



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การศึกษาความสามารถในการใช้น้ำหมักมูลแพะเพื่อการผลิต  
พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์

Study on Potential Utilization of Fermented Goat Manure for  
Polyhydroxyalkanoate Production

โดย

ดร.ณัฐพล ถนัดช่างแสง

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2556



1.55%) สุกถ่ายเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* ด้วยน้ำหมักมูลแพะที่ได้จากการหมักแบบไร้อากาศในปริมาณ 10%-80% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะที่ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มากที่สุด โดยแบคทีเรียชนิดนี้จะให้ผลผลิต PHA โดยเฉลี่ยที่ 5 mg/L/hr สามารถสะสม PHA ได้ 9.38% ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 3.84 g/L และมีปริมาณโคมอนอเมอร์ 3-hydroxyvalerate ประมาณ 6.3% ซึ่งคำนวณแล้วให้ผลผลิต  $Y_{PHA/VFA}$  คือ 0.001 g-PHA/g-VFA ดังนั้นจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ของเหลือทิ้งจากฟาร์มปศุสัตว์แพะเป็นอาหารได้ โดยปริมาณผลผลิตและคุณสมบัติของพลาสติกชีวภาพที่ได้จากน้ำหมักมูลแพะในการทดลองนี้มีแนวโน้มที่จะสามารถนำงานวิจัยนี้ไปต่อยอดในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต

มหาวิทยาลัยรังสิต  
Rangsit University

Title : Study on Potential Utilization of Fermented Goat Manure for Polyhydroxyalkanoate Production

Researcher : Dr.Nuttapol Tanadchangsaeng

Institution : Faculty of Biotechnology, Rangsit University

Year of Publication : 2014

Publisher : Rangsit University

No. of page : 79 pages

Copyright : Rangsit University

Sources : Research Institute of Rangsit University / Library of Rangsit University / National Library of Thailand

Keywords: Polyhydroxyalkanoate, Bioplastics, Goat manure, Volatile fatty acids, Fermentation technology

### Abstract

Nowadays, polyhydroxyalkanoate bioplastics (PHAs) can be synthesized from different kinds of organic matters such as sugars or plant oils by biological fermentation process. PHAs can be storage in various microorganisms such as *Alcaligenes sp.* and *Pseudomonas sp.* However, PHA process has a high production cost than the process of conventional synthetic polymers. Thus, in this research, the production of PHAs was investigated by feeding fermented goat manure slurry containing volatile fatty acids (VFAs) as raw materials for substrate utilization. From the study of potential production of VFAs from goat manure anaerobic fermentation, we found that with 1:2 mixture, the amount of VFAs was at acetate 2.3 g/L, butyrate 2.1 g/L and propionate 0.3 g/L, which contained VFA yield or  $Y_{VFA/TVS}$  0.122 g-VFA/g-TVS that was similar to VFA yield from cow. This VFA production was thus considered to be adequate for further PHA production. After cultivating *Alcaligenes eutrophus*, *Cupriavidus necator* and *Pseudomonas oleovorans* with mixed VFAs (all three acids), we found that *Cupriavidus necator* can be accumulated highest amount of PHAs with substantial growth at 3.75% content and 2.14 g/L DCW (dried-cell weight), respectively. This strain also can be grown and stored with all the VFAs such as propionic acid (1.93 g/L DCW, 1.65%), butyric acid (1.75 g/L DCW, 2.75%) และ acetic acid (1.12 g/L DCW, 1.55%). Moreover, *Cupriavidus necator* can effectively grow on

50% fermented goat-manure from 1:2 mixture which produced 9.38% PHA content in 3.84 g/L dry cell density with PHA copolymer containing 93.7% of 3-hydroxybutyrate and 6.3% of 3-hydroxyvalerate. In addition, PHA productivity and PHA yield or  $Y_{\text{PHA/VFA}}$  of this condition was at 5 mg/L/hr and 0.001 g-PHA/g-VFA, respectively, which have a potential to develop for industrial application in the near future. It can be claimed that in this study for the first time as our knowledge that PHAs can be biosynthesized from livestock organic wastes such as fermented goat-manure by *Cupriavidus necator* strain isolated in Thailand.

มหาวิทยาลัยรังสิต  
Rangsit University

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานผลงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี ผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ซึ่งได้รับการจัดสรรงบประมาณการวิจัย ประจำปี 2556 ในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ คณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้การอนุเคราะห์อุปกรณ์การทดลองและห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือรวม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่สำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์และวิเคราะห์ทางเคมี ขอขอบคุณ นักศึกษา คณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต ดังนี้คือ นายณัฐพล ศิรินภัสโกคิน นายพรชัย มิชพล และ น.ส. เจมจิรา บุญยีน ที่ได้ช่วยทำงานวิจัยอย่างต่อเนื่องตลอดโครงการวิจัย และขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องอื่นๆทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนจนงานวิจัยนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

ณัฐพล ถนัดช่างแสง  
กันยายน 2557

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ณ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	3
ขอบเขตของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
<b>บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>5</b>
<b>บทที่ 3 ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย</b>	<b>31</b>
แผนการวิจัย	31
อุปกรณ์และสารเคมี	31
วิธีการทดลอง	33
การตรวจวิเคราะห์	35
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัย</b>	<b>40</b>
การทดลองผลิตกรดอินทรีย์ระเหยง่ายจากมูลแพะด้วยการหมักแบบไร้อากาศ	40
การคัดเลือกสายพันธุ์และการศึกษาผลของVFAต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์	51
การศึกษาผลของน้ำหมักมูลแพะต่อการเติบโตของจุลินทรีย์และการสะสมPHA	57
<b>บทที่ 5 สรุป และข้อเสนอแนะ</b>	<b>63</b>
สรุปผลการวิจัย	63
ข้อเสนอแนะ	64
<b>บรรณานุกรม</b>	<b>65</b>
<b>ภาคผนวก</b>	<b>71</b>
ประวัติผู้วิจัย	76

## สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	เปรียบเทียบคุณสมบัติของ PHB กับ PP	13
ตารางที่ 2	คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ PHA เมื่อเปรียบเทียบกับเทอร์โมพลาสติกทั่วไป	14
ตารางที่ 3	การผลิต PHA ของจุลินทรีย์บริสุทธิ์และใช้กลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบตะกอนเร่ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน	21
ตารางที่ 4	ค่าการวิเคราะห์คุณลักษณะต่างๆในมูลแพะ	40
ตารางที่ 5	ค่าเปรียบเทียบความเป็นกรดต่างของของเหลวในระบบถังหมักกรด	41
ตารางที่ 6	ค่าเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแข็งทั้งหมดระหว่างอัตราส่วน 1:2 และ 1:3	42
ตารางที่ 7	ค่าเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแข็งระเหยทั้งหมดระหว่างอัตราส่วน 1:2 และ 1:3	43
ตารางที่ 8	เปรียบเทียบความเข้มข้นของปริมาณ COD ระหว่างอัตราส่วนที่ 1:2 และ 1:3	44
ตารางที่ 9	เปรียบเทียบความเข้มข้นปริมาณ BOD ระหว่างอัตราส่วนที่ 1:2 และ 1:3	45
ตารางที่ 10	เปรียบเทียบปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วนที่ 1:2 และ 1:3	45
ตารางที่ 11	แสดงค่าความเข้มข้นของปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2	47
ตารางที่ 12	แสดงค่าความเข้มข้นของปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:3	48
ตารางที่ 13	แสดงค่าความเข้มข้นของปริมาณ VFA ที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2 เปรียบเทียบกับปริมาณ VFA ที่ผลิตได้จากการหมักมูลโคที่ระยะเวลา 6 และ 11 เดือน	50
ตารางที่ 14	แสดงค่าความหนาแน่นของเซลล์ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm และ pH หลังจากป้อนด้วยกรดอินทรีย์ที่ผสมของโพรพิโอเนต 1.5 g/L อะซิเตต 1.5 g/L และ บิวทิเรต 1.5 g/L	52



สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 15	52
แสดงปริมาณ PHAรวม ต่อน้ำหนักเซลล์ และปริมาณโมนอเมอร์ ต่อ PHA รวม หลังจากบ่มด้วยกรดอินทรีย์ที่ผสมของโพรพีโอเนต 1.5 g/L อะซิเตต 1.5 g/L และ บิวทิเรต 1.5 g/L	
ตารางที่ 16	55
แสดงค่าความหนาแน่นของเซลล์ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm และ pH ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Cupriavidus necator</i> หลังจากบ่มด้วยกรดอินทรีย์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 4.5 g/L	
ตารางที่ 17	55
แสดงปริมาณ PHAรวม ต่อน้ำหนักเซลล์ และปริมาณโมนอเมอร์ ต่อ PHA รวม ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Cupriavidus necator</i> หลังจากบ่มด้วยกรดอินทรีย์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 4.5 g/L	
ตารางที่ 18	58
แสดงค่าความหนาแน่นของเซลล์ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm และ pH ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Cupriavidus necator</i> หลังจากบ่มด้วยน้ำหมักมูลแพะในปริมาณ 10%-80% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ	
ตารางที่ 19	59
แสดงปริมาณ PHAรวม ต่อน้ำหนักเซลล์ และปริมาณโมนอเมอร์ ต่อ PHA รวม ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Cupriavidus necator</i> หลังจากบ่มด้วยน้ำหมักมูลแพะในปริมาณ 10%-80% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ	
ตารางที่ 20	61
แสดงปริมาณ PHAรวม ต่อน้ำหนักเซลล์ ปริมาณ 3HVโมนอเมอร์ต่อ PHAรวม และผลผลิต PHA yield ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Cupriavidus necator</i> หลังจากบ่มด้วยน้ำหมักมูลแพะในปริมาณ 50% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับปริมาณ PHA ที่ผลิตได้จากการหมักมูลโคที่ระยะเวลา 6 และ 11 เดือน	

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	กระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากมูลแพะ	2
ภาพที่ 2	เม็ดพลาสติกและขวดพลาสติก	6
ภาพที่ 3	การย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ	8
ภาพที่ 4	กระบวนการย่อยสลายวัสดุ PHA ในสภาวะตามธรรมชาติ	9
ภาพที่ 5	โครงสร้างของ Polyhydroxyalkanoates (PHAs)	9
ภาพที่ 6	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Polyhydroxyalkanoates (PHAs) และ PHA แกรนูลที่ถูกสะสมในเซลล์แบคทีเรีย	10
ภาพที่ 7	ไหมละลายที่ผลิตขึ้นจาก PHA	12
ภาพที่ 8	ผ้าตาข่ายสำหรับงานผ่าตัด (Surgical Mesh) ที่ผลิตขึ้นจาก PHA	12
ภาพที่ 9	ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของ PHA โคพอลิเมอร์	15
ภาพที่ 10	PHA แกรนูล	17
ภาพที่ 11	กระบวนการการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตและการย่อยสลายในแบคทีเรีย	18
ภาพที่ 12	แบบจำลองกลไกการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ในช่วงการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันที่มีขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรีย	19
ภาพที่ 13	มูลแพะ	30
ภาพที่ 14	ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกและปรับสภาพในมูลแพะ	35
ภาพที่ 15	การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณPHA	37
ภาพที่ 16	กราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณหาปริมาณ PHB ในเซลล์แบคทีเรีย	39
ภาพที่ 17	GC โครมาโตแกรม ที่แสดง peak ของ 3HB methyl ester และ benzoic acid standard	39
ภาพที่ 18	กราฟเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณของแข็งทั้งหมดระหว่าง 1:2 และ 1:3	42
ภาพที่ 19	กราฟเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณของแข็งระเหยง่ายทั้งหมดระหว่างอัตราส่วน 1:2 และ 1:3	44
ภาพที่ 20	กราฟเปรียบเทียบปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วนที่ 1:2 และ 1:3	46

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ 21	HPLC chromatogram ของ VFAs ชนิดต่างๆที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2 ของการหมักในวันที่ 30	47
ภาพที่ 22	เปรียบเทียบความเข้มข้นของกรด Acetic acid ที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2 และ 1:3	49
ภาพที่ 23	เปรียบเทียบความเข้มข้นของกรด Propionic acid ที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2 และ 1:3	49
ภาพที่ 24	เปรียบเทียบความเข้มข้นของกรด Butyric acid ที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2 และ 1:3	50
ภาพที่ 25	แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ PHA รวมต่อน้ำหนักเซลล์ของจุลินทรีย์ทั้ง 3 สารพันธุ์ หลังจากบ่มด้วยกรดอินทรีย์ที่ผสม (โพรพิโอเนต 1.5 g/L อะซิเตต 1.5 g/L และ บิวทิเรต 1.5 g/L)	53
ภาพที่ 26	แสดงภาพการติดสี Sudan black B ของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดเพื่อแสดงความเป็นไปได้ของปริมาณ PHA ที่สะสมภายในเซลล์	54
ภาพที่ 27	แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ PHA รวมต่อน้ำหนักเซลล์ ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Cupriavidus necator</i> หลังจากบ่มด้วยกรดอินทรีย์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 4.5 g/L	56
ภาพที่ 28	แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Cupriavidus necator</i> หลังจากบ่มด้วยน้ำหมักมูลแพะในปริมาณ 10%-80% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระยะเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง	57
ภาพที่ 29	แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ PHA รวมต่อน้ำหนักเซลล์ ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Cupriavidus necator</i> หลังจากบ่มด้วยน้ำหมักมูลแพะในปริมาณ 10%-80% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ	60
ภาพที่ 30	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ต่อ PHA รวม ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Cupriavidus necator</i> หลังจากบ่มด้วยน้ำหมักมูลแพะในปริมาณ 10%-80% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ	60

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ 31	แสดงน้ำหมักมูลแพะแบบไร้อากาศที่ผ่านการกรองแล้ว	71
ภาพที่ 32	เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	72
ภาพที่ 33	Column สำหรับ HPLC	72
ภาพที่ 34	การสกัด PHAs จากเซลล์แห้ง	74
ภาพที่ 35	มูลแพะสดจากฟาร์มปศุสัตว์	75
ภาพที่ 36	ระบบหมักกรด 1:2 และ 1:3	75

มหาวิทยาลัยรังสิต  
Rangsit University

## บทที่ 1

### บทนำ

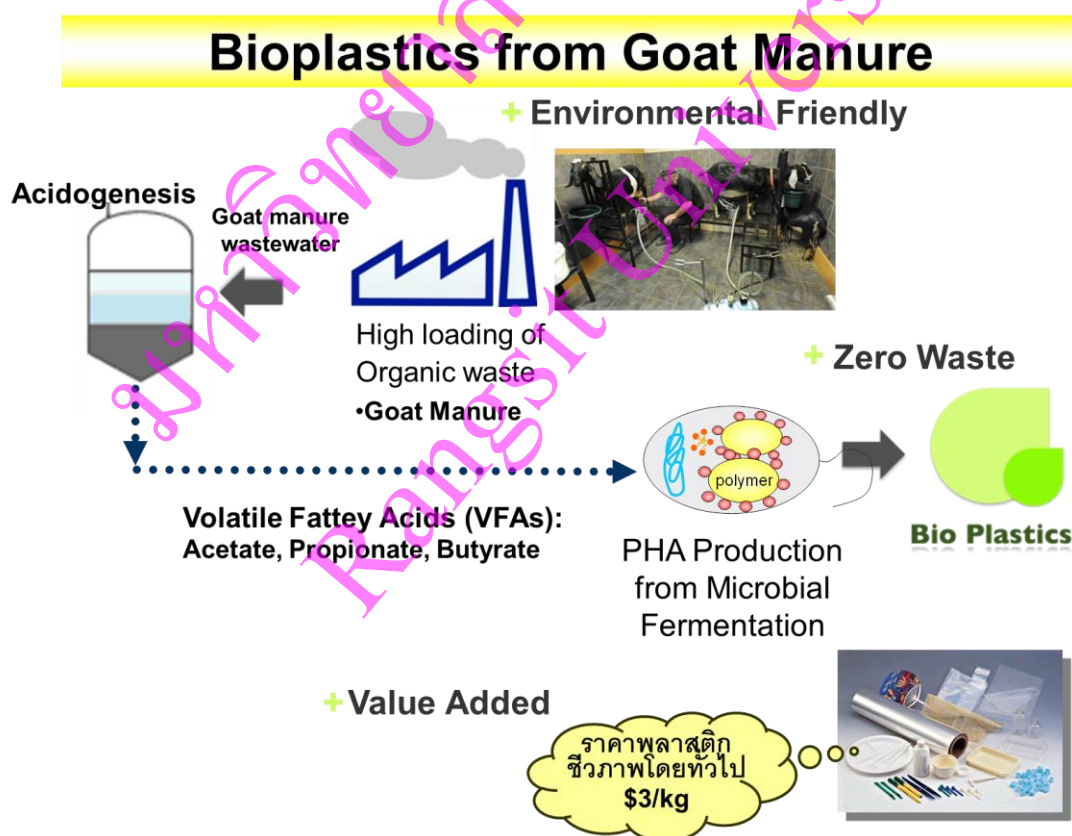
#### ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี มีบทบาทสำคัญในการผลิตมาเป็นสินค้าอุปโภคและบริโภคเนื่องจากคุณสมบัติที่ดีในหลายประการ เช่น ขวดพลาสติกบรรจุน้ำ ถูกร้อน ถูเย็น ถังน้ำ เป็นต้น เนื่องจากพลาสติกมีคุณสมบัติทนทานต่อสภาวะต่างๆ มีความเหนียว ทนต่อแรงฉีกและแรงดึง กันน้ำได้ มีน้ำหนักเบายืดหยุ่นได้ดี มีอายุการใช้งานนานนอกจากนี้ พลาสติกยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่ซื้อได้ง่าย ราคาถูก และสะดวกต่อการใช้งาน แต่พลาสติกเป็นผลิตภัณฑ์ที่ย่อยสลายยากตามธรรมชาติเนื่องจากพลาสติกเป็นสารที่คงทนมีการยึดเกาะกันอย่างเหนียวแน่นส่งผลให้พลาสติกย่อยสลายตัวช้ามาก พลาสติกเหล่านั้นเมื่อผ่านการใช้งานแล้วจะก่อให้เกิดปัญหาขยะพลาสติกซึ่งเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมหนึ่งที่ส่งผลต่อสภาพแวดล้อมธรรมชาติ โดยการเผาไหม้ของพลาสติกบางชนิดทำให้เกิดควันพิษในอากาศ อีกทั้งหากใช้วิธีกำจัดพลาสติกโดยการฝังกลบนั้นอาจก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ อาทิเช่น ส่งผลต่อสภาพดินบริเวณนั้นทำให้ไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ยังมีปัญหาเกี่ยวกับพื้นที่ที่ใช้ในการฝังกลบพลาสติกไม่เพียงพอ และมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มขึ้นอีกในอนาคต นักวิทยาศาสตร์จึงมีความพยายามที่จะแสวงหาแหล่งวัตถุดิบใหม่ที่สามารถใช้ทดแทนวัตถุดิบทางปิโตรเคมีได้ โดยมีการพัฒนาผลิตพลาสติกชีวภาพ (bioplastic) หรือพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ (biodegradable plastic) ซึ่งหมายถึงพลาสติกที่ผลิตขึ้นจากวัสดุธรรมชาติ สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ (biodegradable) ช่วยลดปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการผลิตพลาสติกชีวภาพที่ผลิตจากวัสดุธรรมชาติและสามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาทดแทนการใช้พลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบจากปิโตรเคมี

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate; PHA) โดย PHA สามารถสังเคราะห์ได้จากวัสดุสารอินทรีย์หลายชนิด เช่น น้ำตาล หรือน้ำมันพืช ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นิยมกันในปัจจุบัน ด้วยกระบวนการหมักทางชีวภาพ และถูกสะสมไว้ในเซลล์จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ อาทิเช่น *Pseudomonas sp.* และ *Alcaligenes sp.* เป็นต้น แล้วจึงถูกสกัดออกมาได้โดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม โดย PHA มีแนวโน้มที่จะสามารถประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆมากมาย เช่น ด้านการแพทย์ (ไหมเย็บแผล วัสดุปิดแผล หรืออุปกรณ์ยึดกระดูก) ด้านการเกษตร (ภาชนะปลูกพืช หรือวัสดุคลุมดิน) ด้านการบรรจุภัณฑ์ และด้านเส้นใย เป็นต้น

อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิต PHA มีต้นทุนที่สูงกว่าต้นทุนที่ใช้ในการผลิตพลาสติกสังเคราะห์มาก เนื่องจากวัตถุดิบในการผลิตส่วนใหญ่เป็นผลผลิตจากกระบวนการผลิตน้ำตาล หรือ

น้ำมันพืช ซึ่งมีราคาแพงและยังมีความต้องการของตลาดเพื่อบริโภค อีกเหตุผลหนึ่งมาจากอัตราการผลิตPHAที่ได้ต่ำ เนื่องจากศักยภาพในการผลิตของจุลินทรีย์และวิธีการเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม มีต้นทุนสูง ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงในเชิงพาณิชย์และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาเกี่ยวกับการนำวัตถุดิบที่มีราคาถูกที่เป็นของเสียจากการทำปศุสัตว์ คือ มูลแพะ ซึ่งเป็นของเสียที่ทำให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม ทั้งก่อให้เกิดกลิ่นเหม็น และมีผลทำให้น้ำในคูลองเกิดการเน่าเสียได้ โดยงานวิจัยนี้จะนำเอามูลแพะมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile Fatty Acids, VFAs) ซึ่งเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาการหมักสารอินทรีย์ในสภาพขาดออกซิเจนหรือที่เรียกกันว่าขั้นตอนการสร้างกรด (Acidogenesis) โดย VFAs คือ กรดอินทรีย์ที่มีโมเลกุลเล็กซึ่งประกอบไปด้วย อะซิเตต (Acetic acid) โพรพิโอเนต (Propionic acid) บิวทิเรต (Butyric acid) โดยหลังจากนั้น VFAs ซึ่งผลิตได้จากการหมักมูลแพะในสภาวะไร้ออกซิเจนมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานที่สำคัญในการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดPHAได้ (ดังรูปที่ 1)



รูปภาพที่ 1 กระบวนการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากมูลแพะ

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเป็นเทอร์โมพลาสติกที่มีสมบัติทางวัสดุที่โดดเด่นมีความยืดหยุ่นสูง และทนความร้อน สามารถประยุกต์ใช้แทนพลาสติกสังเคราะห์สำหรับผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ เส้นใย และอาหารได้ การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับการผลิต PHA จาก VFAs ได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงเป็นความท้าทายของงานวิจัยชิ้นนี้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีขึ้นเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการเกิดกรดอินทรีย์ระเหยง่ายจากมูลแพะ โดยการหมักแบบไร้อากาศในระดับห้องปฏิบัติการ จากนั้น VFAs ที่ผลิตได้จากมูลแพะจะถูกใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการผลิต PHA ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ได้จากของเสียอินทรีย์จะสามารถทดแทนการใช้พลาสติกที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้ในอนาคต

การวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการวิจัยประยุกต์ในสาขาจุลชีววิทยา โดยใช้ระเบียบวิธีวิจัยเพื่อหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตให้ได้จำนวนมากที่สุด โดยใช้กรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ได้จากการหมักมูลแพะจากฟาร์มเลี้ยงแพะ ของชุมชนสะพานยาว จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เป็นแหล่งอาหารเพื่อทำการศึกษาศักยภาพในการผลิตสาร PHA

#### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาความเป็นไปได้และปริมาณการเกิดกรดอินทรีย์ระเหยง่ายจากมูลแพะด้วยการหมักแบบไร้อากาศ
2. คัดกรองเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากกรดอินทรีย์สังเคราะห์
3. ศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ได้จากการหมักมูลแพะของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดกรอง

#### นิยามศัพท์เฉพาะ

PHA	Polyhydroxyalkanoate
VFAs	Volatile fatty acids
GC	Gas Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
PHB	Polyhydroxybutyrate
PHV	Polyhydroxyvalerate
3HB	3-hydroxybutyrate;
3HV	3-hydroxyvalerate
3HP	3-hydroxyvalerate

4HB	4-hydroxybutyrate
3HHx	3-hydroxyhexanoate
3H4MV	3-hydroxy-4-methylvalerate
PLLA	Poly(L-lactic acid)
PBS	Polybutylene succinate
PCL	Polycaprolactone
PS	Polystyrene
PP	Polypropylene
HDPE	High-density polyethylene
LDPE	Low-density polyethylene
PVC	Polyvinyl chloride
PET	Polyethylene terephthalate
FDCM	Freeze-dried cell mass
DCW	Dried-cell weight

#### ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Alcaligenes eutrophus*, *Cupriavidus necator* และ *Pseudomonas oleovorans*
2. สารอาหารของกรดอินทรีย์สังเคราะห์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ กรดอะซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก
3. ใช้น้ำหมักที่ได้จากการย่อยมูลแพะแบบไร้อากาศซึ่งมีปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายเพียงพอแก่การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

#### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้รู้ถึงปริมาณการเกิดกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศ
2. ทราบปริมาณการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยกรดอินทรีย์ระเหยง่ายจากมูลแพะซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนวัตถุดิบที่มีต้นทุนต่ำ สำหรับลดต้นทุนในการผลิตพลาสติกชีวภาพ
3. ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการพัฒนาสำหรับการผลิตไบโอพลาสติกต่อไป
4. สร้างทีมวิจัย และความร่วมมือระหว่างสถาบัน และสร้างบุคลากรระดับบัณฑิตจำนวน 4 คน เพื่อส่งเสริมการวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพได้ในอนาคต



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 การทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พลาสติก หมายถึง สารประกอบอินทรีย์ที่สังเคราะห์ขึ้นใช้แทนวัสดุธรรมชาติ บางชนิดเมื่อเย็นก็แข็งตัว เมื่อถูกความร้อนก็อ่อนตัวบางชนิดแข็งตัวถาวร พลาสติกเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากการโพลิเมอไรเซชัน ของโมโนเมอร์ภายใต้ความร้อนและความดันสูงเมื่อเป็นเป็นของแข็งจะสามารถคงรูปร่างได้ภายใต้สภาวะที่มีแรงกดและอุณหภูมิที่เหมาะสม (ดังรูปที่ 2) แต่จะเป็นของไหลหนืด (viscous flow) ที่อุณหภูมิที่ทำการแปรรูป โดยมีการแบ่งชนิดพอลิเมอร์ ดังนี้คือ

2.1.1 การแบ่งชนิดพอลิเมอร์ตามโครงสร้างโมเลกุล เมื่อพิจารณาการเชื่อมโยงระหว่างสายโซ่โมเลกุล (crosslinking) เราสามารถแบ่งชนิดของพอลิเมอร์ได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้

