอมโมเนียมซัลเฟตมีธาตุไนโตรเจนซัลเฟอร์ และออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งองค์ประกอบดังกล่าวเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน และซัลเฟอร์จะถูกนำไปใช้ในรูปของซัลเฟต และนำเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ Active transport เข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนและส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ จุลินทรีย์จึงสามารถนำไปธาตุอาหารดังกล่าวไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตและทำให้เกิดการผลิต PHB ได้ดี ซึ่งจุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของเซลล์ประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักเซลล์แห่ง สอดคล้องกับการศึกษาของ Khosro, Asiybar, Masoud, and Mohammad, (2012) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนและระยะเวลาในการบ่มเชื้อเพื่อการผลิต PHB จาก *Azotobacter vinelandii* ซึ่งแยกได้จากดิน โดยศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด ได้แก่ Bactopeptone casein yeast extract และแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับผลิต PHB หลังจากบ่มเชื้อระยะเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้แอมโมเนียมซัลเฟตยังมีราคาถูกเมื่อเทียบกับอินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้ อาจเป็นโปรตีน ยูเรีย เปปโติน ทริปโติน สารสกัดจากเนื้อและกรดอะมิโนบางชนิด ซึ่งมีราคาแพงกว่าอินทรีย์ไนโตรเจน ดังนั้นการใช้อินทรีย์ไนโตรเจนในระดับอุตสาหกรรมจึงมีความเป็นไปได้มากกว่าการใช้อินทรีย์ไนโตรเจน



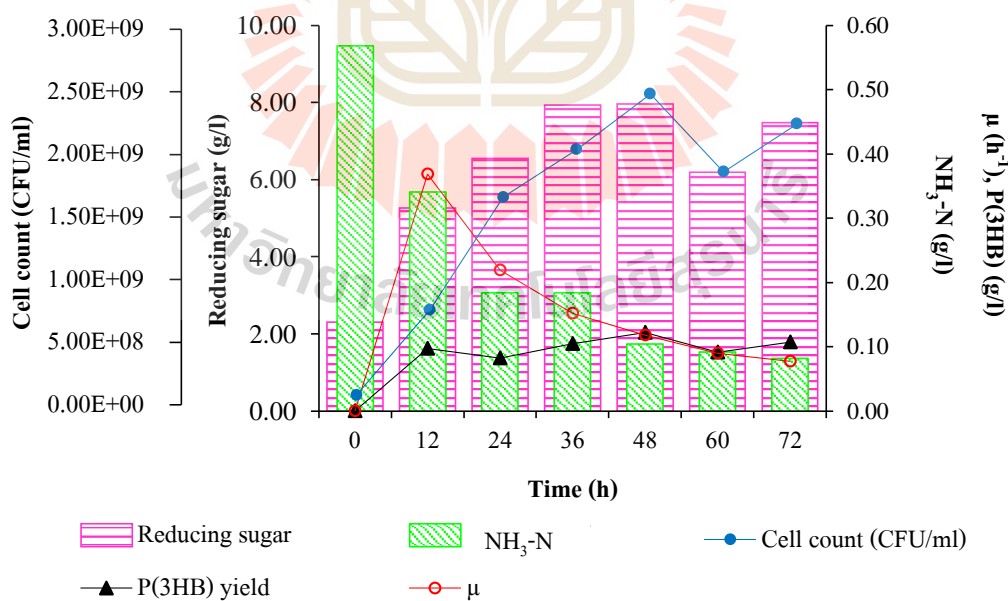
รูปที่ 4.33 การสะสม P(3HB) ของ *C. rugosa* SUTR 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมไนโตรเจน



รูปที่ 4.34 การสะสม P(3HB) ของ *C. rugosa* SUTR 1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.35 การสะสม P(3HB) ของ *C. rugosa* SUTR 1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.36 การสะสม P(3HB) ของ *C. rugosa* SUTR 1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.8 การสะสมพอลิเมอร์ของ *C. rugosa* SUTR 1 เมื่อแปรผันปริมาณไนโตรเจน

$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (g/l)	ระยะเวลา (h)	pH	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-cassava)	แอมโมเนีย (g/l)	จำนวนเซลล์ (CFU/ml.)	อัตราการ เติบโตจำเพาะ : μ (h^{-1})	ปริมาณ PHB (g/l)	ปริมาณ PHB (ng/cell)	PHB ต่อสารตั้งต้น (g/g-cassava)	ชนิดของ พอลิเมอร์
0	0	7.09	2.30±0.047	0.05	ND*	1.45×10^8	0.00	0.0000	0.00	0.0000	P(3HB)
	12	7.09	7.63±0.047	0.15	ND*	9.00×10^8	0.15	0.0553	61.5	0.0011	P(3HB)
	24	7.06	7.63±0.010	0.15	ND*	1.23×10^9	0.09	0.0685	55.7	0.0014	P(3HB)
	36	6.91	7.00±0.019	0.14	ND*	2.16×10^9	0.08	0.0838	38.8	0.0017	P(3HB)
	48	6.89	10.08±0.041	0.20	ND*	2.12×10^9	0.06	0.0993	46.8	0.0020	P(3HB)
	60	6.70	9.49±0.067	0.19	ND*	2.50×10^9	0.05	0.0917	36.7	0.0018	P(3HB)
	72	6.68	8.03±0.014	0.16	ND*	1.74×10^9	0.03	0.0883	50.9	0.0018	P(3HB)
1	0	7.09	2.30±0.013	0.05	0.20±0.000	9.90×10^6	0.00	0.0000	0.00	0.0000	P(3HB)
	12	7.09	2.85±0.004	0.06	0.19±0.000	7.45×10^8	0.37	0.0210	28.2	0.0004	P(3HB)
	24	6.91	2.84±0.003	0.06	0.19±0.000	1.47×10^9	0.21	0.1048	71.6	0.0021	P(3HB)
	36	6.68	14.44±0.016	0.29	0.14±0.000	2.77×10^9	0.16	0.1343	48.6	0.0027	P(3HB)
	48	6.51	7.52±0.020	0.15	0.15±0.000	2.86×10^9	0.12	0.1367	47.9	0.0027	P(3HB)
	60	6.33	5.41±0.109	0.11	0.08±0.001	2.90×10^9	0.10	0.0725	25.0	0.0014	P(3HB)
	72	6.28	3.64±0.060	0.07	0.05±0.000	2.70×10^9	0.08	0.0660	24.4	0.0013	P(3HB)

หมายเหตุ * หมายถึง not detect (วิธีการวิเคราะห์เหมาะสมกับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) มากกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร)

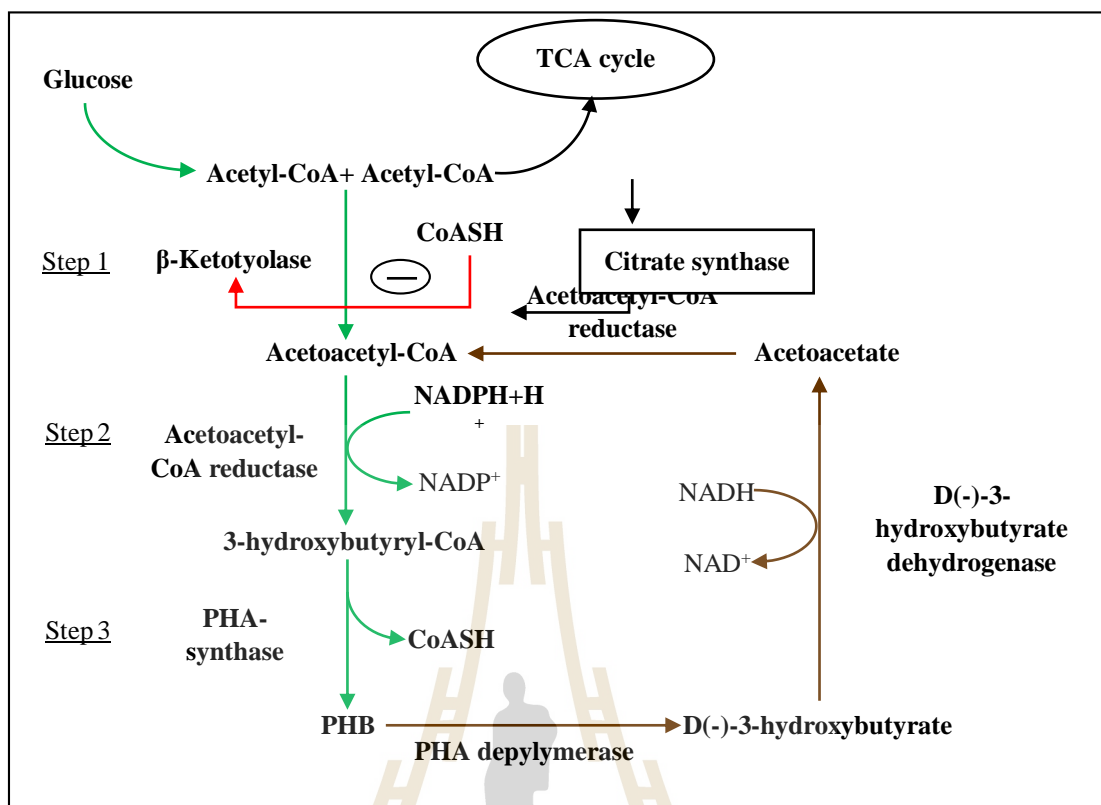
ตารางที่ 4.8 การสะสมพอลิเมอร์ของ *C. rugosa* SUTR 1 เมื่อแปรผันปริมาณไนโตรเจน (ต่อ)

$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (g/l)	ระยะเวลา (h)	pH	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-cassava)	แอมโมเนีย (g/l)	จำนวนเซลล์ (CFU/ml.)	อัตราการ เติบโตจำเพาะ : μ (h^{-1})	ปริมาณ PHB (g/l)	ปริมาณ PHB (ng/cell)	PHB ต่อสารตั้งต้น (g/g-cassava)	ชนิดของ พอลิเมอร์
2	0	7.10	2.30±0.013	0.05	0.45±0.000	9.00×10^6	0.00	0.0000	0.00	0.0000	P(3HB)
	12	7.09	6.63±0.020	0.13	0.41±0.001	1.75×10^8	0.25	0.1477	843.8	0.0030	P(3HB)
	24	7.09	14.08±0.020	0.13	0.41±0.001	9.40×10^8	0.19	0.1017	108.2	0.0020	P(3HB)
	36	7.06	11.46±0.017	0.23	0.28±0.001	2.90×10^9	0.16	0.3912	136.9	0.0079	P(3HB)
	48	6.94	10.23±0.163	0.20	0.10±0.001	2.80×10^9	0.12	0.3212	114.9	0.0064	P(3HB)
	60	6.73	9.92±0.016	0.20	0.09±0.000	2.68×10^9	0.09	0.2398	89.7	0.0048	P(3HB)
	72	6.52	7.16±0.016	0.14	0.08±0.000	2.60×10^9	0.08	0.1588	61.1	0.0032	P(3HB)
3	0	7.08	2.30±0.013	0.05	0.57±0.001	9.90×10^6	0.00	0.0000	0.000	0.0000	P(3HB)
	12	7.08	5.27±0.035	0.11	0.34±0.002	8.25×10^8	0.37	0.0975	118.2	0.0019	P(3HB)
	24	7.01	6.55±0.006	0.13	0.18±0.001	1.90×10^9	0.22	0.0825	43.4	0.0017	P(3HB)
	36	6.93	7.93±0.030	0.16	0.18±0.001	2.36×10^9	0.15	0.1050	44.6	0.0021	P(3HB)
	48	6.88	7.96±0.067	0.16	0.10±0.001	2.89×10^9	0.12	0.1222	42.3	0.0024	P(3HB)
	60	6.71	6.19±0.017	0.12	0.09±0.000	2.14×10^9	0.09	0.0917	42.8	0.0018	P(3HB)
	72	6.61	7.48±0.050	0.15	0.08±0.000	2.60×10^9	0.08	0.1068	41.1	0.0021	P(3HB)

หมายเหตุ * หมายถึง not detect (วิธีการวิเคราะห์เหมาะสมกับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) มากกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร)

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนส่งผลต่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์และการสะสม P(3HB) ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะมีการสะสม P(3HB) ได้ดีในสถานะที่แหล่งคาร์บอนมีปริมาณมากพอ ในขณะที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลง ในขณะที่เดียวกันหากมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของไนโตรเจนมากเกินไปพบว่ามีการสะสม P(3HB) ต่ำ เนื่องจากเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตสารอาหารดังกล่าวจะถูกนำไปใช้สร้างพลังงานเพื่อสังเคราะห์โปรตีนและส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น เอนไซม์ DNA RNA และเพิ่มจำนวนเซลล์ จึงทำให้เกิดการสังเคราะห์ PHB น้อยลง แต่หากแหล่งสารอาหารมีความเข้มข้นมากเกินไปอาจส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์หรือทำให้เซลล์แตกเนื่องจากแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ส่งผลให้การเจริญเติบโตและการนำสารอาหารต่าง ๆ เข้า-ออกเซลล์ถูกยับยั้ง การเจริญเติบโตและการผลิต PHB ของจุลินทรีย์จึงลดลงเช่นเดียวกัน (Shang et al., 2003)

ไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีนและส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ซึ่งจุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของเซลล์ประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป โดยจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีไนโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เคซีน เปปโติน และยีสต์สกัด รวมถึงสามารถใช้ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แกลูตามีน แอมโมเนียม (NH_4^+) ต่าง ๆ โดยจุลินทรีย์จะสามารถผลิต PHA เมื่ออยู่ในสถานะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอแต่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด เนื่องจากในสถานะดังกล่าว จุลินทรีย์มีแนวโน้มที่จะผลิตแหล่งไขมันหรือคาร์โบไฮเดรตไว้ภายในเซลล์มากขึ้น (Liu et al., 2008) เนื่องจากภายใต้สถานะที่มีไนโตรเจนมากเกินไป ความเข้มข้นของ อะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) (สารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ PHB) ภายในเซลล์จะต่ำเมื่อเข้าสู่ TCA cycle ปฏิกิริยาซิเตรทซินเทส (Citrate synthase) จะปล่อยโคเอนไซม์เออิสระ (CoASH) เป็นจำนวนมากซึ่งจะไปยับยั้งปฏิกิริยาการควบแน่นของอะซิติลโคเอนไซม์เอ 2 โมเลกุล โดยเอนไซม์บีต้าคีโตไทโอเลส (β-ketothiolase condensation) ที่ทำให้อะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) เปลี่ยนไปเป็นอะซีโอะอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) ดังนั้นจึงทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ PHB ด้วย (Du, Si, Yu, and Lun, 2001) แต่ในสถานะที่ถูกจำกัดไนโตรเจนปริมาณ โคเอนไซม์เอจะลดลง NADPH จะถูกสะสม ทำให้มีผลยับยั้งการเปลี่ยนอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) ไปเป็นซิเตรต (Citrate) ในวิถี TCA cycle ดังนั้นอะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) จึงเข้าสู่วิถีสังเคราะห์ PHB ของจุลินทรีย์และเกิดการสะสม PHB เกิดขึ้นภายในเซลล์ (Chodak, 2008) ดังรูปที่ 4.37



- หมายเหตุ**
- ⊖ หมายถึง กระบวนการถูกยับยั้งด้วยโคเอนไซม์เอชเอส (CoASH)
 - หมายถึง กระบวนการสังเคราะห์ PHB
 - หมายถึง กระบวนการสลาย PHB

รูปที่ 4.37 วิธีการสังเคราะห์และสลาย PHB คัดแปลงจาก Kessler and Witholt, (2001) และ Khanna and Srivastava, (2005)

เมื่อศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ (Kinetic parameter) ของการผลิต P(3HB) ของยีสต์ *C. rugosa* SUTR1 ในช่วงเวลาที่มีการสะสม P(3HB) สูงสุด ได้แก่ ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ : Specific growth rate, h^{-1}) ปริมาณการสะสม P(3HB) (PHB yield, g/l) ค่าสัมประสิทธิ์การผลิต P(3HB) จากหนึ่งกรัมไนโตรเจน ($Y_{p/s}$, PHB yield coefficient, g-PHB/g-N) และประสิทธิภาพการผลิต (Q_p , volumetric productivity, g-PHB/l/h) (Karbasi et al., 2012; Gumel et al., 2014; Khardenavis et al., 2009) เมื่อใช้กากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตรและแปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เมื่อทำการเลี้ยง *C. rugosa* SUTR1 ในสถานะที่ไม่เต็มไนโตรเจน ยีสต์ *C. rugosa* SUTR1 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) สูงสุดเท่ากับ 0.06 ต่อชั่วโมง

คิดเป็นปริมาณการสะสม ($Y_{p/x}$) 46.8 นาโนกรัมต่อเซลล์ โดยมีประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) สูงสุดเท่ากับ 0.002 g-PHB/l/h ที่ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) สูงสุดเท่ากับ 0.12 ต่อชั่วโมง คิดเป็นปริมาณการสะสม ($Y_{p/x}$) 47.9 นาโนกรัมต่อเซลล์ โดยมีประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) สูงสุดเท่ากับ 0.003 g-PHB/l/h และให้ค่าสัมประสิทธิ์การผลิต P(3HB) ต่อหนึ่งกรัมไนโตรเจน ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 2.69 g-PHB/g-N เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 2 กรัมต่อลิตร พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) สูงสุดเท่ากับ 0.16 ต่อชั่วโมง เช่นเดียวกัน แต่มีปริมาณการสะสม ($Y_{p/x}$) ภายในเซลล์คิดเป็น 136.9 นาโนกรัมต่อเซลล์ โดยมีประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) สูงสุดเท่ากับ 0.011 g-PHB/l/h ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การผลิต P(3HB) ต่อหนึ่งกรัมไนโตรเจน ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 2.37 g-PHB/g-N เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 3 กรัมต่อลิตร พบว่าค่าประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) มีค่าลดลงเป็น 0.003 g-PHB/l/h ขณะที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ของจุลินทรีย์มีค่าคงที่ โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.12 ต่อชั่วโมง หรือคิดเป็นปริมาณการสะสม ($Y_{p/x}$) 42.3 นาโนกรัมต่อเซลล์ (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิต PHB ของยีสต์ *C.rugosa* SUTR1 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจน

Nitrogen concentration (g/l)	ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์				
	μ (h^{-1})	P(3HB) yield (g/l)	$Y_{p/x}$ (ng-PHB/cell)	$Y_{p/s}$ (g-PHB/g-N)	Q_p (g-PHB/l/h)
Control	0.06	0.10	46.8	0.00	0.002
1.0	0.12	0.14	47.9	2.69	0.003
2.0	0.16	0.39	136.9	2.37	0.011
3.0	0.12	0.12	42.3	0.26	0.003

จากข้อมูลข้างต้น สรุปได้ว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ของ *C.rugosa* SUTR 1 คือที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและให้ค่าประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) สูงสุด เท่ากับ 0.011 g-PHB/l/h โดยมีปริมาณการสะสม P(3HB) เท่ากับ 136.8 นาโนกรัมต่อเซลล์ และจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ยังคงมีการเพิ่มจำนวนเซลล์พร้อมกับการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์ เนื่องจากสารตั้งต้นถูกนำไปใช้สร้างเซลล์และสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของแอมโมเนียม

ซัลเฟตเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.9.2 การศึกษาอัตราการเขย่า

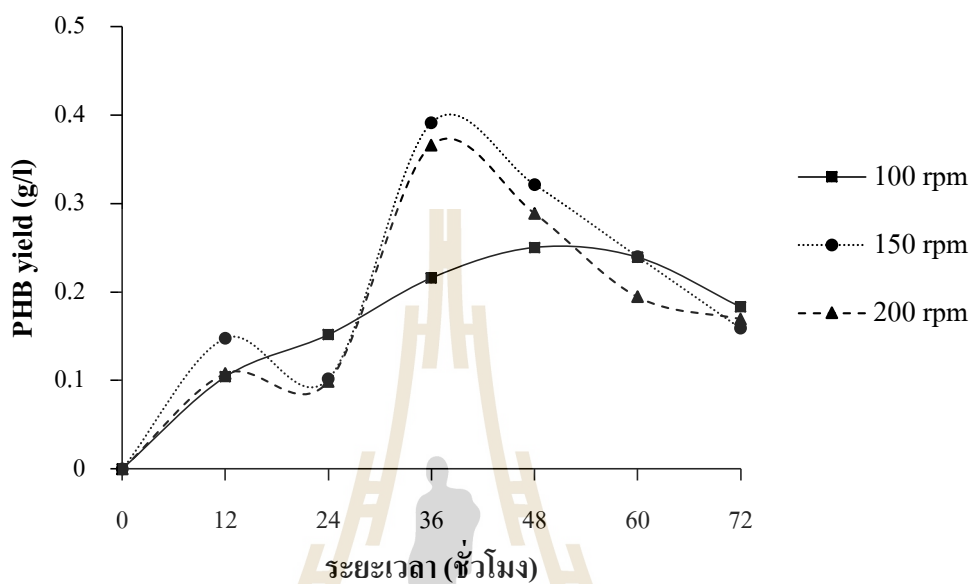
การควบคุมสภาวะเป็นขั้นตอนสำคัญในการสังเคราะห์ PHB ของจุลินทรีย์ ที่ทำให้เกิดการสัมผัสกันระหว่างสารอาหารและจุลินทรีย์ได้อย่างสม่ำเสมอและสามารถดูดซึมสารอาหารรวมถึงทำให้เกิดการละลายของแก๊ส เช่น แก๊สออกซิเจน ส่งผลให้พื้นที่ผิวของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มมากขึ้นจึงเป็นการเพิ่มอัตราการส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่ระบบ หากใช้อัตราการเขย่าที่ไม่เหมาะสมในระหว่างการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ จะส่งผลให้การละลายของแก๊สออกซิเจนไม่สามารถกระจายได้อย่างทั่วถึง เป็นผลให้เซลล์ที่มีความไวต่อออกซิเจนตาย เนื่องจากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะมีผลในการยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการออกซิเจน ดังนั้นจึงทำการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต P(3HB) ของยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 โดยแปรผันอัตราการเขย่าที่ความเร็ว 100 150 และ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเลี้ยง *C. rugosa* SUTR 1 ในสภาวะดังกล่าวโดยใช้อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที จุลินทรีย์มีการสะสม P(3HB) ได้ตั้งแต่ช่วงแรกของการศึกษา โดยจุลินทรีย์มีการสะสม P(3HB) ภายในเซลล์ได้ 0.2158 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 และมีการสะสม P(3HB) ภายในเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 0.2503 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.005 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง ขณะที่จำนวนเซลล์ของยีสต์มีประมาณ 2.57×10^9 CFU/มล. สัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 6.63 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมลดลงเหลือ 0.19 กรัมต่อลิตร จากนั้นการสะสม P(3HB) มีแนวโน้มลดลงเป็น 0.2393 และสามารถสะสมได้เพียง 0.1830 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 ของการศึกษา

และที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต P(3HB) ของ *C. rugosa* SUTR 1 พบว่าจุลินทรีย์มีการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 0.3912 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) ต่อปริมาณสารตั้งต้น 0.0078 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง โดยมีการเจริญของเซลล์ ปริมาณสูงสุด 2.90×10^9 CFU/มล. และลดลงเป็น 2.80×10^9 CFU/มล. ซึ่งสามารถสกัด P(3HB) ได้ 0.3212 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 0.0064 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง ในชั่วโมงที่ 48 ของการศึกษา จากนั้นมีปริมาณลดลงเป็น 0.2398 และ 0.1588 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 และชั่วโมงที่ 72 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาทีมีประสิทธิภาพการผลิต P(3HB) สูงกว่าที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เนื่องจากเมื่ออัตราการเขย่าสูงขึ้นจะทำให้จุลินทรีย์ได้รับ

