

การพัฒนากระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ที่ย่อยสลายได้
ทางชีวภาพ ซึ่งผลิตจาก *Bacillus megaterium* BA-019

นางสาวสุชฎทัย พันศิริพัฒน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
ปีการศึกษา 2556

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตที่ส่งมาขึ้นทะเบียนที่สำนักงานวิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัย
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

DEVELOPMENT OF ISOLATION AND PURIFICATION PROCESSES OF BIODEGRADABLE
POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) PRODUCED BY *BACILLUS MEGATERIUM* BA-019

Miss Sukrutai Phansiripat

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนากระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งผลิตจาก <i>Bacillus megaterium</i> BA-019
โดย	นางสาวสุชฎทัย พันศิริพัฒน์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ตั้งพสุธาตล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิไล ลือพร้อมชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ตั้งพสุธาตล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปทุมพร ฉิมเอนก)

สุขฤทัย พันศิริพัฒน์ : การพัฒนากระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งผลิตจาก *Bacillus megaterium* BA-019. (DEVELOPMENT OF ISOLATION AND PURIFICATION PROCESSES OF BIODEGRADABLE POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) PRODUCED BY *BACILLUS MEGATERIUM* BA-019) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.สงศรี กุลปรีชา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.วราวุฒิ ตั้งพสุธาตล, 168 หน้า.

ศึกษาการพัฒนากระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของ P(3HB) ที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพซึ่งผลิตจาก *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ BA-019 ด้วยการใช้สารเคมีที่มีราคาไม่แพง มีประสิทธิภาพ ง่ายต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยเซลล์ของ *B. megaterium* สายพันธุ์ BA-019 ที่นำมาใช้ในกระบวนการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ได้มาโดยเลี้ยงเซลล์ในอาหาร mineral salt medium (MSM) ด้วยวิธีเฟด-แบตช์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณของ P(3HB) ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี ได้ศึกษาเปรียบเทียบการใช้เซลล์แห้งและเซลล์เปียกในกระบวนการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ผลการศึกษาพบว่า การใช้เซลล์แห้งสำหรับกระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ วิธีที่ดีที่สุดคือ การพรีทรีทเม้นต์เซลล์ด้วยการบ่มเซลล์กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านการพอลิซิงด้วยเอทานอลเย็นความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร โดยวิธีนี้ได้ความบริสุทธิ์และการกักเก็บเท่ากับ 88.30% และ 96.31% โดยน้ำหนักตามลำดับ P(3HB) ซึ่งได้โดยวิธีนี้มีน้ำหนักโมเลกุล (M_w) เท่ากับ 263,766 ดาลตัน การใช้เซลล์เปียกเพื่อแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ วิธีที่ดีที่สุดคือ การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลโดยการใช้ LAS-99 ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ที่ความถี่ 40% แอมพลิจูด เป็นเวลา 10-20 นาที แล้วนำไปผ่านการพอลิซิงด้วยเอทานอลเย็นความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร พบว่าความบริสุทธิ์และการกักเก็บเท่ากับ 95.27% และ 99.01% โดยน้ำหนักตามลำดับ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 88,844 ดาลตัน โดยน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) ที่แยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้มีค่าต่ำกว่าน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) ที่แยกและทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีเดิมที่ใช้คือการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ซึ่งป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (313,873 ดาลตัน) แต่ทั้งนี้ความบริสุทธิ์และการกักเก็บของ P(3HB) ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาในงานวิจัยนี้มีค่าสูงกว่า P(3HB) ที่ได้จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา	2556	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5472129023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: RECOVERY PROCESSES / POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) / BACILLUS
MEGATERIUM

SUKRUTAI PHANSIRIPAT: DEVELOPMENT OF ISOLATION AND PURIFICATION PROCESSES OF BIODEGRADABLE POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) PRODUCED BY *BACILLUS MEGATERIUM* BA-019. ADVISOR: ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Dr.Eng, CO-ADVISOR: ASST. PROF. DR.VARAWUT TANGPASUTHADOL, 168 pp.

Development of isolation and purification processes of biodegradable P(3HB) produced by *Bacillus megaterium* BA-019 was studied. Uses of inexpensive chemicals, in efficient and simple methods were investigated in order to enhance efficiency of the isolation and purification of P(3HB). Bacterial cells were obtained by cultivating in mineral salt medium (MSM) for 24 h. The content of P(3HB) was determined by gas chromatography. Comparison of using dried cells and wet cells were carried out. The best method of isolation and purification of P(3HB) from dried cells was by incubating the cells with 0.1 M sodium chloride, at 30°C, agitation at 200 rpm. for 3 h, followed by cell disruption with 0.1 M sodium hydroxide, incubated at 30°C, agitation at 200 rpm. for 1 h. The product was then polished with cold ethanol 20% v/v. The purity and recovery were 88.30% and 96.31% by weight, respectively. The molecular weight (M_w) of P(3HB) obtained by this method was 263,766 Da. The best method of using wet bacterial cells for isolation and purification of P(3HB) was mechanical cell disruption using 5% (w/v) LAS-99, followed by ultrasonication at 40% amplitude for 10-20 minutes. After polished with cold ethanol 20% v/v, the purity and recovery were 95.27% and 99.01% by weight, respectively with M_w of 88,844 Da. The M_w of P(3HB) that isolated and purified by the developed method was lower than that the conventional method which chloroform was used as an organic solvent that was 313,873 Da. The percentage of purity and recovery of P(3HB) obtain by the developed method in this work was higher than that obtained by the conventional method.