- Thermoplastic polymers เป็นพอลิเมอร์สายตรงหรือกึ่ง ไม่มีการเชื่อมโยงระหว่างสายโซ่โมเลกุล ส่งผลให้สายโซ่โมเลกุลขยับตัวง่ายเมื่อได้รับแรงหรือความร้อน สามารถหลอมและไหลได้เมื่อได้รับความร้อน เป็นส่วนประกอบหลักในพลาสติกอ่อน เช่น Polyethylene ในถุงพลาสติก
- Elastomers เป็นพอลิเมอร์ที่มีการเชื่อมโยงระหว่างสายโซ่โมเลกุลเล็กน้อย ซึ่งทำหน้าที่ดึงสายโซ่โมเลกุลกลับมาให้อยู่ในสภาพเดิม เมื่อปล่อยแรงกระทำ
- Thermosetting polymers เป็นพอลิเมอร์ที่มีการเชื่อมโยงระหว่างสายโซ่โมเลกุลอย่างหนาแน่น ส่งผลให้สายโซ่โมเลกุลขยับตัวยากเมื่อได้รับแรงหรือความร้อน วัสดุที่มีพอลิเมอร์ชนิดนี้เป็นองค์ประกอบหลัก จึงรับแรงได้ดี และไม่หลอมเหลวเมื่อได้รับความร้อน อย่างไรก็ตาม เมื่อความร้อนสูงถึงอุณหภูมิสลายตัว (degradation temperature) วัสดุจะสลายตัวไปเนื่องจากพันธะเคมีแตกหัก พอลิเมอร์ชนิดนี้เป็นส่วนประกอบหลักในพลาสติกแข็ง เช่น ถ้วยชามเมลามีน หลังคาไฟเบอร์ (Thermosets เสริมใยแก้ว)

2.1.2 การแบ่งชนิดพอลิเมอร์ตามโครงสร้างโมเลกุล

- พอลิเมอร์สังเคราะห์ (Synthetic polymers) เป็นพอลิเมอร์เกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นโดยมนุษย์ ด้วยวิธีการนำสารมอนอเมอร์จำนวนมากมาทำปฏิกิริยาเคมีภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทำให้มอนอเมอร์เหล่านั้นเกิดพันธะโคเวเลนต์ต่อกันกลายเป็นโมเลกุลพอลิเมอร์ โดยสารมอนอเมอร์ที่มักใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์ คือ สารไฮโดรคาร์บอนที่เป็นผลพลอยได้จากการกลั่นน้ำมันดิบและการแยกแก๊สธรรมชาติ เช่น เอทิลีน สไตรีน โพรพิลีน เป็นต้น

- พอลิเมอร์ธรรมชาติ (Natural polymers) เป็นพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยพอลิเมอร์ธรรมชาติเหล่านี้เป็นสิ่งที่สิ่งมีชีวิตผลิตขึ้นโดยอาศัยกระบวนการทางเคมีต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ และมีการเก็บสะสมไว้ใช้ประโยชน์ตามส่วนต่าง ๆ ดังนั้นพอลิเมอร์ธรรมชาติจึงมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของสิ่งมีชีวิตและตำแหน่งที่พบในสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างพอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ เส้นใยพืช เซลลูโลส และไคติน เป็นต้น



รูปภาพที่ 2 เม็ดพลาสติกและขวดพลาสติก

ที่มา : (<http://yoochuat1969.com/?portfolio=plastic-resin>)

## 2.2 พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) หรือพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ (Biodegradable plastic)

หมายถึงพลาสติกที่ผลิตขึ้นจากวัสดุธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นพืช สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ (biodegradable) ช่วยลดปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อม วัสดุธรรมชาติที่สามารถนำมาผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพมีหลายชนิด เช่น cellulose collagen casein polyester starch เป็นต้น และในบรรดาวัสดุธรรมชาติทั้งหลาย แป้ง นับว่าเหมาะสมที่สุดเพราะมีจำนวนมากและราคาถูก เนื่องจากสามารถหาได้จากพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี มันฝรั่ง มันเทศ มันสำปะหลัง เป็นต้น พลาสติกชีวภาพที่ผลิตจากแป้งโดยตรงจะมีขีดจำกัด เพราะจะเกิดการพองตัวและเสียรูปร่างเมื่อได้รับความชื้น จึงได้มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์เข้าไปย่อยสลายแป้ง แล้วเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นโมโนเมอร์ (monomer) ที่เรียกว่ากรดแลคติก (lactic acid) จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ polymerization ทำให้กรดแลคติกเชื่อมกันเป็นสายยาวที่เรียกว่า พอลิเมอร์ (polymer)

2.2.1 ประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้ สามารถแบ่งออกเป็น 5 ประเภทหลัก คือ

#### 2.2.1.1 การย่อยสลายได้โดยแสง (Photodegradation)

การย่อยสลายโดยแสงมักเกิดจากการเติมสารเติมแต่งที่มีความว่องไวต่อแสงลงในพลาสติกหรือสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ให้มีหมู่ฟังก์ชันหรือพันธะเคมีที่ไม่แข็งแรง แตกหักง่ายภายใต้รังสี (UV) เช่น หมู่คีโตน (ketone group) อยู่ในโครงสร้าง เมื่อสารหรือหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวสัมผัสกับรังสียูวี จะเกิดการแตกของพันธะกลายเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งไม่เสถียรจึงเข้าทำปฏิกิริยาต่ออย่างรวดเร็วที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ทำให้เกิดการขาดของสายโซ่แต่การย่อยสลายนี้จะไม่เกิดขึ้นภายในบ่อฝังกลบขยะหรือสภาวะแวดล้อมอื่นที่มีดหรือแม้กระทั่งชั้นพลาสติกที่มีหมึกหนามากบนพื้นผิวเนื่องจากพลาสติกจะไม่ได้สัมผัสกับรังสียูวีโดยตรง

#### 2.2.1.2 การย่อยสลายทางกล (Mechanical degradation)

โดยการให้แรงกระทำ แก่ชิ้นพลาสติกทำให้ชิ้นส่วนพลาสติกแตกออกเป็นชิ้นซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้โดยทั่วไปในการทำให้พลาสติกแตกเป็นชิ้นเล็กๆ

#### 2.2.1.3 การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative degradation)

การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสติกเป็นปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนลงในโมเลกุลของพอลิเมอร์ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติอย่างช้าๆ โดยมีออกซิเจน และความร้อน แสงยูวี หรือแรงทางกลเป็นปัจจัยสำคัญ เกิดเป็นสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide, ROOH) ในพลาสติกที่ไม่มีการเติมสารเติมแต่งที่ทำหน้าที่เพิ่มความเสถียร (stabilizing additive) แสงและความร้อนจะทำให้ ROOH แตกตัวกลายเป็นอนุมูลอิสระ RO และ OH) ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยาต่อที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ทำให้เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลอย่างรวดเร็วแต่ด้วยเทคโนโลยีการผลิตที่ได้รับการวิจัยและพัฒนาขึ้นในปัจจุบันทำให้พอลิโอเลฟินเกิดการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนได้เร็วขึ้นภายในช่วงเวลาที่กำหนด โดยการเติมสารเติมแต่งที่เป็นเกลือของโลหะทรานสิชันซึ่งทำหน้าที่คะตะลิสต์เร่งการแตกตัวของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide, ROOH) เป็นอนุมูลอิสระ (free radical) ทำให้สายโซ่พอลิเมอร์เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลรวดเร็วยิ่งขึ้น

#### 2.2.1.4 การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolytic degradation)

การย่อยสลายของพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์หรือเอไมด์ เช่น แป้งพอลิเอสเทอร์ พอลิแอมไนด์ พอลิคาร์บอเนต และพอลิยูรีเทนผ่านปฏิกิริยาทำให้เกิดการแตกหักของสายโซ่พอลิเมอร์ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้น โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือประเภทที่ใช้คะตะลิสต์ (catalytic hydrolysis) และไม่ใช่คะตะลิสต์ (non-catalytic hydrolysis) ซึ่งประเภทแรกยังแบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายนอกโมเลกุลของพอลิเมอร์เร่งให้เกิดการย่อยสลาย (external catalytic degradation) และแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์

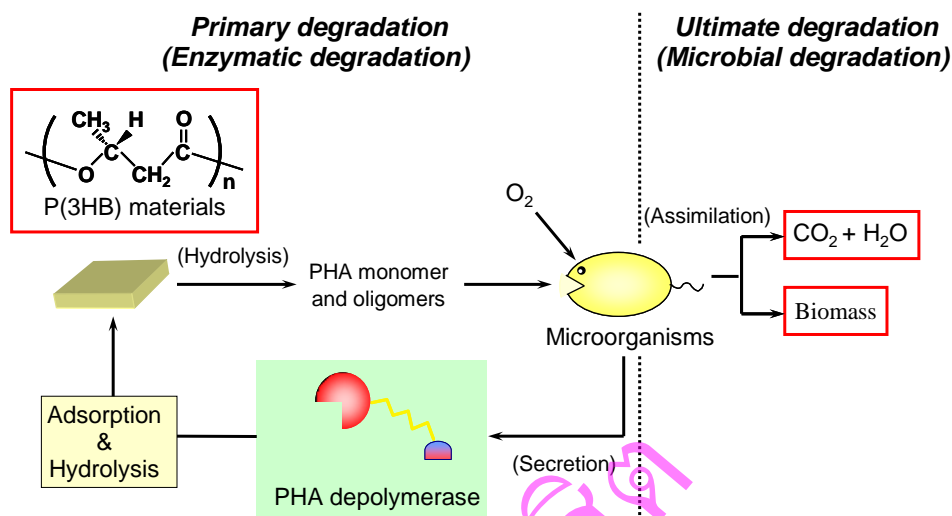
เองในการเร่งให้เกิดการย่อยสลาย (internal catalytic degradation) โดยคะตะลิสต์จากภายนอกมี 2 ชนิด คือ คะตะลิสต์ที่เป็นเอนไซม์ต่างๆ (enzyme) เช่น depolymerase lipase esterase และ glycohydrolase ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางชีวภาพและคะตะลิสต์ที่ไม่ใช่เอนไซม์ (non-enzyme) เช่น โลหะแอลคาไลด์ (alkaline metal) เบส (base) และกรด (acid) ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมในธรรมชาติในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางเคมีสำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์นั้นใช้หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ของหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์บริเวณปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

#### 2.2.1.5 การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation)

การย่อยสลายของพอลิเมอร์จากการทำงานของจุลินทรีย์โดยทั่วไปมีกระบวนการ 2 ขั้นตอน เนื่องจากขนาดของสายพอลิเมอร์ยังมีขนาดใหญ่และไม่ละลายน้ำในขั้นตอนแรกของการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นภายนอกเซลล์โดยการปลดปล่อยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ซึ่งเกิดได้ทั้งแบบใช้ endo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะภายในสายโซ่พอลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบ และแบบ exo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะที่ละหน่วยจากหน่วยซ้ำที่เล็กที่สุดที่อยู่ด้านปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ เมื่อพอลิเมอร์แตกตัวจนมีขนาดเล็กพอจะแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์และเกิดการย่อยสลายต่อในขั้นตอนที่ 2 ได้ผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย (ultimate biodegradation) คือ พลังงานและสารประกอบขนาดเล็กที่เสถียรในธรรมชาติ (mineralization) เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สมีเทน น้ำ เกลือ แร่ธาตุต่างๆ และมวลชีวภาพ (biomass) ดังตัวอย่างในรูปที่ 3 และ 4



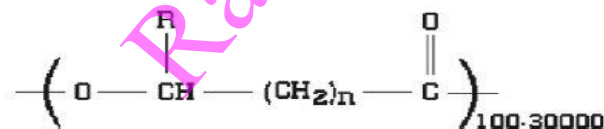
รูปภาพที่ 3 การย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ ที่มา : (<http://www.vcharkarn.com/varticle/38245>)



รูปภาพที่ 4 กระบวนการย่อยสลายวัสดุ PHA ในสภาวะตามธรรมชาติ

### 2.2.2 Polyhydroxyalkanoates (PHA)

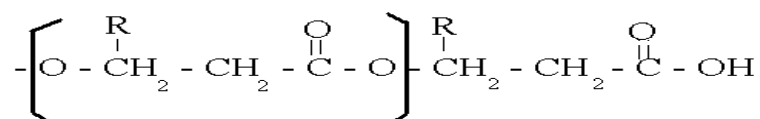
Polyhydroxyalkanoates เป็นกลุ่มพอลิเมอร์ประเภทพอลิเอสเทอร์ ที่สังเคราะห์ได้ทางธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ เช่น *Pseudomonas oleovorans*, *Alcaligenes latus* และ *Alcaligenes eutrophus* ปัจจุบันมีการค้นพบพอลิเอสเทอร์ที่อยู่ในกลุ่ม PHA มากกว่า 100 ชนิด (ดังรูปภาพที่ 5) polyhydroxyalkanoates เป็นพอลิเอสเทอร์ที่สะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดในลักษณะเม็ดแกรนูล ลักษณะของ PHA นั้นจะประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3-hydroxy-acid (HA) เช่นเป็น poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) เมื่อ R เป็นหมู่ CH<sub>3</sub> พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นเพื่อเป็นพลังงานสำรองสำหรับแบคทีเรีย และยังพบอีกว่ามีสาร HAs มากกว่า 80 ชนิด เป็นสารประกอบของ PHA ซึ่งสารเทอร์โมพลาสติกเหล่านี้จะมีคุณสมบัติเชิงกลต่างๆ ขึ้นอยู่กับการรวมตัวกันของหน่วยย่อยของโมโนเมอร์ (Lee, 1996)



n = 1	R = hydrogen	poly(3-hydroxypropionate)
	R = methyl	poly(3-hydroxybutyrate)
	R = ethyl	poly(3-hydroxyvalerate)
	R = propyl	poly(3-hydroxyhexanoate)
	R = pentyl	poly(3-hydroxyoctanoate)
	R = nonyl	poly(3-hydroxydodecanoate)
n = 2	R = hydrogen	poly(4-hydroxybutyrate)
	R = methyl	poly(4-hydroxyvalerate)
n = 3	R = hydrogen	poly(5-hydroxyvalerate)
	R = methyl	poly(5-hydroxyhexanoate)
n = 4	R = hexyl	poly(6-hydroxydodecanoate)

รูปภาพที่ 5 โครงสร้างของ Polyhydroxyalkanoates (PHAs) ที่มา : (Castilho และคณะ,2009)

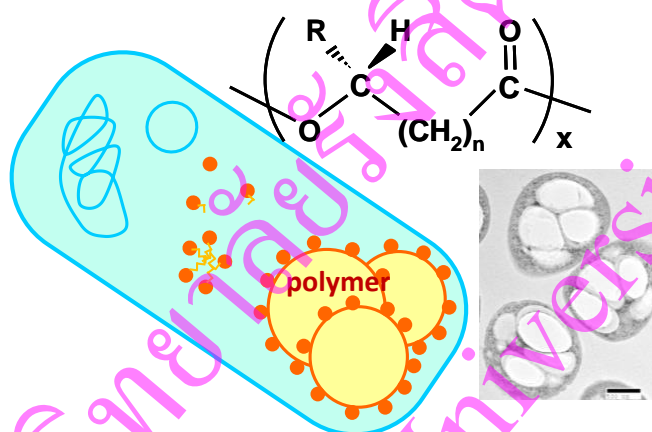
สารประกอบพอลิเอสเทอร์ในกลุ่มของ PHA เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น โดยมีองค์ประกอบของโครงสร้างอยู่ในรูป R-(3)-hydroxy fatty acid หรือ R-β-hydroxy fatty acid โดยมีโครงสร้างทั่วไป (ดังรูปภาพที่ 6)



Poly (3-hydroxyalkanoate) (PHA)

R = CH<sub>3</sub>, Poly(3 hydroxybutyrate)

R = CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, Poly(3-hydroxyvalerate)



รูปภาพที่ 6 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Polyhydroxyalkanoates (PHAs) และ PHA แกรนูลที่ถูกสะสมในเซลล์แบคทีเรีย ที่มา ; Khanna, 2005

ชนิดของ PHA สามารถแบ่ง PHA ได้ตามลักษณะการเชื่อมต่อกันของโมโนเมอร์ ได้เป็น 2 แบบ คือ

2.2.2.1 โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อรวมกันซึ่งในกรณีนี้จะยกตัวอย่างของการเชื่อมต่อกันของ R-β-hydroxy fatty acid ชนิด β-hydroxybutyrate แล้วจะมีการเชื่อมต่อกับโมโนเมอร์ของไฮดรอกซีบิวทิเรตโควาเลนต์มีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ คือ พอลิโพรพิลีน

2.2.2.2 โคพอลิเมอร์ (copolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบเป็นหน่วยย่อยของโมโนเมอร์หลายชนิดมาต่อรวมกัน ในกรณีของโคพอลิเมอร์ของสารพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต นอกจากโมโนเมอร์ที่เป็น β-hydroxybutyrateแล้วมีการเชื่อมต่อกับโมโนเมอร์ของไฮดรอกซีวาลีเรตทำให้เกิดเป็นโคพอลิเมอร์ P(3HB-3HV) หรือที่เรียกว่า poly(3-hydroxybutyrate-copolymer-3-hydroxyvalerate)

### 2.2.3 Polyhydroxybutyrate (PHB)

PHB ค้นพบครั้งแรกในปี 1926 จากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* จาก PHAs ที่มีจำนวนถึง 125 ชนิด PHB จัดเป็น aliphatic polyester ชนิดหนึ่ง ซึ่งอยู่ในตระกูลของ Polyhydroxyalkanoates (PHA) มีคุณสมบัติทางกายภาพคล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์ พบว่ามีความเหมือนกับพอลิโพรพิลีน แต่ยังมีความเปราะมากกว่าและที่สำคัญคือสามารถย่อยสลายได้ในสภาวะที่เหมาะสมและยังเหมาะสมต่อการขึ้นรูปด้วยความร้อน (thermal forming) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHB ได้มีหลากหลายสายพันธุ์ เช่น *Bacillus sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Pseudomonas sp.* หรือ *Vibrio sp.* เป็นต้น

2.2.3.1 การประยุกต์ใช้ PHB สามารถนำ PHB ไปใช้ประโยชน์ได้ดังนี้ (Jogdand, 2004) คือ ใช้เป็นตัวห่อหุ้มที่ย่อยสลายได้ค่อยๆ ปลดปล่อยยาที่บรรจุอยู่ภายในออกมาอย่างช้าๆ ใช้เป็นสารกำจัดแมลง วัชพืช หรือใช้เป็นปุ๋ย วัสดุห่อหุ้มและปล่อยยาฆ่าแมลง ใช้สำหรับอุปกรณ์ที่ใช้เพียงครั้งเดียว ตัวอย่าง เช่น มีดโกน ผ้าอ้อม เครื่องใช้ในครัวเรือน กล่องบรรจุเครื่องสำอาง ถ้วยพลาสติก ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์สารพวก Chiral Compound และประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

PHB สามารถสังเคราะห์ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งของแบคทีเรีย ซึ่งคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมือนกับพอลิโพรพิลีน หรือพอลิเอทิลีน ยังสามารถนำมาอัด ปั่น ให้เป็นเส้นใยหรือแผ่นฟิล์มได้ แต่มีข้อเสีย คือไม่สามารถนำมาผลิตเป็นระดับอุตสาหกรรมในจำนวนมากได้ เนื่องจากราคาสูงกว่าพลาสติกสังเคราะห์

ความเข้ากันได้ของวัสดุทางการแพทย์ที่ผลิตจาก PHA กับสิ่งมีชีวิต ความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต หมายถึง คุณสมบัติของวัสดุที่สามารถปลูกถ่ายเข้าสู่ร่างกายสิ่งมีชีวิตได้โดยไม่ก่อให้เกิดพิษแก่ร่างกายนั้นๆ โดยเฉพาะวัสดุที่ต้องฝังเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วย อาทิ วัสดุค้ำจุนและช่วยผลานกระดูกทางการแพทย์ออร์โธพีดิกส์หรือวัสดุในงานผ่าตัด เช่นไหมละลาย (ดังรูปภาพที่ 7) ไหมเย็บแผลหรือผ้าตาข่ายสำหรับรองแผล หรือห้ามเลือดจากอวัยวะภายในที่บาดเจ็บ ข้อดีของวัสดุที่ทำจาก PHA คือสามารถสลายตัวได้ในร่างกายหลังจากผู้ป่วยหายจากอาการบาดเจ็บแล้ว จึงไม่มีวัสดุแปลกปลอมเหลืออยู่ในร่างกาย โดยไม่จำเป็นต้องผ่าตัดซ้ำเพื่อนำเอาวัสดุเหล่านั้นออกมา (ดังรูปภาพที่ 8) การใช้งานที่มีศักยภาพสำหรับ PHA ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่ ภายในอุตสาหกรรมทางการแพทย์และยาเนื่องจากการย่อยสลายทางชีวภาพ การใช้งานและการตรึงกระดูก เช่น เย็บ แผ่นกระดูกและระบบซูปกระดูก อุปกรณ์ผ่าตัดทางการแพทย์

แต่อย่างไรก็ตาม PHA ที่จะนำมาใช้ผลิตวัสดุทางการแพทย์ ก็จำเป็นต้องผ่านกรรมวิธีการให้บริสุทธิ์ด้วยมาตรฐานที่สูงกว่า PHA สำหรับงานอุตสาหกรรมทั่วไป ที่สำคัญจะต้องผ่านกรรมวิธี

การกำจัดหรือทำลายสารพิษจากแบคทีเรียที่อาจตกค้างอยู่ออกไปให้หมด ทั้งนี้เพื่อลดความเสี่ยงต่อผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาปลูกถ่ายจากวัสดุดังกล่าวนั่นเอง



รูปภาพที่ 7 ไหมละลายที่ผลิตขึ้นจาก PHA  
ที่มา ; <http://www.hfmedicon.en.alibaba.com>



รูปภาพที่ 8 ผ้าตาข่ายสำหรับงานผ่าตัด (Surgical Mesh) ที่ผลิตขึ้นจาก PHA ที่สามารถฝังอยู่ในร่างกายผู้ป่วย ที่ไม่ก่อให้เกิดพิษหรือการต่อต้านจากระบบของร่างกายผู้ป่วย และยังสามารถสลายตัวหลังจากที่แผลผ่าตัดสมานกันดีแล้ว  
ที่มา ; <http://www.hfmedicon.en.alibaba.com>

#### 2.2.3.2 คุณสมบัติทั่วไปของ PHB สามารถสรุปคุณสมบัติทั่วไปของ PHB ได้ดังนี้

- PHB ไม่ละลายน้ำและสามารถต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮดรอกซิส ทำให้ PHB ต่างจากพลาสติกชนิดอื่นที่สามารถละลายน้ำและไวต่อความชื้น
- PHB สามารถต้านทานต่อรังสีอัลตราไวโอเล็ตและออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้ดี แต่มีความต้านทานต่อกรดเบสต่ำ



- PHB ละลายได้ในคลอโรฟอร์มและสารประกอบคลอรีเนตไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ
- PHB มีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (Biocompatible) และในขณะนี้มีการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์
- PHB มีจุดหลอมเหลว ที่ 175 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิทรานสิชัน 15 องศาเซลเซียส และมีความทนแรงดึง 40 MPa
- PHB จมน้ำในขณะที่พอลิโพรพิรีนลอยตัว แต่การจมน้ำของ PHB ก่อให้เกิดการสลายโดยไม่ใช้ออกซิเจนในการตกตะกอน และไม่มีความเป็นพิษ (Siriwan 2552)

นอกจากคุณสมบัติต่างๆของสาร PHB ที่กล่าวมาแล้ว PHB ยังมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่ใกล้เคียงกับเทอร์โมพลาสติกทั่วไป เช่น โพลีโพรพิลีน (Polypropylene, PP) ซึ่งสังเคราะห์ได้จากปิโตรเลียมได้ซึ่งแสดงอยู่ในตารางที่ 1 และ 2 โดยจุดหลอมเหลวของPHA อยู่ที่ประมาณ 140-180 องศาเซลเซียส (Sudesh et al., 2000) จึงทำให้PHA สามารถนำมาหลอมเพื่อขึ้นรูปเป็นฟิล์มบรรจุภัณฑ์ และไฟเบอร์ ซึ่งจะย่อยสลายได้ง่ายในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมตามธรรมชาติ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณสมบัติของ PHB กับ PP

Parameter	PHB	Polypropylene (PP)
Melting point Tm [°C]	171-182	171-186
Glass Transition Temperature [°C]	5-10	-15
Crystallinity [%]	65-80	65-70
Density [g c <sup>-3</sup> ]	1.23-1.25	0.905-0.94
Molecular weight Mw (×10 <sup>-5</sup> )	1-8	2.2-7
Molecular weight distribution	2.2-3	5-12
Flexural modulus [GPa]	3.5-4	1.7
Tensile strength [MPa]	40	39
Extension to break[%]	6-8	400
UV resistance	Good	Poor
Solvent resistance	Poor	Good
Oxygen permeability [cm <sup>3</sup> m <sup>-2</sup> atm <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	45	1700
Biodegradability	Good	-
US Annual production M. tones	Not determined	1.8

ที่มา ; Jogdand, 2004

**ตารางที่ 2** คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของ PHA เมื่อเปรียบเทียบกับเทอร์โมพลาสติกทั่วไป (ที่มา: Aoyagi et al., 2003; Ashby et al., 2005; Averous, 2004; Doi et al., 1995; E. A. Grulke; Luzier, 1992a; Sudesh et al., 2000; Tanadchangsaeng et al., 2009)

Property	$T_m^a$ (°C)	$T_g^a$ (°C)	Crystallinity <sup>b</sup> (%)	Young's modulus (GPa)	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)
<b>Bio-based polymers:</b>						
P(3HB)	175–180	4	70	3.5	43	3–8
UHMW-P(3HB)	182	4	80	0.97	175	104
P(3HB-co-10% 3HV)	162	-1	59	0.8	20	50
P(3HB-co-20% 3HV)	135	-2	58	1.2	32	50–100
P(3HB-co-16% 4HB)	152	-8	45	NA <sup>d</sup>	26	444
P(3HB-co-10% 3HHX)	127	-1	34	0.52	21	400
P(3HB-co-14% 3H4MV)	136	-2	32	0.55	17	230
mcl-PHA	43	-44	NA <sup>d</sup>	0.001	4.7	335
PLLA	152	58	0-1	2.05	NA <sup>d</sup>	9
PBS	114	-28	41	0.25	45	470
PCL	65	-61	67	0.19	14	500
<b>Petroleum-based polymers:</b>						
PS	240	90	NA <sup>d</sup>	3.2	36	2
PP	168	-20	60	1.3	36	350
HDPE	133	-8	NA <sup>d</sup>	0.2	17	680
LDPE	123	-36	30	0.4	20	620
PVC	160–300	110	NA <sup>d</sup>	3.2	46	60
PET	260	75	NA <sup>d</sup>	2.5	56–70	73–100

<sup>a</sup>  $T_m$ , melting temperature;  $T_g$ , glass-transition temperature.