ออกซิเจนสูงขึ้นจนถึงระดับที่ส่งผลต่อการสร้าง PHB (จารูวรรณ มารุตกล้า, สุกัญญา ศรีนอก และ สุวรรณ แก้วล้อม, 2555) การเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิต PHB จึงสูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Pillai และคณะ (2017) ได้ศึกษาการผลิต PHB ของ *Bacillus aryabhatai* โดยใช้แป้งเป็นสารตั้งต้น โดยแปรผันอุณหภูมิและอัตราการเขย่า พบว่า ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที แบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิต PHB ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีการสะสมสูงสุด 0.364 กรัมต่อลิตร

เมื่อเพิ่มอัตราการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที พบว่า จุลินทรีย์มีการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์มีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยพบว่ามี การสะสม P(3HB) ภายในเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีปริมาณพอลิเมอร์สะสมในเซลล์เท่ากับ 0.3660 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณ P(3HB) ต่อปริมาณสารตั้งต้น 0.0073 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง สัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเป็น 14.27 กรัมต่อลิตร และจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 2.92×10^9 CFU/มล. จากนั้นปริมาณการสะสม P(3HB) ลดลงเป็น 0.2887 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 เช่นเดียวกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีปริมาณลดลงเป็น 10.70 กรัมต่อลิตร ขณะที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนลดลงอย่างรวดเร็ว โดยไม่สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 จนถึงชั่วโมงที่ 72 สอดคล้องกับการลดลงของจำนวนเซลล์และปริมาณ P(3HB) อย่างต่อเนื่อง โดยลดลงเหลือเพียง 0.1693 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าแหล่งอาหารไนโตรเจนในช่วงเวลาดังกล่าวมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการสร้างพลังงานและการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ เมื่ออัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลดลงจึงส่งผลต่อการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ ปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจึงมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก เมื่อพิจารณาจากปริมาณการสะสม P(3HB) ภายในเซลล์จะเห็นว่าการเจริญเติบโตและการผลิต P(3HB) ของ *C. rugosa* SUTR 1 ภายใต้สภาวะอัตราการเขย่าที่แตกต่างกันส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและการสะสม P(3HB) ของจุลินทรีย์ โดยการเลี้ยงที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที จุลินทรีย์มีการสะสม P(3HB) ภายในเซลล์ได้สูงสุด (รูปที่ 4.38) สอดคล้องกับการศึกษาของ Ch'ng และคณะ (2012) ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลของอัตราเร็วในการกวนต่อการสังเคราะห์ PHA ชนิดโคพอลิเมอร์ของ *Delftia acidovorans* โดยแปรผันอัตราการกวนเป็น 50 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่าเมื่ออัตราการกวนต่ำในช่วง 50-150 รอบต่อนาที ส่งผลให้ปริมาณ PHB ที่สังเคราะห์ได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 17 เป็นร้อยละ 31 แต่เมื่อเพิ่มอัตราการกวนให้สูงขึ้นเป็น 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณ PHB ที่สังเคราะห์ได้ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ขณะที่ Alejandra และคณะ (2010) ศึกษาการผลิต PHB โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยแบคทีเรีย *E. coli* ที่มียีน phaBAC และ phaP พบว่า ที่อัตราเร็วการกวนที่ 125 รอบต่อนาที มีอัตราการผลิต PHA จำเพาะ (ρ) เท่ากับ 79

มิลลิโมลต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ซึ่งให้ค่า (ρ) เท่ากับ 300 มิลลิโมลต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง



รูปที่ 4.38 ผลของอัตราการเขย่าต่อการสะสม PHA ของ *C. rugosa* SUTR 1

ตารางที่ 4.10 การสะสมพอลิเมอร์ของ *C. rugosa* SUTR 1 เมื่อแปรผันอัตราการเขย่า

ความเร็ว (rpm)	ระยะเวลา (h)	pH	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-cassava)	แอมโมเนีย (g/l)	จำนวนเซลล์ (CFU/ml.)	อัตราการ เติบโตจำเพาะ : μ (h^{-1})	ปริมาณ PHB (g/l)	ปริมาณ PHB (ng/cell)	PHB ต่อสารตั้งต้น (g/g-cassava)	ชนิดของ พอลิเมอร์
100	0	7.09	2.30±0.013	0.0461	0.45±0.000	1.90×10^7	0.00	0.0000	0.00	0.0000	P(3HB)
	12	7.06	4.12±0.042	0.0823	0.30±0.000	6.20×10^8	0.35	0.1040	167.7	0.0021	P(3HB)
	24	7.00	4.76±0.019	0.0952	0.20±0.002	2.38×10^9	0.23	0.1517	63.9	0.0030	P(3HB)
	36	6.87	4.74±0.038	0.0947	0.20±0.000	2.59×10^9	0.16	0.2158	83.3	0.0043	P(3HB)
	48	6.62	6.63±0.011	0.1325	0.19±0.001	2.57×10^9	0.12	0.2503	97.4	0.0050	P(3HB)
	60	6.52	7.64±0.036	0.1528	0.19±0.001	2.39×10^9	0.09	0.2393	100.3	0.0048	P(3HB)
	72	6.48	6.97±0.029	0.1393	0.16±0.003	1.96×10^9	0.07	0.1830	93.6	0.0037	P(3HB)
150	0	7.10	2.30±0.013	0.05	0.45±0.004	9.00×10^6	0.00	0.0000	0.00	0.0000	P(3HB)
	12	7.09	6.63±0.020	0.13	0.41±0.002	1.75×10^8	0.25	0.1477	843.8	0.0030	P(3HB)
	24	7.09	6.63±0.017	0.13	0.41±0.001	9.40×10^8	0.19	0.1017	108.2	0.0020	P(3HB)
	36	7.06	11.46±0.070	0.23	0.28±0.001	2.90×10^9	0.16	0.3912	135.1	0.0078	P(3HB)
	48	6.94	10.23±0.163	0.20	0.10±0.001	2.80×10^9	0.12	0.3212	114.9	0.0064	P(3HB)
	60	6.73	9.92±0.016	0.20	0.09±0.000	2.68×10^9	0.09	0.2398	89.7	0.0048	P(3HB)
	72	6.52	7.16±0.023	0.14	0.08±0.000	2.60×10^9	0.08	0.1588	61.1	0.0032	P(3HB)

ตารางที่ 4.10 การสะสมพอลิเมอร์ของ *C. rugosa* SUTR 1 เมื่อแปรผันอัตราการเขย่า (ต่อ)

ความเร็ว (rpm)	ระยะเวลา (h)	pH	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-cassava)	แอมโมเนีย (g/l)	จำนวนเซลล์ (CFU/ml)	อัตราการ เติบโตจำเพาะ : μ (h^{-1})	ปริมาณ PHB (g/l)	ปริมาณ PHB (ng/cell)	PHB ต่อสารตั้งต้น (g/g-cassava)	ชนิดของ พอลิเมอร์
	0	7.09	2.30±0.013	0.05	0.45±0.000	2.90×10^6	0.00	0.0000	0.00	0.0000	P(3HB)
	12	7.05	4.34±0.018	0.09	0.09±0.000	1.61×10^9	0.43	0.1078	67.2	0.0022	P(3HB)
	24	7.05	6.19±0.049	0.12	0.03±0.000	2.20×10^9	0.23	0.0988	45.0	0.0020	P(3HB)
200	36	7.00	14.27±0.050	0.29	0.01±0.000	2.92×10^9	0.16	0.3660	125.3	0.0073	P(3HB)
	48	6.86	10.70±0.026	0.21	ND *	2.93×10^9	0.12	0.2887	98.7	0.0058	P(3HB)
	60	6.57	11.82±0.017	0.24	ND*	2.56×10^9	0.09	0.1943	76.1	0.0039	P(3HB)
	72	6.54	5.86±0.041	0.12	ND*	1.88×10^9	0.07	0.1693	90.3	0.0034	P(3HB)

หมายเหตุ * หมายถึง not detect (วิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย-ไนโตรเจน (NH_3-N) มากกว่า 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.11 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิต PHB ของยีสต์ *C.rugosa* SUTR1 เมื่อแปรผันอัตราการเขย่า

อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที)	ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์				
	μ (h^{-1})	P(3HB) yield (g/l)	$Y_{p/s}$ (ng-PHB/cell)	$Y_{p/s}$ (g-PHB/g-N)	Q_p (g-PHB/l/h)
100	0.12	0.25	97.4	0.96	0.005
150	0.16	0.39	135.1	2.37	0.011
200	0.16	0.37	125.3	0.83	0.010

เมื่อศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิต P(3HB) ของยีสต์ *C.rugosa* SUTR 1 ในช่วงเวลาที่มีการสะสม P(3HB) สูงสุด (ตารางที่ 4.11) จากผลการศึกษาพบว่า อัตราการเขย่าส่งผลต่อการสะสม P(3HB) ของยีสต์ *C.rugosa* SUTR 1 โดยพบว่าที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที *C.rugosa* SUTR 1 มีการสะสม P(3HB) เท่ากับ 0.2503 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่าสัมประสิทธิ์การผลิต P(3HB) จากหนึ่งกรัมไนโตรเจน ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.96 g-PHB/g-N และประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) เท่ากับ 0.005 g-PHB/l/h. คิดเป็นปริมาณการสะสม ($Y_{p,x}$) 97.4 นาโนกรัมต่อเซลล์ และมีการสะสม P(3HB) มากขึ้นเมื่ออัตราการเขย่าสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการเขย่าเป็น 150 รอบต่อนาที พบว่ามีอัตราการสะสม PHB เท่ากับ 0.3912 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่าสัมประสิทธิ์การผลิต P(3HB) จากหนึ่งกรัมไนโตรเจน ($Y_{p/s}$) และประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) เท่ากับ 2.73 g-PHB/g-N และ 0.011 g-PHB/l/h. กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณการสะสม ($Y_{p,x}$) ภายในเซลล์มากถึง 135.1 นาโนกรัมต่อเซลล์ตามลำดับ และหากเพิ่มอัตราการเขย่าขึ้นเป็น 200 รอบต่อนาที พบว่าประสิทธิภาพการผลิต P(3HB) จะลดลง โดยมีอัตราการสะสม P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 0.3667 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณการสะสม ($Y_{p,x}$) ภายในเซลล์เท่ากับ 125.3 นาโนกรัมต่อเซลล์ คิดเป็นค่าสัมประสิทธิ์การผลิต P(3HB) จากหนึ่งกรัมไนโตรเจน ($Y_{p/s}$) และประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) เท่ากับ 0.83 g-PHB/g-N และ 0.010 g-PHB/l/h. สอดคล้องกับการศึกษาการผลิต PHB จากแบคทีเรีย *Azotobacter chroococcum* ของ Hine and Lees (1976) พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์และการสะสม PHB จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอ โดยต้องรักษาปริมาณออกซิเจนให้ต่ำกว่าระดับการจำกัดออกซิเจน (Oxygen limiting condition) จะทำให้มีอัตราการผลิตสูง เช่นเดียวกับผลการศึกษานี้ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที สามารถรักษาระดับของออกซิเจนให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ *C.rugosa* SUTR 1 ทำให้สามารถผลิตพอลิเมอร์ได้สูงสุด และเมื่อเพิ่มอัตราการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที พบว่าอัตรา

การผลิต P(3HB) ของ *C.rugosa* SUTR 1 ลดลง อาจเนื่องมาจากเมื่อมีออกซิเจนสูง จุลินทรีย์จะสามารถนำ PHB ที่ผลิตขึ้นกลับมาใช้ในการเจริญเติบโตอีกครั้ง (Pena et al., 2011) ทำให้ประสิทธิภาพการผลิต PHB ลดลง จึงสามารถสรุปได้ว่าอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต P(3HB) ของ *C.rugosa* SUTR 1 คือที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เมื่อมีความเข้มข้นของแหล่งอาหารไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ให้ค่าประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) สูงสุด ความเร็วในการเขย่าจึงมีบทบาทสำคัญต่อการผลิต P(3HB) ซึ่งอัตราการเขย่าจะส่งผลต่อระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำและประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลสาร ช่วยให้มีการกระจายตัวของเซลล์และเกิดการถ่ายเทความร้อน ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปหากความเร็วในการกวนช้าอาจทำให้การรวมตัวกันของเซลล์กับสารอาหารเกิดขึ้นน้อย ทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลดลงและส่งผลต่อการผลิต PHB ในทางตรงกันข้ามหากเพิ่มความเร็วในการกวนสูงกว่าระดับที่เหมาะสมก็อาจลดการผลิต PHB ของจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ ออกซิเจนยังทำหน้าที่เป็น Growth factor และทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ขั้นสุดท้ายในห่วงโซ่การหายใจ (Respiratory chain) เมื่อมีการเติมออกซิเจนจะทำให้เกิด Pasteur effect ทำให้มีการออกซิเดชันของกลูโคสอย่างสมบูรณ์ จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมอัตราการเขย่าที่เหมาะสม เนื่องจากจะทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนแก๊สออกซิเจนได้อย่างสม่ำเสมอ ทำให้เซลล์สามารถนำไปใช้ได้มีประสิทธิภาพ โดยในสถานะที่มีปริมาณออกซิเจนเหมาะสม กิจกรรมของเอนไซม์ NADPH oxidase จะลดลงทำให้เกิดการสะสมของ NADPH มากขึ้น สัดส่วนของ NADPH/NAD จึงมีค่าสูงส่งผลให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ซิเตรทซินเทส (Citrate synthase) และเอนไซม์ไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส (Isocitrate dehydrogenase) ทำให้เกิดการสะสมของอะซิetylโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) เพิ่มมากขึ้นจนถึงระดับความเข้มข้นหนึ่ง ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการยับยั้งเอนไซม์ Acetyl-CoA transferase ขึ้นด้วยกระบวนการ Feedback inhibition ทำให้อะซิetylโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) ไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่อะซิetylโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) นำเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB โดยเอนไซม์เบตาคีโตไทโอเลส (β-ketothiolase) ต่อไป (Luengo et al., 2003) นอกจากนี้ยังพบว่า PHB จะมีบทบาทในการเป็นตัวรับอิเล็กตรอนทางเลือก (Arunpan, 1998) แต่เมื่อเจริญในสถานะที่มีออกซิเจนมากเกินไป โคเอนไซม์เอ (CoA) จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น และส่งผลยับยั้งเอนไซม์เบตาคีโตไทโอเลส (β-ketothiolase) ทำให้อะซิetylโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) เข้าสู่วิถี TCA cycle ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ PHB (Anderson and Dawes, 1990) ดังนั้นออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและสะสม PHB อย่างมาก (Xu, Sinha, Bae, Kim, and Yun, 2005; Lakshmi, Hema, Divya, and Starin, 2012) การกวนผสม

จึงมีบทบาทสำคัญต่อการผลิต PHB เนื่องจากการกวนผสมเป็นการทำให้เกิดกระบวนการถ่ายโอนมวลของระบบ แต่ทั้งนี้ควรควบคุมไม่ให้มากเกินไป เนื่องจากการกวนเป็นระบบที่อาศัยพลังงานกลซึ่งหมายถึงพลังงานไฟฟ้าที่ต้องสูญเสียไป และอัตราการกวนที่สูงเกินไปจะก่อให้เกิดความเครียดจากแรงเฉือน (Shear stress) ทำให้เกิดอันตรายแก่เซลล์และส่งผลต่อการสะสมพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์ (Wei et al., 2011; Karbasi et al., 2012; Lakshmi et al., 2012) จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHB เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาไปสู่การผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

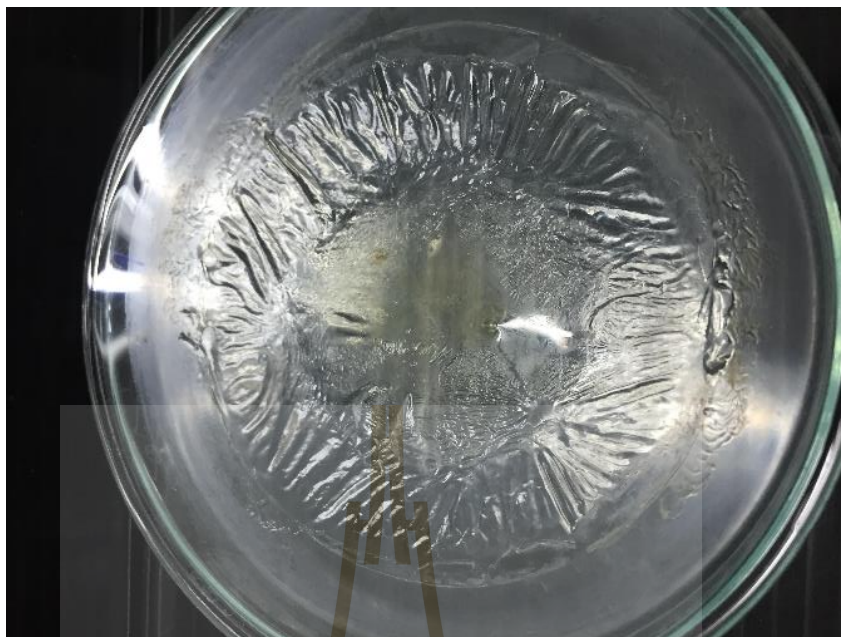
4.10 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์

การศึกษาคูสมบัติของสารประกอบด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) เป็นเทคนิคสำหรับการศึกษาคูสมบัติหรือพิสูจน์เกี่ยวกับ โครงสร้างสารอินทรีย์โดยการวัดความเข้มของแสงหรือกำลังของแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ กันอย่างต่อเนื่องเทียบกับเวลา โดยแสดงตารางรายการของ Wave number กับหมู่ฟังก์ชันที่ดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ปานกลางและดีมาก ทั้งนี้การที่สารจะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดนั้น ความถี่ของรังสีที่ถูกดูดกลืนจะต้องตรงกับความถี่ของการสั่นของพันธะเท่านั้น จากการศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 ผลิตได้ ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบาง (รูปที่ 4.39 และรูปที่ 4.40) ด้วยเทคนิค FT-IR เปรียบเทียบกับพอลิเมอร์มาตรฐาน Poly-3-hydroxybutyrate [P(3HB)] 98% ซึ่งเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ของ PHA ในกลุ่มโฮโมพอลิเมอร์ที่มีสายสั้นที่มีหมู่ R หรือ Side chain คือ หมู่เมทิลมาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่ง β หรือตำแหน่งที่ 3 และมีคุณสมบัติคล้ายพอลิเมอร์สังเคราะห์ คือ โพลีโพรพิลีน (รูปที่ 4.41) เมื่อพิจารณาสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดผลิตได้กับพอลิเมอร์มาตรฐาน พบว่าสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีความคล้ายคลึงกับพอลิเมอร์มาตรฐานซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นหมู่เฉพาะของ P(3HB) ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) หมู่คาร์บอนิลในกลุ่มเอสเทอร์ (R-C=O group) หมู่คาร์บอกซิลในกลุ่มอีเทอร์ (C-O-C group) และหมู่อัลเคน (C-H group) (รูปที่ 4.42 และรูปที่ 4.43) โดยค่าสเปกตรัมของพอลิเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 4.12 เมื่อพิจารณาอินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์จะพบว่า ในตำแหน่งความถี่เท่ากับ 3223 และ 3338 เป็นตำแหน่งของอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group : $3200-3500\text{ cm}^{-1}$) (Andrew, 1992; Ma et al., 2009; Weng et al., 2011) ตำแหน่งความถี่เท่ากับ 2917 และ 2917 เป็นตำแหน่งของหมู่เมทิลีน (-CH₂ methylene group : 2925 cm^{-1}) ตำแหน่งความถี่เท่ากับ 2850 และ 2850 เป็นตำแหน่งของหมู่เมทิล (-CH₃ methyl group : 2962 cm^{-1}) ตำแหน่งความถี่เท่ากับ 1707 และ 1740 เป็นตำแหน่งของอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่คาร์บอนิลในกลุ่ม

เอสเทอร์ (R-C=O group : $1600-1850\text{ cm}^{-1}$) (Hong et al., 1999; Andrew, 1992) และที่ตำแหน่งความถี่เท่ากับ 1283 และ 1160 เป็นตำแหน่งของอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่คาร์บอกซิลในกลุ่มอีเทอร์ (C-O-C group : $100-1300\text{ cm}^{-1}$) (Silverstein et al., 2005) ซึ่งหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวเป็นหมู่ฟังก์ชันเฉพาะที่แสดงถึงความเป็นพอลิเมอร์ในกลุ่มของพอลิเอสเทอร์ (Gumel et al., 2012, 2014; Mohapatra et al., 2014; Kumar et al., 2016) ที่จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดสามารถสังเคราะห์ได้ และพบว่าที่ตำแหน่งความถี่เท่ากับ 1425 และ 1461 เป็นตำแหน่งของอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่เอมีน (N-C=O group) ซึ่งเป็นผลมาจากโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ (Randriamahefa, Renard, Guérin, and Langlois, 2003) เนื่องจากพอลิเมอร์ PHB ที่ผลิตได้เป็นพอลิเมอร์ที่ทราบสูตรโครงสร้างที่แน่นอนจึงทำให้สามารถวิเคราะห์สเปกตรัมที่เกิดขึ้นได้ง่าย และพอลิเมอร์ PHB เป็นพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์ได้จากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทั่วไป และเป็น PHA ชนิดที่มีการศึกษาและจัดจำแนกมากที่สุดในแบคทีเรีย (Karbasi et al., 2012) และเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีระดับความเป็นผลึก (Degree of crystallinity) สูง ทำให้มีความแข็งแรงและมีความต้านทานต่อตัวทำละลายต่าง ๆ ทนต่อรังสียูวี มีสมบัติไม่ละลายน้ำ ทนต่อความชื้น ความสามารถในการซึมผ่านของออกซิเจน น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ โดยสมบัติของ P(3HB) มีความใกล้เคียงกับพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ชนิดโพลิโพรพิลีน (Polypropylene หรือ PP) (Ashby, Solaiman, and Foglia, 2012) การเทียบเคียงกับสเปกตรัมมาตรฐานของพอลิเมอร์ P(3HB) (รูปที่ 4.44) จึงทำให้ผลการวิเคราะห์พอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มสังเคราะห์ได้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้การที่สารจะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดนั้น ความถี่ของรังสีที่ถูกดูดกลืนจะต้องตรงกับความถี่ของการสั่นของพันธะเท่านั้น

ตารางที่ 4.12 สเปกตรัมที่เกิดขึ้นและ wave number ของหมู่ฟังก์ชันที่ดูดกลืนแสงของพอลิเมอร์