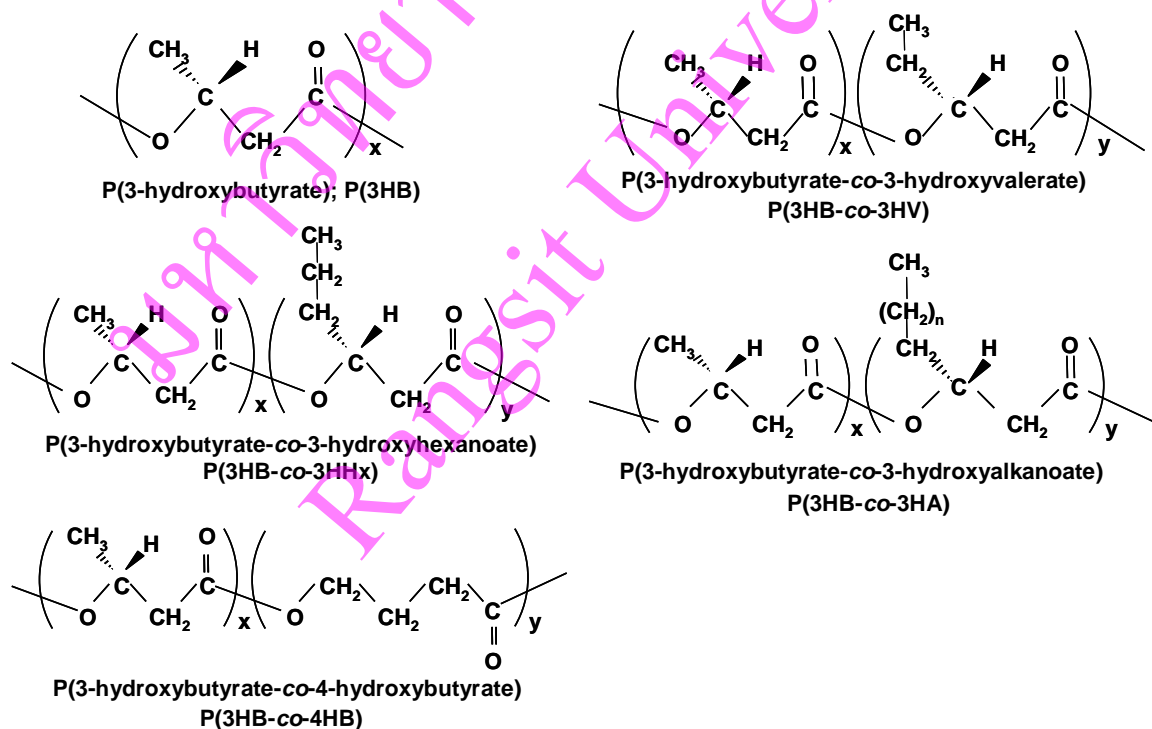
<sup>b</sup> Degree of crystallinity by X-ray diffraction.

<sup>c</sup> The mcl-PHA tested consisted of monomers ranging in size from C6 to C14 (Ashby et al., 2005).

<sup>d</sup> NA: not available.

## 2.2.4 Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) หรือ PHBV หรือ P(3HB-co-3HV)

Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] เป็นโคพอลิเมอร์ที่เกิดแบบสุ่ม ซึ่งมีโอกาสเกิดได้สูง (~50%) โดยเฉพาะ 3-hydroxyvalerate (3HV) เกิดได้ตั้งแต่ 0-95% mol ระหว่างการเกิดผลึกโมโนเมอร์ของ 3-hydroxybutyrate (3HB) และ 3HV (ดังรูปภาพที่ 9) นอกจากนี้ยังการเกิดโคพอลิเมอร์ แบบสุ่มชนิดอื่นๆ ประกอบด้วย 3HB and 3-hydroxyhexanoate (3HHx) ซึ่งจะช่วยปรับปรุงลักษณะทางกายภาพของพลาสติกชีวภาพให้ดีขึ้น โครงสร้างและคุณสมบัติของโคพอลิเมอร์ของ 3HB และ 3HV ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง โคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) มีจำนวนไฮโดรฟิลิเมอร์ที่ใกล้เคียงกันประมาณ 50-70% โคพอลิเมอร์ของ 3HB และ 3HV เป็นลักษณะ isodimorphic พบว่าสัดส่วนของ 3HV ยิ่งสูงจะช่วยให้โคพอลิเมอร์มีความแข็งแรง มีความยืดหยุ่นมากขึ้น (ดังตารางที่ 2) พบว่าค่า elongation จะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้พบว่าเมื่อเพิ่มสัดส่วนของ 3HV จุดหลอมเหลวจะลดลง ดังนั้น สามารถเพิ่มคุณภาพของพอลิเมอร์ได้ โดยการควบคุมสัดส่วนของ 3HV ให้เหมาะสมได้



รูปภาพที่ 9 ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของ PHA โคพอลิเมอร์

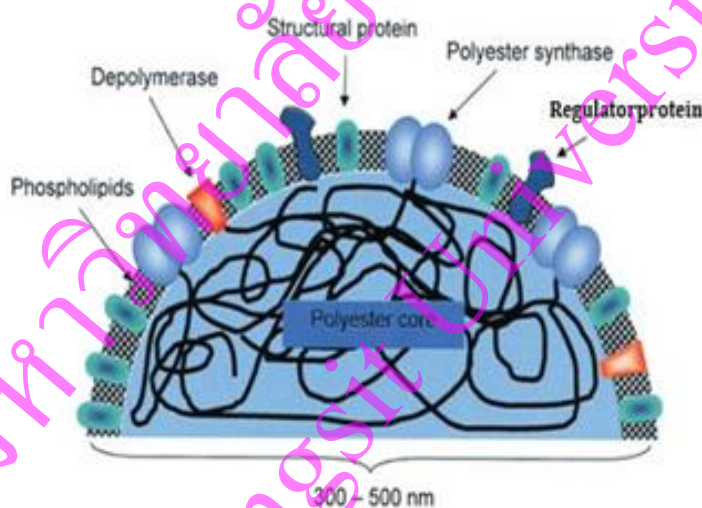
### 2.2.5 กระบวนการสังเคราะห์ PHA ของเชื้อบริสุทธิ์

PHA เป็นสารกลุ่มพอลิเอสเทอร์ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ (R)-3HA ซึ่งสารอยู่ในรูป R-configuration ซึ่งมีความจำเพาะของสเตอริโอไอโซเมอร์ของการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของเอนไซม์ PHA synthase และมีส่วนน้อยที่มีลักษณะเป็นส่วนหนึ่งของเอสโมโนเมอร์ที่ตรวจพบ โดยส่วนใหญ่จะรู้จักพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตกันดีในชื่อของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตประกอบขึ้นจากหน่วยของ (R)-3HB โมโนเมอร์จะถูกสังเคราะห์ไปเป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงอยู่ในช่วง 200,000 – 3,000,000 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะในการเจริญของเชื้อ (Siriwan, 2552)

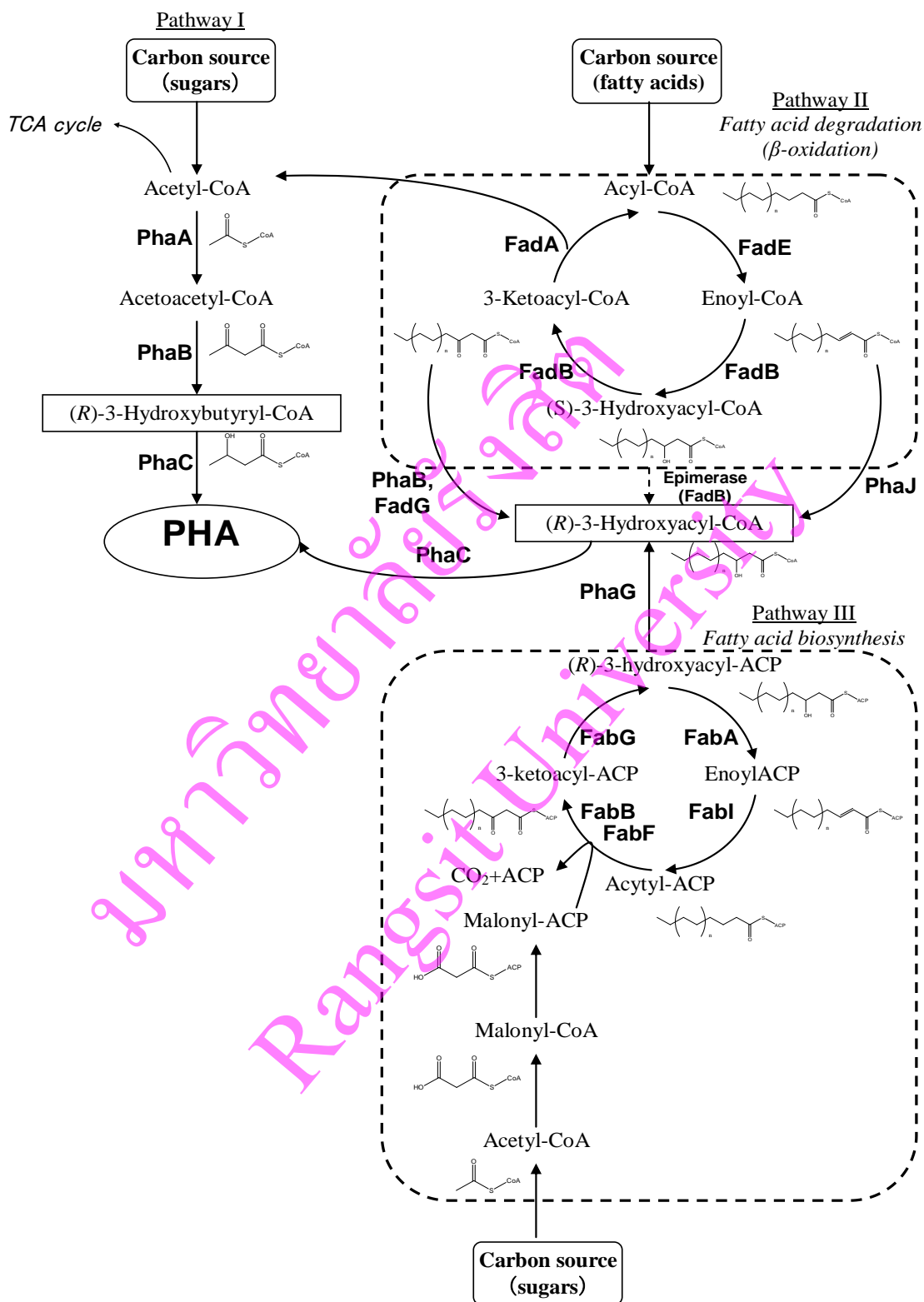
การควบคุมการผลิต PHA นั้นพบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับ *phaCBA* cluster ซึ่งประกอบด้วย *phaA*, *phaB* และ *phaC* โดย *phaA* เป็นส่วนที่ควบคุมสำหรับการผลิตเอนไซม์  $\beta$ -ketothiolase โดยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลง acetyl-coA ไปเป็น acetoacetyl-coA สำหรับ *phaB* เป็นส่วนที่ควบคุมการผลิตหรือสร้างเอนไซม์ NADPH-oxidoreductase ซึ่งทำการเปลี่ยน acetoacetyl-coA ให้เป็น R-3-hydroxybutyryl-coA และสำหรับ *phaC* เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ PHA polymerase โดยทำการสังเคราะห์พอลิเมอร์จาก R-3-hydroxybutyryl-coA ส่วน *phaP* ทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของ PHA granule นั่นคือโปรตีน Phasing ซึ่งเป็น low molecular weight protein โดยมีการสะสมเมื่อเกิดกระบวนการสังเคราะห์ และมีหน้าที่ส่งเสริมการผลิตด้วยการเชื่อมกับ granule เพื่อทำการควบคุมขนาด จำนวน และพื้นที่ผิวของ PHA inclusion การสังเคราะห์และการสะสม Phasing เป็นกลไกที่เกิดขึ้นร่วมกับ *phaR* ซึ่งเป็น autoregulate repressor อย่างไรก็ตาม การควบคุมขนาด และจำนวนของ PHA inclusion ก็ยังขึ้นอยู่กับปริมาณของ *phaC* ที่มีอยู่ในเซลล์ และยังมี *phaZ* ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ depolymerase เพื่อใช้ปลดปล่อย R-3-hydroxybutyrate เมื่อมีการขาดไฮดรอกซีบิวทิเรตพบว่า *phaZ* จะทำการผลิตเอนไซม์ออกมาในรูปแบบที่ไม่สามารถก่อให้เกิดกิจกรรมได้ ซึ่งต้องอาศัยตัวกระตุ้น เช่น ทรูปซิน เป็นตัวกระตุ้นทำให้มีข้อสังเกตว่า *phaZ* จะผลิตออกมาในรูปแบบของ proenzyme ในขณะเดียวกันการสลาย PHB granule จำเป็นต้องอาศัย proteolytic enzyme ร่วมเช่นกัน มีการคาดการณ์ว่า depolymerase น่าจะทำงานร่วมกับเอนไซม์อื่นๆอีกหลายชนิด (Luengoet al., 2003)

วิธีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตหรือ PHB (ดังรูปภาพที่ 11) มีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางที่จะเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) โดย เริ่มต้นจากอะซิetyl-CoA เอนไซม์เปลี่ยนไปเป็นอะซิโตะซิติลโคเอนไซม์เอ และไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ ด้วยการทำงานของเอนไซม์  $\beta$ -ketothiolase และ acetoacetyl-coA reductase ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการ polymerization ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB synthase อย่างไรก็ตาม PHB ที่เกิดขึ้นสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลุ่ม PHA depolymerase (Sudeshet al.,

2000) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ของแต่ละขั้นตอนในการสังเคราะห์ PHB นั้นเกิดจากการแสดงออกของ *phaCBA* cluster (Reddy et al., 2003) (ดังรูปภาพที่ 10 และ 11) PHB ถูกสะสมไว้ภายใน granule ที่มีขนาดต่างๆ กัน โดยถูกล้อมรอบด้วย phospholipid monolayer และ phasing รวมถึงเอนไซม์ polymerase และ depolymerase รวมถึง unknown protein (ดังรูปภาพที่ 1.8) สำหรับหน้าที่ของ phospholipid envelope คาดว่าเพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับน้ำ ซึ่งเป็นการป้องกันการเปลี่ยนแปลงจาก amorphous lipid state ไปเป็น crystalline form และแสดงให้เห็นหน้าที่ในการเป็น protective barrier ป้องกันตัวเซลล์ถูกทำลายจากการมีปฏิสัมพันธ์กับ PHB และโครงสร้างอื่นๆ รวมถึง cytosic protein (unknown protein) ถ้า phospholipid monolayer มีความจำเป็นต่อการป้องกันเซลล์จากกระบวนการสร้าง PHB ในช่วงเริ่มต้น แล้วสามารถตั้งข้อสังเกตได้ว่า envelope ที่เกิดขึ้น จะถูกเพิ่มขึ้นรอบๆ PHB granule ดังนั้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ monolayer ก็ย่อมมีส่วนร่วมกับการเอนไซม์ polymerase (Siriwan, 2552)



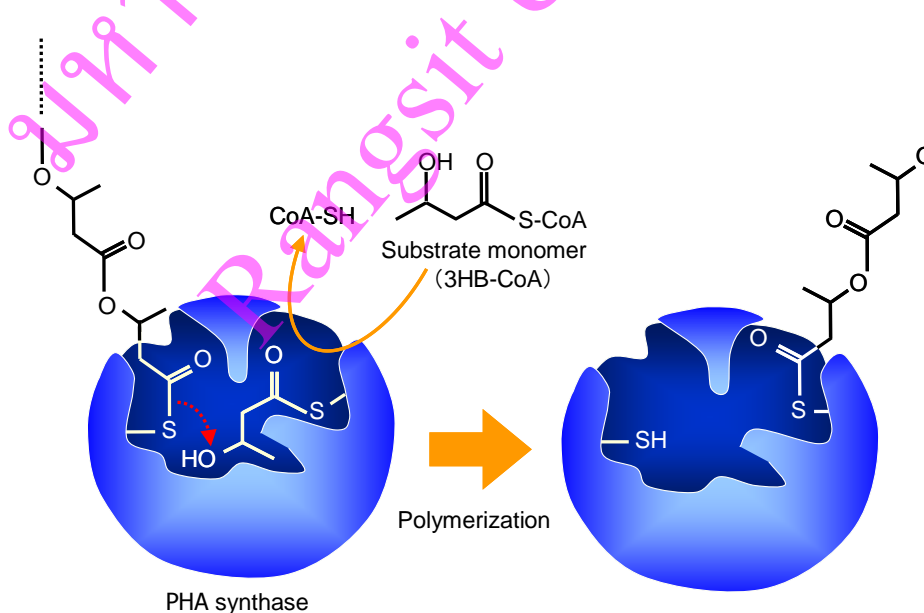
รูปภาพที่ 10 PHA แกรนูล  
ที่มา ; Grageet al., 2009



รูปภาพที่ 11 กระบวนการการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์และการย่อยสลายในแบคทีเรียที่เรียกว่า *Sudesh et al., 2000*

### 2.2.6 กระบวนการสังเคราะห์ PHA ของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์

PHA สามารถผลิตได้ในกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะกระบวนการการบำบัดแบบไร้อากาศให้อากาศ โดยมีจุลินทรีย์ 2 ชนิดที่สามารถสะสม PHA ในสภาวะไร้อากาศ คือ จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมพอลิฟอสเฟต (polyphosphate-accumulating organism; PAOs) และสะสมไกลโคเจน (glycogen-accumulating organisms; GAOs) จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมพอลิฟอสเฟต (PAOs) ได้แก่ *Accumulibacter phosphatis*, *Rhodocyclus spp.*, *Propionibacter pelophilus* (Crocetti et al., 2000), *Acinetobacter baumannii* (Jorgensen & Pauli, 1995) จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมไกลโคเจน (GAOs) ได้แก่ *Acidobacteria subphylum* (Crocetti et al., 2002), *Deftluviococcus vanus* (Dai et al., 2007) ในสภาวะไร้อากาศ จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมพอลิฟอสเฟต จะใช้พอลิฟอสเฟตเป็นแหล่งพลังงาน และไกลโคเจนภายในเซลล์เป็นแหล่งรีดิวซ์ให้อิเล็กตรอน ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมไกลโคเจน จะใช้ไกลโคเจนภายในเซลล์เป็นแหล่งพลังงาน และเป็นแหล่งรีดิวซ์ให้อิเล็กตรอน ในการรับสารอินทรีย์ โดยเฉพาะกรดไขมันระเหยง่ายมาเก็บสะสมไว้ในรูปของ PHA จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดสามารถใช้อะซิเตตและกระตุ้นให้เกิด acetyl-CoA ซึ่ง acetyl-CoA ถูกใช้ในการสังเคราะห์ PHA โดย acetyl-CoA จะเปลี่ยนเป็น acetoacetyl - CoA (ใช้ NADPH ) และเปลี่ยนเป็น hydroxyacetyl - CoA สุดท้ายมีกระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้เป็น PHA (ดังรูปภาพที่ 12) (Salehizadeh and Van Loosdrecht , 2004) ความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ PHB และ PHBV (ดังรูปภาพที่ 11) และวิธีการผลิต propionyl-CoA จากกรดอะมิโน threonine



รูปภาพที่ 12 แบบจำลองกลไกการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ในช่วงการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันที่มีขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรีย

## 2.2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHA ของจุลินทรีย์

การผลิตหรือสังเคราะห์พอลิเมอร์โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพจะต้องคำนึงถึงหลายๆปัจจัย ที่มีผลต่อชนิดและคุณสมบัติของ พอลิเมอร์ที่ผลิตได้ เนื่องจากมีกลไกการสังเคราะห์ที่ซับซ้อน สามารถเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม ปัจจัยที่สำคัญต่อการสังเคราะห์ PHA มี ดังนี้

### 2.2.7.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอน

สายพันธุ์จุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอน มีผลทำให้ชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกัน (ดังตารางที่ 3) (Punrattanasin, 2001) เห็นได้ว่าการใช้จุลินทรีย์ต่างชนิดกัน คือ *Rhodococcus sp.* NCIMB 40126 และ *Corynebacterium hydrocarboxydans*, ATCC 21767 แต่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน คือ อะซิเตต 10 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต PHA พบว่ามีจุลินทรีย์ทั้งสอง มีความสามารถในการผลิต PHA ในเซลล์ต่างกัน เท่ากับ 29 และ 21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สัดส่วนของ HB และ HV ใน PHA ก็แตกต่างกันด้วย เท่ากับ 31:69 และ 50:50 ตามลำดับ และเมื่อนำเปรียบเทียบกับสัดส่วน HB และ HV ในการผลิต PHA จากการใช้อะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ *Ralstonia eutropha* H16 พบว่า PHA ที่ผลิตได้มีเพียง HB (100%) เท่านั้น

จุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แต่แหล่งคาร์บอนต่างกัน มีผลทำให้ชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ แตกต่างกัน เช่น จากการเลี้ยง *Ralstonia eutropha* H16 เพื่อผลิต PHA โดยใช้อะซิเตตเปรียบเทียบกับโพรพิโอเนต อย่างละ 22 กรัมต่อลิตร พบว่าความสามารถในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์แตกต่างกัน เท่ากับ 53% และ 35% ตามลำดับ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า ชนิดของพอลิเมอร์ก็แตกต่างกัน โดยอะซิเตตจะส่งเสริมให้ผลิตโฮโมพอลิเมอร์ ซึ่งมีสัดส่วนของ HB และ HV ใน PHA เท่ากับ 100:0 ส่วนโพรพิโอเนตส่งเสริมให้ผลิตโคพอลิเมอร์ มีสัดส่วน HB และ HV เท่ากับ 57:43 และเมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นของจุลินทรีย์ คือ กรดบิวทิริก และ วาเลอเรต พบว่า กรดบิวทิริก ส่งเสริมให้ได้โฮโมพอลิเมอร์ มีสัดส่วน HB ใน PHA 100% ส่วนวาเลอเรต เมื่อมีการใช้ร่วมกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น เช่น กลูโคส ส่งเสริมให้เกิดทั้งสัดส่วน HB และ HV โดยสัดส่วน HB และ HV ที่เกิดขึ้น ขึ้นกับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนด้วย (ดังตารางที่ 3)

จุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน แต่ความเข้มข้นต่างกันมีผลให้ปริมาณของพอลิเมอร์แตกต่างกัน (ดังตารางที่ 3) การเลี้ยง *Azotobacter beijerinckii* โดยใช้กลูโคส ที่ความเข้มข้นต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร พบว่าจุลินทรีย์ผลิต PHA ได้แตกต่างกันเท่ากับ 35% และ 75% ตามลำดับ ดังนั้นการศึกษาการผลิต PHA ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ต้องมีการศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เพื่อการผลิต PHA ให้ได้มากที่สุด



ตารางที่ 3 การผลิต PHA ของจุลินทรีย์บริสุทธิ์และใช้กลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบตะกอนเร่ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ที่มา ; Sudesh et al., 2000

Organisms	Substrate,conc.	PHA (%w/w)	Composition of PHA	
			HB(%)	HV(%)
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	G, 5 g/L,	35	NR	NR
	G, 20g/L	75	NR	NR
<i>Azotobacter vinelandii</i>	V, 10 mM+G,NR	94	72	18
	V, 20 mM+G,NR	64	78	22
	V, 30 mM+G,NR	74	75	25
	V,10 mM	67	84	16
	V, 20 mM	36	79	21
	V, 30 mM	29	72	28
<i>Rhodococcus sp.</i> NCIMB 40126	A, 10 g/L	29	31	69
	L, 10 g/L	25	22	78
<i>Rhodococcus ruber</i> NCIMB 40126	G, NR	16.2	30.3	69.7
	VA,NR	26.2	18	82
	G+VA,NR	27.7	21.9	78.1
<i>Corynebacterium hydrocarboxydans</i>	A, 10 g/L	21	50	50
	L, 10 g/L	2	61	39

ตารางที่ 3 (ต่อ) การผลิต PHA ของจุลินทรีย์บริสุทธิ์และใช้กลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบตะกอนเร่ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

Organisms	Substrate,conc.	PHA (%w/w)	Composition of PHA	
			HB(%)	HV(%)
ATCC 21767	G,10g/L	8	28	72
<i>Alcaligenes latus</i>	Sucrose, 20 g/L	50	100	0
<i>Ralstonia eutropha</i> Strain R3	F, 0.5 g/L	47	93	7
	GL,0.5 g/L	35.7	94	6
	A, 0.5g/L	29.5	96	4
	S, 0.8 g/L	21.5	93	7
	L, 10 g/L	43.2	96	4
	F, NR	45	93	7
	F,NR	47	94	6
	GL, NR	33	95	5
	GL, NR	38	96	4
<i>R. eutropha</i>	Digested sludge	34	NR	NR
	Supernatant			
<i>R. eutropha</i> H16	A, 22g/L	53	100	0
	A, 22g/L+P, 10 g/L	51	81	19
	P, 22 g/L	35	57	43
	B, 0.03 g/L	44	100	0
(ATCC 17699)	B, 0.3 g/L	55	100	0
	B, 3 g/L	75	100	0
	B, 10 g/L	63	100	0
	B, 1.8 g/L+ V,1.2g/L	48	NR	NR

ตารางที่ 3 (ต่อ) การผลิต PHA ของจุลินทรีย์บริสุทธิ์และใช้กลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบตะกอนเร่ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

Organisms	Substrate,conc.	PHA (%w/w)	Composition of PHA	
			HB(%)	HV(%)
<i>R. eutropha</i> H16	A, 20 g/L	51	100	0
	A, 5 g/L	13	100	0
	A, 20 g/L+P,1g/L	46	98	2
	A,20 g/L+P,2g/L	52	95	5
	A,5g/L +P, 10g/L	38	74	26
<i>R. eutropha</i> NCIB 11599	G, 10 g/L+P, 1g/L	59	85	15
	G, 10 g/L+V, 1g/L	60	78	22
<i>Alcaligenes faecalis</i> NCIB 8156	A,10g/L+P,1g/L	14	78	22
	A,10g/L+V,1g/L	5	52	48
<i>Pseudomonas</i> <i>extorquens</i> MP4	M,10g/L+P,1g/L	26	95	5
	M,10g/L+V,1g/L	5	46	54
<i>Pseudomonas</i> sp. K	M, 1%(v/v)	52-57	100	0
<i>Pseudomonas</i> 135	M, 0.5%(v/v)	34-42	100	0
Activated sludge	A. NR	47	NR	NR
Activated sludge	A. 0.6g/L	51	NR	NR
Activated sludge	A. 16.95g/L	33	NR	NR

โดยที่ A = acetate , B = butyric acid , F = fructose , G = glucose , GL = gluconate , M = methanol , L = lactate, P= propionate , S = succinate, V= valerate , VA = valine , NR = not reported

ที่มา : Siriwan, 2552

### 2.2.7.2 แหล่งอาหารอื่นๆ

การสะสม PHA จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล แต่มีแหล่งคาร์บอนเพียงพอ แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการผลิต PHA กระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHA จะเกิดขึ้นสูงหลังจากแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด และภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล คือ เมื่อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป แต่มีการจำกัดปัจจัยบางชนิด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน หรือ ฟอสฟอรัส เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม สารอาหารที่ต้องจำกัดนั้นจัดเป็นแร่ธาตุหลัก สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้าง และถ่ายเทพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ ซึ่งในการสังเคราะห์ พอลิเมอร์จึงจำเป็นต้องมีปริมาณแร่ธาตุหลักเหล่านี้เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์เท่านั้น เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสะสมแหล่งคาร์บอน และพลังงานอยู่ในเซลล์ในรูปพอลิเมอร์ ดังนั้นในการศึกษาถึงชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จึงจะทำให้การผลิตเกิดขึ้นได้ดี นอกจากนี้จุลินทรีย์แต่ละชนิด สามารถผลิต PHA ได้จากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (ดังตารางที่ 3)

แบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้ผลิต PHA แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (Lee, 1996)

กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียที่ใช้สารอาหารในปริมาณจำกัด คือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โพแทสเซียม ออกซิเจน หรือ ซัลเฟอร์ ในการสังเคราะห์ PHA แต่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งอาหาร ได้แก่ *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans*

กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียที่ไม่ต้องจำกัดปริมาณสารอาหารในการสังเคราะห์ PHA และสามารถเพิ่มปริมาณพอลิเมอร์ในระหว่างการเติบโต ได้แก่ *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* ที่ผ่านการทำให้กลายเป็นพันธุ์และรีคอมบิแนนต์เชื้อ *E. coli* ที่ได้รับยีนจาก *Alcaligenes eutrophus*

### 2.2.7.3 อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

งานวิจัยของ Kumar และ คณะได้ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ผสม เพื่อเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารสังเคราะห์ โดยใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 500 ถึง 300 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรการใช้งาน 250 มิลลิลิตร โดยเติมจุลินทรีย์ผสมเริ่มต้น 430 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงนำมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ในรูปของ MLSS ผลการทดลองพบว่า การเติมกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3,150 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองนี้เพื่อเป็นการ เพิ่มกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHB จึงได้ศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 24,96,120,144 และ 168 ตามลำดับ โดยเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

นำมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และปริมาณเซลล์ และคำนวณในรูปร้อยละของการสะสม PHB ต่อปริมาณเซลล์ ที่เวลาต่างๆ พบว่า เมื่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้น การสะสม PHB ต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น จุดการทดลองที่มีการสะสม PHB สูงสุด คือ จุดที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 144 มีการสะสม PHB 33%

#### 2.2.7.4 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHA เนื่องจากสภาวะออกซิเจนมีจำกัด เอนไซม์ซีเตรทซิงเทส และไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส ถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้ acetyl CoA ไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซีโตอะซิetyl โคเอ เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHA โดยเอนไซม์ เบต้าคีโตไทโอเลส (Luengo *et al.*, 2003)

#### 2.2.7.5 pH

pH เริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และการผลิต PHB พบว่า เมื่อต้องการผลิต PHB ควรทำการควบคุม pH ไม่ให้ต่ำกว่า 7 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่า pH ลดลงอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดมากเกินไปเมื่อสิ้นสุดการเจริญ

#### 2.2.7.6 อุณหภูมิ

งานวิจัยของ โสภา ชินเวชกิจวานิชย์ ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHA ด้วยเชื้อผสมโดยใช้น้ำเสีย อุณหภูมิที่ใช้ทดลอง ได้แก่ 10,20,30 องศาเซลเซียส โดยแต่ละอุณหภูมิได้ทำการทดลอง กับการจำกัดธาตุอาหาร 3 แบบ คือ จำกัดเฉพาะไนโตรเจน , ฟอสฟอรัส , และจำกัดเฉพาะทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ใช้รูปแบบการเดินระบบแบบสองขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ผลิต PHA แล้วตามด้วยขั้นตอนการจำกัดธาตุอาหาร เพื่อกระตุ้นการผลิต PHA ให้มากขึ้น ผลการทดลอง พบว่า อุณหภูมิส่งผลต่ออัตราการผลิตและผลผลิตของ PHA อย่างชัดเจน คืออัตราการผลิตและผลผลิต PHA จะเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ การจำกัดธาตุอาหารทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสให้ผลผลิต PHA ดีกว่าการจำกัดธาตุอาหารแบบอื่น โดยการทดลองที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส กับการจำกัดธาตุอาหารเฉพาะไนโตรเจน ค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุด เท่ากับ 40% โดยค่าความเข้มข้นของ PHA ในระบบ คือ 2,830 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองการจำกัดธาตุอาหารเฉพาะฟอสฟอรัส ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 52 % ค่าความเข้มข้นของระบบ คือ 1,491 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองจำกัดธาตุอาหารทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ผลผลิต PHA ในการทดลองที่ 10 ,20 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกัน โดยค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 45% และความเข้มข้นของ PHA เท่ากับ 2,133 มิลลิกรัมต่อลิตร

### 2.2.8 การสกัด PHA และทำให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนปกติ ประกอบด้วย การแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกจากน้ำหมัก จากนั้นนำเซลล์จุลินทรีย์ที่เก็บรวบรวมได้ไปเข้า กระบวนการย่อยเซลล์เพื่อให้เซลล์แตกและปล่อย PHA ที่สะสมไว้หลุดออกมา หลังจากแยกเอากากชีวมวลออก จึงส่งเข้าสู่กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ในขั้นตอนการแยกเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ออกจากน้ำหมัก ใช้วิธีการแยกเซลล์ตามปกติธรรมดา มักอาศัยกระบวนการแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงหรือ อาศัยเพียงการกรองก็สามารถแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักได้ สำหรับในขั้นตอนถัดไป เป็นการย่อยให้เซลล์แตก เพื่อแยกเอา PHA ที่อยู่ภายในออกมา สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

2.2.8.1 การย่อยเซลล์และสกัด PHA ออกด้วยตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ chloroform, methylene chloride, propylene carbonate, dichloroethane แต่กระบวนการสกัด PHA ออกด้วยตัวทำละลาย จะได้สารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้นประมาณ 5% ของน้ำหนักต่อปริมาตรของ PHA ซึ่งมีความหนืดสูงมาก ทำให้กระบวนการแยกเศษชีวมวลออกไปทำได้ยาก จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายในปริมาณมากจนให้ผล ไม่คุ้มค่ากับการลงทุน ถึงแม้จะมีการหมุนเวียนนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่ (Lee, 1996)

2.2.8.2 การย่อยเศษชีวมวลที่ไม่ใช่ PHA ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย วิธีนี้จะช่วยย่อยสลายเศษชีวมวลออกไป ทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ จะไปย่อยสลายสารพอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ด้วย และนอกจากนี้ ยังมีผลทำให้ PHA ที่แยกสกัดได้มีคุณสมบัติไม่เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้งานหลายๆด้าน

2.2.8.3 การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เอนไซม์ กระบวนการนี้ประกอบด้วย การให้ความร้อนกับชีวมวลแล้วนำไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ จากนั้นนำไปล้างด้วยสารละลายเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ เพื่อละลายเอาเศษชีวมวลออกจาก PHA แต่ผลที่ได้จากกระบวนการนี้ มักจะมีความบริสุทธิ์ไม่สูงนัก ในกรณีที่ต้องการความบริสุทธิ์สูงๆ ต้องใช้ร่วมกับกระบวนการแยกสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูงขึ้น (Hocking & Marchessault, 1992)

## 2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการทบทวนเอกสารไม่พบงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้ของเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHA โดยตรง แต่มีงานวิจัยที่ใช้สารเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตอื่น ๆ อาทิเช่น

1. งานวิจัยของ Satoh และคณะ ปี 1998 ได้ทำการศึกษาเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบแอกทิเวเต็ด 2 แบบ คือ anaerobic - aerobic - aerobic AS (A-A) และ microanaerobic - aerobic (M-A) แล้วนำสารที่สกัดได้จากทั้ง 2 ระบบมาทดสอบปริมาณ PHA ในปฏิกรณ์แบบกะ 2 แบบ คือ ไม่มีการเติมออกซิเจนและที่มีการเติมออกซิเจนในปริมาณจำกัด พบว่าสัลดจากระบบ A-A มี

การสังเคราะห์ PHA ในการทดสอบที่มีออกซิเจนสูงกว่าในสภาวะ ที่ไม่มีออกซิเจน เท่ากับ 33% และ 22% ตามลำดับ ส่วนในสลัดจากระบบ M-A สามารถสังเคราะห์ PHA ได้ถึง 62% สรุปผลการทดลองได้ว่า ออกซิเจนที่ไม่มากจนเกินไป อาจจะทำให้มีการทำงานของ TCA cycle ทำให้สามารถผลิต NADH ได้มากขึ้น NADH สามารถยับยั้งเอนไซม์ซิเตรทซินเทส (citrate synthase) และ isocitrate dehydrogenase ทำให้ acetyl - CoA ไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็น acetoacetyl - CoA เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHA ส่งผลให้สามารถสังเคราะห์ PHA ได้มากขึ้น

2. งานวิจัยของ Punrattanasin และ Randall ปี 1999 ได้ทำการศึกษา ทดลองเลี้ยง จุลินทรีย์ ในสภาวะ microaerophilic - aerobic AS รวมทั้งสภาวะที่จำกัดธาตุอาหาร โดยทำการวัด ปริมาณ PHA สะสมในเซลล์ของระบบ SBR แบบต่อเนื่อง พบว่าในสภาวะที่มีการจำกัดธาตุอาหารทั้ง ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส จุลินทรีย์จะมีการสะสม PHA สูงถึง 45 % ของ total suspension solids (TSS) และเมื่อจำกัดไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว พบว่ามีการสะสม PHA เท่ากับ 36% ของ TSS แต่เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ต่อไปในสภาวะดังกล่าว จะพบว่าจุลินทรีย์ในระบบจะค่อยๆ ลดจำนวนลง และไม่ทำการสะสม PHA อีกต่อไป สามารถสรุปได้ว่า จุลินทรีย์จะทำการสะสม PHA ในสภาวะจำกัด ธาตุอาหารได้สูงขึ้น แต่ถ้าปล่อยให้ขาดธาตุอาหารต่อไปเรื่อยๆ จุลินทรีย์จะตายเนื่องจากขาดธาตุ อาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต

3. งานวิจัยของ Yu ปี 2001 ได้ทำการศึกษาการผลิต PHA จากน้ำเสียโรงงานแปง โดย ศึกษาเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนที่หนึ่งใช้จุลินทรีย์สร้างกรดผลิตกรดและขั้นตอนที่สองใช้จุลินทรีย์ที่ใช้กรด เพื่อสังเคราะห์พอลิเมอร์ น้ำเสียที่ใช้ทดลอง ขั้นตอนที่หนึ่ง ใช้ น้ำเสียจากโรงงานแปงที่ผ่านการบำบัดใน ถึง UASB ผลิตภัณฑ์ที่ได้ในขั้นตอนที่หนึ่ง ได้แก่ กรดอะซิติก (60 - 80%) กรดโพรพิโอนิก (10 - 30%) กรดบิวทีริก (5-40%) โดยมีกรดระเหยง่ายทั้งหมดเท่ากับ 4,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำเสียที่มี สารอินทรีย์เท่ากับ 25 -35 กรัมต่อลิตร ต่อวัน โดยสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงสุดที่สารอินทรีย์ เท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ต่อวัน และได้กรดบิวทีริกสูงสุดที่สารอินทรีย์เท่ากับ 26 กรัมต่อลิตร ต่อวัน หลังจากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ศึกษาการผลิต PHA โดยใช้เชื้อ *Alcaligenes eutropus* พบว่า 50 กรัม ของ PHA ผลิตจาก 100 กรัม total organic carbon (TOC) ที่ถูกใช้ไป และปริมาณ PHA ในเซลล์ คิดเป็น 34% และจากการศึกษาการผลิต PHA แบบกึ่งกะ โดยป้อนกรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริก เข้าถึงหมักด้วยอัตรา 3 ระดับ คือ 0.5, 0.75, 1 กรัมต่อลิตร และมีแหล่งไนโตรเจน 80 -100 มิลลิ-กรัมแอมโมเนียมต่อลิตร สามารถผลิต PHA ได้สูงสุด 45 ชั่วโมง ได้ PHA 48 % เมื่อเติมกรดบิวทีริก ได้ PHA 53 %

4. งานวิจัยของ Alias and Tan ปี 2005 ทำการศึกษาการแยกเชื้อที่สามารถผลิต PHA จากกลุ่มเชื้อผสมในน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์ม พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 45 ไอโซเลท โดยการเกลี่ยเชื้อในอาหารรูน เมื่อนำมาทดสอบการย้อมสีด้วย Sudan Black B ได้เชื้อ 10 ไอโซเลท

ที่สามารถผลิตไขมันไว้ภายในเซลล์ได้ หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีการจำกัดไนโตรเจนและมี palm olein (ไตรกลีเซอไรด์) หรือ saponified palm olein (เกลือของกรดไขมัน) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม palm olein เชื้อมีการเจริญดีกว่าการเติม saponified palm olein และนำไอโซเลทเดี่ยวๆ ที่ได้มาทดสอบด้วย nine blue A เพื่อหาเชื้อที่ผลิต PHA พบว่าวิธีนี้ไม่เพียงพอในการเลือกเชื้อที่ผลิต PHA จึงมีการศึกษาการแยกเชื้อโดยวิธี Enrichment technique โดยศึกษาการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายแบบ พบว่าการเติม palm olein (1% น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและเติมน้ำเสียที่เป็นแหล่งของกลุ่มเชื้อที่ใช้ (2.5% ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปขยายที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบจุลินทรีย์ทั้งหมด 7 ไอโซเลท แต่มีเพียง 2 ไอโซเลทที่เจริญได้ดี (FLP1 และ FLP2) โดยเชื้อ FLP1 สามารถเจริญและผลิต PHA ได้ดีกว่าในอาหารที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เมื่อนำไปบ่งชี้จุลินทรีย์โดยวิธี BIOLOG พบว่า FLP1 คือ *Burkholderia cepacia* เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมโพรพิโอเนตหรือวาเลอเรต จุลินทรีย์สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ชนิด poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

5. งานวิจัยของ Kasemsap และ Wantawin ปี 2007 ได้ทำการศึกษาผลของ PHA ต่อศักยภาพในการสังเคราะห์ PHA โดยใช้ชุดทดลองในสภาวะไร้อากาศโดยใช้กรดอะซิติกเป็นสารอาหาร และเปรียบเทียบการสะสม PHA จากสไลด์ส่วนเกิน 2 กลุ่ม คือ RP5 และ RP15 ที่มีปริมาณพอลิฟอสเฟตในเซลล์ 2% และ 6 % ตามลำดับ ไกลโคเจนภายในเซลล์ 12% และ 15% ตามลำดับ ผลการทดลอง พบว่า การสลายสารที่เป็นแหล่งพลังงาน ได้แก่ ไกลโคเจนและพอลิฟอสเฟตที่ค่า pH 6 จะน้อยที่สุดและมากขึ้นตามลำดับ เมื่อ pH สูงขึ้น มีผลทำให้มีการสะสม PHA ที่ pH 6 มากที่สุด คือ 17% และ 29% ในรูปคาร์บอน สำหรับ RP5 และ RP15 ตามลำดับแต่การใช้พลังงานมากขึ้น และเป็นพลังงานจากการสลายไกลโคเจน ในการดั่งสารอาหารเข้าเซลล์ที่ pH สูงขึ้น มีผลให้สัดส่วน HV ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของพลาสติกประเภทนี้ มีค่าสูงขึ้น ดังนั้น สลัด RP5 จะมีสัดส่วน HV/PHA ที่ pH 8 สูงกว่าที่สะสมที่ pH 6 แต่สัดส่วนดังกล่าวค่อนข้างคงที่สำหรับ RP15

6. งานวิจัยของ Chaudhry และคณะ ปี 2010 ได้ทำการศึกษา Polyhydroxyalkanoate PHA Product Using Waste Vegetable Oil by *Pseudomonas sp.* Strain DR2 แบคทีเรียที่สามารถสร้าง PHA ได้จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูก, ผัก-น้ำมัน ที่เป็นของเสีย แบคทีเรียจะถูกนำมาแยกสายพันธุ์โดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมไปด้วยสารอาหารครบถ้วน ในการแยกสายพันธุ์ของ *Pseudomonas sp.* DR2 เป็นสายพันธุ์ที่เราเห็นจุดสีส้มหรือสีแดงที่สะสมอยู่ใน PHA แกลนูล เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพอสเฟตและไนโตรเจนในปริมาณที่จำกัดที่มีน้ำมันผักเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาย้อมดูด้วยสี Nile blue A พบว่าแบคทีเรียมีการสร้าง PHA ขึ้นภายในเซลล์ 37.34% ที่ใช้น้ำมันข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน สารที่เป็นตัวสร้าง PHA ที่เชื้อสร้าง



ขึ้น ได้แก่ 3-hydroxyalkanoate ; octanoic (C8:0, 37.75% จำนวน PHA ทั้งหมดที่ได้จาก 3-hydroxyalkanoate ), decanoic (C10:0,36.74%), และ dodecanoic (C12:0,11.36%) *Pseudomonas sp.* สายพันธุ์ DR2 มีการสร้าง PHA มากถึง 23.52% ของ MCL-PHA จากน้ำมันผักที่เป็นของเสีย ปริมาณของ PHA ที่ได้จากสัดส่วนของ 3-hydroxyalkanoate กับน้ำมันผักที่เป็นของเสีย [hexanoic (5.86%), octanoic (45.67%), decanoic (34.88%), tetradecanoic (8.35%) และ hexadecanoic (5.24%)] แสดงถึงตำแหน่งของอัตราส่วนที่แตกต่างของการสร้าง PHA จากน้ำมันข้าวโพด DR2 ใช้กรดอะมิโน 3 ตัวในอัตราส่วนที่เหมือนกัน กรด linoleic เป็นแหล่งอาหารหลักที่เชื้อใช้สร้าง PHA เป็นที่น่าสนใจว่า การสร้าง PHA ของเชื้อ *Pseudomonas sp.* DR2 ไม่สามารถสร้าง acetate หรือ butyrate-amended บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ *Pseudomonas sp.* DR2 มีการสะสม PHA ได้ดีกว่าเชื้อที่ได้มีการศึกษามาแล้ว (*Chromobacterium violaceum* และ *Ralstonia eutropha* H16) ที่เชื้อเจริญเติบโตบนน้ำมันผัก. ข้อมูลแสดง *Pseudomonas sp.* DR2 ที่สร้าง PHA ได้จากการใช้น้ำมันผักที่เป็นของเสียเป็นแหล่งคาร์บอน

7. งานวิจัยของ F. Mtunzi และคณะ ปี 1900 ได้ทำการตรวจหาสารประกอบทางเคมีของสารสกัด Hexane จากเปลือกไม้ส่วนลำต้น *bolusanthus speciosus* โดยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) สารละลายคล้าย Methanol, Ethanol และ Acetone ซึ่งเป็นสารที่มีขั้ว การวิเคราะห์หา Hexane ที่ได้จากการสกัดจากเปลือกไม้ส่วนลำต้น *bolusanthus speciosus* ด้วย GC-MS ซึ่งเครื่องจะแยกชนิดของสารเป็น 13 ชนิด สารที่สกัดออกมาได้หลักๆ ที่พบคือ 1,3-Dimethylbenzene (39.15%) และ Caryophyllene (16.25%)

## 2.4 มูลแพะ

แหล่งวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพมีหลายชนิด โดยมาจากมูลสัตว์ 1,059 ล้าน ลบ.ม และน้ำเสีย 1,000 ล้าน ลบ.ม (ประทีน กุลละวณิชย์ และคณะ, 2550) ซึ่งมูลสัตว์ส่วนใหญ่เป็นของแข็งจะประกอบไปด้วยเศษของพืชและสัตว์ ที่สัตว์กินเข้าไป แล้วไม่สามารถย่อยหรือนำไปใช้ประโยชน์ได้หมด จึงเหลือเป็นกากที่สัตว์ขับถ่ายออกมา โดยเศษอาหารเหล่านี้ได้ผ่านกระบวนการย่อยสลายไปบางส่วนแล้วในทางเดินอาหาร ดังนั้นส่วนที่เป็นมูลสัตว์จึงอุดมไปด้วยธาตุอาหารชนิดต่างๆ รวมทั้งสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้หลายชนิด ซึ่งเมื่อรวมกันก็จะมียังมีองค์ประกอบที่สามารถใช้เป็นธาตุอาหารที่สมบูรณ์ของพืชได้ ส่วนมูลสัตว์แต่ละชนิดจะมีธาตุอาหารชนิดใดมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่สัตว์ชนิดนั้นกินเข้าไปเป็นปัจจัยสำคัญรวมทั้งปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ ระบบการย่อยอาหารของสัตว์ วิธีการให้อาหาร รวมทั้งการจัดการรวบรวมมูล การเก็บรักษา ฯลฯ ยกตัวอย่างวัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตก๊าซชีวภาพคือ มูลแพะ

มูลแพะมีลักษณะพิเศษคือ เป็นก้อนขนาดเล็ก ลักษณะเหมือนยาอมหรือยาลูกกลอน มีกลิ่นฉุนสลายตัวช้า มูลแพะสามารถใช้ทำปุ๋ยหมักได้ดี เนื่องจากในมูลแพะจะมีปริมาณสารอินทรีย์สูง จึงสามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยคอกได้โดยตรง แต่อาจจะมีปัญหาในเรื่องของโรคพยาธิ แต่ถ้าเป็นมูลที่ผ่านกระบวนการการหมักแล้ว จะได้ปุ๋ยอินทรีย์เพื่อใช้แทนปุ๋ยเคมีในการเพาะปลูกช่วยลดผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อม เช่น กลิ่น แหล่งเพาะเชื้อโรค ได้



รูปภาพที่ 13 มูลแพะ

### บทที่ 3

#### ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 แผนการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการวิจัยประยุกต์ในสาขาจุลชีววิทยา โดยใช้ระเบียบวิธีวิจัยเพื่อหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate (PHA)) ให้ได้จำนวนมากที่สุด โดยใช้กรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ได้จากการหมักมูลแพะจากฟาร์มเลี้ยงแพะ ของชุมชนสะพานยาว จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เป็นแหล่งอาหารเพื่อทำการศึกษาความสามารถในการผลิตสาร PHA ผู้วิจัยใช้เทคนิคการย้อมสี Sudan black B ช่วยในการวินิจฉัยและการดูการสร้าง PHA ในเบื้องต้น ก่อนทำการทดสอบยืนยันความสามารถในการผลิต PHA ด้วยวิธี Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถทำนายชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสาร ซึ่งสามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพ (Qualitative analysis) และทำการศึกษาปริมาณของ PHA จากน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อที่ผลิตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salts medium (MS) 10-80% Fermented Goat Manure และปริมาณ PHA ที่สะสมในเซลล์จุลินทรีย์ได้อย่างค่อนข้างแม่นยำ

#### 3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

##### 3.2.1 เครื่องมือการทดลอง

- เครื่องชั่งแบบ 2 ตำแหน่ง (Balance  $\pm 0.01g$  , Melter Toledo , JL 602-G)
- เครื่องชั่งแบบ 4 ตำแหน่ง (Balance  $\pm 0.0001g$  , Melter Toledo , AB 204 - S)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- ตู้อบแห้งชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Oven set , Memmert UFB 500)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH Meter , Suntex SP - 701)
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker set , 28L B/S/C)
- เครื่องกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)
- เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรมิเตอร์ (UV – Visible Spectrophotometer , Genesys 20)
- Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID)
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
- block heater
- เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dried machine)

### 3.2.2 วัตถุประสงค์ สารเคมี และจุลินทรีย์

- มูลแพะสดจากฟาร์มเลี้ยงแพะ
- จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษา คือ *Alcaligenes eutrophus* (AE), *Cupriavidus necator* (CN) และ *Pseudomonas oleovorans* (PO) ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถผลิต PHA ได้
- กรดอินทรีย์ระเหยง่าย เช่น กรดอะซิติก (Acetic acid) และกรดโพรพิโอนิก (Propionic acid) และ กรดบิวทีริก (Butyric acid)
- ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม เมทานอล เฮกเซน
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB)
- กรดเบนโซอิก (Benzoic Acid)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- กรดซัลฟูริก ( $H_2SO_4$ )
- กรดฟอสฟอริก ( $H_3PO_4$ )
- โซเดียมฟอสเฟต ( $NaH_2PO_4$ )
- แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(NH_4)_2SO_4$ )
- แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4$ )
- โพแทสเซียมฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )

### 3.2.3 อุปกรณ์

- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask ) ขนาด 250 มิลลิลิตร (Pyrex, Germany)
- ปีกเกอร์ ( Beaker ) ขนาด 50 100 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (Pyrex , Germany)
- แท่งแก้ว (Stirring rod) (Pyrex , Germany)
- กรวยกรอง (Funnel) (Pyrex , Germany)
- ช้อนตักสาร (Spatula)
- กระดาษกรอง (Filter papers) เบอร์ 1
- ภาชนะทนความร้อน (Crucible) (Pyrex , Germany )
- ไมโครปิเปต (Micro Pipette) ขนาด 100 ul 1000ul (Pyrex , Germany )

- ไมโครปิเปตทิป (Micro Pipette Tip) ขนาด 100 ul 1000ul (Pyrex ,Germany )
- ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 25 และ 50 มิลลิลิตร (Pyrex , Germany)
- หลอดทดลองแบบมีฝาปิด (Pyrex , Germany )
- Laboratory Bottle ขนาด 250,500,1000 มิลลิลิตร (Duran, Germany)

### 3.3 วิธีการทดลอง

#### 3.3.1 การผลิตกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (VFAs) จากมูลแพะ

- เก็บตัวอย่างมูลแพะมาทำการวิเคราะห์ค่า ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid, TS) และของแข็งระเหยได้ทั้งหมด (Total volatile solid, TVS), ซีโอดีรวม (Chemical oxygen demand, COD) และปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (VFAs) เริ่มต้นของวัตถุดิบ
- เตรียมวัตถุดิบสำหรับการหมักในถัง 1.2 ลิตร โดยสัดส่วนมูลแพะบดละเอียดกับน้ำในถังหมักมีสัดส่วน 1:2 และ 1:3 (w/w) เขย่าให้เข้ากัน ทำการป้อนวัตถุดิบเพียงครั้งเดียวตอนเริ่มต้นทดลอง
- ใส่หัวเชื้อจากบ่อบำบัดน้ำเสียแบบไร้อากาศ (Slurry inoculum) 20% v/v ประมาณ 200 มิลลิลิตร ต่อน้ำหมักมูลแพะ 1000 มิลลิลิตร
- ดำเนินการทดลองที่สภาวะอุณหภูมิห้อง ( $35 \pm 2$  °C) ปรับค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ให้เป็น  $7.1 \pm 0.1$  เป็นระยะเวลา 30 วัน (Yu, 1993)
- เก็บตัวอย่างภายในถังหมักเพื่อมาวิเคราะห์โดยเก็บตัวอย่างอาทิตย์ละ 2 ครั้ง วันละ 10 มิลลิลิตร เพื่อนำผลมาวิเคราะห์ตัวแปรต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของระบบ และบันทึกปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (VFAs) แต่ละชนิด และค่า pH TS TVS BOD COD ที่เกิดขึ้น

#### 3.3.2 การปรับสภาพความพร้อมของจุลินทรีย์สำหรับผลิต PHA

นำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Alcaligenes eutrophus* (AE), *Cupriavidus necator* (CN) และ *Pseudomonas oleovorans* (PO) มาเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบของมูลแพะ ได้แก่ VFAs ชนิด อะซิเตด (Acetic acid) โพรพิโอเนต (Propionic acid) และ บิวทิเรต (Butyric acid) จุดประสงค์เพื่อปรับสภาพจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ และเพื่อให้มีความพร้อมในการใช้แหล่งอาหารจากมูลแพะ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ คือ

- เตรียมกล้าเชื้อในหลอดทดลองปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth 5 มิลลิลิตร

- บ่มในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 36 ชั่วโมง
- นำกล้าเชื้อมาลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร มีอาหาร MS 70 มิลลิลิตร และเติมสารอาหารกรดอินทรีย์ที่ผสมด้วยอัตราเท่าๆกันมี โพรพิโอเนต 1 กรัมต่อลิตร อะซิเตต 1 กรัมต่อลิตร บิวทิเรต 1 กรัมต่อลิตร อย่างละฟลาสก์ รวมกรดทั้งหมดจะมี 3 กรัมต่อลิตร
- MS medium 1 ลิตร จะมีอาหารเลี้ยงเชื้อต่อลิตรคือ 1.2 g of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 7.34 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and 1 mL of trace element solution
- บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ถ้าสังเกตว่าเชื้อไม่เจริญหรือเจริญไม่ดีให้ถ่ายเชื้อไปเลี้ยงในฟลาสก์ใหม่โดยทำวิธีเดิมสุดท้ายเก็บแบคทีเรียที่ผ่านการปรับสภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) เพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

### 3.3.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ และการศึกษาผลของกรดอินทรีย์ผสมต่อการเติบโตของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ จะถูกคัดเลือกให้เหลือสายพันธุ์ที่ดีที่สุด โดยการเลี้ยงในกรดอินทรีย์ผสม จุดประสงค์เพื่อเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดในการใช้ แหล่งอาหารจากมูลแพะ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ คือ

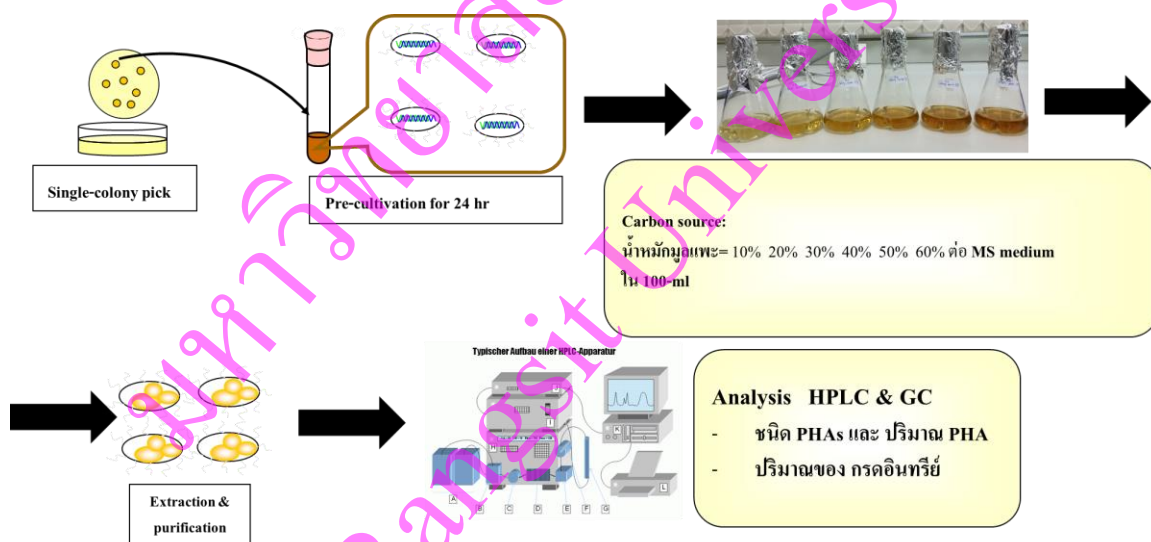
- นำกล้าเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว มาบ่มในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร มีอาหาร MS 150 มิลลิลิตร และเติมสารอาหารกรดอินทรีย์ที่ผสมด้วยอัตราเท่าๆกันมี โพรพิโอเนต 1.5 กรัมต่อลิตร อะซิเตต 1.5 กรัมต่อลิตร บิวทิเรต 1.5 กรัมต่อลิตร อย่างละฟลาสก์ รวมกรดทั้งหมดจะมี 4.5 กรัมต่อลิตร
- บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
- เก็บตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร ในทุกๆ 24 ชั่วโมง
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร
- จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง แล้วทำให้เซลล์แห้งโดยวิธีการการ Freeze-dried

### 3.3.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดต่อการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือก

จุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกแล้วได้สายพันธุ์ที่ดีที่สุด จะถูกเลี้ยงใน VFA ชนิดชนิดเดียวแบบไม่ผสม ดังนี้คือ โพรพิโอเนต 4.5 กรัมต่อลิตร อะซิเตต 4.5 กรัมต่อลิตร บิวทิเรต 4.5 กรัมต่อลิตร จุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดต่อการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้วิธีการทดลองของหัวข้อ 2.3.2 และ 2.3.3

### 3.3.5 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะต่อการเติบโตของจุลินทรีย์และการสะสม PHA

จุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกแล้วได้สายพันธุ์ที่ดีที่สุด จะถูกเลี้ยงใน MS medium และ น้ำหมักมูลแพะที่ได้จากกระบวนการ 2.3.1 ด้วยความเข้มข้นต่างกัน ซึ่งกำหนดให้ความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะเป็นเปอร์เซ็นต์ต่ออาหาร MS ที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ จุดประสงค์เพื่อการศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะต่อการเติบโตของจุลินทรีย์และการสะสม PHA โดยใช้วิธีการทดลองของหัวข้อ 2.3.2 และ 2.3.3



รูปภาพที่ 14 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกและปรับสภาพในมูลแพะ

## 3.4 การตรวจวิเคราะห์

### 3.4.1 วิธีการตรวจกรองเบื้องต้นสำหรับจุลชีพที่สร้าง PHA

นำ bacteria ที่บริสุทธิ์ในขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์ จาก 2.3.3 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาตรวจคัดกรองเชื้อที่มีการสร้าง PHA โดยการย้อมด้วยสี Sudan black B ประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

- เสมียร์เชื้อทิ้งให้แห้ง และฟิกรอยเสมีร์ด้วยเปลวไฟ

- จุ่มสไลด์ในสารละลาย 0.3% Sudan black B ใน 95% Ethanol นานอย่างน้อย 10 นาที
- ล้างสไลด์โดยผ่านน้ำประปาที่กำลังไหล
- ย้อมทับด้วย 0.5% Safranin ในน้ำกลั่น 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำประปาที่กำลังไหล ซับให้แห้งแล้วนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นก้อนสีน้ำเงินแกมดำ หรือจุดดำในไซโทพลาสซึมสีชมพู ถ้าให้ผลบวก จะเห็นเป็นลักษณะ granule ติดสีดำ หรือติดสีเข้มมากในเซลล์ที่มี granule มาก แสดงว่าเชื้ออาจสร้าง PHA ได้ (ดังรูปภาพที่ 2.2) และถ้าให้ผลลบ โดยการย้อมแล้วไม่ติดสี Sudan black B แต่ติดสีแดงของสี Safranin แสดงว่าเชื้ออาจไม่สามารถสร้าง PHA ได้

### 3.4.2 ความหนาแน่นของเซลล์ และ น้ำหนักแห้ง

แบ่งตัวอย่างที่เก็บได้ส่วนหนึ่งเพื่อหาความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร หาน้ำหนักเซลล์แห้งหลังจากการปั่นเหวี่ยงแล้ว ระเบิดด้วยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยใช้สูตร

สูตรคำนวณ

น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลชีพ

$$= \frac{\text{น้ำหนักเซลล์ (g)} \times 1000}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (mL)}}$$

### 3.4.3 ค่ากรดไขมันระเหยได้ (Volatile fatty acid : VFAs) โดยเทคนิค HPLC

การหาปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่เกิดขึ้นในระบบสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี

เครื่องมือและอุปกรณ์

คอลัมน์ HPLC reverse phase C18 column stablebond

- เครื่องตรวจวัดแบบ UV – Detector ความยาวคลื่น 210 nm

- Column Temperature 40 °C

- mobile phase flow rate 1.0 ml/min

- inject volume 5 ul

- เวลาในการฉีด 30 นาที

- ใช้ mobile phase H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100%

วิธีวิเคราะห์

กรองสารตัวอย่างใส่ขวดฉีด HPLC ติดตั้งเครื่องให้เรียบร้อยตามค่าที่ต้องการแล้วเริ่ม

วิเคราะห์สารตัวอย่าง คำนวณหาปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานโดย

ดูพื้นที่ใต้พีค (Peak Area)



### 3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของ PHA

- การเตรียมตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณPHA จากเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ ซึ่งเซลล์แห้ง 10-30 mg ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นใส่เมทานอลที่ผสมกรดเบนโซอิก และ คลอโรฟอร์มอย่างละ 2 ml จากนั้นปิดฝาให้สนิทแล้วให้ความร้อน 100 องศา 4 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ข้ามคั่นและใส่น้ำ 1 ml ผสมให้เข้ากันทิ้งให้แยกชั้นดูจุดชั้นล่างสุดมากรองเพื่อจะฉีด Gas Chromatography (GC)



รูปภาพที่ 15 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณPHA

- การวิเคราะห์ PHAs ด้วย Gas Chromatography (GC)  
ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์หาปริมาณพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHB) หรือพลาสติกชีวภาพที่สะสมในเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีวิเคราะห์แบบ Gas Chromatography (GC)
1. แยกเซลล์ออกจากอาหารเหลว โดยปั่นที่ 6000 รอบ/นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง
  2. ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง (FDCM) ประมาณ 50-100 มิลลิกรัม บนกระดาษชั่ง แล้วจึงถ่ายเซลล์ลงในใส่หลอดฝาเกลียว (Test tube)
  3. เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร และเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 3 (3% กรดซัลฟูริก) พร้อมด้วยกรดเบนโซอิก 10 mg/mL (internal standard) 2 มิลลิลิตร
  4. นำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง (นำออกมาเขย่าที่ครึ่งชั่วโมงแรก)
  5. นำออกมาปล่อยให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่านาน 2 นาทีติดต่อกัน ปล่อยให้ตั้งไว้ค้างคืน

6. ถ่ายชั้นคอลโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ใส่หลอด vial สำหรับการวิเคราะห์หา PHAs ด้วยวิธี Gas Chromatography (GC) ภายใต้สภาวะดังนี้

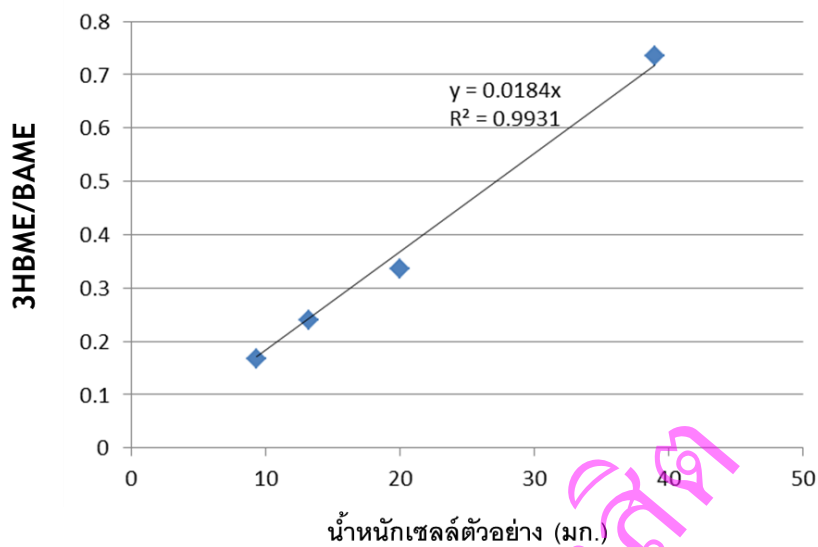
ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด HP-5 เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 25 เมตร
อุณหภูมิของ injector	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของคอลัมน์	: 100 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิของ Detector (FID)	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
Split ratio	: 50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: ก๊าซไนโตรเจน, ก๊าซฮีเลียม (carrier gas), ก๊าซไฮโดรเจน, Air gas (อัตราการไหล 1 มิลลิตรต่อนาที)
ปริมาตรที่ฉีด	: 1 ไมโครลิตร

7. บันทึกผลการทดลอง โดย retention time ของ 3-hydroxybutyrate methyl ester (3HBME) และ Benzoic acid methyl ester standard (BAME) จะอยู่ที่ประมาณ 4 และ 8 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 17

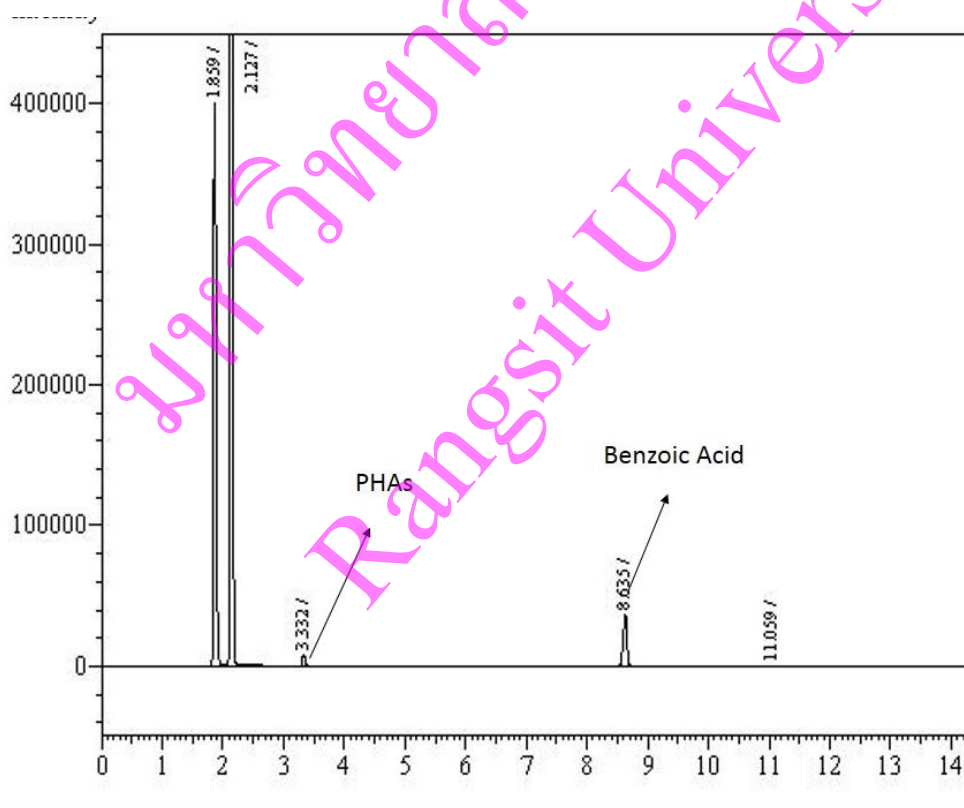
8. คำนวณหาค่าพื้นที่ใต้กราฟของผลการทดลองทั้งสองพีค แล้วจึงคำนวณหาค่าน้ำหนักและเปอร์เซ็นต์ PHB ได้จากอัตราส่วนของพื้นที่ดังนี้

$$\text{PHB (mg)} = (\text{3HBME/BAME area ratio}) \times \text{Slope ในกราฟ}$$

$$\text{PHB wt\%} = \text{PHB (mg)/FDCM (mg)} \times 100\%$$



รูปภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณหาปริมาณ PHB ในเซลล์แบคทีเรีย



รูปภาพที่ 17 GC โครมาโตแกรม ที่แสดง peak ของ 3HB methyl ester และ benzoic acid standard

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

การทดลองนี้เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ของการเกิดกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (VFAs) จากมูลแพะด้วยการหมักแบบไร้อากาศ โดยใช้อัตราส่วนของมูลแพะกับน้ำเป็น 1:2 และ 1:3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และมีการเติมของอาหาร 1 ครั้งเท่านั้นก่อนเริ่มระบบหมัก ใช้ระยะเวลาหมักของถังหมักกรด 30 วันจากนั้นจึงนำน้ำหมักมูลแพะที่มี VFAs ไปทำการทดสอบการผลิตสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) ในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งกำหนดให้ความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะเป็นเปอร์เซ็นต์ต่ออาหาร MS ที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตะกอนเซลล์ไปสกัดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography เพื่อหาปริมาณและชนิดของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่สะสมอยู่ในเซลล์แบคทีเรีย โดยผลที่ได้ต่างๆ ตลอดจนการทดลองมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

### 4.1 การทดลองผลิตกรดอินทรีย์ระเหยง่ายจากมูลแพะด้วยการหมักแบบไร้อากาศ

#### 4.1.1 ผลการศึกษาสมบัติของมูลแพะเริ่มต้นที่เข้าระบบ

จากการเก็บตัวอย่างมูลแพะมาวิเคราะห์คุณลักษณะต่างๆ ก่อนเข้าระบบเพื่อเป็นค่าพื้นฐานในการนำมาใช้เปรียบเทียบแล้วได้ข้อมูลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าการวิเคราะห์คุณลักษณะต่างๆ ในมูลแพะ

ตัวแปรต่างๆ	ค่าคุณลักษณะเริ่มต้นวัตถุดิบ
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	2.050 – 2.125 %
ปริมาณของแข็งระเหยง่ายทั้งหมด	1.167 – 1.170 %
Total Chemical Oxygen Demand: COD	691 – 720 มิลลิกรัมต่อลิตร
Biochemical Oxygen Demand, BOD	340 – 576 มิลลิกรัมต่อลิตร

#### 4.1.2 ผลการศึกษาตัวแปรที่ควบคุมระบบการผลิตกรดอินทรีย์ระเหยง่ายด้วยมูลแพะ

##### 4.1.2.1 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

ค่า pH ของสารละลายของเหลวในระบบหมักกรดที่ความเข้มข้นที่ 1:2 และ 1:3 แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าเปรียบเทียบความเป็นกรดต่างของของเหลวในระบบถังหมักกรด

วัน	ค่าความเข้มข้น 1:2	ค่าความเข้มข้น 1:3
1	7.00	7.00
4	6.95	6.82
8	6.87	6.78
11	6.86	6.78
15	6.65	6.61
18	7.37	7.24
22	7.65	7.57
25	6.65	7.10
29	6.92	7.21
30	7.05	7.26

จากตารางที่ 5 จะพบว่าค่า pH ของสารละลายในถังหมักมูลแพะที่อัตราส่วน 1:2 และ 1:3 มีค่าเปลี่ยนแปลงน้อยมาก และแนวโน้มของค่า pH ก็ไม่คงที่มีขึ้นมีลงตลอดเวลาในถังหมัก อาจเนื่องมาจากการในถังหมักของมูลแพะที่อัตราส่วน 1:2 และ 1:3 มีสารอินทรีย์ถูกย่อยไปเป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่ายเพียงเล็กน้อย

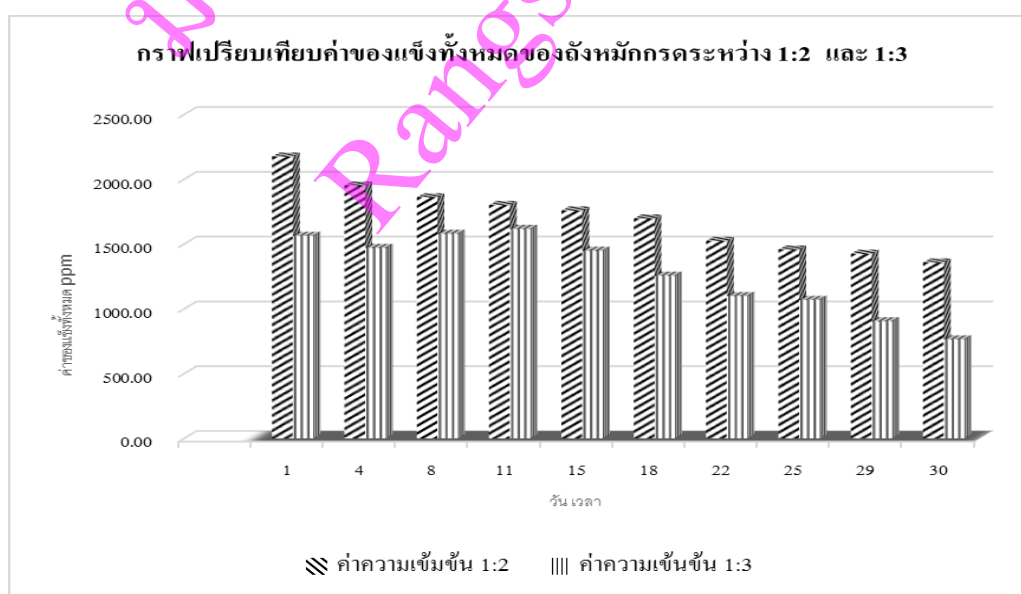
##### 4.1.2.2 ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total Solids, TS)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของแข็งทั้งหมดในระบบที่ความเข้มข้น 1:2 กับ 1:3 กับน้ำเสียเทียม แสดงตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่าเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแข็งทั้งหมดระหว่างอัตราส่วน 1:2 และ 1:3

วัน	ค่าความเข้มข้น 1:2 (ppm)	ค่าความเข้มข้น 1:3 (ppm)
1	2173.33	1561.67
4	1950.00	1468.33
8	1860.00	1578.33
11	1800.00	1615.00
15	1756.67	1446.67
18	1695.00	1255.00
22	1523.33	1096.67
25	1456.67	1068.33
29	1423.33	903.33
30	1356.67	763.33

จากตารางที่ 6 จะพบว่าค่าของแข็งทั้งหมดในสารละลายอัตราส่วน 1:2 มีค่าอยู่ในช่วง 2173.33 – 1356.67 มิลลิกรัมต่อลิตร และอัตราส่วนที่ 1:3 มีค่าอยู่ในช่วง 1561.67 – 763.33 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าของแข็งทั้งหมดในระบบถังหมักกรดมีค่าลดลงเรื่อยๆ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของแข็งที่เหลืออยู่ในระบบพบว่ามูลแพะที่อัตราส่วน 1:2 เหลือของแข็งในระบบมากที่สุดรองลงมาก็คือมูลแพะที่อัตราส่วน 1:3 ดังกราฟรูปภาพที่ 18



รูปภาพที่ 18 กราฟเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณของแข็งทั้งหมดระหว่าง 1:2 และ 1:3

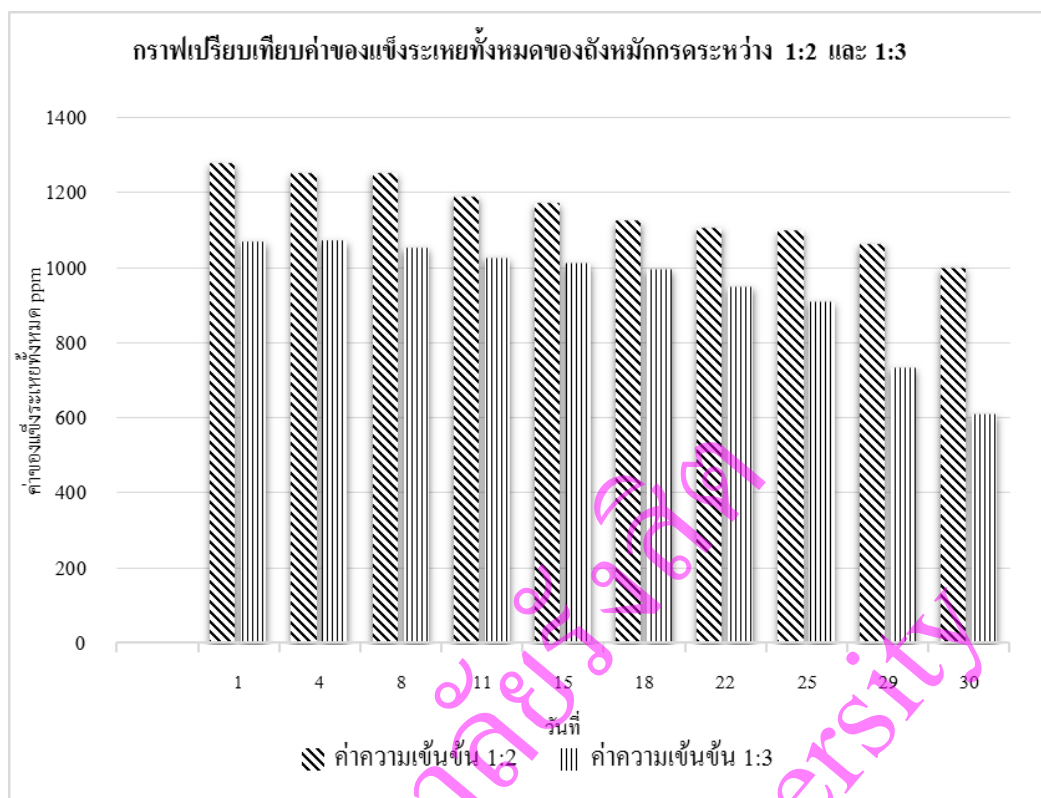
#### 4.1.2.3 ปริมาณของแข็งระเหยทั้งหมด (Total Volatile Solids, TVS)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของแข็งระเหยทั้งหมดและประสิทธิภาพการกำจัดของแข็งระเหยทั้งหมดในระบบที่ความเข้มข้น 1:2 กับ 1:3 แสดงตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่าเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแข็งระเหยทั้งหมดระหว่างอัตราส่วน 1:2 และ 1:3

วัน	ค่าความเข้มข้น 1:2 (ppm)	ค่าความเข้มข้น 1:3 (ppm)
1	1280.00	1071.67
4	1253.33	1073.33
8	1253.33	1055.00
11	1191.67	1028.33
15	1173.33	1013.33
18	1126.67	998.33
22	1108.33	951.67
25	1100.00	911.67
29	1065.00	735.00
30	1001.67	611.67

จากตารางที่ 7 จะพบว่าค่าของแข็งระเหยทั้งหมดในสารละลายอัตราส่วน 1:2 มีค่าอยู่ในช่วง 1280 – 1001.67 มิลลิกรัมต่อลิตร และอัตราส่วนที่ 1:3 มีค่าอยู่ในช่วง 1071 – 611.67 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าของแข็งระเหยทั้งหมดในระบบทั้งหมดกรดมีค่าลดลงเรื่อยๆ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของแข็งระเหยทั้งหมดที่เหลืออยู่ในระบบพบว่ามูลแพะที่อัตราส่วน 1:2 เหลือของแข็งในระบบมากที่สุดรองลงมาคือมูลแพะที่อัตราส่วน 1:3 ดังกราฟรูปภาพที่ 19



รูปภาพที่ 19 กราฟเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณของแข็งระเหยง่ายทั้งหมดระหว่างอัตราส่วน 1:2 และ 1:3

#### 4.1.2.4 ปริมาณออกซิเจนที่ต้องการออกซิไดส์อินทรีย์สาร (COD)

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบความเข้มข้นของปริมาณ COD ระหว่างอัตราส่วนที่ 1:2 และ 1:3

วัน (สัปดาห์)	อัตราส่วนที่ 1:2 (ppm)	อัตราส่วนที่ 1:3 (ppm)
1	52,000	9,600
2	30,000	4,800
3	24,000	4,800
4	24,000	4,800

จากตารางที่ 8 พบว่า ค่าซีโอดีอัตราส่วนที่ 1:2 มีปริมาณซีโอดีที่สูงมากในวันที่ป้อนสารเข้าสู่ระบบครั้งแรก และลดลงอย่างต่อเนื่องอย่างเห็นได้ชัดเจนในวันที่สารออกจากระบบ ส่วนสัดส่วนที่ 1:3 มีปริมาณซีโอดีน้อยกว่าสัดส่วน 1:2 แต่จะลดลงทีละน้อย เมื่อดูจากวันที่ป้อนสารเข้าสู่ระบบครั้งแรกและลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่สารออกจากระบบ เมื่อเทียบแล้วสัดส่วนที่ 1:2 จะมีค่าซีโอดีสูงที่สุด