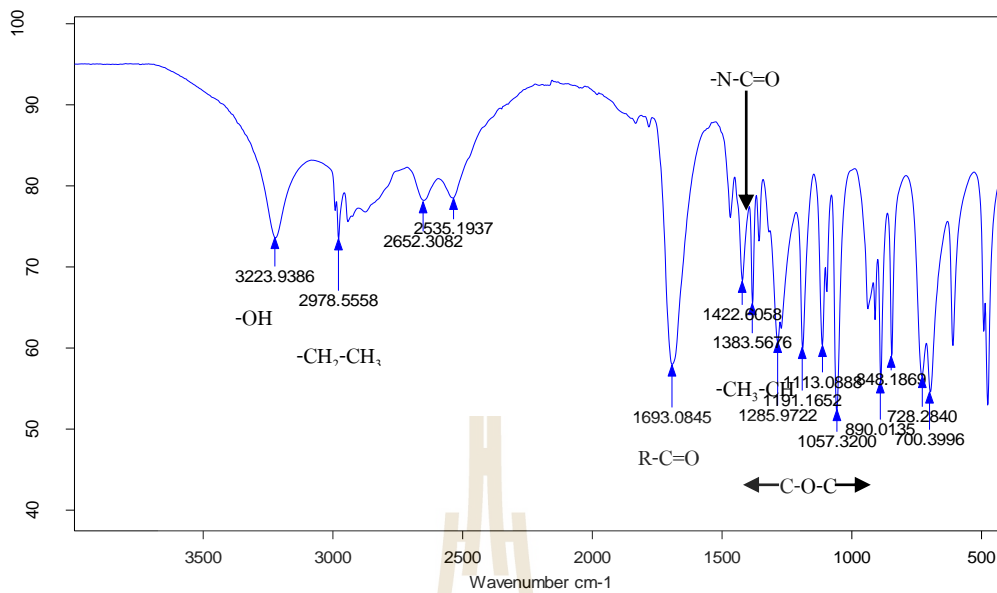
Functional group	Functional group name	Standard polymer	Frequency (cm ⁻¹)	
			<i>C. rugosa</i> SUTR 1	<i>A. tumefaciens</i> SUTS 1
O-H stretching	Hydroxyl (-OH)	3223	3223	3338
C-H stretching	Alkane/Methylene (-CH ₂ -)	2978	2917	2917
C-H stretching	Alkane/Methyl (-CH ₃)	2978	2850	2850
C=O stretching	Carbonyl/Esters (R-C=O)	1693	1707	1740
N-H bending	Amide (R-C(O)-NH ₂)	1422	1425	1461
C-H bending	Alkane CH ₃ (C-H)	1383	1386	1371
C-O stretching	Carboxyl/Ethers (C-O-C)	1285, 1057	1283, 1062	1160, 1057



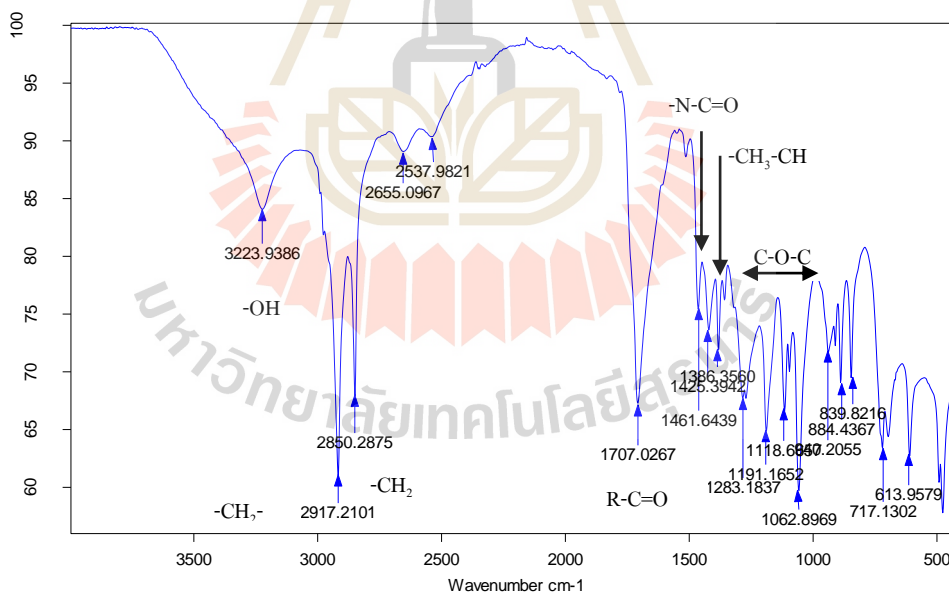
รูปที่ 4.39 ตัวอย่างผลึกพอลิเมอร์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1



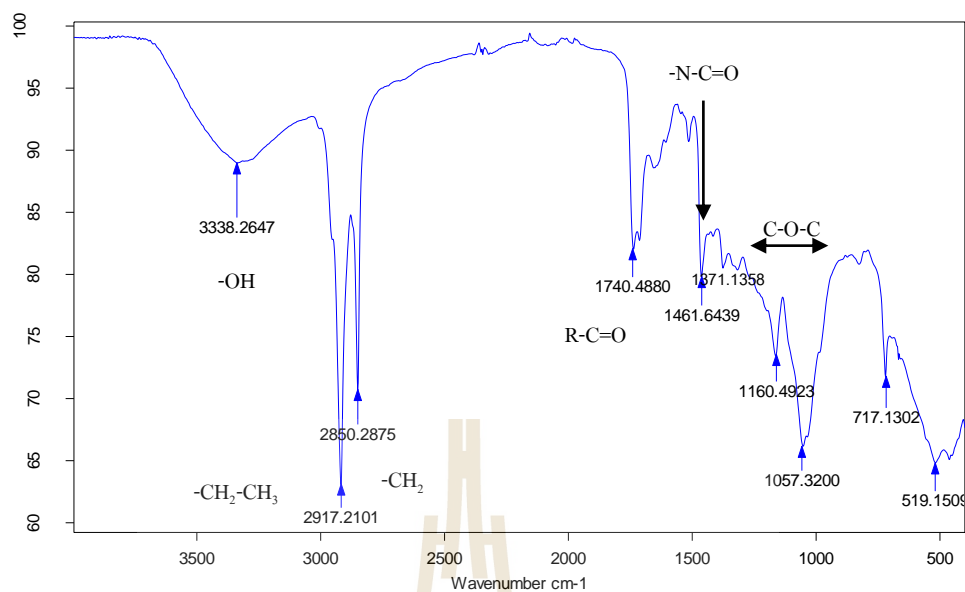
รูปที่ 4.40 ตัวอย่างผลึกพอลิเมอร์ที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *A. tumefaciens* SUTS 1



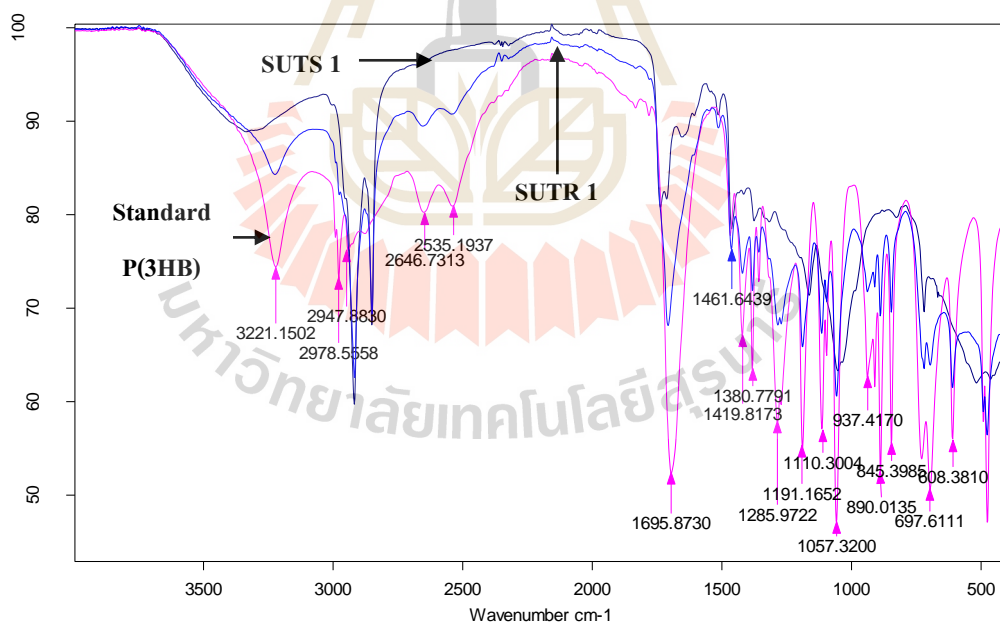
รูปที่ 4.41 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ Poly-3-hydroxybutyrate ; P(3HB) มาตรฐาน



รูปที่ 4.42 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *C. rugosa* SUTR 1



รูปที่ 4.43 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *A. tumefaciens* SUTS 1

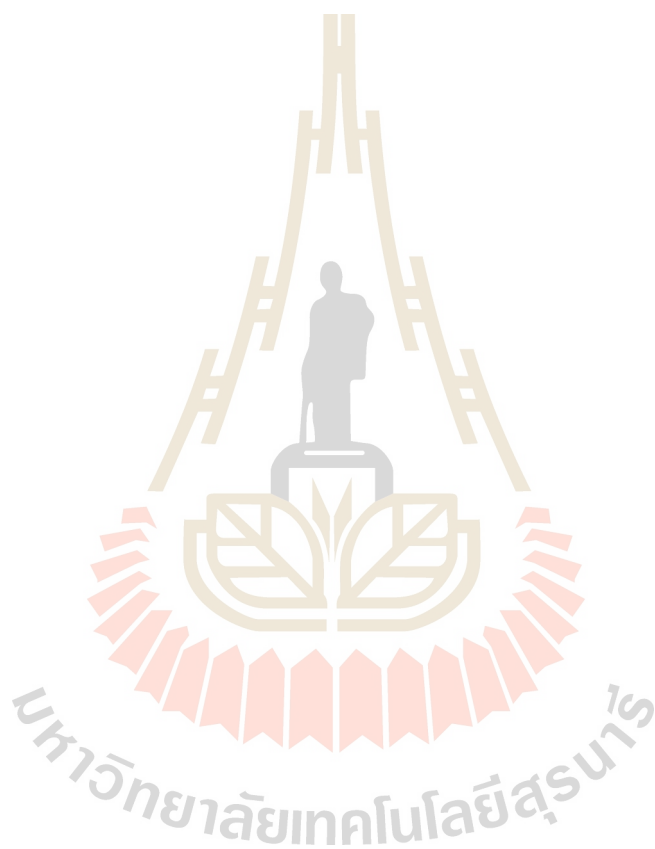


รูปที่ 4.44 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 เปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ Poly-3-hydroxybutyrate : P(3HB) มาตรฐาน

อย่างไรก็ตามการสะสมโพลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีผลต่อชนิดหรือกลุ่มของพอลิเมอร์ กล่าวคือ จุลินทรีย์บางสายพันธุ์อาจผลิตพอลิเมอร์ในรูปของโพลิเมอร์ ในขณะที่เดียวกันจุลินทรีย์อีกชนิดอาจผลิตพอลิเมอร์เป็นโคพอลิเมอร์ และแหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นแหล่งอาหารหลักที่ทำให้เกิดการสะสมของพอลิเมอร์ขึ้นภายในเซลล์ พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันแต่ใช้จุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์ในการผลิต PHA ส่งผลทำให้พอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกันออกไปด้วย เช่น เมื่อใช้ฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่ *Alcaligenes eutrophus* R3 พบว่ามีการผลิตพอลิเมอร์ในรูปโคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) แต่เมื่อมีการใช้แหล่งคาร์บอนเดิมให้แก่ *Alcaligenes eutrophus* ATCC17697 พบว่า มีการผลิต P(3HB) ซึ่งเป็น โพลิเมอร์ (Anderson and Wynn, 1995) ในขณะเดียวกันถ้ามีการเพิ่มแหล่งคาร์บอนอื่น ที่เป็นตัวช่วยที่ทำให้เกิดการสร้างโคพอลิเมอร์ เช่น โพรพานอลิก เพนทานอลิก เป็นต้น เมื่อถูกดูดซึมในเวลาเดียวกันจะมีการเมตาบอลิซึมกลายเป็นโคพอลิเมอร์ เช่น P(3HB-co-HV) เป็นต้น เนื่องจากเมื่อจุลินทรีย์มีการดูดซึมแหล่งคาร์บอนมากกว่า 2 ชนิดในเวลาเดียวกัน จะเกิดกลไกในการรวมตัวกันระหว่างแอซิติล โคเอ (Acetyl-CoA) 2 โมเลกุล และกลายเป็นมอนอเมอร์ของไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Hydroxyalkanoate : HA) โดยมีเอนไซม์ไทโอเลสและรีดักเทสเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยา หลังจากนั้นจะเกิดการสร้างสายพอลิเมอร์โดยเอนไซม์พอลิเมอร์เรส ทำให้เอนไซม์ PHA synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการเชื่อมต่อหน่วยย่อยหรือมอนอเมอร์ให้เกิดเป็นพอลิเมอร์ด้วยการเร่งการเกิดพันธะเอสเทอร์ระหว่างหน่วยย่อยที่เกิดขึ้น นอกจากนี้หากแหล่งคาร์บอนดังกล่าวเป็นกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนในสายหรือโครงสร้างเป็นเลขคี่ จะมีผลให้เกิดพอลิเมอร์ชนิดโคพอลิเมอร์มากกว่าโพลิเมอร์ ทั้งนี้จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ในปริมาณและองค์ประกอบที่แตกต่างกัน และจะเกิดเป็น PHA ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันขึ้นกับปริมาณและกลไกการทำงานภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เอง

ทั้งนี้เนื่องจากพอลิเมอร์ที่ยีสต์ *C.rugosa* SUTR 1 คือ P(3HB) ซึ่งจัดเป็น PHA ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่โดดเด่น คือ สามารถเข้ากันได้ดีกับระบบชีวภาพ (Biocompatible) เนื่องจากมีองค์ประกอบคล้ายกับผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และความสามารถถูกดูดซึม (Bioresorbable) ในกระบวนการชีวภาพ (Biological system) และยังสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติคล้ายกับโพลีเอทิลีน (Polyethylene: PE) และโพลีโพรไพลีน (Polypropylene: PP) จึงมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เพื่อแก้ปัญหาผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นจากการสะสมของขยะพลาสติกจำนวนมาก และลดผลกระทบของเกิดแก๊สเรือนกระจกแพร่กระจายไปในบรรยากาศที่เกิดจากการกำจัดขยะด้วยการเผา ซึ่งส่งผลกระทบต่ออุณหภูมิของโลกที่เพิ่มสูงขึ้น จึงควรศึกษาเกี่ยวกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์รวมถึง

สภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญและการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ โดยใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูกเพื่อช่วยลดต้นทุนในการผลิต PHB จากจุลินทรีย์เพื่อให้การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำลง



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate : PHA) เป็นพอลิเอสเทอร์ชีวภาพที่จุลินทรีย์บางชนิดสร้างและสะสมภายในแกรนูลในเซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของเซลล์ ภายใต้สภาวะที่จำกัดสารอาหารบางชนิด และมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป แต่ปัญหาสำคัญในการผลิต PHA คือต้นทุนในการผลิต โดยส่วนหนึ่งมีสาเหตุจากแหล่งคาร์บอนมีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นทุนการผลิตพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ผู้วิจัยจึงมีความสนใจนำของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปมันสำปะหลังมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA โดยจุลินทรีย์ เพื่อลดต้นทุนการผลิตเนื่องจากมันสำปะหลังถือเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่สามารถเพาะปลูกได้ดีในประเทศไทย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ รวมถึงคุณลักษณะของพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดผลิตได้ จากการศึกษาสามารถสรุปผลได้ดังนี้

5.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHA จากระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง และแบคทีเรียที่ถูกเก็บรักษา ณ ห้องปฏิบัติการอนามัยสิ่งแวดล้อมมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ด้วยการคัดเลือกจากจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต (Living cells) บนอาหาร Minimal medium agar ที่เติมสีย้อม Nile red 0.5 พบว่ามีจุลินทรีย์จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นที่สามารถผลิต PHA ได้ เมื่อทำการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) พบว่ามีความคล้ายกับฐานข้อมูลของ GenBank ระบุว่าเป็นยีสต์ *Candida rugosa* SUTR 1 และแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1 และ *Delftia* sp. SUTR 3 เมื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate : μ) ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 มีการเจริญเติบโตและแบ่งจำนวนเซลล์สูงที่สุดในวันที่ 4 ของการศึกษา โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด 0.03 ต่อชั่วโมง สามารถเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้สูงที่สุด 2.0×10^8 CFU/ml. ขณะที่ *A. tumefaciens* SUTS 1 สามารถ

เจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้สูงที่สุดในวันที่ 3 โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.03 ต่อชั่วโมง และมีจำนวนโคโลนีมากที่สุดประมาณ 1.55×10^9 CFU/มล. และ *Delftia* sp. SUTR 3 สามารถแบ่งเซลล์ได้สูงสุดในวันที่ 2 ของการศึกษา มีจำนวนโคโลนีสูงสุดประมาณ 7.10×10^8 CFU/มล. มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.05 ต่อชั่วโมง

5.2 การศึกษาความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังของจุลินทรีย์

เมื่อทดสอบจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากผลบวกรของการสะสม PHA ด้านความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast-Peptone-Cassava agar (YPC agar) เพื่อตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส พบว่ายีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 และแบคทีเรีย *A. tumefaciens* SUTS 1 มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ เมื่อศึกษาความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHA ของ *C. rugosa* SUTR 1, *Delftia* sp. SUTR 3 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 โดยเฉพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกากมันสำปะหลัง 10 กรัม พบว่า ยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 สามารถย่อยกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณสูงสุด 2.82 กรัมต่อลิตร สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของยีสต์ซึ่งอยู่ในช่วงระยะการเจริญแบบทวีคูณ (Log phase หรือ Exponential phase) ขณะที่ *A. tumefaciens* SUTS 1 พบว่าสามารถย่อยกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ มีปริมาณสูงสุด 3.86 กรัมต่อลิตร โดยมีจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเป็น 4.55×10^8 CFU/มล. และการย่อยกากมันสำปะหลังของ *Delftia* sp. SUTR 3 พบว่าสามารถย่อยกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณสูงสุด 2.34 กรัมต่อลิตร ขณะที่จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเป็น 2.42×10^7 CFU/มล. เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดพบว่า *A. tumefaciens* SUTS 1 สามารถย่อยสลายกากมันสำปะหลังและให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่า *C. rugosa* SUTR 1 และ *Delftia* sp. SUTR 3 ตามลำดับ จากนั้นศึกษาความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ของ *A. tumefaciens* SUTS 1 โดยแปรผันปริมาณกากมันสำปะหลัง 30 และ 50 กรัมต่อลิตร เพื่อให้มีปริมาณสารตั้งต้นเพียงพอต่อการเจริญเติบโตและการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณกากมันสำปะหลังเป็น 50 กรัมต่อลิตร *A. tumefaciens* SUTS 1 สามารถย่อยกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณสูงสุด 8.27 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 66 และจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 1.90×10^{10} CFU/มล. ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณกากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร ตลอดการศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังได้ใกล้เคียงกับยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5118 ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์

ที่สามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์ โดยพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากยีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5118 มีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการศึกษา คือ 6.64 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ของแบคทีเรีย *A. tumefaciens* SUTS 1 พบว่า แบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังได้ดีกว่ายีสต์ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5118 ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ได้แก่ *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 เพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถในการย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลและผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในขั้นตอนเดียวของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ต่อไป

5.3 การสะสม PHA ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์

การศึกษาการสะสม PHA ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งมีลักษณะเป็นแกรนูลที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ Lipophilic material โดยเฉพาะเลี้ยงในสารอาหาร Minimal medium ที่เติมกากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาการสะสม PHA ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ด้วยการย้อมติดสี 1% Nile blue A และนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเรืองแสงของสีย้อม พบว่าเซลล์ของ *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 ปรากฏแกรนูลสีส้มแดงภายในเซลล์ แต่การติดสีย้อมและขนาดของแกรนูลภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกันมาก จึงประยุกต์ใช้ค่าความเข้มของการเรืองแสงสีย้อม (Mean fluorescence intensity) ในการเปรียบเทียบระหว่างจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด เพื่อศึกษาการสะสม PHA granule ภายในเซลล์โดยวัดจากค่าเฉลี่ยความเข้มของการเรืองแสงสีย้อม (Mean fluorescence intensity) ต่อพื้นที่เซลล์ทั้งหมด พบว่ายีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 มีค่าเฉลี่ยความเข้มของการเรืองแสงสีย้อมเท่ากับ 3435 ขณะที่ *A. tumefaciens* SUTS 1 มีค่าเฉลี่ยความเข้มของการเรืองแสงสีย้อมเท่ากับ 1778 สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) พบว่ามีการสะสม PHA ภายในเซลล์ของ *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 โดยรูปร่างของเซลล์เมื่อมีการสะสม PHA จะมีลักษณะค่อนข้างกลม เนื่องจากมีการสะสมพอลิเมอร์อยู่ภายในเซลล์ ภายใต้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เมื่อจุลินทรีย์ได้รับสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์จะทำการสลายแหล่งคาร์บอนที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ คือ ไกลโคเจนเพื่อให้ได้พลังงานในการนำมาเปลี่ยนรูปคาร์บอนภายนอกเข้ามาสะสมภายในเซลล์ในรูปของไบโอพอลิเมอร์ คือ PHA

5.4 การผลิต PHA จากกากมันสำปะหลัง

การศึกษาความสามารถในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ ได้แก่ *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 พบว่า เมื่อเลี้ยง *C. rugosa* SUTR 1 ในสารอาหาร Minimal medium โดยใช้กากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร เป็นสารตั้งต้นในการย่อยของจุลินทรีย์ให้ได้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อเป็นธาตุอาหารคาร์บอนหลักที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสังเคราะห์ PHA พบว่าเซลล์ของ SUTR 1 เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยสามารถย่อยกากมันสำปะหลังให้อยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณสูงสุด 14.44 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.29 กรัม น้ำตาลต่อกรัมกากมันสำปะหลังที่ใช้ หรือคิดเป็นร้อยละ 29 ของสารชีวมวลเริ่มต้น ในชั่วโมงที่ 36 ขณะที่จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 2.77×10^9 CFU/มล. ซึ่งจุลินทรีย์มีการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์เท่ากับ 0.1343 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 0.1368 และ 0.1367 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 42 และ 48 ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการสะสมพอลิเมอร์ที่สูงที่สุด โดยมีจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 2.80×10^9 CFU/มล. และ 2.86×10^9 CFU/มล. จากนั้นการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์และปริมาณการสะสม PHA ภายในเซลล์รวมถึงปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียและน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องจากช่วงเวลาที่มีการปลดปล่อยน้ำตาลได้สูงสุด ขณะที่การศึกษาความสามารถในการผลิต PHA จากกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาล เพื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการผลิต PHA โดยตรงของ *A. tumefaciens* SUTS 1 พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 8.70 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 0.17 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง หรือคิดเป็นร้อยละ 17 ของสารชีวมวลเริ่มต้น ในชั่วโมงที่ 48 ของการศึกษา ขณะที่ความสามารถในการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์สามารถสะสมได้ 0.0727 กรัมต่อลิตร และมีจำนวนเซลล์เจริญเติบโตสูงสุดในช่วงเวลาเดียวกัน คือประมาณ 2.35×10^9 CFU/มล. และมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียลดลงเหลือ 0.09 กรัมต่อลิตร โดยไนโตรเจนจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ โดยการสะสมพอลิเมอร์จะเกิดขึ้นสูงสุดเมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญเข้าสู่สภาวะคงที่ (Stationary phase) และอาจเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือคงที่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์ผลิตได้พบว่าเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต [Poly-3-hydroxybutyrate : P(3HB)] ดังนั้นเมื่อพิจารณาทั้งด้านการเจริญเติบโตและความสามารถในการสะสม PHA ภายในเซลล์จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด พบว่า *C. rugosa* SUTR 1 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของยีสต์ มีคุณลักษณะที่เหมาะสมสามารถนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ P(3HB) เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิต P(3HB) ในลำดับต่อไป

5.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ของ *C. rugosa* SUTR 1

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ของ *C. rugosa* SUTR 1 โดยแปรผันความเข้มข้นแหล่งอาหารไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตและแปรผันอัตราการเขย่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1 2 และ 3 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า การแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการสะสม P(3HB) ภายในเซลล์จุลินทรีย์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตรเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสะสม P(3HB) ของ *C. rugosa* SUTR 1 โดยจุลินทรีย์ยังคงมีการเพิ่มจำนวนเซลล์พร้อมๆ กับการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์ เนื่องจากสารตั้งต้นถูกนำไปใช้สร้างเซลล์และสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีผลทำให้มีการสะสมพอลิเมอร์สูงสุดในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 0.3912 กรัมต่อลิตร โดยมีประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) สูงสุดเท่ากับ 0.011 g-PHB/l/h ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การผลิต PHB ต่อหนึ่งกรัมไนโตรเจน ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 2.37 g-PHB/g-N และมีปริมาณการผลิต P(3HB) ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 0.0079 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง โดยมีจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์สูงสุดเป็น 2.90×10^9 CFU/มล. ที่อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) สูงสุดเท่ากับ 0.16 ต่อชั่วโมงในช่วงเวลาเดียวกัน ขณะที่น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเท่ากับ 11.46 กรัมต่อลิตร และไนโตรเจนลดลงเหลือ 0.28 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกัน เนื่องจากในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด จุลินทรีย์มีแนวโน้มที่จะผลิตแหล่งไขมันหรือคาร์โบไฮเดรตไว้ภายในเซลล์มากขึ้น เมื่อทำการศึกษาการสะสม P(3HB) ของยีสต์ดังกล่าวในสภาวะเดียวกันกับข้างต้น โดยแปรผันอัตราการเขย่าที่ความเร็ว 100 และ 200 รอบต่อนาที พบว่า การเปลี่ยนแปลงอัตราการเขย่าส่งผลให้จุลินทรีย์มีการสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์ ของ *C. rugosa* SUTR 1 ที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที พบว่า จุลินทรีย์มีการสะสม P(3HB) ภายในเซลล์ได้สูงสุด เท่ากับ 0.2503 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.005 กรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง คิดเป็นค่าประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) สูงสุด เท่ากับ 0.005 g-PHB/l/h ในชั่วโมงที่ 48 ของการศึกษา ขณะที่ที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาทีพบว่ามีค่าประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยมีการสะสม P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 0.3667 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่าสัมประสิทธิ์การผลิต P(3HB) จากหนึ่งกรัมไนโตรเจน ($Y_{p/s}$) และประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) เท่ากับ 0.83 g-PHB/g-N และ 0.010 g-PHB/l/h.