#### 4.1.2.5 ปริมาณออกซิเจนที่แบคทีเรียต้องการใช้ในการย่อยสลายอินทรีย์สาร (BOD)

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบความเข้มข้นปริมาณ BOD ระหว่างอัตราส่วนที่ 1:2 และ 1:3

สัปดาห์ที่	BOD (ppm) 1:2	BOD (ppm) 1:3
1 (Influent)	1,200	1,300
4 (Effluent)	300	200

จากตารางที่ 9 ผลการทดลองพบว่า ในวันแรกวันที่ป้อนสารเข้าสู่ระบบครั้งแรก ค่าบีโอดีของ สัดส่วน 1:3 มีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับสัดส่วนที่ 1:2 แต่เมื่อถึงวันสุดท้ายค่าบีโอดีที่ได้มีปริมาณลดลง ซึ่งเป็นวันที่สารออกจากระบบ

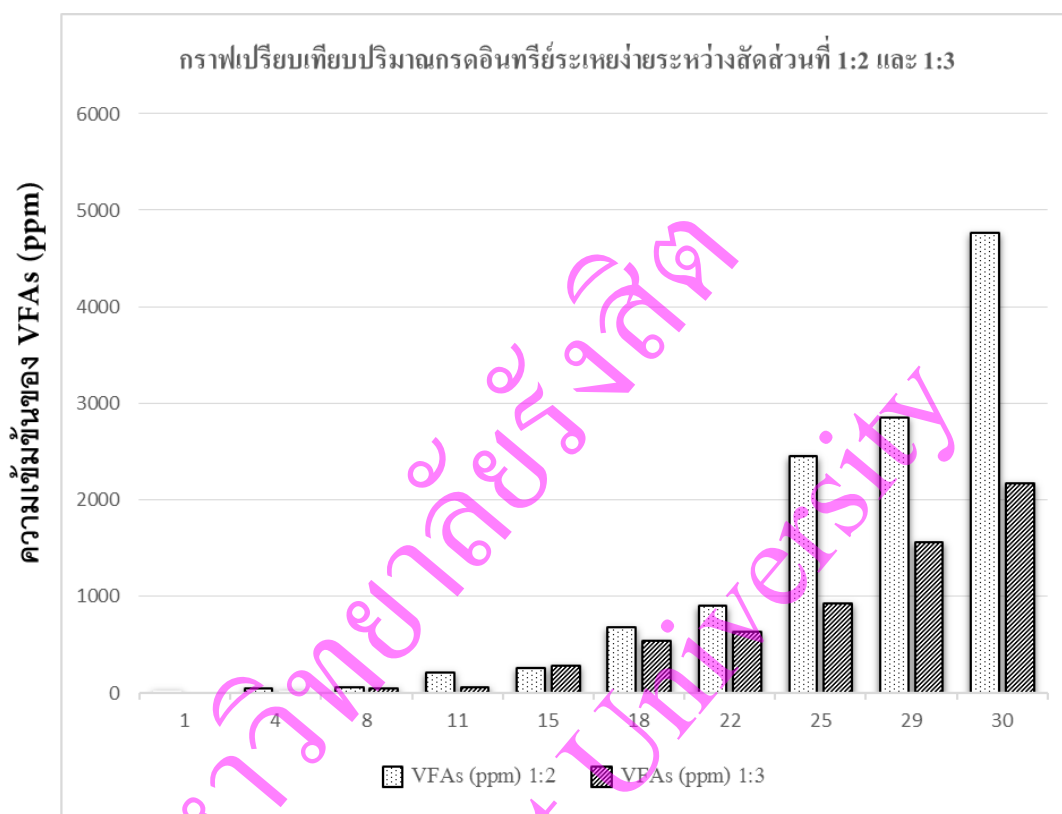
#### 4.1.2.6 ปริมาณกรดอินทรีย์ระเหย (VFAs)

การหาปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายโดยการวิเคราะห์จากเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยผลการทดลองมีดังนี้

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศ ในอัตราส่วนที่ 1:2 และ 1:3

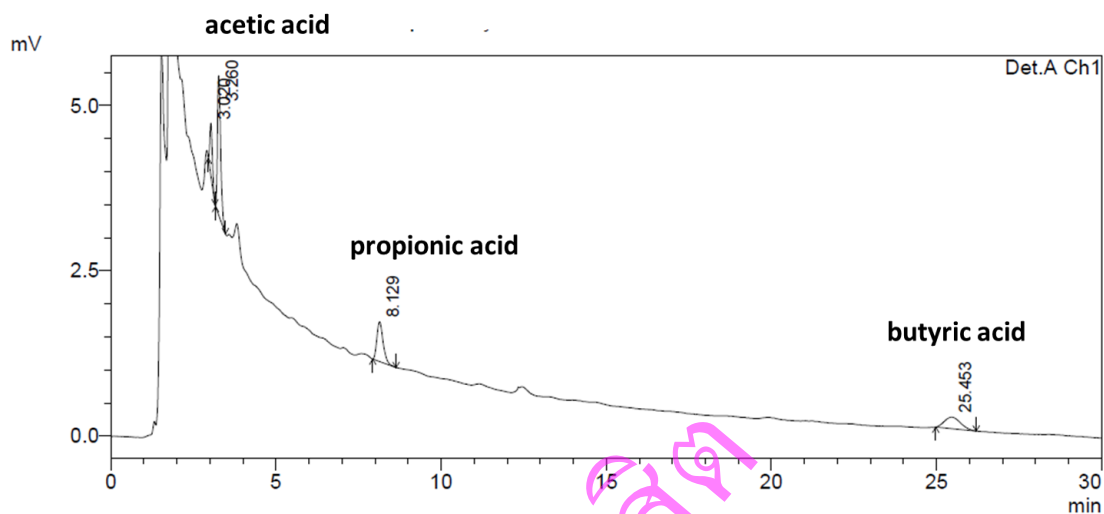
วัน	กรดอินทรีย์ระเหยง่าย (ppm)	
	อัตราส่วน 1:2	อัตราส่วน 1:3
1	20.9	0.0
4	46.3	24.8
8	55.7	46.8
11	212.0	57.8
15	254.9	283.2
18	677.1	539.3
22	898.05	629.2
25	2448.0	929.0
29	2853.9	1561.3
30	4767.0	2174.4

จากตารางที่ 10 ทำให้เราทราบว่าวิธีการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศที่อัตราส่วนที่ 1:2 สามารถผลิตกรดอินทรีย์ระเหยง่ายได้มากกว่า อัตราส่วนที่ 1:3 เนื่องจากอัตราส่วนที่ 1:2 มีความเข้มข้นของปริมาณสารอินทรีย์จากมูลแพะมากกว่าอัตราส่วนที่ 1:3 ดังกราฟรูปภาพที่ 20



รูปภาพที่ 20 กราฟเปรียบเทียบปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วนที่ 1:2 และ 1:3

เมื่อมาพิจารณากรดอินทรีย์ระเหยง่ายแต่ละชนิดจะทำให้พบว่าในระบบถังหมักกรดอัตราส่วน 1:2 มีกรดอินทรีย์ระเหยง่ายเกิดขึ้นในระบบดังนี้ Acetic acid มีความเข้มข้นมากที่สุด 2295.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมา Butyric acid 2084.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมา Propionic acid 309.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และสุดท้าย Lactic acid 77.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 21 ที่แสดง HPLC chromatogram ของ VFAs ชนิดต่างๆที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2 ของการหมักในวันที่ 30 และแสดงสรุปเป็นตารางในตารางที่ 11



PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.020	4158	778	13.015	21.238
2	3.260	14010	2107	43.852	57.555
3	8.129	7856	601	24.592	16.410
4	25.453	5923	176	18.541	4.796
Total		31947	3661	100.000	100.000

รูปภาพที่ 21 HPLC chromatogram ของ VFAs ชนิดต่างๆที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2 ของการหมักในวันที่ 30

ตารางที่ 11 แสดงค่าความเข้มข้นของปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2

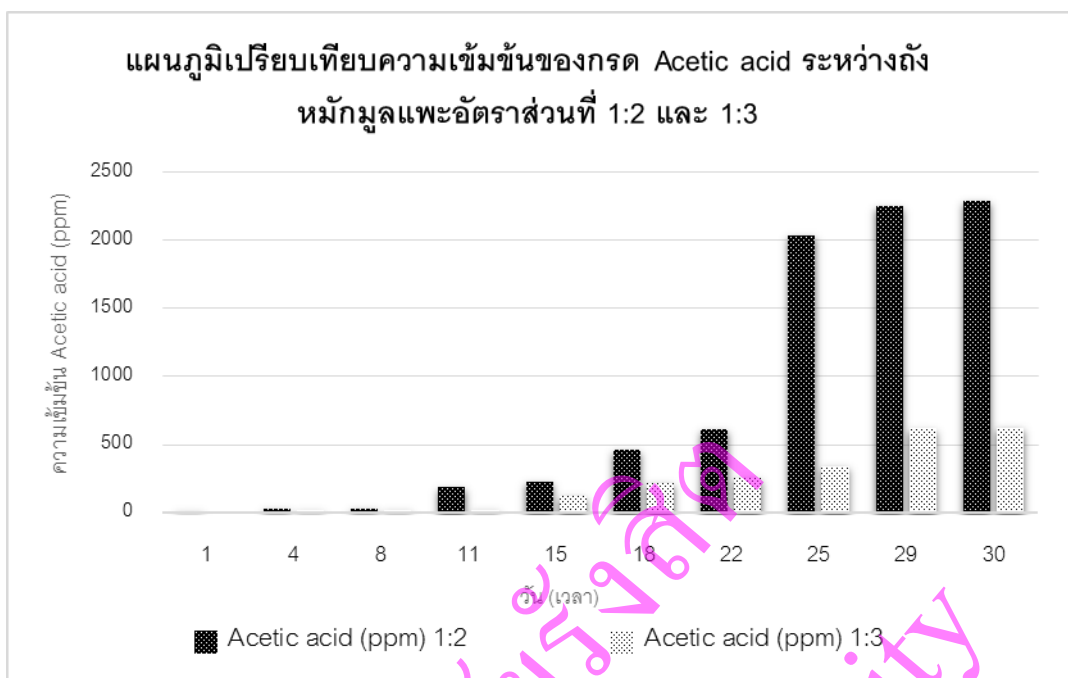
วัน (เวลา)	Acetic acid (ppm)	Lactic acid (ppm)	Propionic acid (ppm)	Butyric acid (ppm)
1	20.9	0	0	0
4	37.5	0	8.8	0
8	39.6	0	16.1	0
11	193.4	0	18.6	0
15	235.6	0	19.3	0
18	470.3	0	68.9	137.9
22	619.9	0.95	129.3	147.9
25	2041.6	6.6	215.1	184.7
29	2255.7	15.8	247.7	334.7
30	2295.9	77.5	309.2	2084.4

ในระบบถังหมักกรดอัตราส่วน 1:3 มีการดอินทรีย์ระเหยง่ายเกิดขึ้นในระบบดังนี้ Butyric acid มีความเข้มข้นมากที่สุด 669.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมา Acetic acid 632.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมา Lactic acid 442.7 มิลลิกรัมต่อลิตร และสุดท้าย Propionic acid 430.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 12

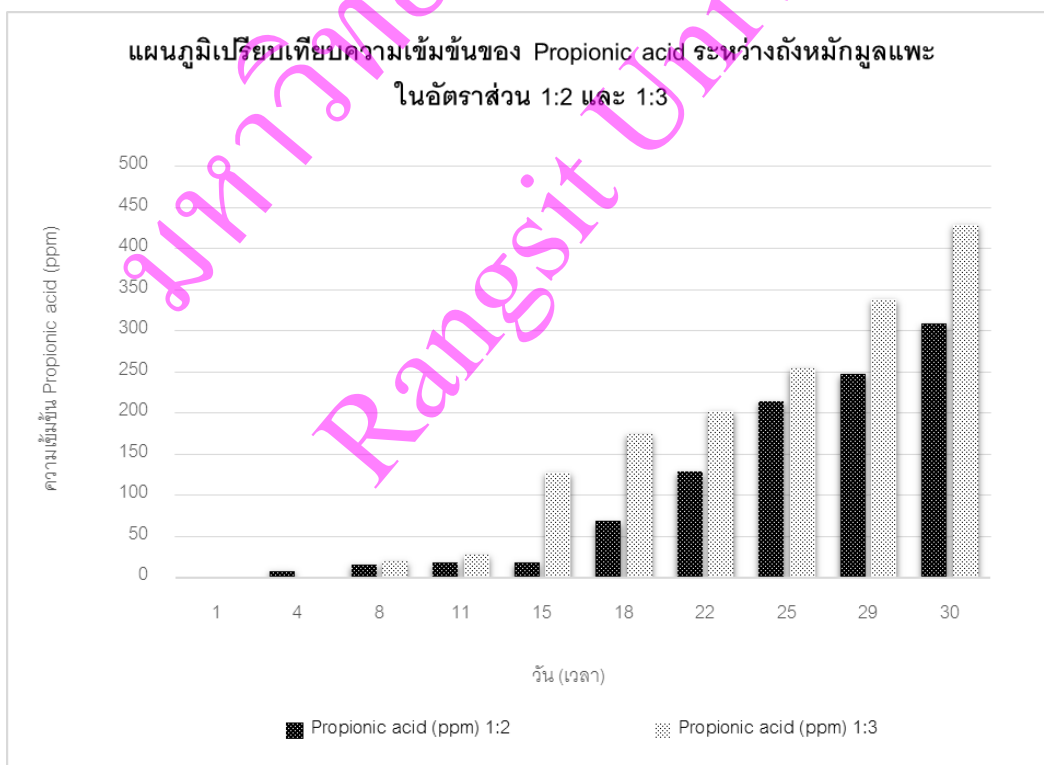
**ตารางที่ 12** แสดงค่าความเข้มข้นของปริมาณกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:3

วัน (เวลา)	Acetic acid (ppm)	Lactic acid (ppm)	Propionic acid (ppm)	Butyric acid (ppm)
1	0	0	0	0
4	24.8	0	0	0
8	26.7	0	20.1	0
11	29.7	0	28.1	0
15	128.3	4.2	128.5	22.2
18	227.2	12.2	175.2	124.7
22	262.7	34.5	202.9	129.1
25	349.7	126.7	255.1	197.5
29	624.9	264.6	339.1	332.7
30	632.6	442.7	430	669.1

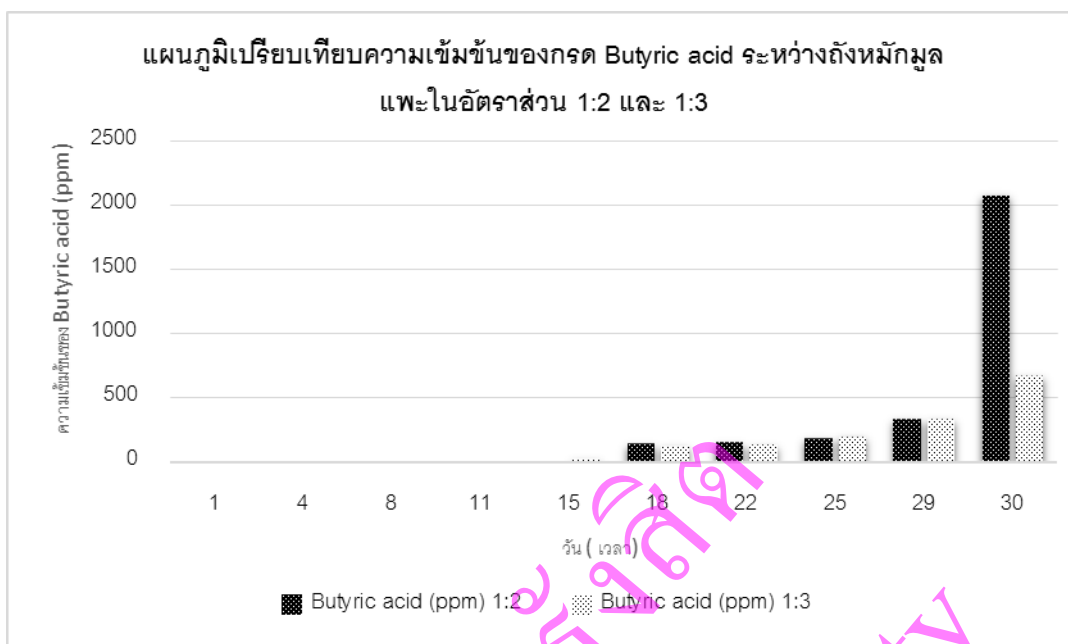
เมื่อพิจารณาทั้งหมดแล้วพบว่า การหมักมูลแพะที่อัตราส่วนที่ 1:2 มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอินทรีย์ระเหยง่ายได้มากกว่าที่อัตราส่วน 1:3 ชนิดของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตได้มากที่สุดคือ Acetic acid ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่สำคัญและเป็นตัวหลักในการผลิตพลาสติกชีวภาพ โดยกราฟรูปภาพที่ 22, 23, 24 ที่แสดงการเปรียบเทียบปริมาณการผลิต VFAs แต่ละชนิดคือ acetate, propionate และ butyrate ดังนี้



รูปภาพที่ 22 เปรียบเทียบความเข้มข้นของกรด Acetic acid ที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2 และ 1:3



รูปภาพที่ 23 เปรียบเทียบความเข้มข้นของกรด Propionic acid ที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2 และ 1:3



รูปภาพที่ 24 เปรียบเทียบความเข้มข้นของกรด Butyric acid ที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2 และ 1:3

ตารางที่ 13 แสดงค่าความเข้มข้นของปริมาณ VFA ที่ผลิตได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2 เปรียบเทียบกับปริมาณ VFA ที่ผลิตได้จากการหมักมูลโคที่ระยะเวลา 6 และ 11 เดือน

Parameters	มูลแพะ (1:2)	มูลโค (6 เดือน) <sup>a</sup>	มูลโค (11 เดือน) <sup>a</sup>
Acetate (ppm)	2300	3420	3740
Propionate (ppm)	310	1320	1590
Butyrate (ppm)	2080	750	1460
Total VFA (ppm)	4690	5490	6790
Volatile solid loaded (ppm)	38400	43200	43200
VFA Yield, $Y_{VFA/TVS}$ (g-VFA/g-TVS)	0.122	0.127	0.157

<sup>a</sup> อ้างอิงจาก Wei L. et. al, 2014

จากการทดลองทั้งหมดดังตารางที่ 13 พบว่าปริมาณของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile Fatty Acids, VFAs) ซึ่งผลิตได้จากการหมักมูลแพะในสภาวะไร้ออกซิเจนในขั้นตอนการสร้างกรด (Acidogenesis) มีการเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยในการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศในอัตราส่วน 1:2 จะมีกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตได้มากที่สุดคือ อะซิเตต (2.3 g/L) ตามด้วย บิวทิเรต (2.1 g/L) และ โพรพิโอ

เนต (0.3 g/L) ตามลำดับ ซึ่งคำนวณแล้วให้ผลผลิตต่อกรัมของปริมาณของแข็งมูลแพะที่ใส่เข้าไปในระบบ หรือ  $Y_{VFA/TVS}$  คือ 0.122 g-VFA/g-TVS ในขณะที่การผลิต VFA ที่ได้จากมูลวัวหมักเป็นระยะเวลา 6 เดือน (Wei L. et. al, 2014) ให้กรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ อะซิเตต (3.4 g/L) ตามด้วย บิวทิเรต (0.8 g/L) และ โพรพิโอเนต (1.3 g/L) ตามลำดับ ซึ่งได้  $Y_{VFA/TVS}$  คือ 0.127 g-VFA/g-TVS สำหรับการผลิต VFA ที่ได้จากมูลวัวหมักเป็นระยะเวลา 11 เดือน (Wei L. et. al, 2014) ให้กรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ อะซิเตต (3.7 g/L) ตามด้วย บิวทิเรต (1.5 g/L) และ โพรพิโอเนต (1.6 g/L) ตามลำดับ ซึ่งได้  $Y_{VFA/TVS}$  คือ 0.157 g-VFA/g-TVS

โดยสรุปแล้วปริมาณ VFAs และปริมาณการให้ผลผลิตจากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศ มีปริมาณเพียงพอเทียบเท่ากับการหมักมูลวัว ซึ่งทางคณะผู้วิจัยเห็นว่าการหมักมูลแพะเพื่อให้ได้กรดอินทรีย์ระเหยง่าย จะสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่สำคัญในการผลิตพลาสติกชีวภาพ PHA ได้ต่อไป

## 4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์และการศึกษาผลของกรดอินทรีย์ระเหยง่ายต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

### 4.2.1 การศึกษาผลของการผสมกรดอินทรีย์ต่อการเติบโตและการผลิต PHAs เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว คือ *Alcaligenes eutrophus* (AE), *Cupriavidus necator* (CN) และ *Pseudomonas oleovorans* (PO) ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนเป็นการผสมกรดอินทรีย์ที่จำเป็นทั้ง 3 ชนิด บ่มในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร มีอาหาร MS 150 มิลลิลิตร โดยเติมสารอาหารกรดอินทรีย์ที่ผสมด้วยอัตราเท่าๆกันคือ โพรพิโอเนต 1.5 กรัมต่อลิตร อะซิเตต 1.5 กรัมต่อลิตร บิวทิเรต 1.5 กรัมต่อลิตร อย่างละพลาสติก รวมกรดทั้งหมด 4.5 กรัมต่อลิตร แล้วเก็บตัวอย่างทุกวัน วันละ 14 มิลลิลิตร ระยะเวลา 3 วัน ข้อมูลที่ได้ผลเป็นค่าเฉลี่ยดังนี้

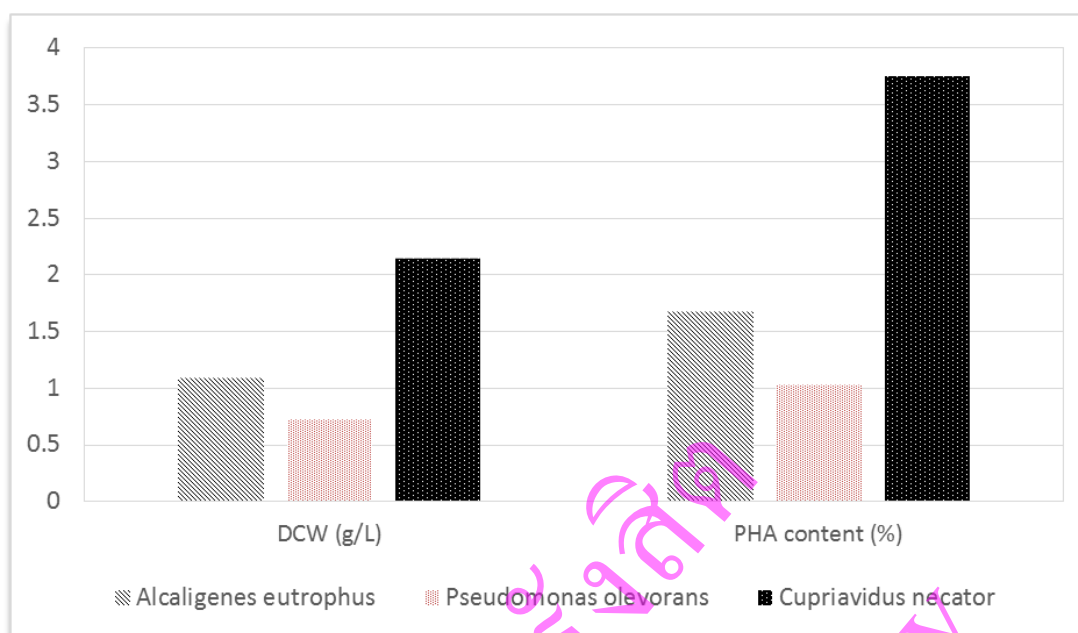
ตารางที่ 14 แสดงค่าความหนาแน่นของเซลล์ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm และ pH หลังจากบ่มด้วยกรดอินทรีย์ที่ผสมของโพรพิโอเนต 1.5 g/L อะซิเตต 1.5 g/L และ บิวทิเรต 1.5 g/L

เชื้อแบคทีเรีย	เวลา (hr)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm (OD <sub>620</sub> )	pH	ความหนาแน่นของเซลล์ DCW (g/L)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	24	3.48	7.92	1.04
	48	3.20	7.78	1.53
	72	3.27	8.41	1.09
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	24	4.62	7.73	1.49
	48	4.26	8.43	1.31
	72	2.67	7.46	0.72
<i>Cupriavidus necator</i>	24	5.05	8.23	1.66
	48	9.9	8.64	2.51
	72	8.4	7.98	2.14

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณ PHAรวม ต่อน้ำหนักเซลล์ และปริมาณโมโนเมอร์ต่อ PHA รวม หลังจากบ่มด้วยกรดอินทรีย์ที่ผสมของโพรพิโอเนต 1.5 g/L อะซิเตต 1.5 g/L และ บิวทิเรต 1.5 g/L

เชื้อแบคทีเรีย	เวลา (hr)	ปริมาณ PHAรวม ต่อน้ำหนักเซลล์ (%)	ปริมาณ 3HB (%) ต่อ PHA รวม	ปริมาณ 3HV (%) ต่อ PHA รวม
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	24	1.00	54.42	45.58
	48	1.03	76.01	23.99
	72	1.67	86.48	13.52
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	24	0.58	100.00	0.00
	48	0.75	100.00	0.00
	72	1.02	100.00	0.00
<i>Cupriavidus necator</i>	24	1.69	90.52	9.48
	48	2.10	89.66	10.34
	72	3.75	90.19	9.81

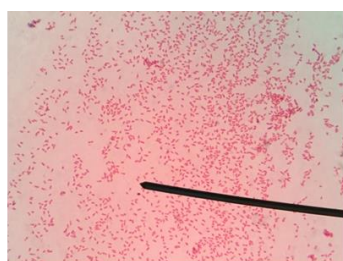




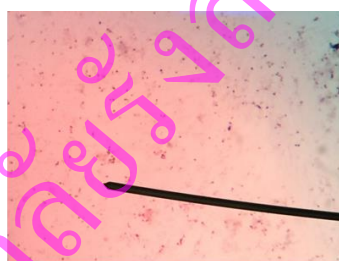
รูปภาพที่ 25 แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ PHA รวมต่อน้ำหนักเซลล์ของจุลินทรีย์ทั้ง 3 สารพันธุ์ หลังจากบ่มด้วยกรดอินทรีย์ที่ผสม (โพรพิโอเนต 1.5 g/L อะซิเตต 1.5 g/L และ บิวทิเรต 1.5 g/L)

จากตารางที่ 14 และรูปภาพที่ 25 แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นกรดอินทรีย์ผสมได้ดีที่สุดเมื่อผ่านการบ่มนาน 72 ชั่วโมง คือ เชื้อ *Cupriavidus necator* (2.14 g/L DCW) รองลงมาคือเชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes eutrophus* (1.09 g/L DCW) และเจริญได้แย่งที่สุดคือ *Pseudomonas oleovorans* (0.72 g/L DCW) และจากตารางที่ 15 และรูปภาพที่ 25 *Cupriavidus necator* สามารถสะสม PHA ได้มากที่สุดคือ 3.75 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งของแบคทีเรีย โดยที่แบคทีเรียสายพันธุ์ *Cupriavidus necator* และ *Alcaligenes eutrophus* สามารถผลิต PHA ได้ในรูปของโคพอลิเมอร์ที่เกิดแบบสุ่มชนิด Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] ซึ่งมีมอนอเมอร์ชนิด 3-hydroxyvalerate (3HV) ที่เกิดได้ตั้งแต่ 10-15 mol% โดยจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดสามารถใช้อะซิเตตและกระตุ้นให้เกิด acetyl-CoA ซึ่ง acetyl-CoA ถูกใช้ในการสังเคราะห์ 3-hydroxybutyrate และสามารถใช้กรดโพรพิโอเนต และกรดบิวทิเรต เพื่อกระตุ้นให้เกิด propionyl-CoA ซึ่ง propionyl-CoA ถูกใช้ในการสังเคราะห์ 3-hydroxyvalerate สำหรับแบคทีเรีย *Pseudomonas oleovorans* นั้นไม่สามารถสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ได้ในการวิจัยนี้ โดยจะสะสมในรูปของโฮโมพอลิเมอร์ มีสัดส่วน 3HB ใน PHA 100%

จากผลการทดลองการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสามารถใช้กรดอินทรีย์รวมเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHA สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียชนิด *Cupriavidus necator* เป็นเชื้อที่มีการเจริญเติบโตและสะสมพอลิเมอร์ได้ดีที่สุดดังตาราง รูปภาพ และรายงานด้านบน โดยที่ในรูปภาพที่ 26 แสดงให้เห็นถึงการสะสมของ PHA ในเซลล์ *Cupriavidus necator* ซึ่งสามารถสะสมได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียอีกสองสายพันธุ์ ดังนั้นในการทดลองเพื่อศึกษาการผลิต PHA ในกรดอินทรีย์แต่ละชนิดและน้ำหมักมูลแพะ จุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* จะถูกใช้ทดลองเพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เพื่อการผลิต PHA และการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียให้ได้มากที่สุดในช่วงต่อไป



*Alcaligenes eutrophus*



*Pseudomonas oleovorans*



*Cupriavidus necator*

รูปภาพที่ 26 แสดงภาพการติดสี Sudan black B ของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดเพื่อแสดงความเป็นไปได้ของปริมาณ PHA ที่สะสมภายในเซลล์

#### 4.2.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดต่อการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือก *Cupriavidus necator*

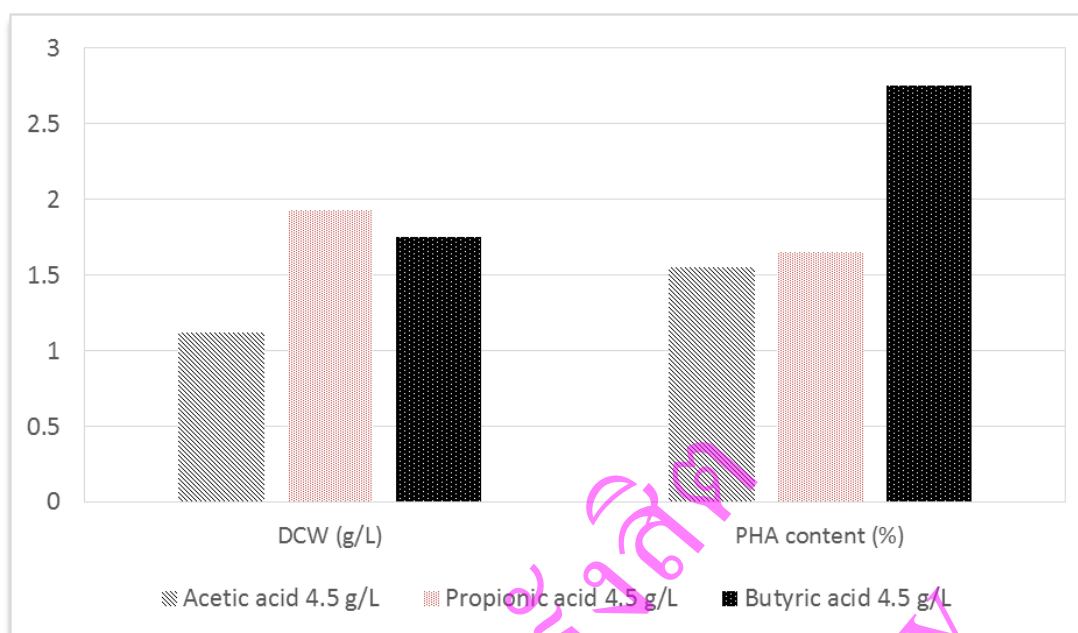
จุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* ที่ผ่านการคัดเลือกถือเป็นสายพันธุ์ที่ผลิต PHA และเจริญเติบโตในกรดอินทรีย์ได้ดีที่สุด จะถูกเลี้ยงโดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกรดอินทรีย์ 3 ชนิด คือ กรดโพธิโอเนต 4.5 กรัมต่อลิตร กรดอะซิเตต 4.5 กรัมต่อลิตร และกรดบิวทิเรต 4.5 กรัมต่อลิตร บ่มแยกในฟลาสก์เดี่ยวขนาด 500 มิลลิลิตร มีอาหาร MS 150 มิลลิลิตร แล้วเก็บตัวอย่างทุกๆวัน วันละ 14 มิลลิลิตร ระยะเวลา 3 วัน ข้อมูลที่ได้ผลเป็นค่าเฉลี่ยดังนี้

ตารางที่ 16 แสดงค่าความหนาแน่นของเซลล์ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm และ pH ของเชื้อจุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* หลังจากบ่มด้วยกรดอินทรีย์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 4.5 g/L

ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์	เวลา (hr)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm ( $OD_{620}$ )	pH	ความหนาแน่นของเซลล์ DCW (g/L)
Acetic acid 4.5 g/L	24	7.8	8.38	0.45
	48	15.7	8.93	0.76
	72	5.55	8.95	1.12
Propionic acid 4.5 g/L	24	16.6	7.91	0.54
	48	5.05	8.32	0.97
	72	4.9	8.48	1.93
Butyric acid 4.5 g/L	24	17.35	7.86	1.47
	48	11.3	8.42	1.60
	72	6.9	8.32	1.75

ตารางที่ 17 แสดงปริมาณ PHAรวม ต่อน้ำหนักเซลล์ และปริมาณโมโนเมอร์ต่อ PHA รวม ของเชื้อจุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* หลังจากบ่มด้วยกรดอินทรีย์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 4.5 g/L

ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์	เวลา (hr)	ปริมาณ PHAรวม ต่อน้ำหนักเซลล์ (%)	ปริมาณ 3HB (%) ต่อ PHA รวม	ปริมาณ 3HV (%) ต่อ PHA รวม
Acetic acid 4.5 g/L	24	0.59	100.00	0.00
	48	1.36	100.00	0.00
	72	1.55	100.00	0.00
Propionic acid 4.5 g/L	24	0.52	86.09	13.91
	48	1.07	88.09	11.91
	72	1.65	87.05	12.95
Butyric acid 4.5 g/L	24	1.15	96.49	3.51
	48	1.43	94.64	5.36
	72	2.75	93.75	6.25

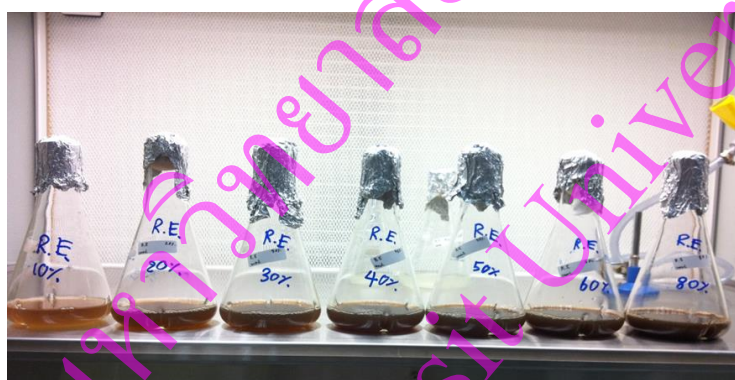


รูปภาพที่ 27 แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ PHA รวมต่อน้ำหนักเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* หลังจากบ่มด้วยกรดอินทรีย์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 4.5 g/L

จากตารางที่ 16 และรูปภาพที่ 27 แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *Cupriavidus necator* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในกรด Propionic acid (1.93 g/L DCW) ตามด้วย Butyric acid (1.75 g/L DCW) และ Acetic acid (1.12 g/L DCW) ตามลำดับ เมื่อผ่านการบ่มนาน 72 ชั่วโมง แต่ในขณะที่ *Cupriavidus necator* สามารถสะสม PHA ได้มากที่สุดในกรด Butyric acid คือ 2.75 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของแบคทีเรีย ตามด้วย Propionic acid และ Acetic acid ที่ 1.65 และ 1.55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 17 และรูปภาพที่ 27) จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า *Cupriavidus necator* ที่ผ่านการคัดเลือกสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการใช้กรดอินทรีย์ระเหยง่ายในการเจริญเติบโตและสะสม PHA ได้ทุกประเภท โดยกรดอินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดคือ กรด Butyric acid ซึ่งเกิดโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-6%-3HV) ตามด้วย Propionic acid เกิดโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-13%-3HV) และ Acetic acid เกิดโฮโมพอลิเมอร์ PHB ดังนั้นในการทดลองเพื่อศึกษาการผลิต PHA ในน้ำหมักมูลแพะ จุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* ซึ่งสามารถสะสม PHA และเจริญเติบโตได้ในกรดอินทรีย์ทุกชนิดจะถูกใช้ทดลองเพื่อหาปริมาณและความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะที่เหมาะสมเพื่อการผลิต PHA และการของเซลล์แบคทีเรียให้ได้มากที่สุดในการขั้นต่อไป

#### 4.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะต่อการเติบโตของจุลินทรีย์และการสะสมพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตในจุลินทรีย์ *Cupriavidus necator*

จุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* ที่ผ่านการคัดเลือกถือเป็นสายพันธุ์ที่ผลิต PHA และเจริญเติบโตในกรดอินทรีย์ได้ดีที่สุด จะถูกเลี้ยงด้วยการใช้น้ำหมักมูลแพะที่ผ่านการหมักโดยไม่ใช้อากาศ ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MS เป็นแหล่งอาหารสำหรับการผลิต PHA โดยผสมน้ำหมักมูลแพะเป็นอัตราส่วนเปอร์เซ็นต์คือ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ดังรูปภาพที่ 28 น้ำหมักมูลแพะที่ใช้ในการทดลองนี้ได้จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศที่อัตราส่วนที่ 1:2 ในระยะเวลา 30 วัน ซึ่งเกิดกรดอินทรีย์ระเหยง่ายสูงสุดดังนี้คือ กรดโพรพิโอเนต 0.31 กรัมต่อลิตร กรดอะซิเตต 2.3 กรัมต่อลิตร และกรดบิวทิเรต 2.1 กรัมต่อลิตร รวม VFAs ทั้งหมด 4.71 กรัมต่อลิตร หลังจากบ่มด้วยเครื่องเขย่าแล้วเก็บตัวอย่างทุกวัน วันละ 14 มิลลิลิตร ระยะเวลา 3 วัน ข้อมูลที่ได้ผลเป็นค่าเฉลี่ยดังนี้



24 hr

*Cupriavidus necator*

72 hr

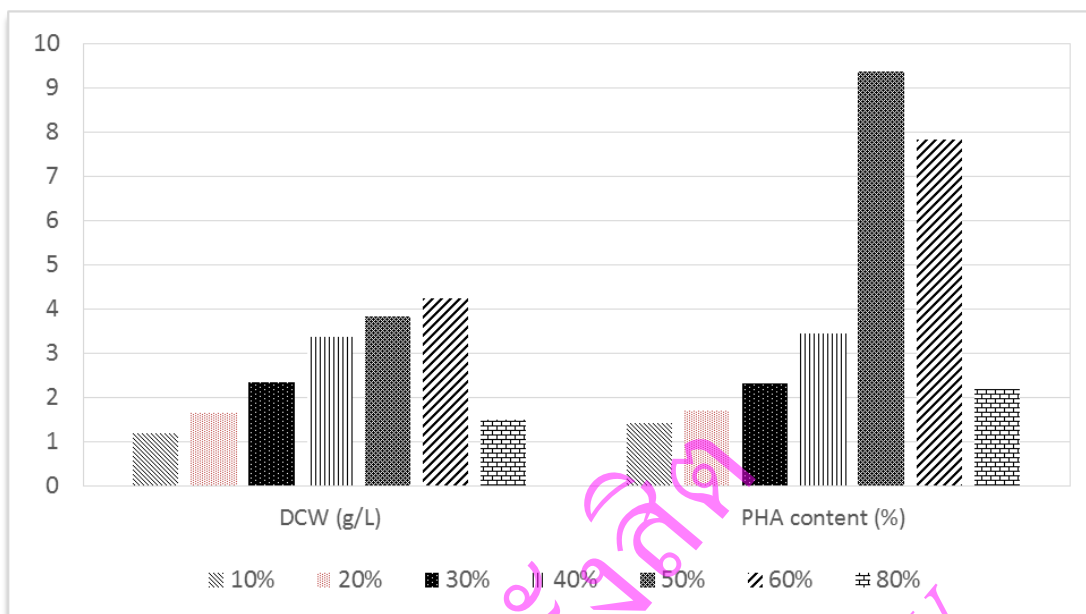
รูปภาพที่ 28 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* หลังจากบ่มด้วยน้ำหมักมูลแพะในปริมาณ 10%-80% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระยะเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 18 แสดงค่าความหนาแน่นของเซลล์ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm และ pH ของเชื้อจุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* หลังจากบ่มด้วยน้ำหมักมูลแพะในปริมาณ 10%-80% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

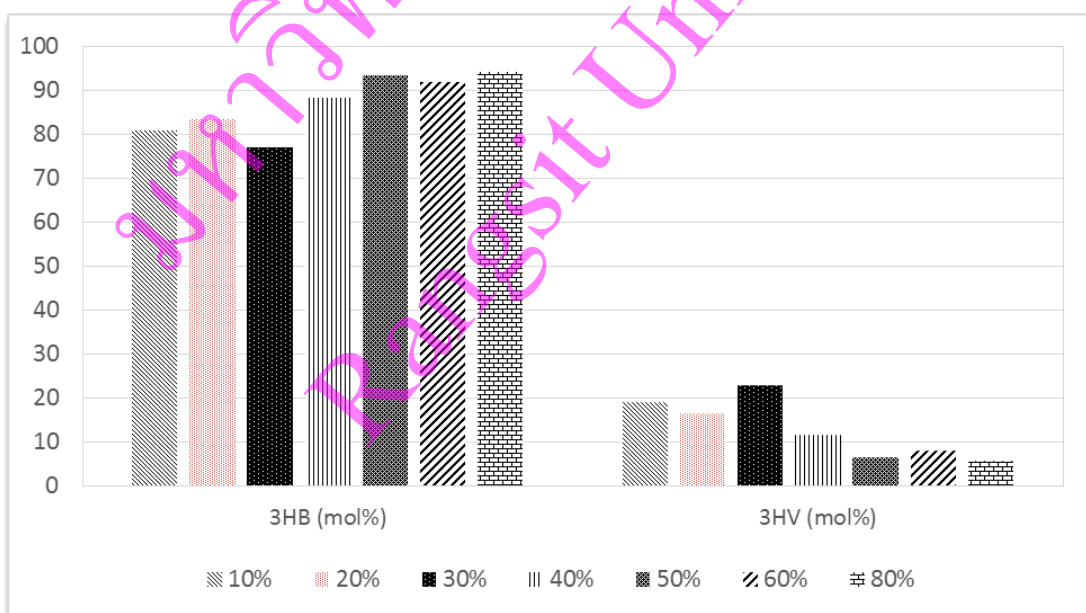
ปริมาณมูลแพะ (%)	เวลา (hr)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm (OD <sub>620</sub> )	pH	ความหนาแน่นของเซลล์ DCW (g/L)
10%	24	2.97	8.31	1.65
	48	3	8.26	1.58
	72	12.8	7.96	1.21
20%	24	5.4	8.68	1.67
	48	2.43	8.66	1.47
	72	8.4	8.27	1.66
30%	24	6.65	8.24	1.99
	48	8.1	8.73	2.45
	72	10.3	8.35	2.36
40%	24	9.4	8.78	3.50
	48	10.9	8.75	3.11
	72	13.1	8.33	3.38
50%	24	9.8	8.77	3.36
	48	11	8.76	3.14
	72	15	8.41	3.84
60%	24	7.26	8.65	3.94
	48	13.6	8.67	3.91
	72	11.9	8.35	4.25
80%	24	3.18	9.17	1.45
	48	5.45	9.16	1.36
	72	8.1	8.85	1.51

ตารางที่ 19 แสดงปริมาณ PHAรวม ต่อน้ำหนักเซลล์ และปริมาณโมนอเมอร์ต่อ PHA รวม ของ เชื้อจุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* หลังจากบ่มด้วยน้ำหมักมูลแพะในปริมาณ 10%-80% ของ อาหารเลี้ยงเชื้อ

ปริมาณมูลแพะ (%)	เวลา (hr)	ปริมาณ PHAรวม ต่อน้ำหนักเซลล์ (%)	ปริมาณ 3HB (%) ต่อ PHA รวม	ปริมาณ 3HV (%) ต่อ PHA รวม
10%	24	0.93	100.0	0.0
	48	1.19	77.9	22.1
	72	1.43	81.0	19.0
20%	24	0.93	100.0	0.0
	48	1.15	89.2	10.8
	72	1.72	83.6	16.4
30%	24	0.89	100.0	0.0
	48	1.51	87.0	13.0
	72	2.34	77.2	22.8
40%	24	0.66	100.0	0.0
	48	2.09	94.9	5.1
	72	3.45	88.5	11.5
50%	24	2.90	95.4	4.6
	48	5.86	85.5	14.5
	72	9.38	93.7	6.3
60%	24	3.08	89.7	10.3
	48	4.67	87.3	12.7
	72	7.85	92.1	7.9
80%	24	1.40	87.6	12.4
	48	2.00	92.5	7.5
	72	2.20	94.4	5.6



รูปภาพที่ 29 แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ และปริมาณ PHA รวมต่อน้ำหนักเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* หลังจากบ่มด้วยน้ำหมักมูลแพะในปริมาณ 10%-80% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปภาพที่ 30 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณโมโนเมอร์ 3HB และ 3HV ต่อ PHA รวมของเชื้อจุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* หลังจากบ่มด้วยน้ำหมักมูลแพะในปริมาณ 10%-80% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ



จากตารางที่ 18 แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *Cupriavidus necator* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะที่ 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (4.25 g/L DCW) รองลงมาคือ 50% (3.84 g/L DCW) เมื่อผ่านการบ่มนาน 72 ชั่วโมง จากรูปภาพที่ 29 จะสังเกตได้ว่าความหนาแน่นของเซลล์ (DCW, dry cell weight) จะค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะเพิ่มขึ้นจาก 10% ถึง 60% แต่ในความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะที่ 80% ความหนาแน่นของเซลล์กลับลดลง เนื่องจากที่ 80% ปริมาณของ VFAs มีความเข้มข้นมากเกินไปที่ *Cupriavidus necator* จะสามารถเติบโตได้ดี ซึ่งผู้วิจัยเห็นว่า VFAs เมื่อมีปริมาณมากอาจจะยับยั้งการเจริญของเซลล์แบคทีเรียได้

จากตารางที่ 19 แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *Cupriavidus necator* สามารถสะสมPHA ได้ดีที่สุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะที่ 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (9.38% PHA) รองลงมาคือ 60 เปอร์เซ็นต์ (7.85% PHA) ตามลำดับ จากรูปภาพที่ 29 จะสังเกตได้ว่าปริมาณ PHA รวมต่อน้ำหนักเซลล์ (% PHA content) จะค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะเพิ่มขึ้นจาก 10% ถึง 50% และจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะเพิ่มขึ้นเกิน 60% เนื่องจากที่ 60-80% VFAs มีความเข้มข้นมากเกินไปและอาจจะยับยั้งการสะสมของ PHA ในเซลล์แบคทีเรีย *Cupriavidus necator*

จากรูปภาพที่ 30 จะเห็นได้ว่า *Cupriavidus necator* สามารถผลิตPHA ได้ในรูปของโคพอลิเมอร์ชนิด P(3HB-co-3HV) ซึ่งมีมอนอเมอร์ชนิด 3-hydroxyvalerate (3HV) ที่เกิดได้ตั้งแต่ 5-20 mol% จากการบ่มด้วยน้ำหมักมูลแพะที่ผ่านการหมักโดยไม่ใช้อากาศ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า *Cupriavidus necator* สามารถใช้อซิเจนและกระตุ้นให้เกิด acetyl-CoA ซึ่งถูกใช้ในการสังเคราะห์ 3-hydroxybutyrate และสามารถใช้กรดไพรูวิกและกรดบิวทิเรต เพื่อกระตุ้นให้เกิด propionyl-CoA ซึ่งถูกใช้ในการสังเคราะห์ 3-hydroxyvalerate ได้

ตารางที่ 20 แสดงปริมาณ PHAรวม ต่อน้ำหนักเซลล์ ปริมาณ 3HVมอนอเมอร์ต่อ PHAรวม และผลผลิต PHA yield ของเชื้อจุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* หลังจากบ่มด้วยน้ำหมักมูลแพะในปริมาณ 50% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับปริมาณ PHA ที่ผลิตได้จากการหมักมูลโคที่ระยะเวลา 6 และ 11 เดือน

Parameters	มูลแพะ (1:2)	มูลโค (6 เดือน) <sup>o</sup>	มูลโค (11 เดือน) <sup>o</sup>
ปริมาณ PHA ต่อน้ำหนักเซลล์ (%)	9.4	42	36
ปริมาณ 3HV (%) ต่อ PHA รวม	6.3	34.0	33.5
PHA Yield, $Y_{PHA/VFA}$ (g-PHA/g-VFA)	0.01	0.04	0.03

<sup>o</sup> อ้างอิงจาก Wei L. et. al, 2014

จากผลการทดลองทั้งหมดของการเลี้ยง *Cupriavidus necator* ที่ผ่านการคัดเลือกสำหรับการผลิต PHA ด้วยน้ำหมักมูลแพะ ในตารางที่ 20 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะที่ 50 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มากที่สุด เนื่องจาก *Cupriavidus necator* สามารถมีผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (PHA productivity) ได้สูงที่สุดคือ 5 mg/L/hr ในขณะที่ 60 เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะมีผลผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตที่ 4.6 mg/L/hr เท่านั้น ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากเชื้อ *Cupriavidus necator* ด้วยอาหารที่ได้จากน้ำหมักมูลแพะที่ผ่านการหมักโดยไม่ใช้อากาศผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MS อัตราส่วนของน้ำหมักมูลแพะที่เหมาะสมที่สุดคือ 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งเมื่อบ่มในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 วันแล้วจะให้ผลผลิต PHA โดยเฉลี่ยที่ 5 mg/L/hr สามารถสะสม PHA ได้ 9.4% ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 3.84 g/L และมีปริมาณคอมอนอเมอร์ 3HV ประมาณ 6.3% ซึ่งคำนวณแล้วให้ผลผลิตต่อกรัมของปริมาณ VFA ที่ใส่เข้าไปในระบบ หรือ  $Y_{PHA/VFA}$  คือ 0.001 g-PHA/g-VFA ในขณะที่การผลิต PHA ที่ได้จากมูลวัวหมักเป็นระยะเวลา 6 เดือน (Wei L. et al, 2014) จะให้ผลผลิต PHA โดยเฉลี่ยที่ 0.04 g-PHA/g-VFA สามารถสะสม PHA ได้ 42% และมีปริมาณคอมอนอเมอร์ 3HV ประมาณ 34% สำหรับการผลิต VFA ที่ได้จากมูลวัวหมักเป็นระยะเวลา 11 เดือน (Wei L. et al, 2014) ให้ผลผลิต PHA โดยเฉลี่ยที่ 0.03 g-PHA/g-VFA สามารถสะสม PHA ได้ 36% ที่ และมีปริมาณคอมอนอเมอร์ 3HV ประมาณ 33.5%

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ของเหลือทิ้งจากฟาร์มแพะเป็นอาหารแทนการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือกรดอินทรีย์สังเคราะห์ได้ โดยปริมาณ PHA ที่ผลิตได้ และปริมาณการให้ผลผลิตจากการใช้ VFA จากกรหมักมูลแพะแบบไร้อากาศ ให้ผลผลิต PHA yield น้อยกว่าการหมักมูลวัวประมาณ 3-4 เท่าตัว ซึ่งอาจเกิดจากการไม่ได้ทำการทดลองผลิตแบบ high cell density fermentation อย่างไรก็ตามทางคณะผู้วิจัยเห็นว่าจำนวนและปริมาณผลผลิตและคุณสมบัติของพลาสติกชีวภาพที่ได้จากน้ำหมักมูลแพะในการทดลองนี้มีแนวโน้มที่จะสามารถนำงานวิจัยนี้ไปต่อยอดในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต

## บทที่ 5

### สรุป และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

1. จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการเกิดกรดอินทรีย์ระเหยง่ายจากมูลแพะด้วยการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศเป็นเวลา 30 วัน ในอัตราส่วนมูลแพะต่อน้ำ 1:2 สามารถผลิตกรดอินทรีย์ระเหยง่ายได้มากกว่า อัตราส่วนที่ 1:3 โดยมีกรดอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตได้มากที่สุดคือ อะซิเตต 2.3 g/L ตามด้วย บิวทิเรต 2.1 g/L และ โพรพิโอเนต 0.3 g/L ซึ่งให้ผลผลิตต่อกรัมของปริมาณของแข็งมูลแพะที่ใส่เข้าไปในระบบ หรือ  $Y_{VFA/TVS}$  คือ 0.122 g-VFA/g-TVS โดยพิจารณาแล้วมีปริมาณเพียงพอเทียบเท่ากับการหมักมูลวัว ซึ่งเพียงพอที่จะใช้เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญในการผลิตพลาสติกชีวภาพ PHA ได้

2. จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว คือ *Alcaligenes eutrophus*, *Cupriavidus necator* และ *Pseudomonas oleovorans* ด้วยกรดอินทรีย์บริสุทธิ์ผสม 3 ชนิด พบว่าเมื่อผ่านการบ่มในเครื่องเขย่านาน 72 ชั่วโมง *Cupriavidus necator* สามารถสะสม PHA ได้มากที่สุดคือ 3.75 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งของแบคทีเรีย และสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยมีความหนาแน่นของเซลล์ (DCW, dry cell weight) ที่ 2.14 g/L

3. จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Cupriavidus necator* ซึ่งถูกคัดเลือก หลังจากถูกใช้แยกเพาะเลี้ยงด้วยกรดอินทรีย์ 3 ชนิด คือ กรดโพรพิโอเนต 4.5 กรัมต่อลิตร กรดอะซิเตต 4.5 กรัมต่อลิตร และกรดบิวทิเรต 4.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งบ่มในเครื่องเขย่านาน 72 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีคุณสมบัติในการใช้กรดอินทรีย์ระเหยง่ายในการเจริญเติบโตและสะสม PHA ได้ทุกประเภท คือ Propionic acid (1.93 g/L DCW, 1.65%) ตามด้วย Butyric acid (1.75 g/L DCW, 2.75%) และ Acetic acid (1.12 g/L DCW, 1.55%)

4. จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *Cupriavidus necator* ด้วยน้ำหมักมูลแพะที่ได้จากการหมักในข้อที่ 1 ในปริมาณ 10%-80% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อบ่มในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 วันแล้ว ที่ความเข้มข้นของน้ำหมักมูลแพะที่ 50 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มากที่สุด โดยแบคทีเรียชนิดนี้จะให้ผลผลิต PHA โดยเฉลี่ยที่ 5 mg/L/hr สามารถสะสม PHA ได้ 9.38% ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 3.84 g/L และมีปริมาณโคมอนอเมอร์ 3HV ประมาณ 6.3% ซึ่ง

คำนวณแล้วให้ผลผลิต  $Y_{\text{PHA/VFA}}$  คือ 0.001 g-PHA/g-VFA ปริมาณการให้ผลผลิตจากการใช้ VFA จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศ ให้ผลผลิต PHA yield น้อยกว่าการหมักมูลวัวประมาณ 3-4 เท่าตัว

5. งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ของเหลือทิ้งจากฟาร์มปศุสัตว์และเป็นอาหาร ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน วัตถุประสงค์ที่มีต้นทุนต่ำสำหรับลดต้นทุนในการผลิตพลาสติกชีวภาพ ทดแทนการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือกรดอินทรีย์สังเคราะห์ได้ โดยจำนวนและปริมาณผลผลิตและคุณสมบัติของพลาสติกชีวภาพที่ได้จากน้ำหมักมูลแพะในการทดลองนี้มีแนวโน้มที่จะสามารถนำงานวิจัยนี้ไปต่อยอดในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต

### ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษานี้ยังต้องการผลการทดลองคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของพอลิเมอร์ PHA ที่ผลิตได้หลังจากทำการขึ้นรูปฟิล์ม เพื่อทดสอบแรงดึงและความยืดหยุ่น (tensile testing) และสมบัติการหลอมเหลว (melting behavior) ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการพิจารณาการนำไปใช้ทางวัสดุ
2. การศึกษานี้ยังต้องการผลการทดสอบการสลายตัวได้ทางชีวภาพในเบื้องต้นของแผ่นพอลิเมอร์ PHA โดยการวิเคราะห์ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในสภาวะปิดที่มีการควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งสามารถทำได้ในงานวิจัยขั้นต่อไปของคณะผู้วิจัย
3. โดยปริมาณ PHA ที่ผลิตได้ และปริมาณการให้ผลผลิตจากการใช้ VFA จากการหมักมูลแพะแบบไร้อากาศ ให้ผลผลิต PHA yield น้อยกว่าการหมักมูลวัวประมาณ 3-4 เท่าตัว ซึ่งอาจเกิดจากการไม่ได้ทำการทดลองผลิตแบบ high cell density fermentation ซึ่งสามารถปรับปรุงได้ในงานวิจัยต่อไป

### บรรณานุกรม

- กฤตภาส สิงคิบุตร, วิชชากร จารุศิริ และ ปฐมทัศน์ จิระเดชะ. 2554. การศึกษาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการผลิตก๊าซชีวภาพจากขยะเศษอาหารในมหาวิทยาลัย. วารสารวิจัยพลังงาน; ปีที่ 8, หน้า 26-32.
- กุลวดี ทองภูเบศร์, คันธง วงศ์วัฒนา และ เตชา ศิลป์ศร. 2544. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลาย Polyhydroxybutyrate (PHB). วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง; ปีที่ 10 (ฉบับที่ 1), หน้า 29.
- ชิตชนก คงแดง. 2554. การผลิตก๊าซชีวภาพจากใบยางพาราโดยหมักร่วมกับมูลสุกรสำหรับใช้ในครัวเรือน. วิทยานิพนธ์, สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ประทีน กุลละวณิชย์, นันทิยา เปปะตั้ง, อรอมล เหล่าปิตินันท์, อรรณพ นพรัตน์, วรินธร สงคศิริ และ ภาวิณี ชัยประเสริฐ. 2550. ภาพรวมเชิงสถานภาพและศักยภาพของเทคโนโลยีก๊าซชีวภาพในประเทศไทย. ใน รายงานการประชุมวิชาการด้านสิ่งแวดล้อมและวัสดุ.
- พูนศักดิ์ สักกทัตติยกุล. 2542. พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic). [ออนไลน์] [อ้างถึง 3 มกราคม 2555] เข้าถึงได้จาก: <http://www.thaigoodview.com/node/19323>
- ประทีน กุลละวณิชย์, นันทิยา เปปะตั้ง, อรอมล เหล่าปิตินันท์, อรรณพ นพรัตน์, วรินธร สงคศิริ, และภาวิณี ชัยประเสริฐ. 2555. ภาพรวมเชิงสถานภาพและศักยภาพของ เทคโนโลยีก๊าซชีวภาพในประเทศไทย. ใน รายงานการประชุมวิชาการด้านสิ่งแวดล้อมและวัสดุ.
- ธนาวดี ลี้จากภัย และคณะ. 2550. พลาสติกย่อยสลายได้เพื่อสิ่งแวดล้อม. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- ราชวณิชย์ ชำนาญ. 2554. ศักยภาพการผลิตก๊าซชีวภาพชุมชนจากมูลสุกรร่วมกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร กรณีศึกษาจังหวัดชัยภูมิ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.
- เรวดี แสนอุดม, รัชพล สันติวารากร และ พงษ์พันธ์ ชัยนเอียด. 2554. การเพิ่มประสิทธิภาพเครื่องกำเนิดไฟฟ้าจากก๊าซชีวภาพในฟาร์มสุกร. ใน รายงานการวิชาการเครือข่ายวิศวกรรมเครื่องกลแห่งประเทศไทย.
- สาโรจน์ ศิริตันสนียกุล และ หยาดฝน มหาทรัพย์ไพบูลย์. 2554. กรรมวิธีการผลิตพอลิปีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต. ใน สรรสารเทคโนโลยีชีวภาพ; หน้า 30.
- สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ. เทคโนโลยีของผู้นำด้านพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ. อ้างถึง 3 มกราคม 2555 เข้าถึงได้จาก: <http://www.nia.or.th/download/document/chapter3.pdf>.

### บรรณานุกรม (ต่อ)

- สุทธินันท์ ประชัญพฤทธิ. 2557. “ลานสวนป่า.” [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก :  
<http://lanpanya.com/sutthinun/archives/6885>.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. : ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- โสภา ชินเวชกิจวานิชย์. 2550. การผลิตพีเอชเอจากระบบบำบัดน้ำเสีย. สิ่งแวดล้อม; ปีที่ 11; ฉบับที่ 3: 49-56.
- ศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด. 2552. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไรดรอกซีบิวทิเรต-โค-ไฮดรอกซีเวเลอเรตจากน้ำเสียโรงงานอาหารทะเลโดยใช้แบคทีเรียได้จากระบบเอสปีอาร์. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อรพิน ภูมิภมร. 2550. การควบคุมระบบจุลินทรีย์อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิต. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Alvare, R., and Liden, G. 2009. Low temperature anaerobic digestion of mixtures of llama, cow and sheep manure for improved methane production. *Biomass and bioenergy*, 33: 527-533.
- Aoyagi, Y., Y. Doi, and T. Iwata. 2003. Mechanical properties and highly ordered structure of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] films: Effects of annealing and two-step drawing. *Polymer Degradation and Stability*. 79: 209-216.
- Anderson AJ, Dawes EA. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Review*; 54(4):450-472.
- Ashby, R.D., D.K.Y. Solaiman, and T.A. Foglia. 2005. Synthesis of Short-/Medium-Chain-Length Poly(hydroxyalkanoate) Blends by Mixed Culture Fermentation of Glycerol. *Biomacromolecules*. 6:2106-2112.
- Averous, L. 2004. Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: A review. *Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews*. C44:231-274.
- Cox M.K. 1994. properties and application of polyhydroxyalkanoates. Edited by Y. Doi and K. Fukuda. In *Biodegradable plastic and polymer*. Amsterdam: Elsevier B.V., 1994, p. 120-135.

### บรรณานุกรม (ต่อ)

- Chandrashekharaiah P.S. 2010. Isolation, Screening and selection of efficient polyhydroxybutyrate (PHB) synthesizing bacteria. Thesis for Master of science (Agriculture). Dharwad University.
- Chaudhry W.N., Jamil N., Ali I., Ayaz M.H., Hasnain S. 2010. Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. *Annals of Microbiology*. 61(3):623-9.
- Crocetti, G.R, Banfield J.F, Keller J, Bond P.L, Blackall L.L. Glycogen-accumulating organism in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiol* 2002; 148: 3353-3364.
- Dai Y., Yuan Z., Wang X., Oehmen A., Keller J. 2007. Anaerobic metabolism of *DeFluviicoccus* related glycogen accumulating organism (GAOs) with acetate and propionate as carbon sources. *Water research*; 41(9): 1885-1896.
- Doi, Y., S. Kitamura, and H. Abe. 1995. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*. 28:4822-4828.
- Du, G., and Yu, J. 2002. Green Technology for Conversion of Food Scraps to Biodegradable Thermoplastic Polyhydroxyalkanoates. *Environmental Science & Technology*. 36: 5511-5516.
- Eschenlauer A. C, Stoup S. K, Srieence F, Somers D. A. 1996. Production of heteropolymeric polyhydroxyalkanoate in *Escherichia coli* from a single carbon source. *Int. J. BiolMacromol* 19(2): 121-130.
- Hocking P.J, and R.H. Marchessault. 1994. Biopolymers. In: G.J.L. Griffin (Ed.) Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers, Chapman and Hall. London, 48-96.
- Jogdand, S.N. Welcome to the Eco-Friendly Plastic. 2004. Online available: <http://www.biotechsupportindae.com/jogsn/html> (2004, March).
- Jorgensen K.S, and Pauli A.S.L. 1995. Polyphosphate accumulation among denitrifying bacteria in activated sludge. *Anaerobic Environmental Microbiology*; 1: 161-168.

## บรรณานุกรม (ต่อ)

- Kasemsap C, and Wantawin C. 2007. Batch production of polyhydroxyalkanoate by low polyphosphate content activated sludge at varying pH. *Bioresource Technology*; 98: 1020-1027.
- Khanna S., Srivastava A.K. 2005. Production of poly-hydroxyalkanoate production by halotolerant *Rhodobacter sphaeroides* U7. *World J Microbiol Biotechnol*; 24 : 2073.
- Krupp L.R and Jewell W.J. 1992. Biodegradability of modified plastics film in controlled biological environments. *Environmental Science and Technology*; 26:193-198.
- Kusch, S., Oechsner, Hans and Jungbluth, Thomas. 2008. Biogas production with horse dung in solid-phase digestion systems. *Bioresource Technology*; 99: 1280-1292.
- Lee S.Y. 1996a. An overview of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*; 49: 1-14.
- Lee S.Y. 1996b. Plastic Bacterial Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*; 14: 431-438.
- Luengo J.M., Garcia B., Sandoval A., Noharro G., Olivera E.R. 2000. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*; 6: 256-260.
- Punrattanasin W. and Randall C.W. 1999. Factors affecting the production and storage of polyhydroxyalkanoates in activated sludge biomass. M.Sc. Thesis.
- Reddy C.S.K, Ghai, R, RashmiKalia V.C. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*; 87: 137-146.
- Satoh H., Iwamoto Y., Mino T., Matsuo T. 1998. Activated sludge as possible source of biodegradable plastic. *Water Sci. Technol.*; 38(2): 103-109.
- Sangkharak, K. 2007. Production and application of Polyhydroxybutyrate (PHB) from Mutant Strain of *Rhodobactersphaeroides* ES 16. Ph.D. Dissertation. Prince of Songkla University.



## บรรณานุกรม (ต่อ)

- Spiekermann, P., Rehm, B., Kalscheuer, R., Baumeister, D. and Steinbuchel 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.
- Sudesh, K., H. Abe, and Y. Doi. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 25:1503-1555.
- Suriyamongkol, P., R Weselake, S. Narine, M. Moloey and s .Shah. 2007. Biotechnology approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganism and plants - A review. *Biotechnology Advances*. 25: 148-175
- Tanadchangsang, N., A. Kitagawa, T. Yamamoto, H. Abe, and T. Tsuge. 2009. Identification, Biosynthesis, and Characterization of Polyhydroxyalkanoate Copolymer Consisting of 3-Hydroxybutyrate and 3-Hydroxy-4-methylvalerate. *Biomacromolecules*. 10:2866-2874.
- Thu, C.T.T. 2012 Manure management practices on biogas and non-biogas pig farms in developing countries - using livestock farms in Vietnam as an example.” *Journal of Cleaner Production*; 27: 64-71.
- Tsuge, T. 2002. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng*. 94:579-584.
- Volova, T. G., G.S. Kalacheva, I.V. Kozhevnikov and A. Steinbuchel 2007. Biosynthesis of Multicomponent Polyhydroxyalkanoates by *Wautersia eutropha*. *Microbiology*. 76(6): 704-711.
- Wei L., N. M. Guho, E. R. Coats, A. G. McDonald 2014. Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Biosynthesized by Mixed Microbial Consortia Fed Fermented Dairy Manure. *Journal of Applied Polymer Science* 131(11): 1-12.
- Witholt, B., and B. Kessler. 1999. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Current Opinion in Biotechnology*. 10:279-285.

## บรรณานุกรม (ต่อ)

- Yamane T., Fukunaga M. and Lee Y.W. 1996. Increased PHB productivity by high-cell-density-fed-batch culture of *Alcalagineslatus*, a growth-associated PHB producer. *Biotechnology and Bioengineering*; 50: 197-202.
- Yim, J.H., O.H. Lee, U.K. Choi and Y.C. Kim, 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ethanolic extracts of *Glycine Rhynchosia nulubilis* seeds. *Int. J. Mol. Sci.*, 10: 4742-4753.
- Yu, J., and Pinder, L., K. 1993. Utilization of Volatile Fatty Acids in Methanogenic Biofilms. *Bioresource Technology*; 46: 241-250.
- Yu, J. 2001. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *Journal of Biotechnology*. 86:105-112.

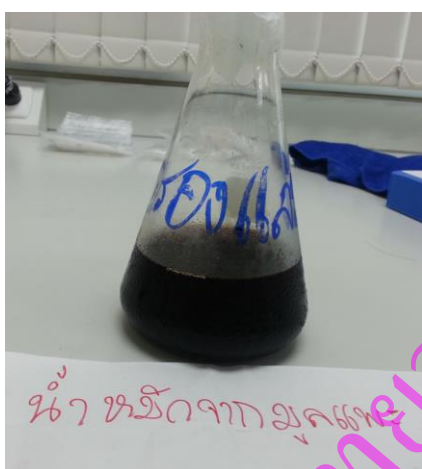
มหาวิทยาลัยรังสิต  
Rangsit University

## ภาคผนวก

### ภาคผนวก ก

#### 1. การหมักมูลแพะแบบไม่ใช้อากาศ

นำภาชนะแบบปิดมาใส่มูลแพะไป 1 ใน 2 ของถัง จากนั้นใส่น้ำลงไปจนเต็มแล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วันก็สามารถนำมาใช้ได้



รูปภาพที่ 31 แสดงน้ำหมักมูลแพะแบบไร้อากาศที่ผ่านการกรองแล้ว

#### 2. การเตรียมอาหารสูตร MS

ซึ่งสารต่อไปนี้  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  4.5 g,  $NaH_2PO_4$  1.2 g,  $(NH_4)_2SO_4$  2 g ละลายสารทั้ง 3 อย่างในน้ำปริมาณ 1 L ต่อมาเตรียม  $MgSO_4 \cdot 2H_2O$  300g ละลายน้ำ 1 L ต่อมาเตรียม Trace solution 1 L ประกอบด้วย  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  10 g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  2.25 g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  1g,  $MnSO_4 \cdot 5H_2O$  0.5 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  2 g,  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  0.23 g,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$  0.1 g, HCl 35% 10 ml ฆ่าเชื้อแล้วผสมกันตามอัตราดังนี้  $MgSO_4 \cdot 2H_2O$  0.5 g/L, Trace solution 1 mL/L

#### 3. การวิเคราะห์กรดอินทรีย์ระเหยง่าย

อุปกรณ์สารเคมีและการตั้งค่า ดังรูปภาพที่ 32 และ 33

- Column : reverse phase C18 column stable bond
- Mobile Phase :  $H_3PO_4$  100%

- Flow Rate : 1 ml/min
- Temperature : 40 °C
- Detertor : เครื่องตรวจวัดแบบ UV – Detector คลื่น 210 nm
- inject volume 2 ul

#### วิธีวิเคราะห์

กรองสารตัวอย่างให้เรียบร้อยแล้วนำไปฉีดเครื่อง HPLC เมื่อได้ค่าที่ต้องการจะได้มาในรูปแบบของพื้นที่ใต้พีค(Peak Area) และเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยดูพื้นที่ใต้พีค(Peak Area)



รูปภาพที่ 32 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



รูปภาพที่ 33 Column สำหรับ HPLC

#### 4. การคำนวณค่าของแข็งทั้งหมด (Total Solids, TS)

ของแข็งทั้งหมด หมายถึง ปริมาณสารที่เหลืออยู่ในภาชนะหลังจากระเหยน้ำออกจากสารตัวอย่างจนหมด แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น (Dessicator) แล้วชั่งน้ำหนักของของแข็งในภาชนะนั้น จะได้ปริมาณของของแข็งทั้งหมด

#### วิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมจานระเหย จานที่จะใช้ต้องอบแห้งที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียสประมาณ 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน สมมติ = A มิลลิกรัม
2. เลือกใช้ปริมาตรตัวอย่างน้ำที่เหมาะสม

3. ค่อย ๆ รินน้ำตัวอย่างที่ต้องการหาของแข็งทั้งหมดใส่ในจานระเหย นำไปประเหยน้ำออกให้หมดบน Water Bath หรือ Hot Plate นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 – 105 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น

4. ชั่งน้ำหนักจานระเหยทันทีที่เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง สมมติ = B มิลลิกรัม น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นก็คือ น้ำหนักของปริมาณของแข็งทั้งหมด ซึ่งคำนวณออกมาในรูปของมิลลิกรัมต่อลิตร

การคำนวณ

$$\text{มิลลิกรัม/ลิตร total} = \frac{(A-B) \text{ มิลลิกรัม} \times 1,000}{\text{มิลลิลิตรตัวอย่าง}}$$

#### การคำนวณค่าของแข็งระเหยทั้งหมด (Total Volatile Solids, TVS)

ของแข็งระเหยทั้งหมด หมายถึงปริมาณของสารที่ระเหยไปได้ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ ส่วนตะกอนที่เหลืออยู่ไม่สลายไป เรียกว่าปริมาณของแข็งคงตัว (Fix Solids)

วิธีการวิเคราะห์

1. นำจานระเหยที่ได้จากการหาปริมาณของแข็งทั้งหมด แล้วนำไปเผาในเตาเผา (Muffle Furnace) ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 550 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ (ประมาณ 15-20 นาที)
2. ปล่อยให้เย็นลงเท่ากับอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักของแข็งที่เหลืออยู่ (Fix Solids)

การคำนวณ

$$\text{มิลลิกรัม/ลิตร Fix Solid} = \frac{\text{มิลลิกรัม Fix Solid} \times 1,000}{\text{มิลลิลิตรตัวอย่าง}}$$

ดังนั้น

$$\text{มิลลิกรัม/ลิตร Total Volatile Solid} = \text{มิลลิกรัม/ลิตร total solid} - \text{มิลลิกรัม / ลิตร Fix Solid}$$

#### 5. การสกัดPHAs จากเซลล์แห้งของจุลินทรีย์

ชั่งเซลล์แห้ง 1-2 g ใส่ในขวดทดลอง จากนั้นใส่ไดคลอโรมีเทนอย่างละ 200 ml จากนั้นปิดฝาให้สนิทแล้วให้ความร้อน 60 องศาเซลเซียส ทิ้งข้ามคืน แล้วจึงปั่นด้วย mixer อีกข้ามคืน ผสมให้เข้าแล้วให้

ตกตะกอนใน เฮกเซน (Hexane) แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จะได้ตะกอนพลาสติกชีวภาพ PHAs  
 ดังรูปภาพที่ 34



รูปภาพที่ 34 การสกัด PHAs จากเซลล์แห้ง

มหาวิทยาลัยรังสิต  
 Rangsit University

## ภาคผนวก ข ภาคผนวกรูปภาพ



รูปภาพที่ 35 มูลแพะสดจากฟาร์มปศุสัตว์



รูปภาพที่ 36 ระบบหมักกรด 1:2 และ 1:3

มหาวิทยาลัยรังสิต  
Rangsit University

## ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย ณัฐพล ถนัดช่างแสง
2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Nuttapol Tanadchangsang
2. วัน/เดือน/ปี เกิด 23/07/2525
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ
4. หน่วยงานที่สังกัด คณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต  
52/347 ม.7 ซ.พหลโยธิน 87 (เมืองเอก) ถ.พหลโยธิน ต.หลักหก อ.เมือง  
จ.ปทุมธานี 12000  
โทรศัพท์: 02-997-2222 ต่อ 3213  
แฟกซ์: 02-997-2222 ต่อ 3214  
อีเมล: nuttapol.t@rsu.ac.th

## 5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อ ปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา หรือ วิชาเอก	ชื่อ สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2548	ปริญญาตรี	วศ.บ. (วิศวกรรมสิ่งแวดล้อม)	วิศวกรรมการบำบัด น้ำเสีย	ม. เกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
2550	ปริญญาโท	M.Eng. (Environmental Engineering)	Wastewater Engineering	Asian Institute of Technology	ประเทศไทย
2553	ปริญญาเอก	D.Eng. (Innovative and Engineered Materials)	Bioengineering and Polymer Science	Tokyo Institute of Technology	Japan
2556	นักวิจัยหลังปริญญา เอก	Postdoctoral Research Fellow	Biodegradable polymer and plastics	University of Hawaii	USA

## 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีการประยุกต์พลาสติกชีวภาพทางการแพทย์ / เทคโนโลยีการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ / เทคโนโลยีชีวภาพ / เทคโนโลยีพอลิเมอร์ / เคมีวิเคราะห์



## 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

## 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย :

ชื่อโครงการวิจัย	แหล่งทุน	ระยะเวลา/ปีที่ได้รับทุน
การศึกษาความสามารถในการใช้กรดอินทรีย์ระเหยง่ายจากมูล	สถาบันวิจัย	1 ปี /
แพะของจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์เพื่อการผลิตพลาสติกชีวภาพ	มหาวิทยาลัยรังสิต	2556-2557

## 7.2 บทความวิจัย/การเผยแพร่ผลงานวิจัย มีดังนี้

Peer-reviewed Publications

- 1) **Nuttapol Tanadchangsaeng**, Asahi Kitagawa, Tetsuya Yamamoto, Hideki Abe, Takeharu Tsuge; (2009) Identification, Biosynthesis, and Characterization of Polyhydroxyalkanoate Copolymer Consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxy-4-methylvalerate; *Biomacromolecules* Volume 10, Issue 10, pages 2866-2874. (Impact factor: 5.371)
- 2) **Nuttapol Tanadchangsaeng**, Takeharu Tsuge, and Hideki Abe; (2010) Comonomer Compositional Distribution, Physical Properties and Enzymatic Degradability of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) Copolyesters; *Biomacromolecules* Volume 11, Issue 6, pages 1615-1622. (Impact factor: 5.371)
- 3) **Nuttapol Tanadchangsaeng**, Jian Yu (2012) Microbial Synthesis of Polyhydroxybutyrate from Glycerol: Gluconeogenesis, Molecular Weight and Material Properties of Biopolyester; *Biotechnology and Bioengineering* Volume 109, Issue 11, pages 2808-2818. (Impact factor: 3.648)
- 4) **Nuttapol Tanadchangsaeng**, Jian Yu (2013) Miscibility of Natural Polyhydroxyalkanoate Blend with Controllable Material Properties; *Journal of Applied Polymer Science* Volume 129, Issue 4, pages 2004–2016. (Impact factor: 1.395)
- 5) Michael M. Porter, Steve Lee, **Nuttapol Tanadchangsaeng**, Matt J. Jaremko, Jian Yu, Marc Meyers, and Joanna McKittrick (2013) Porous Hydroxyapatite-Polyhydroxybutyrate Composites Fabricated by a Novel Method Via

Centrifugation; Mechanics of Biological Systems and Materials Volume 5, pages 63-71. (Book chapter)

- 6) **Nuttapol Tanadchangsang** (2014) Structure, Chemomechanical Properties and Degradability of Polyhydroxyalkanoates: A Review; Bulletin of Health, Science and Technology (In press).

#### Awards and Funding

2005-2007	Royal Thai Government (RTG) Fellowship, Asian Institute of Technology
2007-2010	International Program Associate (IPA) Scholarship, as a research associate in Bioplastic Team at RIKEN Institute, Japan
2009	Poster Award at RIKEN Spring-8 Center from Yoshiharu Doi (Director of RIKEN)

#### Professional Affiliations and Activities

- Invited Reviewer of Journal of Applied Polymer Science (2012-present)
- Advisor of Master thesis and Bachelor senior projects (2013-present)
- Organizing Committee of The 3rd Joint Conference on Renewable Energy and Nanotechnology (JCREN 2014)
- Head of Editorial Staff for the 3<sup>rd</sup> Thailand-Japan International Academic Conference (TJIA 2010), Nagoya University, Japan

#### Presentations and Proceedings

- 1) **N. Tanadchangsang**, A. Kitagawa, H. Abe, T. Tsuge; "Thermal and mechanical properties of PHA containing branched side-chained monomer unit"; *57th SPSJ Symposium on Macromolecules*; Sep. 25-27, 2008, Ozaka, Japan.
- 2) T. Tsuge, **N. Tanadchangsang**; "Novel naturally occurring 3HA unit and its PHA copolymer produced by recombinant *Ralsonia eutropha*"; *International Symposium on Biological Polyesters (ISBP 2008)*; Nov. 23-26, 2008, Massey University, New Zealand.

- 3) **N. Tanadchangsaeng**, T. Tsuge, H. Abe; “Biosynthesis and comonomer composition distribution of P(3HB-co-3H4MV) copolymers and thermal and crystalline properties of their fractions”; *The 2<sup>nd</sup> International Conference on Bio-based Polymers (ICBP 2009)*; Nov. 11-13, 2009, Penang, Malaysia.
- 4) **N. Tanadchangsaeng**, H. Abe, T. Tsuge; “Biosynthesis and structural property relationship studies for novel aliphatic copolyesters produced by recombinant *Ralstonia eutropha*”; *The 2<sup>nd</sup> Thailand-Japan International Academic Conference (TJIA'09)*; Nov. 20, 2009, Kyoto University, Japan.
- 5) T. Tsuge, **N. Tanadchangsaeng**, H. Abe; “Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate copolymers consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxy-4-methylvalerate”; *Advanced Materials and Technology Symposium (APMT 2010)*; Jan. 24-27, 2010, Jeju, Korea.
- 6) M.J. Jaremko, **N. Tanadchangsaeng**, J. Yu; “Production of polyhydroxybutyrate with residual algal biomass from biodiesel extraction”; *The 2nd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts*; Jun. 10-13, 2012, San Diego, USA.