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่ากากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพได้ของจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากมีองค์ประกอบของแป้งและเซลลูโลสในปริมาณสูง โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของยีสต์

C.rugosa SUTR1 คือที่สภาวะที่ใช้อัตราการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เมื่อมีความเข้มข้นของ แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ให้ค่าประสิทธิภาพการผลิต (Q_p) สูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.011 g-PHB/l/h โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) สูงสุดเท่ากับ 0.16 ต่อ ชั่วโมง และมีค่าสัมประสิทธิ์การผลิต PHB ต่อหนึ่งกรัมไนโตรเจน ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 2.37 g-PHB/g-N อย่างไรก็ตามการควบคุมอัตราการเขย่าที่เหมาะสมจะทำให้เกิดการสัมผัสกันระหว่างสารอาหาร และจุลินทรีย์รวมถึงเกิดการแลกเปลี่ยนแก๊สออกซิเจนได้อย่างสม่ำเสมอ ทำให้เซลล์สามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งปริมาณออกซิเจนมีผลต่อปริมาณการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ เนื่องจากออกซิเจนจะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการสร้างพลังงานและการนำ สารอาหารเข้าสู่เซลล์ จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHB เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาไปสู่การผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

5.6 คุณลักษณะของพอลิเมอร์

การศึกษาคุณสมบัติของสารประกอบด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) จากการศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก *C. rugosa* SUTR 1 และ *A. tumefaciens* SUTS 1 ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ด้วยเทคนิค FT-IR เปรียบเทียบกับพอลิเมอร์มาตรฐาน พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต [Poly-3-hydroxybutyrate : (P(3HB))] 98% พบว่าสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ จุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มผลิตได้มีความคล้ายคลึงกับพอลิเมอร์มาตรฐานซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นหมู่ เฉพาะของ PHB ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) ที่ตำแหน่งความถี่เท่ากับ 3223.9386 และ 3338.2647 หมู่คาร์บอนิลในกลุ่มเอสเทอร์ (R-C=O group) ที่ตำแหน่งความถี่เท่ากับ 1707.0267 และ 1740.4880 หมู่คาร์บอกซิลในกลุ่มอีเทอร์ (C-O-C group) ที่ตำแหน่งความถี่เท่ากับ 1283.1837 และ 1160.4923 และหมู่แอลเคน (C-H group) ตำแหน่งความถี่เท่ากับ 2917.2101 และ 2917.2101 โดย หมู่ฟังก์ชันดังกล่าวเป็นหมู่ฟังก์ชันเฉพาะที่แสดงถึงความเป็นพอลิเมอร์ในกลุ่มของพอลิเอสเทอร์ ซึ่ง แผ่นฟิล์มที่จุลินทรีย์ผลิตได้อาจนำไปพัฒนาต่อเป็นฟิล์มหรือขึ้นรูปเป็นพลาสติกชีวภาพได้

5.7 ข้อเสนอแนะ

เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ งานวิจัยนี้มีข้อเสนอแนะเพื่อเป็นแนวทาง ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป ดังนี้

1. ควรมีการศึกษาการผลิต PHA ของจุลินทรีย์แบบรวมกลุ่ม เพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพในการผลิตพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์

2. ควรมีการพัฒนาการทดลองในระบบถังปฏิกรณ์ในรูปแบบการทดลองแบบเบทซ์ซึ่งเติมอาหารแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous fermentation) เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิต PHA สูงสุดของจุลินทรีย์

3. ควรมีการศึกษาพัฒนาการผลิต PHA ชนิดโคพอลิเมอร์ เนื่องจากมีคุณสมบัติทางเชิงกลที่ดี สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ ในทางอุตสาหกรรมการผลิตพอลิเมอร์โดยการควบคุมแหล่งคาร์บอนที่เติมลงไป เพื่อให้ได้โคพอลิเมอร์ในปริมาณมากและมีสัดส่วนที่เหมาะสม

4. ควรมีการสกัดพอลิเมอร์ออกจากเซลล์ของจุลินทรีย์ นำมาทำการขึ้นรูปและวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเชิงกลต่างๆ เช่น ค่าต้านทานแรงดึง (Tensile strength) ค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวก่อนขาด (Elongation to break) ค่าความเหนียว (Toughness) และค่าการซึมผ่านของออกซิเจน (Oxygen permeability) เป็นต้น เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ PHA ที่ผลิตได้และนำไปเปรียบเทียบกับเทอร์โมพลาสติกจากปิโตรเคมี เพื่อดูแนวโน้มการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป



รายการอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. (2548). **มันสำปะหลัง**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.
- กรมโรงงานอุตสาหกรรม. (2540). **คู่มือการจัดการสิ่งแวดล้อมอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง แป้งมันต์ดัดแปร และแป้งมันแปรรูป**. สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและโรงงาน. กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.
- กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะขวัญ. (2546). **เทคโนโลยีของแป้ง**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กิตติศักดิ์ พนิกรณ์. (2551). **การใช้ประโยชน์กากมันสำปะหลังและขาน้อยในการปรับปรุงดินเค็มสำหรับการปลูกผักบึงจีน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- กอบวุฒิ รุจิฉานกุล. (2549). **การวิเคราะห์ของแข็งเชิงฟิสิกส์**. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.
- กฤติกา กาบพลอย. (2551). **การศึกษาชนิดแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกในกากมันสำปะหลังหมักและผลการใช้กากมันสำปะหลังหมักเป็นสารเสริมชีวณะสำหรับลูกสุกรหย่านม**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เขมรัฐ เขมวงศ์. (2550). **การคัดเลือกและสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนเค็มสายพันธุ์กลาย**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จารุวรรณ มารุตกล้า, สุกัญญา ศรีนอก และสุวรรณ แก้วล้อม. (2555). **การผลิตพลาสติกชีวภาพจากน้ำย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วย *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095**. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.
- จิราภรณ์ ขอดเลื่อน วลัยรัตน์ จันทรปานนท์ และ หทัยรัตน์ ริมศิริ. (2558). **การคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์โดยการทดสอบการย่อยแป้งและการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำข้าวหมาก**. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชาคร วิชกุล. (2548). **การศึกษาการหมักกากมันสำปะหลังในฟาร์มโค**. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- ชลดา ชื้อสตัย. (2546). การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธัญยาภรณ์ นาวินวรรณ. (2542). การผลิตแซนแทนกัมจากกากมันสำปะหลังโดย *Xanthanomonas
campestris* TISTR 840. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิทัศน์ จิระอรุณ. (2543). วัสดุพอลิเมอร์ชุดที่ 2. โครงการเอกสารและตำราภาควิชาเคมี
อุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เบญจพร บัวบาน. (2542). การผลิตและสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อยีสต์
Saccharomycopsis sp. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์.
- ปวีรา บุตรวงศ์. (2546). การสังเคราะห์ PHA จากกระบวนการแอนแอโรบิก-แอโรบิกแอกทีเวเต็ด
สลัดจ์ที่ใช้บำบัดน้ำเสียต่างชนิด. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัย
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. (2551). เอนไซม์ตัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม. ศูนย์หนังสือแห่ง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- พัศตร์ประไพ ประจำเมือง. (2546). การผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วย
เอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- แมน อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. (2539). Principles and techniques of instrumental analysis
(หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ). ชวนพิมพ์ กรุงเทพฯ.
- มณชัย เดชสังกรานนท์. (2546). คุณสมบัติของยีสต์และราที่มีบทบาทในการหมักข้าวหมากและ
สาโท. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิภาวดี ดิสโร. (2543). การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ผสมในเครื่องปฏิกรณ์. วิทยานิพนธ์
มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล. (2552). PHA : พลาสติกชีวภาพจากแบคทีเรีย. วารสารส่งเสริมเทคโนโลยีปีที่
35 ฉบับที่ 202 ภาควิชาวิทยาศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยราชภัฏ
พระนครศรีอยุธยา.
- ศิริวรรณ ระเด่นอามัด. (2551). สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำ
เสียโรงงานอาหารทะเลโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์จากระบบเอสปีอาร์. วิทยานิพนธ์วิทยา
ศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- สุกัญญา จัตตุพรพงษ์ และผกาพรรณ สุกุลมัน. (2545). อาหารหมักจากมันสำปะหลัง. ศูนย์การ
ค้นคว้าและพัฒนาวิชาการอาหารสัตว์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตกระบือและโค สถาบัน
สุวรรณกจากกลกิจฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- สุนีย์ โชตินิรนาท. (2539). การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์และอัลตรา
ฟิวเทรชัน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุรลักษณ์ รอดทอง จันทิมา ดีประเสริฐกุล นิธินาด ศุภกาญจน์ มาโนชัย สุธีพัฒนานนท์
และวีระศักดิ์ เลิศศิริโยธิน. (2551). การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตพอลิ-
ไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย. มหาวิทยาลัย
เทคโนโลยีสุรนารี.
- สุวิมล กาญจนสุธา. (2551). การใช้กากมันสำปะหลังและฟางข้าวเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติก
ชีวภาพโพลีไฮดรอกซีแอลคาโนเอทและการผลิตก๊าซไฮโดรเจนโดยวิธีชีวภาพจากกากของ
แข็งที่เกิดจากอุตสาหกรรมสกัดปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัย
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.
- เสริมศักดิ์ มานะเลิศสกุล. (2546). การผลิตอาหารสัตว์จากกากมันสำปะหลังและกากน้ำตาลโดย
การหมักแบบแห้ง. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมใจ ศิริโชค. (2001). จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. สื่อเสริมกรุงเทพ. กรุงเทพฯ. 339 หน้า
- สมพร สันธรา. (2544). การแยก การจัดจำแนก และการเก็บรักษาอีสต์และราที่แยกได้จากลูกแป้ง
ข้าวหมากและลูกแป้งเห็ดในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- โสภา ชินเวชกิจวานิชย์. (2547). อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตพีเอชเอเชื้อผสมโดยน้ำเสีย.
วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2554). ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร (มันสำปะหลัง). กระทรวง
เกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.
- อัมทิกา เมืองวงษ์. (2553). การผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอทโดยใช้ของเสียอินทรีย์จาก
กระบวนการผลิตไบโอดีเซล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย.
- ธงชัย วงศ์สุวรรณ. (2550). การผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอทโดยใช้กรดคาร์บอกซิลิกที่ได้จาก
การหมัก เส้นใยปาล์ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ธีระพงษ์ สุขสว่าง. (2550). การหมักกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลสในถังหมักแบบ
แพคเบต. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- Aarthi, N., and Ramana, K.V. (2011). Identification and characterization of polyhydroxybutyrate producing *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. **J Environ Sci.** 1(5): 744-756.
- 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. **J Biotechnol.** 130(4): 411-421.
- Alias, Z. and Tan, I.K.P. (2005). Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA) producing bacteria by an enrichment technique. **Bioresource Technol.** 96(11): 1229-1234.
- de Almeida, A., Catone, M.V., Rhodius, V.A., Gross, C.A., and Pettinari, M.J. (2011) Unexpected stress-reducing effect of PhaP, a poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated protein, in *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol.** 77(18): 6622-6629.
- Anderson, A.J. and Wynn, J.P. (1995). Microbial polyhydroxyalkanoates, polysaccharides and lipids. **In: Basic Biotechnology.** 325- 333.
- Anderson, A.J., and Dawes, E.A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol Rev.** 54(4): 450-472.
- Andrews, B.A.K., Morris, N.M., and Catalano-Edwin, A. (1994). The durability of ester groups to laundering of polycarboxylic acid finished cotton fabric. **Am Dyest Reprtr.** 83: 22-39.
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N., and Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. **Int J Biol Macromol.** 89:161-74
- APHA, AWWA. and WPCF. (1998). Standard method for the examination of water and wastewater, 19th ed. **American Public Health Association.** Washington DC.
- APHA, AWWA. and WPCF. (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. **American Public Health Association.** Washington DC, USA.
- Aremu, M.O., Layokun, S.K. and Solomon, B.O. (2010). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from cassava starch hydrolysate by *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 950. **Am J Sci Ind Res.** 1(3): 421-426.
- Arumugam, A., Sandhya, M., Ponnusami, V. (2014). Biohydrogen and polyhydroxyalkanoate co-production by *Enterobacter aerogenes* and *Rhodobacter sphaeroides* from *Calophyllum inophyllum* oil cake. **Biores Technol.** 164: 170-176.

- Arunpan, N. (1998). Production of poly- β -hydroxyalkanoate from microorganism. **Mater of Science Thesis in Biotechnology**. Prince of Songkla University.
- Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y., and Foglia, T.A. (2002). Poly(ethylene glycol)- mediated molar mass control of short-chain- and medium-chainlength poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonas oleovorans*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 60(1-2):154-159.
- Aslim, A., Caliskan, F., Beyath, Y., and Gunduz, U. (1998). Poly- β -hydroxybutyrate production by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol Lett**. 159(2): 293-297.
- Babruwad, P.R, Prabhu, S.U, Upadhyaya K.P, Hungund B.S. (2015). Production and characterization of thermostable polyhydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PW3A. **J Biochem Tech**. 6(3): 990-995.
- Balagopalan, C., Ray R.C., Sheriff J.T., and Rajalekshmy, L. (1994). Biotechnology for the value addition of waste waters and residues from cassava processing industries. **In: Proceedings of the Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network**. Bogor, Indonesia. 22-26 Aug 1994.
- Ballard, D.G.H., Holmes, P.A., and Snior, P.J. (1987). Formation of polymers of β -hydroxybutyric acid in bacteria cell and a comparison of the morphology of growth the formation of polyethylene in the solid state. 215: 239-314.
- Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S., and Goulet, J. (1995). Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. **Appl Environ Microbiol**. 61(1): 165-169.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., and Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. **Bioresource Technol**. 99(3): 509-516.
- Benson, D., Karsch-Mizrachi I., Lipman, D., Ostell, J., and Sayers, E. (2011). GenBank. **Nucleic Acids Res**. 39: D32-D37.
- Beral, E.B. (2013). Production of β -hydroxybutyric acid (PHB) by *Rhizobium elti* and *Pseudomonas stutzeri*. **Current Research Journal of Biological Sciences**. 5(6): 273-284.
- Berlanga, M., Montero, T.M., Borrell, J.H., and Guerrero, R. (2006). Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate producing bacteria from microbial mats. **Int Microbiol**. 9: 95-102.

- Bernard, M. (2014). Industrial potential of polyhydroxyalkanoate bioplastic: A brief review. **University of Saskatchewan Undergraduate Research Journal**. 1(1). 1-14.
- 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. **Polym Degrad Stabil**. 93(1): 17-23.
- Bhuwal, A.K., Singh, G., Aggarwal, N.K., Goyal, V., and Yadav A. (2013) Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper and cardboard industry waste. **Int J Biomate**. 2013: 10 pp.
- Bloembergen, S., Holden, D.A., Hamer, G.K., Bluhm, T.L., and Marchessault, R.H. (1986). Study of composition and crystallinity of bacterial poly (β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). **Macromolecules**. 19: 2865-2871.
- Borrero-de Acuna, J.M.B., Bielecka, A., Haussler, S., Schobert, M., Jahn, M., Wittmann, C., Jahn, D., and Poblete-Castro, I. (2014). Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. **Microb Cell Fact**. 13: 88.
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., and Fuller, R.C. (1990). Plastics from bacteria and for bacteria: poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. **Adv in Biochem Eng Biotechnol**. 41: 77-93.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., and Gecser, K.F. (1998). Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **J Biotechnol**. 65(2-3): 127-161.
- Braunegg, G., Bona, R., and Koller, M. (2004). Sustainable polymer production. **Polym-Plast Technol**. 43(6): 1779-1793.
- Breuer, U., Terentiev, Y., Kunze, G., and Babel W. (2002). Yeast as producers of polyhydroxyalkanoates: Genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Macromol Biosci**. 2(8): 380-386.
- Byrom, D. (1990). Industrial production of copolymer from *Alcaligenes eutrophus*. In Novel Biodegradable Microbial Polymers ed Dawes, E.A. Dordrecht/Boston/ London: **Kluwer Academic Publishers**. pp. 113-117.

- Byrom, D. (1993). The synthesis and biodegradation of polyhydroxyalkanoates from bacteria. **Int Biodeterior Biodegrad.** 31(3):199-208.
- Byrom, D. (1994). Polyhydroxyalkanoates. In: Mobley D.P. (ed.). **Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors.** pp. 5-33. Hanser Munich.
- Carta, F.S., Soccol, C.R., Ramos, L.P., and Fontana, J.D. (1999). Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. **Bioresour Technol.** 68(1): 23-28.
- Cervantes-Uc, J.M., Catzin, J., Vargas, I., Herrera-Kao, W., Moguel, F., Ramirez, E., Rincón-Arriaga, S., and Lizama-Uc, G. (2014). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium *Halomonas nitroreducens* isolated from hypersaline ponds. **J Appl Microbiol.** 117(4): 1056-65.
- Ceyhan, N., and Ozdemir, G. (2011). Polyhydroxybutyrate production from domestic wastewater using *Enterobacter aerogenes* 12Bi strain. **Afr J Microbiol Res.** 5: 690-702.
- Chansatein, O., Urairong, H., and Rodthong. (2012). Development of cultivation media for Polyhydroxyalkanoates accumulation in bacterial cells isolated from cassava pulp. **Res J Biol Sci.** 7(1): 31-37.
- Chao, Z., and Lingwei, R. (2011). Combination of spectrophotometry and polymerase chain reaction for rapid detection of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating (Mcl-PHA). **Afr J Microbiol Res.** 5(28): 5053-5056.
- Chang, H. F., Chang, W. C., and Tsai, C. Y. (2012). Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate/3-hydroxyvalerate) from propionate-fed activated sludge under various carbon sources. **Bioresour Technol.** 113: 51-57.
- Chaplin, M., and Kennedy, J. (1994). **Carbohydrate analysis.** A practical approach. 2nd. New York: IRL Press.
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschek, P.A., Todd, B.E.N.T. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. **Aust J Grape Wine R.** 3(1): 2-8.
- Chavalparit, O., and Ongwandee, M. (2009). Clean technology for the tapioca starch industry in Thailand. **J Clean Product.** 17(2): 105-110.

- Chee, J.Y., Tan, Y., Samian, M.R., and Sudesh, K. (2010). Isolation and characterization of a *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) capable of producing polyhydroxyalkanoate (PHA) from triglycerides, fatty acids and glycerols. **J Polym Environ.** 18(4): 584-592.
- Chen, G.Q., König, K.H., and Lafferty, R.M. (1991). Production of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate and poly-D(-)-3-hydroxyvalerate by strains of *Alcaligenes latus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 60(1): 61-6.
- Chen, G.Q., and Wu, Q. (2005). Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. **Appl Microbiol Biot.** 67(5): 592-599.
- 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 Biochem.** 41(11): 2289-2296.
- Chen, G.Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and material industry. **Chem Soc Rev.** 38(8): 2434-2446.
- Chen, G.Q. (2010). Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Monographs.** 14: 17-37.
- Ch'ng, D.H., Lee, W.H., and Sudesh, K. (2012). Biosynthesis and lipase-catalysed hydrolysis of 4-hydroxybutyrate-containing polyhydroxyalkanoates from *Delftia acidovorans*. **Malaysian Journal of Microbiology (MJM).** 8(3): pp. 156-163.
- Chodak, I. (2008). Chapter 22 - Polyhydroxyalkanoates: Origin, Properties and applications. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources.** 451-477.
- Cooper, G.M., and Hausman, R.E. (2004). **The cell: a molecular approach (3rd edn).** Palgrave-Macmillans Global Academic Publishing. 713 pp.
- Davis, R., Kataria, R., Cerrone, F., Woods, T., and Kenny, S. (2013). Conversion of grass biomass into fermentable sugars and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by *Pseudomonas* strain. **Bioresource technol.** 150: 202-209.
- Dawes, E.A., and Senior, P.J. (1973). The role of energy reserve polymer in microorganisms. **Adv Microb Physiol.** 10: 135-266.
- De-Mot, R., and Verachtert, H., (1987). Some microbiological and biochemical aspects of starch bioconversion by amylolytic yeasts. **J Biotechnol.** 5(3): 259-272.

- De Mot, R. (1990). Conversion of starch by yeasts. **In Yeast Biotechnology and Biocatalysis ed.** Verachtert, H. and de Mot, R. New York: Marcel Dekker. Pp. 163-222.
- Djuma, A., Soewarno, N., Sumarno, S., Primarini, D., and Sumaryono, W. (2011). Cassava pulp as a biofuel feedstock of an enzymatic hydrolysis process. **Makara J Technol.** 15(2): 183-192.
- Dionisi, D., Carucci, G., Papini, M.P, Riccardi, C., Majone, M., and Carrasc, F. (2005). Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. **Water Res.** 39(10): 2076-2084.
- Doi, Y. (1990). Microbial Polyester, by Yoshiharu Doi. **VCH, New York.**
- Doi, Y., Segawa, A., Kawaguchi, Y., and Kunioka, M. (1990). Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiol Lett.** 67(1-2);165-169.
- Doi, Y., Y. Kanesawa, and N. Tanahashi. (1992). Biodegradation of microbial polyesters in the marine environment. **Polym Degrad.** 36(2):173-177.
- Du, G., Chen, J., Yu, J., and Lun, S. (2001). Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. **J Biotechnol.** 88(1): 59-65.
- Du, G., Si, Y., and Yu, J. (2001). Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acids on synthesis of polyhydroxy-alkanoates from volatile fatty acids by *Ralstonia eutropha*. **Biotechnol Lett.** 23(19): 1613-1617.
- Elain, A., Le Fellic, M., Corre, Y.M., Le Grand, A., Le Tilly, V., Audic, J.L., and Bruzard, S. (2015). Rapid and qualitative fluorescence-based method for the assessment of PHA production in marine bacteria during batch culture. **World J Microbiol Biotechnol.** 31(10): 1555-1563.
- El-Sayed, A.A., Abdel Hafez, A.M., Hemmat, Abdelhady M., and Khodair, T.A. (2009). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) using batch and two-stage batch culture strategies. **Aust J Basic Appl. Sci.** 3(2): 617-627.
- El-Sharkawy, M.A. (2004). Cassava biology and physiology. **Plant Mol Biol.** 56: 481–501.
- Evans, D. J., and Sikdar, K. S. (1990). Biodegradable plastic. **Chemtech.** 5: 38-42.
- Fiorese, M.L., Freitas, F., Pais, J., Ramos, A.M., de Aragão, G.M.F., and Reis, M.A.M. (2009) Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent

- extraction with 1,2-propylene carbonate. **Eng Life Sci.** 9(6): 454-461.
- 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. **J Biotechnol.** 132(3): 283-286.
- Goh, Y.S., and Tan, I.K. (2012). Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island. **Microbiol Res.** 167(4):211-9.
- Gorenflo, V., Steinbuchel, A., Morose, S., Rieseberg, M., and Scheper, T. (1999). Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. **Appl Microbiol Biotechnol.** 51(6):765-772.
- Gottschalk, G. (1985). Bacterial metabolism. **Springer-Verlage** Berlin Heidelberg. New York.
- Grace, M.R. (1977). Cassava Processing. **Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Rome.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., and Fowler, S.D. (1985). Nile Red" A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **J Cell Biol.** 100: 965-973.
- Grothe, E., Yuong, M.M., and Chisti, Y. (1999). Fermentation optimization for the production of poly(β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme Microb Tech.** 25(1-2): 132-141.
- Gumel, A.M., Annuar, M.S.M., and Heidelberg, T. (2012). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates copolymers produced by *Pseudomonas putida* Bet001 isolated from palm oil mill effluent. **PLoS One.** 7(9): e45214.
- Gumel, A.M., Annuar, M.S.M., and Heidelberg, T. (2014). Growth kinetics, effect of carbon substrate in biosynthesis of mcl-PHA by *Pseudomonas putida* Bet001. **Braz J Microbiol.** 45(2): 427-438.
- Ha, C.S., and Cho, W.J. (2002). Miscibility, properties and biodegradability of microbial polyester containing blends. **Prog Polym Sci.** 27(4):759-809.
- Haas, R., Jin, B., and Zepf, F.T. (2008). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. **Biosci Biotech Bioch.** 72(1): 253-256.
- Hanggi, U.J. (1990). Pilot Scale Production of PHB with *Alcaligenes Latus*. **Kluwer Academic Publishers.** Dordrecht. The Netherlands.

- Harbak, O. (1992). Industrial production of poly- β -hydroxy butyrate: Rev. **FEMS Microbiol.** 103: 251-256.
- Harper, D.J., and Mc Kellar, J.F. (1972). Sensitised photodegradation of polypropylene. **Chem Indust.** 25: 848.
- Hassan, A.M., Shirai, Y., Kusubayashi N., Ismail Abdul Karim, M. Nakanishi, K. and Hashimoto, K. (1997). The production of polyhydroxyalkanoate from anaerobically palm oil mill effluent by *Rhodobacter sphaeroides*. **J Ferment Bioeng.** 83(5): 485-488.
- Haywood, A.C. (1958). Poly- β -hydroxybutyrate inclusion in the classification of aerobic gram-negative bacteria. **Proc Soc Gen Microbioa.** 56: ii-iii.
- Hine, P.W., and Lees, H. (1976). The growth of nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum* in continuous culture under intense aeration. **Can J Microbiol.** 22(5): 611-618.
- Hocking, P.J., and Marchessault R.H. (1994). Biopolyesters. **In chemistry and technology of biodegradable polymers.** (Griffin, G. J. L. ed.). p. 48-95. Chapman and Hall, London.
- Holmes, P.A. (1988). Biological produced PHA polymers and copolymer. **In Developments in Crystalline Polymer.** Bassett, D.C. (ed.). Elsevier, London. 2: 1-65.
- Hong, K., Sun, S., Tian, W., Chen, G.Q., and Huang, W. (1999). A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. **Appl Microbiol Biot.** 51(4): 523-526.
- Jendrossek, D. (2007). Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. **Appl Microbiol Biotechnol.** 74:1186-1196.
- Jhonson, K., Jiang, Y., Kleerebezem, R., Muyzer, G., and Loosdrecht, M.C.M.V. (2009). Enrichment of a mixed bacteria culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. **Biomacromolecules.** 10(4): 670-676.
- Kanchanasuta, S., and Boonyanich, S. (2011). Effect of cultivations on polyhydroxyalkanoate biopolyester yield. **The Journal of Applied Science.** 10: 15-31.
- Karbasi, F., Ardjmand, M., Younesi, H., Safe kordi, A., and Yaghmaei, S. (2012) Investigation of optimum fermentation condition for PHA production by four species: *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Azohydromonas lata*, *Cupriavidus necator*, *Azotobacter beijinckii*. **World Applied Sciences Journal.** 20(12): 1713-1724.
- Kasemsap, C., and Wantawin, C. (2007). Batch production of polyhydroxyalkanoate by low

- polyphosphate content activated sludge at varying pH. **Bioresource Technol.** 98(5): 1020-1027.
- 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(10): 5440-5444.
- Kedia, G., Passanha, P., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., and Esteves, S.R. (2014). Evaluation of feeding regimes to enhance PHA production using acetic and butyric acids by a pure culture of *Cupriavidus necator*. **Biotechnol Bioproc E.** 19(6): 989-995.
- Kessler, B., and Witholt, B. (2001). Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **J Biotechnol.** 86(2): 97-104.
- Khanna, S., and Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochem.** 40(2): 607-619.
- Khardenavis, A.A, Vaidya, A.N., Kumar, M.S., and Chakrabarti, T. (2009). Utilization of molasses spentwash for production of bioplastics by waste activated sludge. **Waste Manage.** 29(9): 2558-2565.
- Khosro, I., Asiybar, A.S., Masoud, G.S., and Mohammad, F.G. (2012). Effect of Nitrogen Sources and Incubation Times on Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) Synthesis by *Azotobacter vinelandii* Isolated from Soils of Guilan Province (North of Iran). **J Appl Environ Biol Sci.** 2(7): 294-299.
- Kinoshita, S., Kulprecha, K., and Chao, A. (1991). Microbial Production of Poly-β-hydroxybutyric Acid. In **Annual Report of IC Biotech (Oshima, Y.,ed)**. Osaka: Osaka University. pp. 347-349.
- 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*. **Bioresour Technol.** 99(11): 4854-63.
- Koller, M., Atlic, A., Dias, M., Reiterer, A., and Braunegg, G. (2010). Microbial PHA production from waste raw materials. **Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications.** pp. 85-119.

- Koller, M., Sandholzer, D., Salerno, A., Braunegg, G., and Narodoslawsky, M. (2013). Resources conservation and recycling biopolymer from industrial residues: life cycle assessment of poly(hydroxyalkanoates) from whey. **Resour Conserv Recycl** . 73: 64-71.
- Koller, M., and Contreras, A.R. (2015). Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative analysis and quantitative analysis of intra-and extracellular PHA. **Eng Life Sci**. 15(6): 558-581.
- Kosugi, A., Kondo, A., Ueda, M., Murata, Y., Vaithanomsat, P., Thanapase, W., Arai, T., and Mori, Y. (2009). Production of ethanol from cassava pulp *via* fermentation with a surface-engineered yeast strain displaying glucoamylase. **Renewable Energ**. 34(5): 1354-1358.
- Koutinas, A.A., Xu, Y., Wang, R., and Webb, C. (2007). Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat-based biorefinery. **Enzyme Microb Tech**. 40(5): 1035-1044.
- Kumar, M. S., Mudliar, S. N., Reddy, K. M. K., and Chakrabarti, T. (2004). Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant. **Bioresour Technol**. 95(3): 327-330.
- Kumar, M., Gupta, A., and Thakur, I.S. (2016). Carbon dioxide sequestration by chemolithotrophic oleaginous bacteria for production and optimization of polyhydroxyalkanoate. **Bioresour Technol**. 213: 249-256.
- Kunioka, M., Nakamura, Y., and Doi, Y. (1988). New bacterial copolyester produced in *Alcaligenes Eutrophus*. **Appl Microb Biotechnol**. 30: 569-573.
- Lafferty, R.M., Korsatko, B. and Korstako, W. (1988). Microbial production of poly-3-hydroxybutyric acid. In: **Biotechnology Special Microbial Processes**. Rehm HJ and Reed G (eds.), pp. 136-176.
- Lakshmi, R.S., Hema, T.A., Divya, T.R., and Starin, S.T. (2012). Production and optimization of polyhydroxyalkanoate from *Rhizobium* sp. present in root nodule. **IOSR J pharm biol sci (IOSRJPBS)**. 3(2): 21-25.
- Lasemi, Z., Darzi, G.N., and Baei, M.S. (2012). Media optimization for poly(β -hydroxybutyrate) production using *Azotobacter beijerinckii*. **Int J of Polym Mat**. 62: 265-269.
- Lee, S.Y. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoate. **Biotechnol Bioeng**. 49(1): 1-14.

- Lee, S.Y., and Choi, J.I. (1998). Effect of fermentation of performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. **Polym Degrad Stabil.** 59(1-3): 387-393.
- 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. **Bioresour Technol.** 99(15): 6844-6851.
- Lee, S. H., Kim, J. H., Mishra, D., Ni, Y. Y., and Rhee, Y. H. (2011). Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by activated sludge enriched under periodic feeding with nonanoic acid. **Bioresour Technol.** 102(10): 6159-6166.
- Lemoigne, M. (1926). Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide b-oxobutyrique. **Bull Soc Chem Biol.** 8: 770-782.
- Lemos, P. C., Serafim, L. S., and Reis, M.A.M. (2006). Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. **J Biotechnol.** 122(2): 226-238.
- Liu, Q., Luo, G., Zhou, X.R., and Chen, G-Q. (2011). Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by β -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. **Metab Eng.** 13(1): 11-17.
- Liu, H.Y., Hall, P.V., Darby, J.L., Coats, E.R., Green, P.G., Thompson, D.E., and Loge, F.J. (2008). Production of polyhydroxyalkanoate during treatment of tomato cannery wastewater. **Water Environ Res.** 80(4): 367-372.
- Liu, W.T., Marsh, T., and Forney J.L. (1998). Determination of the Microbial diversity of anaerobic- aerobic activated sludge by a novel molecular biological technique. **Water Sci Technol.** 37(4-5): 417-422.
- Loo, C.Y., Sudesh, K. (2007). Biosynthesis and native granule characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans*. **Int J Biol Macromol.** 40(5):466-71.
- López-Cuellar, M.R., Alba-Flores, J., Gracida, Rodríguez J.N., and Pérez-Guevara, F. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. **Int J Biol Macromol.** 48(1): 74-80.

- Lopez-Cortes, A., Lanz-Landozuri, A., and Garcia-Maldonado, J.Q. (2008). Screening and isolation of PHB-producing bacteria in a polluted marine microbial mat. **Microb Ecol.** 56(1): 112-120.
- Luengo, J. M., Garcia, B., Sandoval, A., Noharro, G., and Olivera, E. R. (2003). Bioplastics from microorganisms. **Curr Opin Microbiol.** 6(3): 256-260.
- Lu, X., Zhang, J., Wu, Q., and Chen, G.Q. (2003). Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid L-oxidation pathway in *E. coli*. **Microbiol Lett.** 221(1): 97-101.
- Luli, G. W., and Strohl, W. R. (1990). Comparison of Growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. **Appl Environ Microbiol.** 56(4): 1004-1011.
- Ma, L., Zhang, H., Liu, Q., Chen, J., Zhang, J., and Chen G.Q. (2009). Production of two monomer structures containing medium-chain length polyhydroxyalkanoates by β -oxidation-impaired mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. **Bioresource Technol.** 100(20): 4891-4894.
- Madison, L.L., and Huisman, G.W. (1999). Metabolic engineering of poly(3 hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiol Mol Biol Rev.** 63(1): 21-53.
- Macrae, R.M., Wilkinson, J.R. J. (1958). The influence of culture conditions on polyhydroxybutyrate synthesis by *Bacillus megaterium*. **Gen Microbiol.** 19: 210-222.
- 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.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of production of fructosyltransferase by *Penicillium purporogenum*. **Braz J Microbiol.** 38:194-199.
- Mizuno, K., Ohta, A., Hyakutake, M., Ichinomiya, Y., Tsuge, T. (2010). Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. **Poly Degrad Stab.** 95(8): 1335-1339.
- Moat, A.G., Foster, J.W., Spector, M.P. (2002). **Microbial physiology.** John Wiley & Sons. Singapore.

- Morgunov, I.G., Kamzolova, S., Sokolov, AP., and Finogenova, T.V. (2004). The Isolation, Purification, and Some Properties of NAD-Dependent Isocitrate Dehydrogenase from the Organic Acid-Producing Yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technol.** 73(3):300-6.
- Mohapatra, S., Samantaray, D.P., and Samantaray, S.M. (2014). Phylogenetic heterogeneity of the rhizospheric soil bacterial isolates producing PHAs revealed by comparative analysis of 16S-rRNA. **Int J Curr Microbiol App Sci.** 3(5): 680-690.
- Morgunov, I.G., Solodovnikova, N.Y., Sharyshev, A.A., Kamzolova, S.V., and Finogenova, T.V. (2004). Regulation of NAD⁺-Dependent isocitrate dehydrogenase in the citrate producing yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biochem Mosc.** 69(12): 1391-1398.
- Mothes, G., Schnorpfeil, C., and Ackermann, J.U. (2007). Production of PHB from crude glycerol. **Eng Life Sci.** 7(5): 475-479.
- Mozejko-Ciesielska, J., Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous. **Microbiolo Res.** 192: 271-282.
- Muller, H.M., and Seebach, D. (1993). Poly(hydroxyfettsaureester), eine funfte Klasse von physiologisch bedeutsamen organischen biopolymeren. **Angew Chem.** 105(4):483-509.
- Naheed, N., and Jamil, N. (2014). Optimization of biodegradable plastic production on sugar cane molasses in *Enterobacter* sp. SEL2. **Braz J Microbiol.** 45(2):417-26.
- Nair, A.M., Annamalai, K., Kannan, S.K., and Kuppusamy, S. (2014). Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Bacillus subtilis* isolated from soil samples. **Malaya J Biosci.** 1(1): 8-12.
- Neissa M.P., Kelly G.A., Jeffrey A.G., and Lawrence P.W. (2011). Nile Red Detection of Bacterial Hydrocarbons and Ketones in a High-Throughput Format. **mBio.** 2(4):e00109-11.
- Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, G.J., Hiroshi Kouchi, H., Haruko I.A., Murakami, Y., Kawasaki, S., Akao, S., Ohmori, M., Nagasawa, M., Harada, K., Kawaguchi, M. (2002). HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. **Int J Sci.** 420: 426-429.
- Nishimura, R., Ohmori, M. and Kawaguchi, M. (2002). The novel symbiotic phenotype of enhanced-nodulating mutant of *Lotus japonicus*: *astray* is an early nodulating mutant with wider nodulation zone. **Plant Cell Physiol.** 43(8): 853-859.

- Nubia, M., Ivonne, G., Dionisio, M., Victoria, G., Dolly, R., Diego, S., Juan, G., Fabio, A., Armando, E., and Dolly, M. (2007). Bioprospecting and characterization of polyhydroxyalkanoate (PHAs) producing bacteria isolated from Colombian sugarcane producing areas. **Afr J Biotechnol.** 6(13): 1536-1543.
- Nurbas, M., and Kutsal, T. (2004). Production of PHB and P(HB-co-HV) Biopolymers by Using *Alcaligenes Eutrophus*. **Iran Polym J.** 13(1): 45-51.
- Ojumu, T.V.1, Yu, J.2., and Solomon, B.O., (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **Afr J Biotechnol.** 3(1): 18-24.
- Oliviera, F.C., Freire, D.M.G., and Castilho, L.R. (2004). Production of poly(3-hydroxybutyrate) by solid-state fermentation with *Ralstonia eutropha*. **Biotechnol Lett.** 26(24): 1851-1855.
- Osman, Y.A., Elrazak, A.A., Khater, W., Nashy, E.S., and Mohamadeen, A. (2015). Molecular characterization of a poly- β -hydroxybutyrate-producing microbacterium isolate. **Int J Appl Sci Biotechnol.** 3(2): 143-150.
- Osman, Y., Elrazak, A.A., and Khater, W. (2016). Bioprocess optimization of microbial biopolymer production. **J Biobased Mater Bioenergy.** 10(2): 1-10.
- Ostle, A.G., and Holt, J.G. (1982). Nile blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. **Appl Environ Microbiol.** 44(1): 238-41.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vanderberghe, L.P.S., and Mohan, R. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residue. II: cassava bagasse. **Bioresour Technol.** 74(1): 81-87.
- Panichnumsin, P., Nopharatana, A., Ahring, B., and Chaiprasert, P. (2010). Production of methane by co-digestion of cassava pulp with various concentrations of pig manure. **Biomass Bioenerg.** 34(8): 1117-1124.
- Parmar, D. and Pandya, A. (2012). Characterization of amylase producing bacterial isolates. **Bull Environ Pharmacol Life Sci.** 1(60): 42-47.
- Paul, E., and Liu, Y. (2012). **Biological sludge minimization and biomaterial/bioenergy recovery technologies**: John Wiley & Sons. Inc. United states of America
- Pena, C., Castillo, T., Nunez, C., and Segura, D. (2011). Bioprocess design: Fermentation strategies for improving the production of alginate and poly- β -hydroxyalkanoates (PHAs) by *Azotobacter vinelandii*. Progress in molecular and environmental bioengineering from

analysis and modeling to technology applications. **Progress in molecular and environmental bioengineering from analysis and modeling to technology applications.** In Tech. Croatia.

- Pillai, A.B., Kumar, A.J., Thulasi, K., and Kumarapillai, H. (2017). Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhatai*. **Braz J Microbiol.** 48(3): 451-460.
- Poblete-Castro, I., Escapa, I.F., Jäger, C., Puchalka, J., Chi-Lam, C., Schomburg, D., Prieto, M., and Martins dos Santos, V.A. (2012). The metabolic response of *P. putida* KT2442 producing high levels of polyhydroxyalkanoate under single- and multiple-nutrient-limited growth: highlights from a multi-level omics approach. **Microb Cell Fact.** 11:34-55.
- Poirier, Y., Erard, N., and MacDonald, J. (2002). Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Lett.** 207(1): 97-102.
- Potivichayanon, S., and Kitleartpornpaioat, R. (2010). Biodegradation of cyanide by a novel cyanide-degrading bacterium. **Proceedings of ICEESD 2010 International Conference on Energy, Environment, Sustainable Development in World Academy of Science, Engineering and Technology.** Paris, France 66:606-609.
- Prasad, S., Singh, A., Jain, N., and Joshi, H.C. (2007). Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India. **Energy Fuels.** 21(4): 2415-2420.
- Preiswerk, B., Ullrich, S., Speich, R., Bloemberg, G.V., and Hombach, M. (2011). Human infection with *Delftia tsuruhatensis* isolated from a central venous catheter. **J Med Microbiol.** 60: 246-248.
- Qi, Q., and Rehm, B.H.A. (2001). Polyhydroxybutyrate biosynthesis by *Caulobacter crescentus*: physiology and molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. **Microbiology.** 147: 3353-3358.
- Quillaguaman, J., Delgado, O., Mattiasson, B., and Hatti-Kaul, R. (2006). Poly(beta-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile *Halomonas boliviensis* LC1. **Enzyme Microb Technol.** 38(1-2): 148-154.
- Ramachandran, H., and Abdullah, A.A. (2010). Isolation of PHA producing bacteria from Malaysian environment. **In proceedings of the 7th IMT-GT UNITED and the 3rd international PSU-UNS conferences on bioscience.** pp. 178-179.

- Ramadas, M., Holst, O., and Maltiason, B. (1996). Production of amyloglucosidase by *Aspergillus niger* under different cultivation regimens. **World J Microbiol Biotechnol.** 12(3): 267-271.
- Ramadas, N.V., Singh, K.S., Soccol, R.C., and Pandey, A. (2009). Polyhydroxybutyrate production using Agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. **Braz Arch Biol Technol.** 52(1): 17-23.
- Randriamahefa, S., Renard, E., Guérin, P., and Langlois, V. (2003). Fourier transform infrared spectroscopy for screening and quantifying production of PHAs by *Pseudomonas* grown on sodium octanoate. **Biomacromolecules.** 4(4): 1092-1097.
- Rattanachomsri, U., Tanapongpipat, S., Eurwilaichitr, L., and Champreda, V. (2009). Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. **J Biosci Bioeng.** 107(5): 488-93.
- Reddy, M.V., and Mohan, S.V. (2012). Influence of aerobic and anoxic microenvironments on polyhydroxyalkanoates (PHA) production from food waste and acidogenic effluents using aerobic consortia. **Bioresour Technol.** 103(1): 313-321.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., and Rashmi Kalia, V.C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresour Technol.** 87(2): 137-146.
- Reis, M.A.M., Serafim, L.S., Lemos, P.C., Ramos, A.M., Aguiar, F.R., van Loosdrecht, M.C.M., (2003). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. **Bioprocess Biosyst.** 25(6): 377-385.
- Rehm, B.H.A, Steinbüchel, A, (1999). Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **Int J Biol Macromol.** 25(1-3): 3-19.
- Rodriguez-Contreras, A., Koller, M., Miranda-de Sousa Dias, M., Calafell-Monfort, M., Braunegg, G., and Marques-Calvo, M.S. (2015). High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. **J Appl Microbiol.** 114: 1378-1387.
- Rodriguez-Contreras, A., Canal, C., Calafell-Monfort, M., Ginebra, M.P., Julio-Moran, G., and Marques-Calvo, M.S. (2013). Methods for the preparation of doxycyclineloaded phb micro and nano spheres. **Eur Polym J.** 49(11): 3501-3511.
- Rodtong, S., Deprasertkul, C., Supakarn, N., Suteerawattananon, M., and Lertsiriyothin, W. (2008). Selection of bacteria for the potential production of polyhydroxyalkanoate (PHA)

- production by *Brachymonas* sp. P12. **World J Microbiol Biotechnol.** 23: 625-632.
- Ryu, H. W., Hahn, S. K., Chang, Y. K., and Chang, H. N. (1997). Production of poly (3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. **Biotechnol Bioeng.** 55(1): 28-32.
- Satoh, Y., Tajima, K., Tannai, H., and Munekata, M. (2003). Enzymecatalyzed poly (3-hydroxybutyrate) synthesis from acetate with CoA recycling and NADPH regeneration in vitro. **J Biosci Bioeng.** 95(4): 335-341.
- Saelim, K., Dissara, Y., and H-Kittikun, A. (2008). Saccharification of cassava starch by *Saccharomycopsis fibuligera* YCY1 isolated from Loog-Pang (rice cake starter). **Songklanakarin J Sci Technol.** 30: 65-71.
- Samrot, A.V., Avinesh, R.B., Sukeetha, S.D., and Senthilkumar, P. (2011). Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Enterobacter cloacae* SU-1 during growth with two different carbon sources in batch culture. **Appl Biochem Biotechnol.** 163(1): 195-203.
- Sasikala, C., and Ramana C.V. (1996). Biodegradable polyesters. **Adv Appl Microbiol.** 42: 45-51.
- Satoh, H., Iwamoto, Y., Mino, T. and Matsuo, T. (1998). Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. **Water Sci Technol.** 38(2): 103-109.
- Savenkova, L., Gerberga, Z., Nikolaeva, V., Dzene, A., Bibers, I., and Kalnin, M. (1999). Mechanical properties and biodegradation characteristic of PHB-based films. **Process Biochem.** 35(6): 573-579.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Levantesi, C., Tandoi, V., Santos, H., and Reis, M.A. (2002). Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. **J Microbiol Methods.** 51(1): 1-18.
- Shakeri, S., Ronhanian, R., and Emtiazi, G. (2011). Comparision of intracellular polyhydroxybutyrate granules formation between different bacterial cell subpopulations by flow cytometry. **Jundishapur J Microb.** 4(4): 229-238.
- Shang, L., Jiang, M., and Chang, H.N. (2003). Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations. **Biotechnol Lett.** 25(17): 1415-1419.
- Shang, L., Jiang, M., Yun, Z., 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 J Microb Biot.** 24(12): 2783-2787.

- Shrivastav, A., Mishra, S., Bhumi, S., Imran, P., Deepti, J., and Sandhya M. (2010). Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. **Int J Biol Macromol.** 47(2): 283-287.
- Silverstein, R., Webster, F., and Kiemle, D. (2005). **Spectrometric identification of organic compounds.** 7th ed. John Wiley & Sons Inc. United states of America.
- Singh, A.K., and Mallick, N. (2009). Exploitation of inexpensive substrates for production of a novel SCL–LCL-PHA co-polymer by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. **J Indus Microbiol Biotechnol.** 36(3): 347-354.
- Solaiman, D., Ashby, R., Hotchkiss, A., and Foglia, T. (2006). Biosynthesis of mediumchain-length poly(hydroxyalkanoates) from soy molasses. **Biotechnol Lett.** 28(3): 57-162.
- Song, J.H., 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. **J Microbiol Biotechnol.** 18(8): 1408-1415.
- Spiekermann, P., Rehm, B.H.A., Kalscheuer, R., Baumeister, D., and Steinbüchel, A. (1999). A sensitive viable colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Arch Microbiol.** 171(2): 73-80.
- Sriroth, K., Piyachomkwan, K., Wanlapatit, S., and Oates, C.G. (2000). Cassava starch technology. **The Thai experience, Starch/Starke.** 52(12): 439-449.
- Steinbüchel, A. (1991). **Novel materials from biological sources.** New York. pp.124-213.
- Steinbüchel, A., and Hein, S. (2001). Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Adv Biochem Eng Biotechnol.** 71: 81-123.
- Sudesh, K., Abe, H., and Doi, Y. (2000). Synthesis structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog Polym Sci.** 25(10): 1503-1555.
- Sukumavasi, J., Kato, K., and Harade, T. (1975). Glucoamylase of a strain of *Enndomycopsis fbuligera* isolate from mold bran (Look-Pang) of Thailand. **J Ferment Technol.** 53(8): 559-565.
- Sundarram, A., Murthy, T.P.K. (2014). α -Amylase production and applications: A review.

J Appl Environ Microbiol. 2(4): 166-175.

Suresh K.M., Mudliar, S.N., Reddy K.M.K., and Chakrabarti, T. (2004). Production of bio-degradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant. **Bioresour Technol.** 95(3): 327-330.

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. **Biotechnol Adv.** 25(2): 148-175.

Suwannasing, W., Moonamart, S., and Kaewkannetra, P. (2011). Yields of polyhydroxyalkanoates (PHAs) during batch fermentation of sugar cane juice by *Alcaligenes latus* and *Alcaligenes eutrophus*. **J Life Sci.** 5(11): 960-966.

Suwannasing, W., Imai, T., and Keawkannetra, P. (2015). Cost-effective defined medium for the production of polyhydroxyalkanoates using agricultural raw material. **Bioresour Technol.** 194: 67-74.

Taguchi, S., and Doi Y. (2004). Evolution of polyhydroxyalkanoate (PHA) production system by "enzyme evolution": successful case studies of directed evolution. **Macromol Biosci.** 4(3): 146-56.

Tandoi, V., Majone, M., May, J., and Ramadori, R. (1998). The behaviour of polyphosphate accumulating *Acinetobacter* isolates in an anaerobic-aerobic chemostat. **Water Res.** 32(10): 2903-2912.

Teeka J, Imai, T., Xuehang, C., and Sekine, M. (2010). Screening of PHA-producing bacteria using biodiesel-derived waste glycerol as a sole carbon source. **J Water Environ Technol.** 8(4): 371-381.

Thai Tapioca Starch Association. (2017). Export tapioca product. [Online available] ;

http://www.thaitapiocastarch.org/th/information/statistics/export_tapioca_products

Thomson, N., Roy, I., Summers, D., and Sivaniah, E. (2010), In vitro production of polyhydroxyalkanoates: Achievements and applications. **J Chem Technol Biotechnol.** 85(6): 760-767.

Tomizuka, N., Ota, Y., and Yamada, K. (1966). Studies on lipase from *Candida cylindracea*: Part I. Purification and properties. **Agric Biol Chem.** 30(6): 576-584.

- Trainer, M.A., and Charles, T. C. (2006). Therole of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. **App Microbiol Biot.** 71(4): 377-386.
- Valentin, H.E., Schoebaum, A., and Steinbuechel, A. (1992). Identification of 4-hydroxyvaleric acid as a constituent in biosynthetic polyhydroxyalkonic acids from bacteria. **App Microbiol Biot.** 36(4): 507-514.
- Venkateswar, R.M., and Venkata M.S. (2012). Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment. **Bioresour Technol.** 114: 573-582.
- Volova, T.G., Kalacheva, G.S., Kozhevnikov, I.V., and Steinbüchel, A. (2007). Biosynthesis of multicomponent polyhydroxyalkanoates by *Wautersia eutropha*. **Microbiology.** 76(6): 704- 711.
- Wang, F., and Lee, S.Y. (1997). Poly(3-Hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. **Appl Environ Microb.** 63(9): 3703-3706.
- Wang, Y. J., Hua, F. L., Tsang, Y. F., Chan, S. Y., Sin, S. N., Chua, H., Yu, P. H. F., and Ren, N. Q. (2007). Synthesis of PHAs from waste under various C:N ratio. **Bioresour Technol.** 98(8): 1690-1693.
- 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 Chip.** 11: 1957-1962.
- Wei, H., Chen, W.C., Huang, C.K., Wu, H.S., Sun, Y.M., Lo, C.W., and Janarthanan, O.M. (2011). Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. **Int J Mol Sci.** 12(1): 252-265.
- Wen, Q., Chen, Z., Tian, T., and Chen, W. (2010). Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. **J Environ Sci.** 22(10): 1602-1607.
- Weng, Y.X., Wang, X.L., and Wang, Y.Z. (2011). Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. **Polym Test.** 30(4): 372-380.
- Williamson, D.H., and Wilkinson, J.F. (1958) The isolation and estimation of the β -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. **J Gen Microbiol.** 19:198-209.

- Wilson, J.J., Ingledew, W.M. (1982). Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzymes. **Appl Environm Microbiol.** 44(2): 301-3-7.
- Windish, W.W., and Mhatre, N.S. (1965). Microbial amylase. **Adv Appl Microbiol.** 7: 273-304.
- 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*. **Biochem Eng J.** 38: 384-389.
- Xu, C.P., Sinha, J., Bae, J.T., Kim, S.W., and Yun, J.V. (2005). Optimization of physical parameters for exo-biopolymer production in submerged mycelial cultures of two entomopathogenic fungi *Paecilomyces japonica* and *Paecilomyces tenuipes*. **Lett Appl Microbiol.** 42: 501-506.
- Yang, S.S., and Wang, J.Y. (1999). Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. **Bot Bull Acad Sinica.** 40: 259-265.
- Yamada, K.Y., Ota, H., and Machida, H. (1962). A modified method for lipase activity assay with emulsified olive oil as substrate. **Nippon Nogeikagaku Kaishi.** 36: 860.
- Yamada, K., Machida, H., Higashi, T., Koide, A., and Ueda, K. (1963). Studies on the production of lipase by microorganisms. Part III. On the medium composition of *Candida cylidracea*. **Agric Chem Soc Japan.** 37: 645-648.
- Yamane, T. (1993). Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. **Biotechnol Bioeng.** 41(1): 165-170.
- Yehia, O., Ahmed-Abd, E., and Wesam, K. (2016). Bioprocess optimization of microbial biopolymer production. **J Biobased Mater Bioenergy.** 10(2): 119-128.
- Yu, J., and Heiko, S. (2008). Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. **Bioresour Technol.** 99(17): 8042-8048.
- Zinn, M., Witholt, B., and Egli, T. (2001). Occurrence synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Adv Drug Deliver Rev.** 53(1): 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(8): 1532-1541.



ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาล Reducing sugar ที่มีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 5-500 ไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส

สารเคมี

2 M NaOH 50 มิลลิลิตร (เตรียมโดยละลาย NaOH ปริมาณ 4 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

DNS solution เตรียมโดยละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 0.25 กรัม ใน 50 มิลลิลิตร ของ 2 N NaOH เติม Sodium potassium tartrate (Rochelle salt) ลงไป 75 กรัม และคนจนกระทั่งสารละลายหมด จึงเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง

วิธีวิเคราะห์

- 1) ดูดตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาล 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองสำหรับหลอดที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) ใช้น้ำกลั่น
- 2) เติม DNS solution ลงไปในแต่ละหลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 3) ต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 4) ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว โดยการนำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง
- 5) เติมน้ำให้ครบ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 6) นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาล ที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอน

2. การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย (NH₃-N) ในน้ำ

ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Distillation Nesslerization (APHA, AWWA, WPCF, 2005)

สารเคมี

- 1) โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมล/ลบ.ดม. หรือกรดซัลฟิวริก 0.5 โมล/ลบ.ดม.
- 2) สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์

นำโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ 88 ลบ.ซม. เติมลงในสารละลายโซเดียมเตตระบอเรต (Na₂B₄O₇) 500 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ 1,000 มิลลิลิตร

(สารละลายโซเดียมเตตระโบเรตเตรียมได้โดยนำ 5.0 กรัม ของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ หรือ 9.5 กรัม ของ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ 1,000 มิลลิลิตร)

3) Indicating boric acid

ละลายกรดบอริก 20 กรัม ในน้ำกลั่นเพียงเล็กน้อย เติม Mixed indicator 10 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ 1 ลิตร

3.1) การเตรียม Mixed indicator

ละลาย methyl red indicator 200 มิลลิกรัม ใน ethyl alcohol (95%) 100 มิลลิลิตร ละลาย methylene blue 100 มิลลิกรัม ใน ethyl alcohol (95%) 50 มิลลิลิตร แล้วผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิดเข้าด้วยกัน สารละลายนี้ควรเตรียมทุก ๆ เดือน

3.2) สารละลาย Boric acid

ละลายกรดบอริก 20 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางเป็น 1,000 มิลลิลิตร

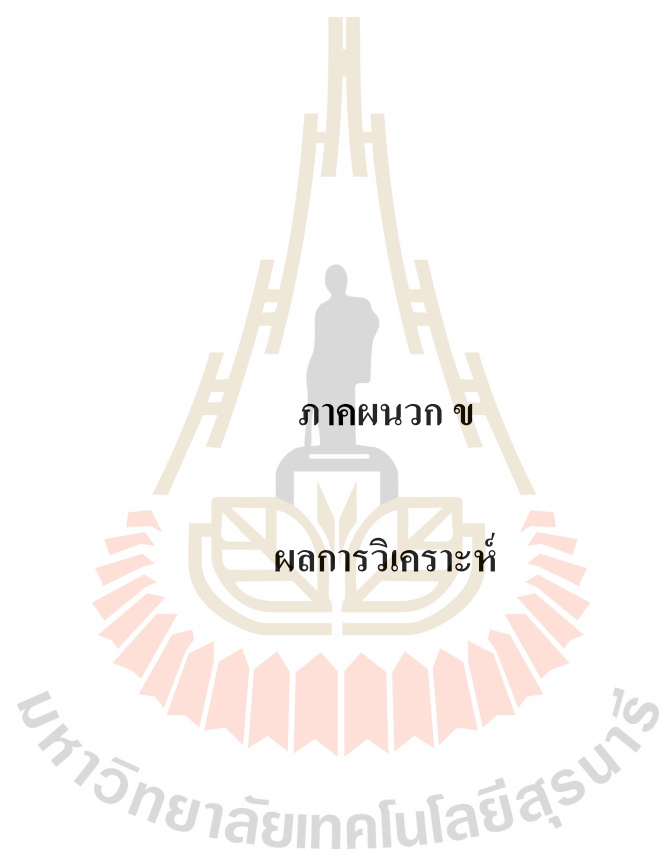
4) สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก 0.01 โมล/ลบ.ดม.

5) Phenolphthalein indicator

วิธีวิเคราะห์

- 1) สำหรับตัวอย่างน้ำที่เป็นกรดหรือด่าง ต้องปรับให้เป็นกลางก่อนด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมล/ลบ.ดม. หรือกรดซัลฟิวริก 0.5 โมล/ลบ.ดม.
- 2) ตวงตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Digestion tube ใส่ลูกแก้ว 3-4 เม็ด
- 3) เติมสารละลายบอริคบัฟเฟอร์ 25 มิลลิลิตร หยด Phenolphthalein indicator 2-3 หยด
- 4) เติม NaOH 6 M จนได้สีชมพู แล้วนำไปกลั่น
- 5) เก็บส่วนที่กลั่นออกมาได้ประมาณ 200 มิลลิลิตร ไว้ในขวดรูปชมพู่ที่มี indicating boric acid อยู่ 50 มิลลิลิตร

ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก 0.01 โมล/ลิตร



ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Candida rugosa strain ATCC 10571 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|GU144663.1|](#) Length: 2624 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 2113 to 2624 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
941 bits(509)	0.0()	511/512(99%)	0/512(0%)	Plus	Plus
Features:					
Query	1	GAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA			60
Sbjct	2113	GAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA			2172
Query	61	ATTTGAAAGCCCGCGGGCGTTGTAATTTGCAGGCGGATGTTTTGGGGCGGGCGCTGTCTA			120
Sbjct	2173	ATTTGAAAGCCCGCGGGCGTTGTAATTTGCAGGCGGATGTTTTGGGGCGGGCGCTGTCTA			2232
Query	121	CGTTCCTTGGAACAGGACGCCGAGAGGGTGAAGAGCCCGTGCATGGCGCCTCAACCG			180
Sbjct	2233	CGTTCCTTGGAACAGGACGCCGAGAGGGTGAAGAGCCCGTGCATGGCGCCTCAACCG			2292
Query	181	CGTAAACTCCGCCGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCCAAGTGGGTGGTAAAT			240
Sbjct	2293	CGTAAACTCCGCCGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCCAAGTGGGTGGTAAAT			2352
Query	241	TCCATCTAAAGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGA			300
Sbjct	2353	TCCATCTAAAGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGA			2412
Query	301	TGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTAT			360
Sbjct	2413	TGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTAT			2472
Query	361	GCGATTAGCGGCCAGCAGGAGGTGCCTTCTCGTGAAAAGGCCGTGCACCGTCTTCGGACA			420
Sbjct	2473	GCGATTAGCGGCCAGCAGGAGGTGCCTTCTCGTGAAAAGGCCGTGCACCGTCTTCGGACA			2532
Query	421	CCGTGCGCGGAGATGGCGAGGGGGCGCCTGAGGTCTGCGACTCGAGGTTGCTGGCGTAAT			480
Sbjct	2533	CCGTGCGCGGAGATGGCGAGGGGGCGCCTGAGGTCTGCGACTCGAGGTTGCTGGCGTAAT			2592
Query	481	GATTGCATACCACCGTCTTGAAACACGGACC		512	
Sbjct	2593	GATTGCATACCACCGTCTTGAAACACGGACC		2624	

รูปที่ ข.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ *Candida rugosa* SUTR 1



ที่ ศธ 5632/Rep. 1385

๑๒ ตุลาคม 2558

เรียน นางสาวรัตนา เทินสะเกษ

สาขาวิชามลพิษสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัย สำนักวิชาแพทยศาสตร์

เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

รายงานผลการทดสอบ

ห้องปฏิบัติการ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

หมายเลขใบขอรับบริการ ผวคน1314/58

รายงานผลการทดสอบลำดับที่ Repผวคน581314

วันที่รับตัวอย่างทดสอบ 22 กันยายน 2558

วันเดือนปีที่ทำการทดสอบ 22 - 25 กันยายน 2558

รายการ ที่	รายการทดสอบ	วิธีการ/เครื่องมือ ที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบ
			ชื่อตัวอย่าง : กากมันสำปะหลัง หมายเลขตัวอย่าง : ผวคนS4303/58 ลักษณะหรือสภาพตัวอย่าง : ผงสีน้ำตาล
1	Protein	Protein analysis ยี่ห้อ Foss รุ่น Kjeltac 8400	1.68 %
2	Moisture	Ash and moisture Analyzer ยี่ห้อ LECO รุ่น TGA - 701	7.44 %
3	Ash		2.26 %
4	Fat	Crude Fat analysis ยี่ห้อ Foss รุ่น 2050	0.29 %
5	Fiber	Crude Fiber analysis ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น FT12	13.51 %
6	Carbohydrate	calculated by difference*	74.82 %

หมายเหตุ *100 - (%Moisture + %Ash + %Protein + %Fat + %Fiber)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ภคินิจ คุปพิทยานันท์)
รองผู้อำนวยการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ปฏิบัติการแทนผู้อำนวยการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ผู้รับรองรายงานผลการทดสอบ

- รายงานนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ทำการทดสอบตามที่ระบุไว้ข้างต้นเท่านั้น
- ห้ามคัด ห้ามถ่ายสำเนาใบรายงานผลการทดสอบแต่เพียงบางส่วนยกเว้นทำทั้งฉบับโดยไม่ได้รับความยินยอม
เป็นลายลักษณ์อักษรจากห้องปฏิบัติการ

End of Report

FM-510-01-01/Rev.No.2/25/01/2555

หน้า 1/1

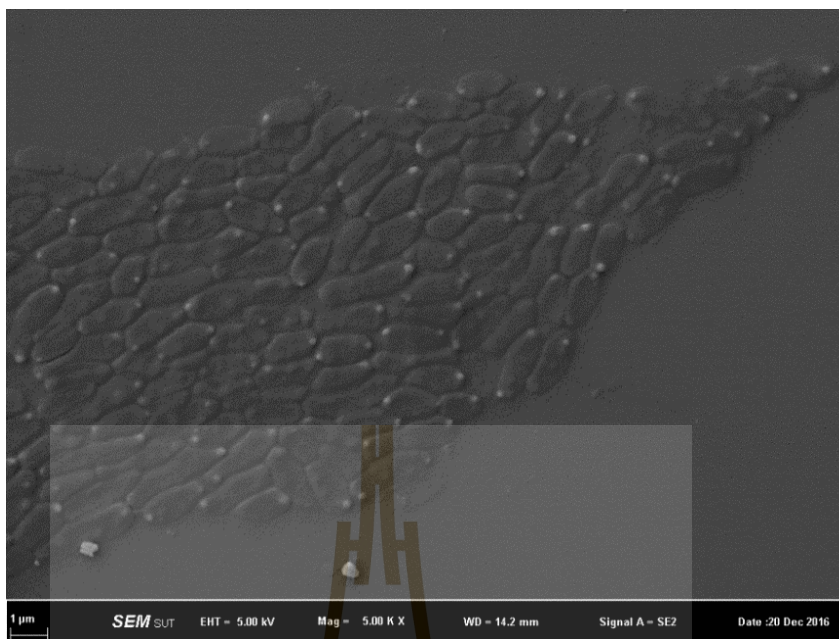


ภาคผนวก ค

ลักษณะทางสถาปัตยกรรมของเซลล์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

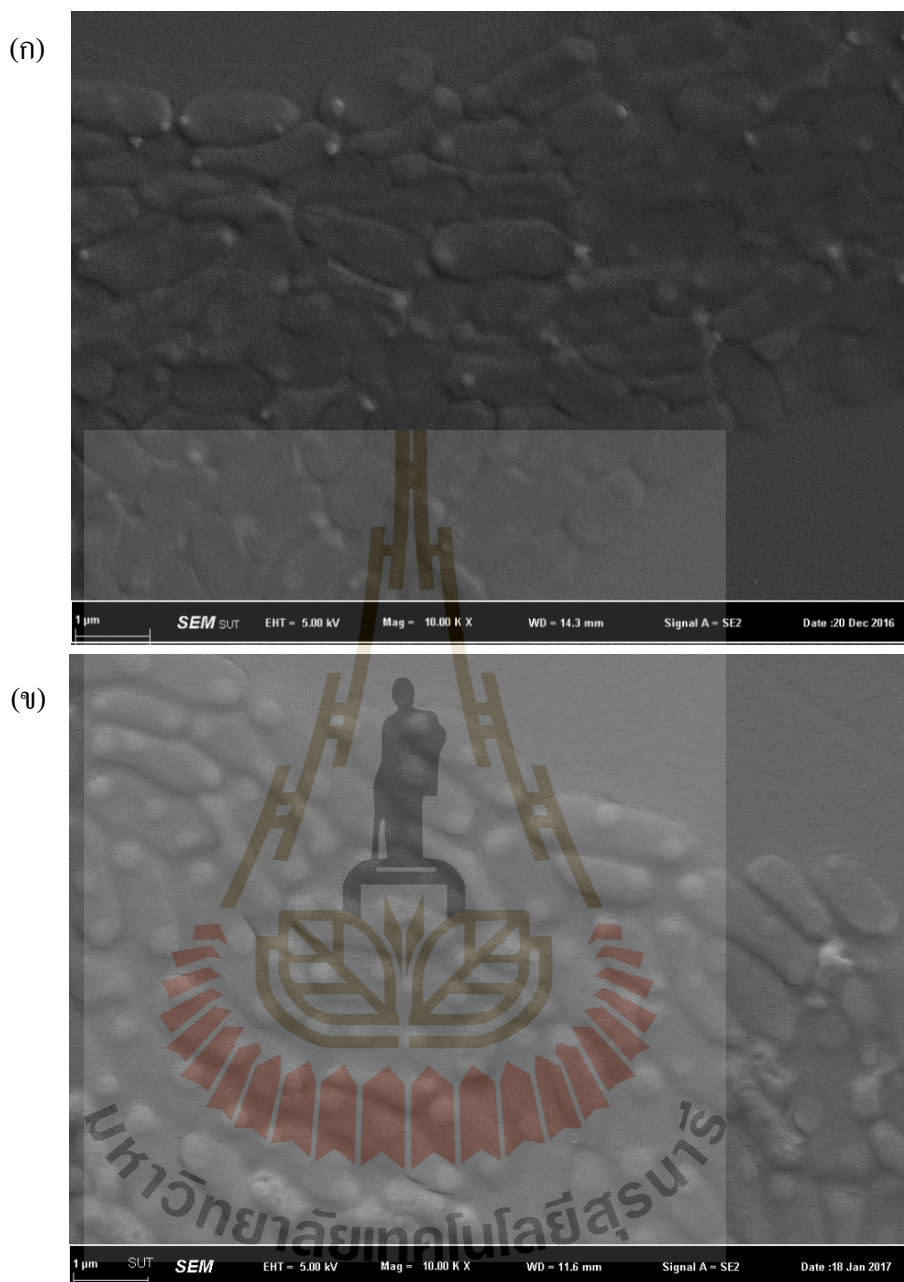
ก))



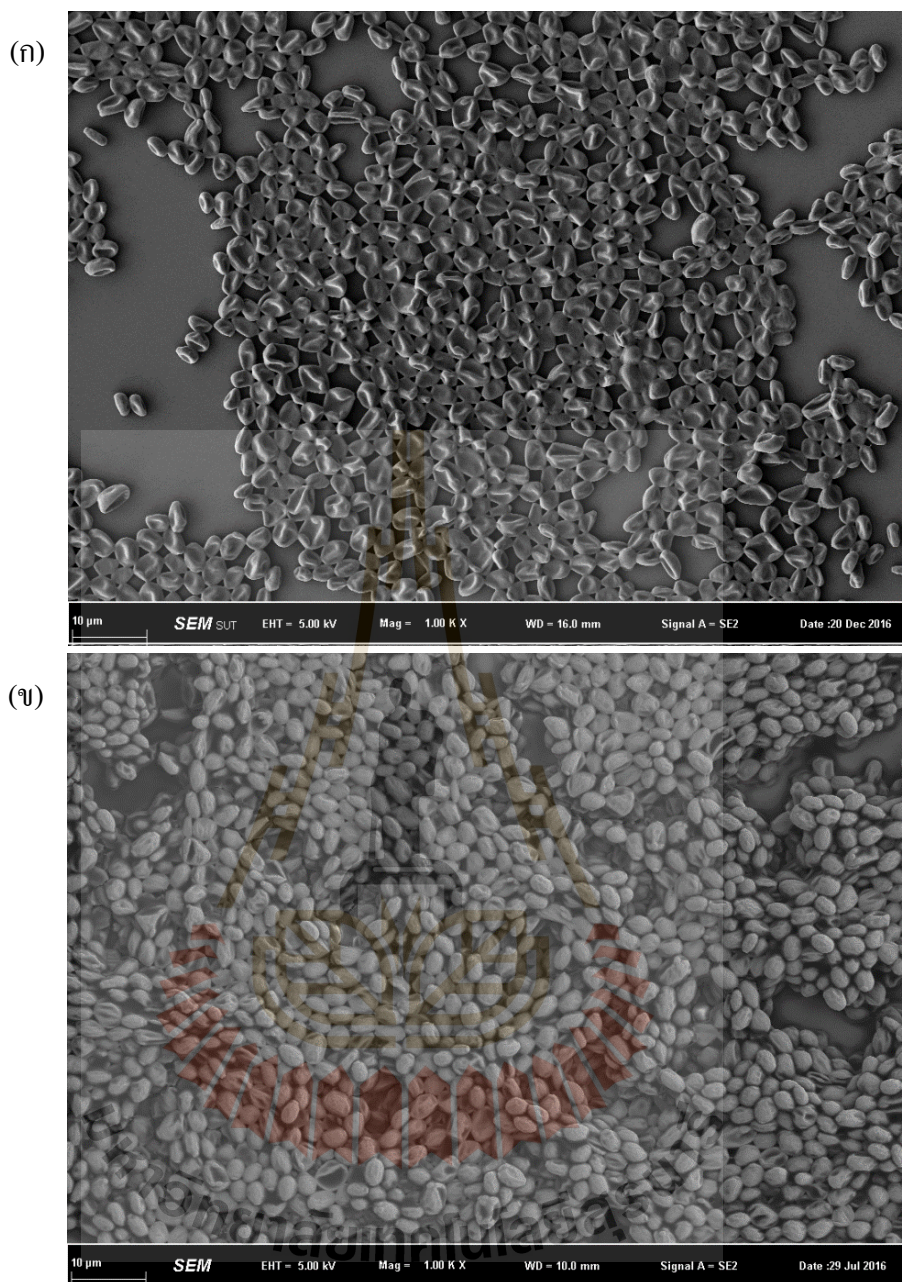
ข))



รูปที่ ค.1 ลักษณะของเซลล์ *A. tumefaciens* SUTS 1 ที่มีการสะสม PHA granule ภายในเซลล์ด้วย กล้องจุลทรรศน์ Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) A) SUTS 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน B) SUTS 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/l และกากมันสำปะหลัง 50 g/l ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

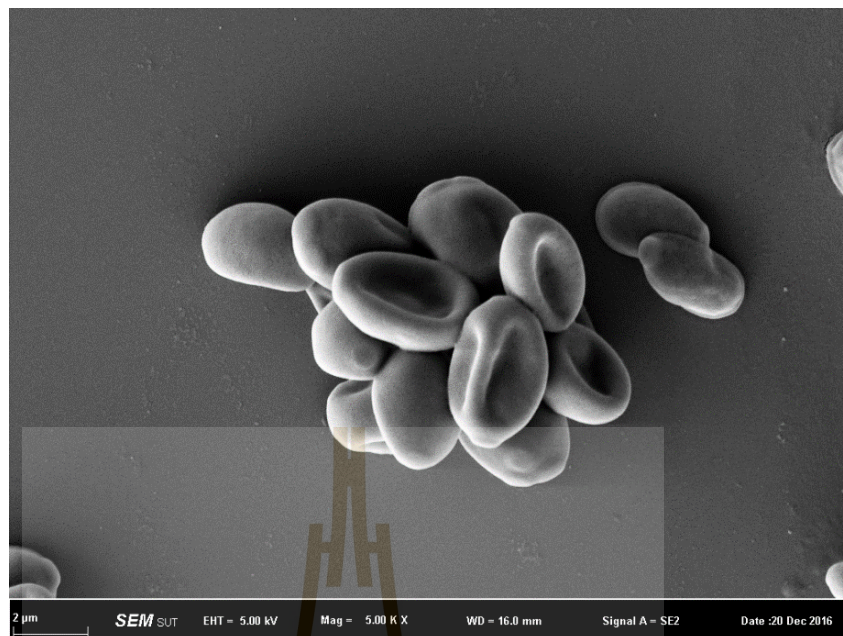


รูปที่ ค.2 ลักษณะของเซลล์ *A. tumefaciens* SUTS 1 ที่มีการสะสม PHA granule ภายในเซลล์ด้วย กล้องจุลทรรศน์ Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) A) SUTS 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน B) SUTS 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/l และกากมันสำปะหลัง 50 g/l ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า



รูปที่ ค.3 ลักษณะของเซลล์ *C.rugosa* SUTR 1 ที่มีการสะสม PHA granule ภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) A) SUTR 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน B) SUTR 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/l และกากมันสำปะหลัง 50 g/l ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

(ก)



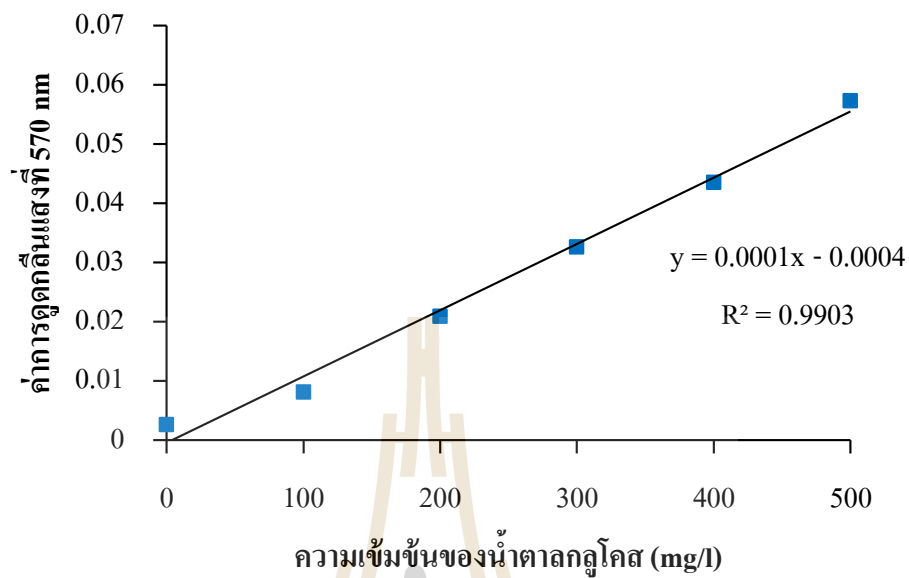
(ข)



รูปที่ ๓.๔ ลักษณะของเซลล์ *C.rugosa* SUTR 1 ที่มีการสะสม PHA granule ภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) A) SUTR 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน B) SUTR 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่จำกัดแหล่งไนโตรเจน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/l และกากมันสำปะหลัง 50 g/l ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

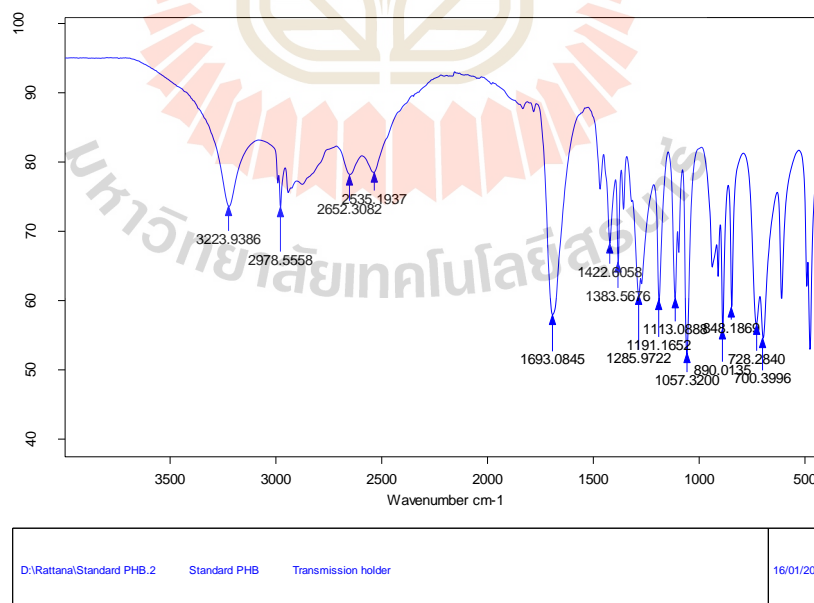


ง.1 กราฟมาตรฐาน

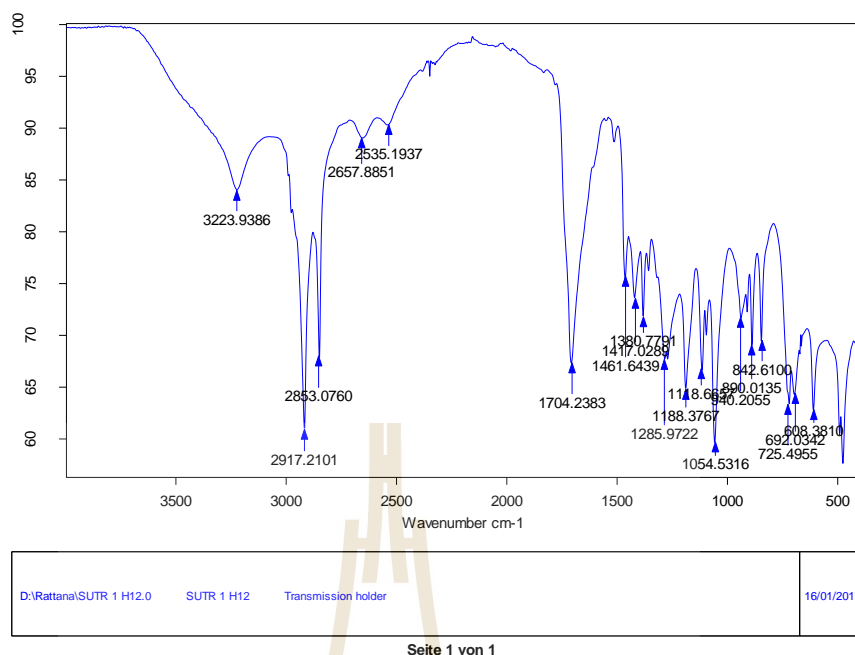


รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

ง.2 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์

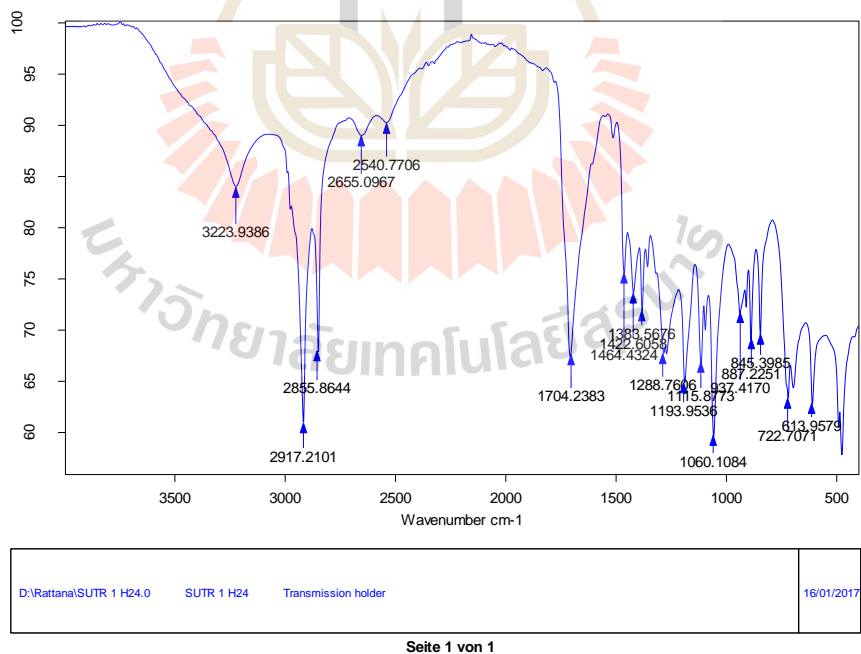


รูปที่ ง.2 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์มาตรฐานพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต Poly-3-hydroxybutyrate P(3HB)



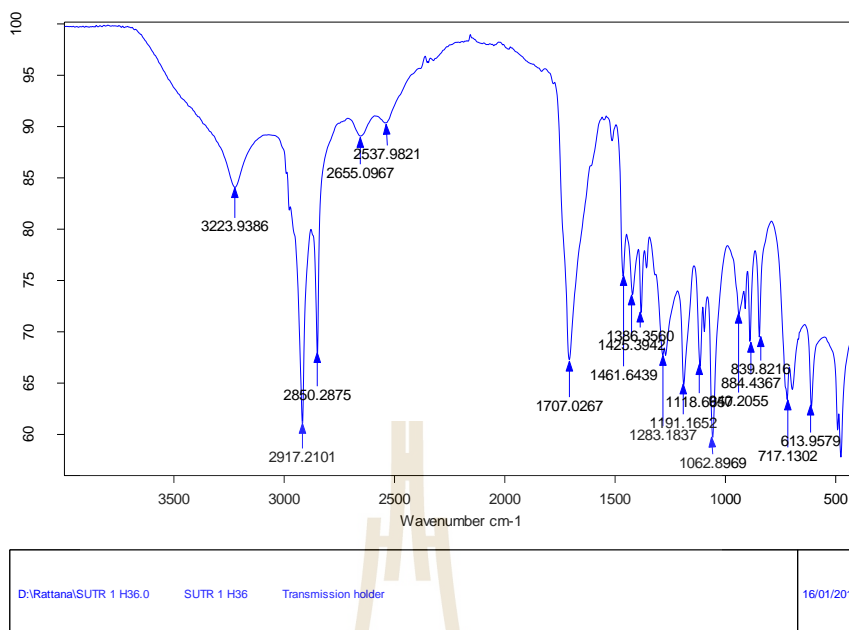
รูปที่ ง.3 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *C. rugosa* SUTR 1 ในช่วงโมเมนต์

12



รูปที่ ง.4 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *C. rugosa* SUTR 1 ในช่วงโมเมนต์

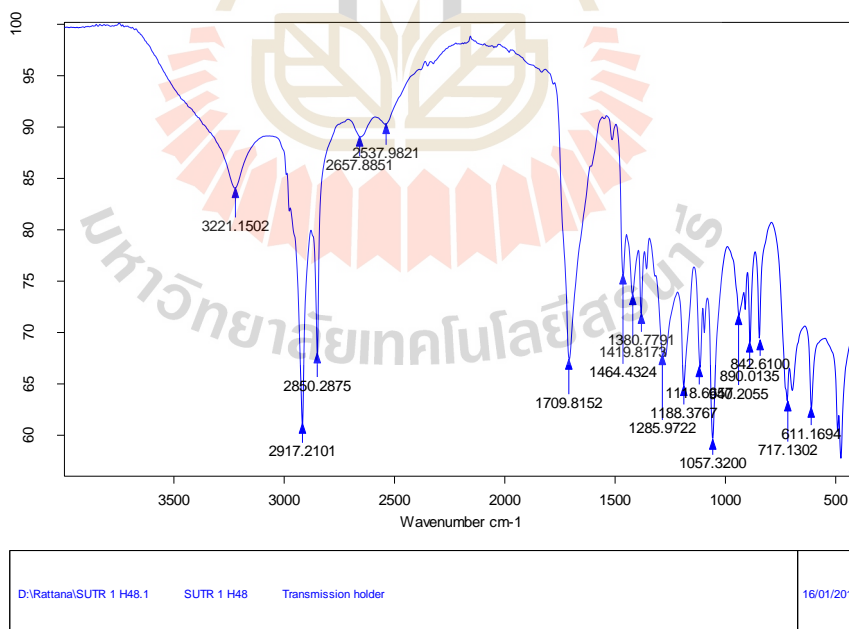
24



Seite 1 von 1

รูปที่ ๓.5 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *C. rugosa* SUTR 1 ในชั่วโมงที่

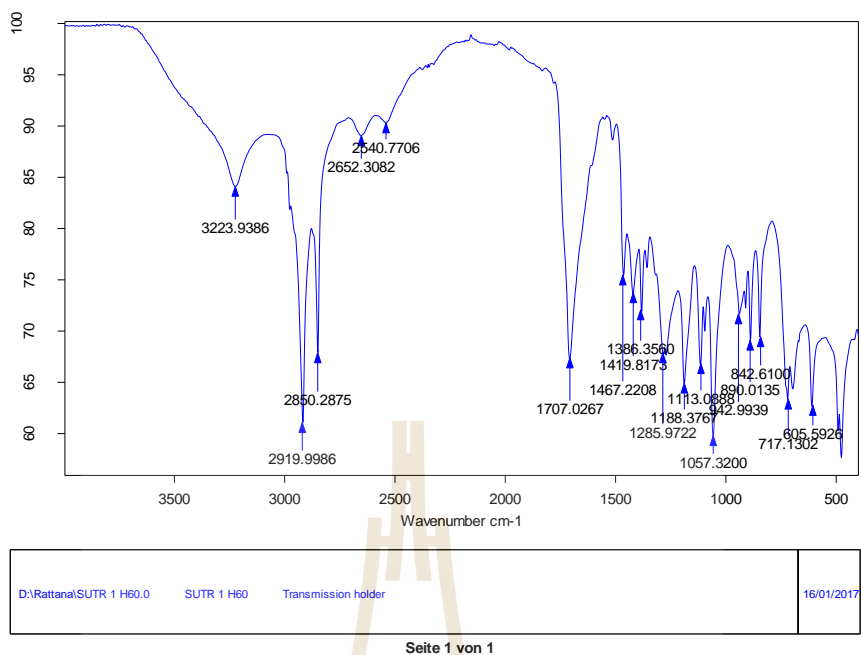
36



Seite 1 von 1

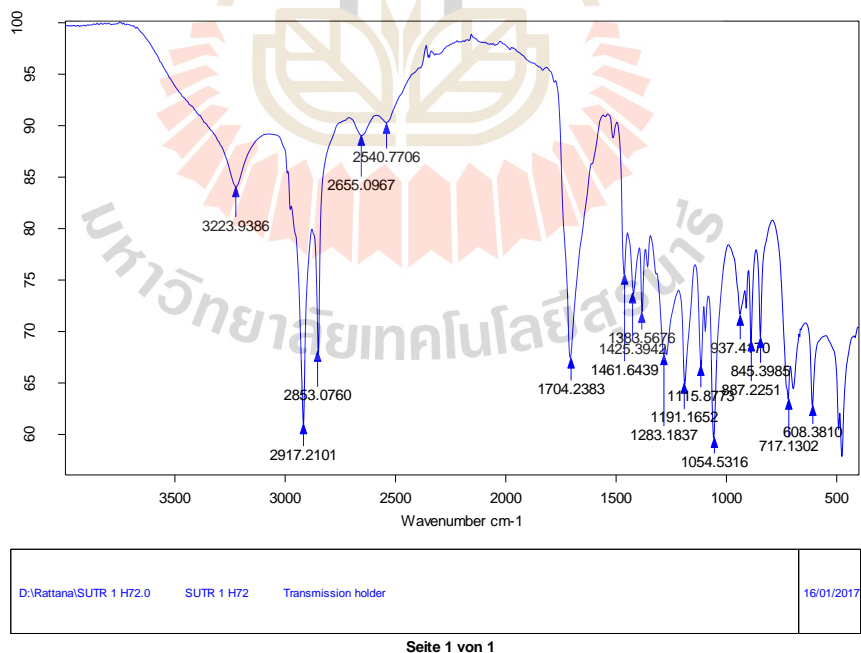
รูปที่ ๓.6 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *C. rugosa* SUTR 1 ในชั่วโมงที่

48



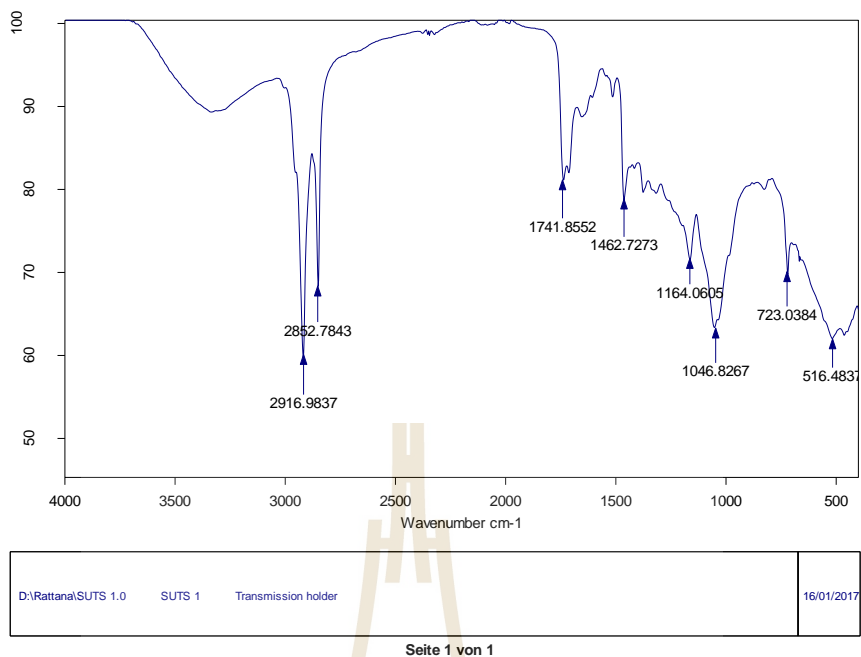
รูปที่ ๖.7 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *C.rugosa* SUTR 1 ในชั่วโมงที่

60

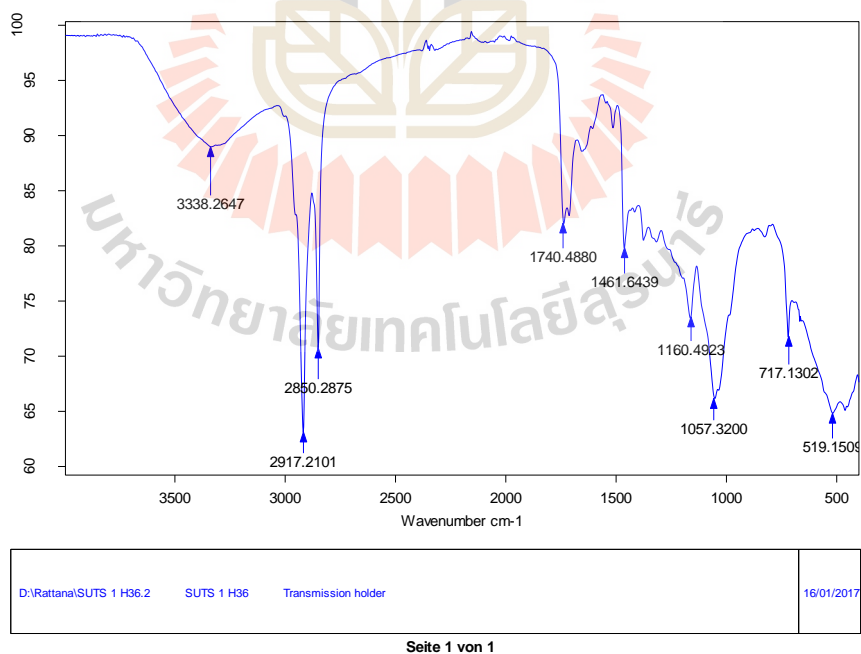


รูปที่ ๖.8 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *C.rugosa* SUTR 1 ในชั่วโมงที่

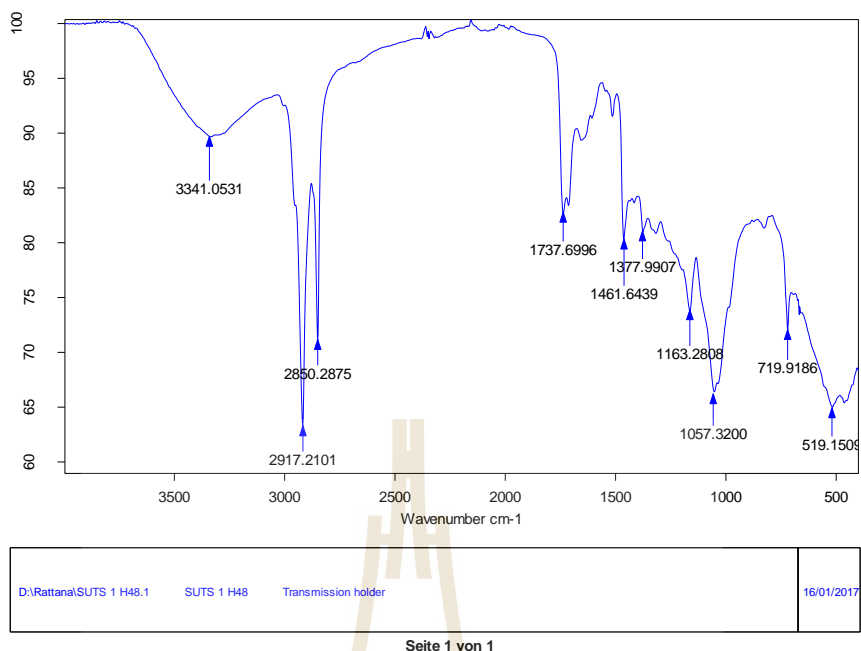
72



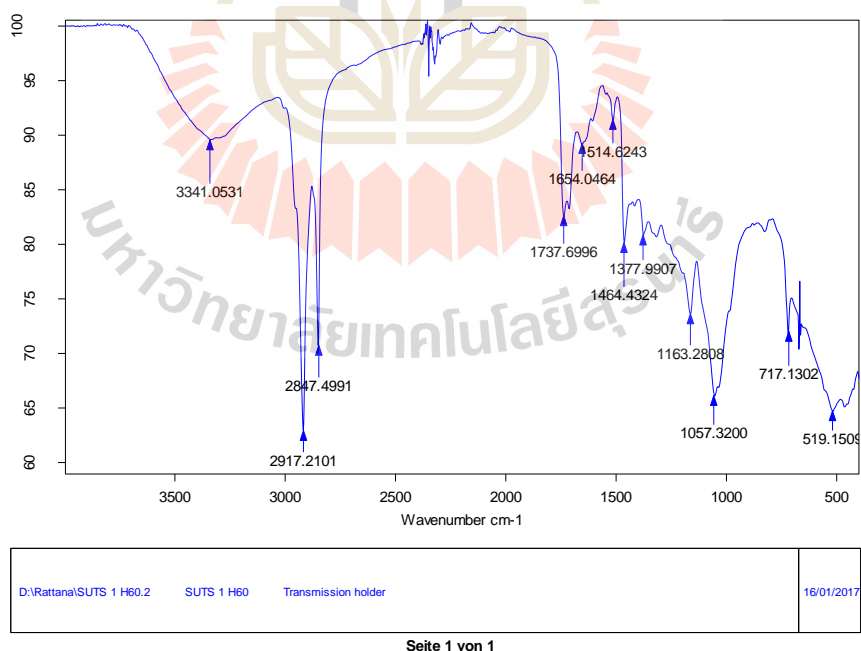
รูปที่ ง.9 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *A. tumefaciens* SUTS 1 ในชั่วโมงที่ 24



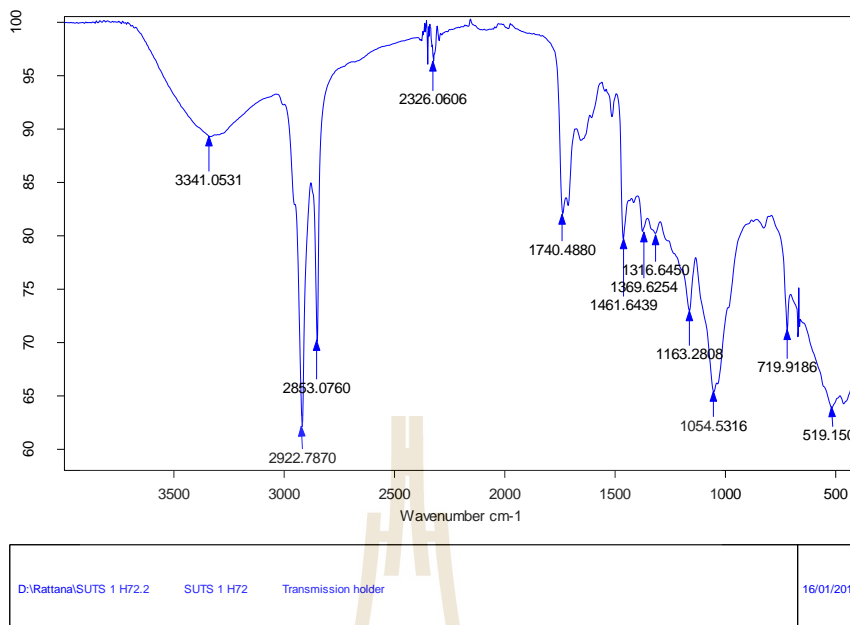
รูปที่ ง.10 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *A. tumefaciens* SUTS 1 ในชั่วโมงที่ 36



รูปที่ ง.11 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *A. tumefaciens* SUTS 1 ในชั่วโมงที่ 48

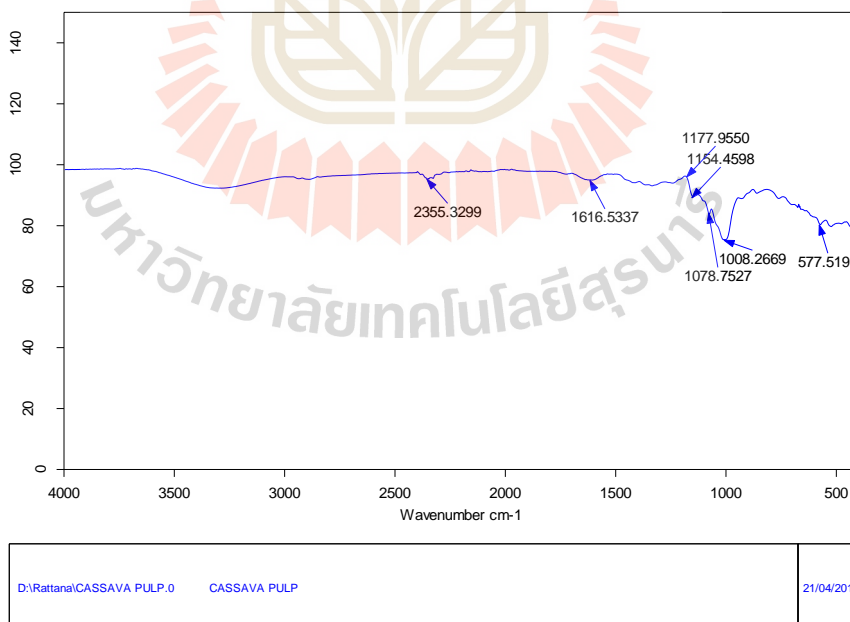


รูปที่ ง.12 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *A. tumefaciens* SUTS 1 ในชั่วโมงที่ 60



Seite 1 von 1

รูปที่ ง.13 อินฟราเรดสเปกตรัมของพอลิเมอร์ที่ได้จากการผลิตของ *A. tumefaciens* SUTS 1 ในชั่วโมงที่ 72



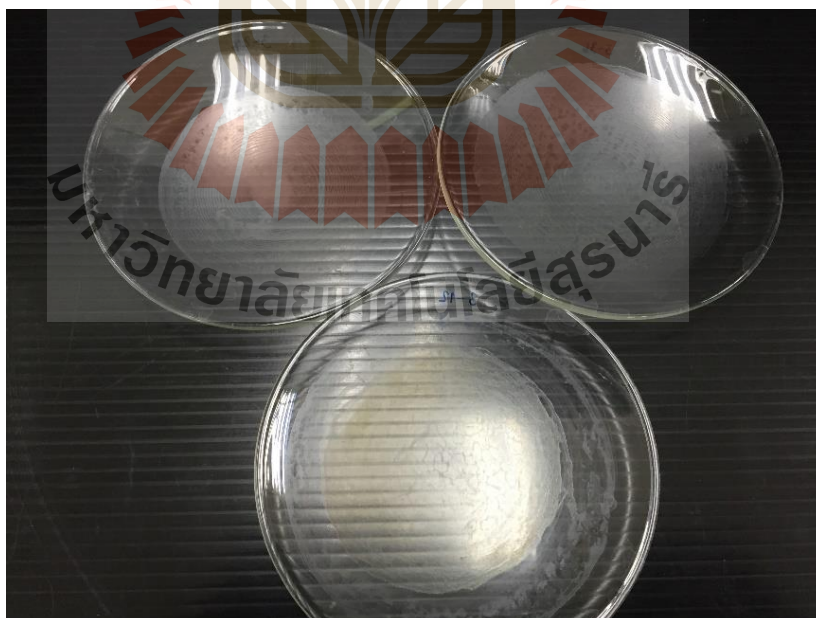
Seite 1 von 1

รูปที่ ง.14 อินฟราเรดสเปกตรัมของกากมันสำปะหลัง

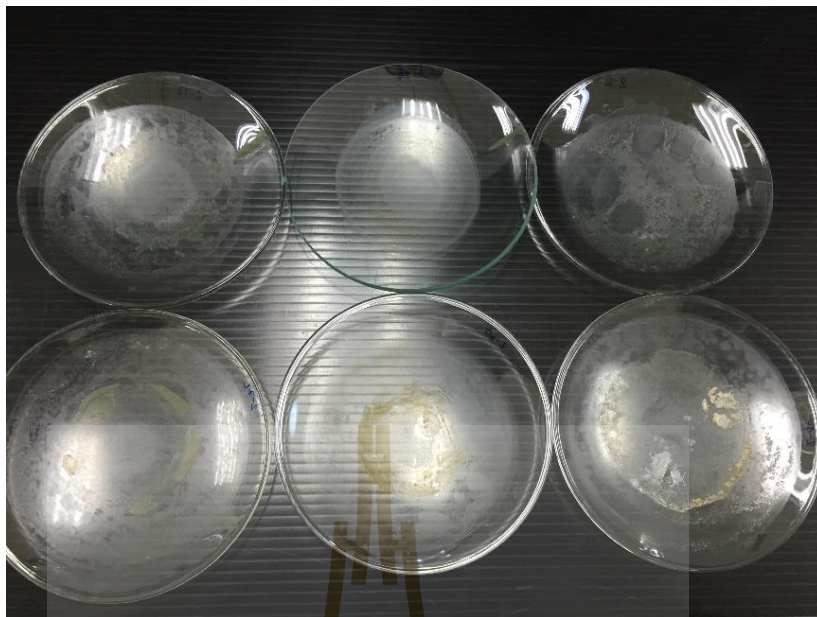




รูปที่ จ.1 การสกัดพอลิเมอร์ออกจากเซลล์ด้วย 1,2 ไดคลอโรอีเทน



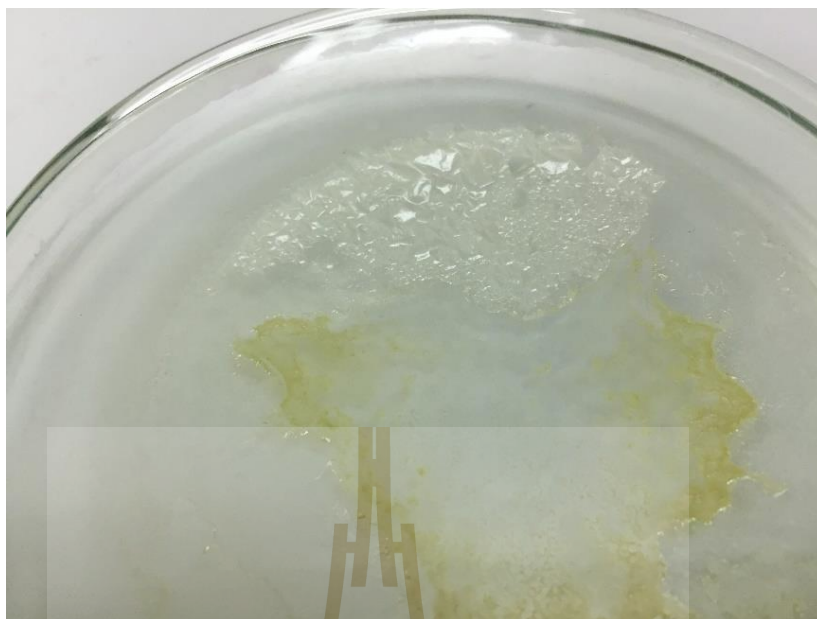
รูปที่ จ.2 ตัวอย่างผลึกพอลิเมอร์ที่สกัดจากเซลล์แบคทีเรีย *A. tumefaciens* SUTS 1 จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร



รูปที่ จ.3 ตัวอย่างผลึกพอลิเมอร์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร



รูปที่ จ.4 ตัวอย่างผลึกพอลิเมอร์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร



รูปที่ ๑.๕ ตัวอย่างผลึกพอลิเมอร์ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ *C. rugosa* SUTR 1 จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร





ภาควิชา

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

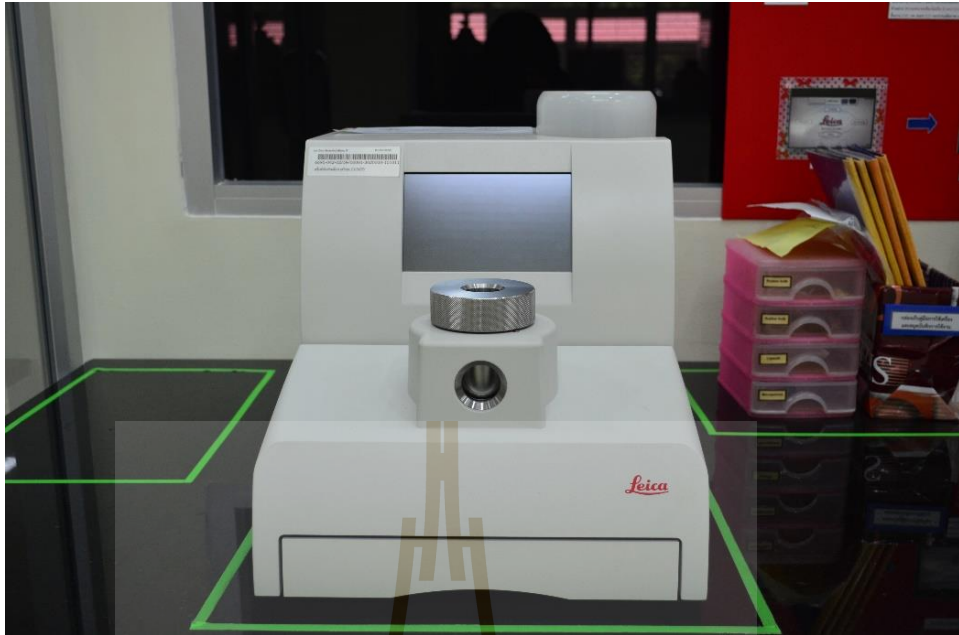
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ ๑.1 การวิเคราะห์แอมโมเนียไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) ด้วยเครื่องกลั่นไนโตรเจน (Distilling unit)



รูปที่ ๑.2 การฉาบผิวตัวอย่างด้วยโลหะทองคำ 99% ด้วยเครื่อง Vacuum sputter coater



รูปที่ ๓.3 การทำตัวอย่างให้แห้งด้วยเครื่องทำตัวอย่างแห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical dry point)



รูปที่ ๓.4 การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ Field-emission scanning electron microscope (FE-SEM)

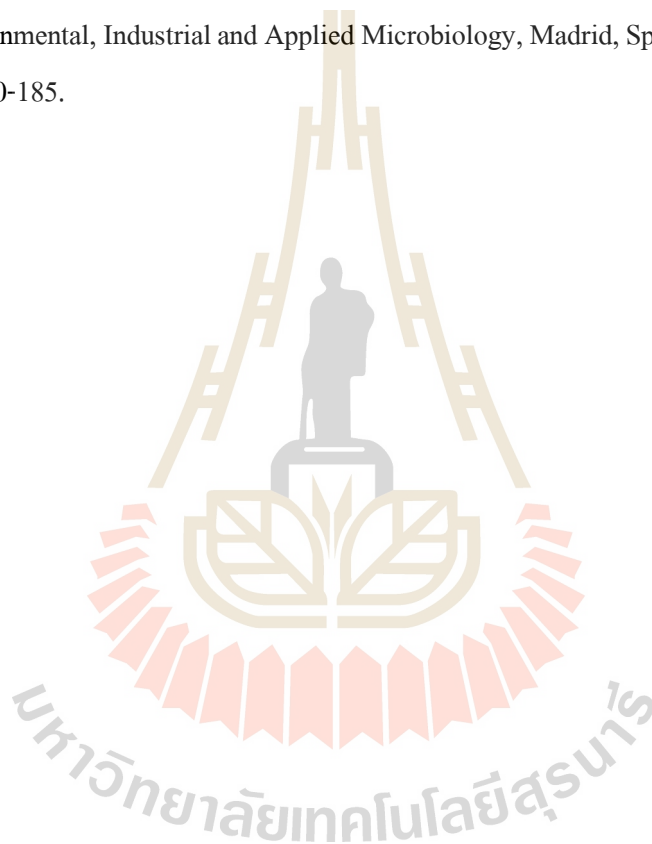


ภาคผนวก ช

บทความวิชาการที่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ระหว่างการศึกษา

รายชื่อบทความวิชาการที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

Toensakes, R., Potivichayanon, S., Tittabutr, P., and Vao-Soongnern. (2018). **Isolation and identification of biodegradable plastic polyhydroxyalkanoate-producing strains by utilizing cassava pulp as a substrate.** Exploring microorganisms: Recent advances in applied microbiology. BioMicroWorld 2017 : VII International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Madrid, Spain, October 18-20 2017, pp. 180-185.



ประวัติผู้เขียน

นางสาวรัตนา เทินสะเกษ เกิดเมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม พ.ศ. 2531 เริ่มเรียนชั้นประถมศึกษาที่โรงเรียนอ่างห้วยยาง ชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลายที่โรงเรียนราชสีมาวิทยาลัย 2 (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็นโรงเรียนอุบลรัตนราชกัญญาราชวิทยาลัย นครราชสีมา) อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2553 และหลังจากสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรี 2 ปี ได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชามลพิษสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัย สำนักวิชาสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา โดยขณะศึกษาได้ได้รับทุนวิจัยจากแหล่งทุนภายนอกจากกองทุนสนับสนุนการวิจัยและพัฒนา (OROG) และทำวิทยานิพนธ์ในหัวข้อเรื่อง การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพ (Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria by utilizing cassava pulp as a substrate for biodegradable plastic production) อีกทั้งเป็นผู้ช่วยวิจัยในโครงการวิจัยเรื่อง การกำจัดไซยาไนด์จากน้ำเสียอุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์รวมกลุ่มร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียแบบฟิซซ์-ฟิล์มเอสปีอาร์ (Removal of cyanide from industrial wastewater by mixed culture microorganisms with fixed-film sequencing batch reactor)

ผลงานวิจัย: ได้นำเสนองานวิจัย ในหัวข้อเรื่อง Isolation and identification of biodegradable plastic polyhydroxyalkanoate-producing strains by utilizing cassava pulp as a substrate. ในการประชุมวิชาการ BioMicroWorld 2017 : VII International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology ระหว่างวันที่ 18-20 ตุลาคม พ.ศ. 2560, กรุงมาดริด ประเทศสเปน