Department: Microbiology

Student's Signature

Field of Study: Industrial Microbiology

Advisor's Signature

Academic Year: 2013

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราวุฒิตั้งพสุธาตล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่เสียสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษาและคำแนะนำแก่ข้าพเจ้า รวมทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้สามารถทำงานวิจัยได้สำเร็จตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกวัล ลือพร้อมชัย ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปทุมพร ฉิมเอนก กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัยจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ดียิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สุวบุญ จิรชาญชัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบซึมผ่านเจล ในห้องปฏิบัติการที่วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครลาภสกุล ที่กรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือเพื่อการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลด้วยเครื่องอัลตราโซนิก

ขอขอบพระคุณ บริษัท มิตรผลวิจัยและพัฒนา ที่ให้ความอนุเคราะห์กากน้ำตาลเพื่อใช้ในการงานวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ ในห้องวิจัย 462 หรือ 1804/13 ทุกคน รวมถึงเพื่อนๆ และน้องๆ ระดับปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา สำหรับความช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน สำหรับการอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้า สำหรับความรัก ความห่วงใย คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่ 1.....	14
บทนำ.....	14
มูลเหตุจูงใจในการวิจัย.....	15
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	16
ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	16
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	17
บทที่ 2.....	18
ปรีทรรศน์วรรณกรรม.....	18
2.1 พลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ.....	18
2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต.....	19
2.2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHAs.....	21
2.2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้.....	22
2.3 พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต).....	24
2.3.1 โครงสร้างของ P(3HB).....	25
2.3.2 วิธีชีวสังเคราะห์ P(3HB).....	25
2.4 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้เซลล์ที่มี P(3HB) ภายในเซลล์.....	27
2.4.1 ระดับขวดเขย่า (shake flask).....	27
2.4.2 ระดับถังหมัก (fermenter).....	27
2.5 แนวทางการนำ PHAs ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์.....	29
2.5.1 ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม.....	29
2.5.2 ด้านเกษตรกรรมและปศุสัตว์.....	30

2.5.3. วัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์	30
2.5.4. วัสดุเส้นใยและแผ่นผ้าแบบ non-woven.....	30
2.5.5. วัสดุด้านอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และการสื่อสาร	30
2.6 บริษัทผู้ผลิต PHAs	31
2.7 ข้อจำกัดในการนำ PHAs ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์และแนวทางในการแก้ปัญหา	32
2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อต้นทุนการผลิต P(3HB).....	32
2.8.1 ชนิดของจุลินทรีย์.....	32
2.8.2 แหล่งคาร์บอน.....	33
2.8.3 แหล่งไนโตรเจน.....	33
2.8.4 แหล่งฟอสฟอรัสและเกลือแร่	34
2.8.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง.....	34
2.8.6 อุณหภูมิ	34
2.8.7 ออกซิเจน	34
2.8.8 ปัจจัยทางด้านการผลิต.....	35
2.9 กระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ หรือกระบวนการกู้คืน (recovery process)	35
2.9.1 วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	35
2.9.2 วิธีการย่อย (digestion methods)	36
2.9.3 วิธีการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกล	36
2.9.4 วิธีการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid).....	38
2.9.5 วิธีการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมี	38
บทที่ 3.....	41
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	41
3.1 วัสดุอุปกรณ์	41
3.2 เคมีภัณฑ์	42
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	44
3.4 วิธีวิเคราะห์	50
บทที่ 4.....	54

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	54
4.1 การเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 ด้วยวิธีเฟด-แบตช์ เพื่อให้ได้เซลล์ของ <i>B. megaterium</i> ที่มี P(3HB) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร.....	54
4.1.1 การเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 ด้วยวิธีแบตช์ เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญและการผลิต P(3HB)	54
4.1.2 การเลี้ยงเชื้อ <i>B. megaterium</i> BA-019 เพื่อผลิต P(3HB) ด้วยวิธีเฟด-แบตช์ โดยการป้อนกากน้ำตาลและยูเรียแบบ exponential feeding.....	57
4.2 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์.....	60
4.3 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการย่อยเซลล์ด้วยสารเคมีประเภทดีเทอร์เจนต์. 62	
4.4 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรดต่าง.....	64
4.5 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลร่วมกับการใช้สารเคมี	73
4.6 การเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพรีทรีทเมนต์.....	76
4.7 การเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพอลิซิง.....	78
4.8 การพิสูจน์ทราบสมบัติและโครงสร้างของพอลิเมอร์ P(3HB) ที่แยกได้จาก <i>B. megaterium</i> BA-019	82
บทที่ 5.....	90
สรุปผลการทดลอง	90
รายการอ้างอิง	94
ภาคผนวก.....	105
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	168

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ชนิดของจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนและพอลิเมอร์ที่ผลิต.....	22
ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพ เคมีและเชิงกลของ PP และ P(3HB).....	26
ตารางที่ 2.3 บริษัทผู้ผลิต PHAs	30
ตารางที่ 2.4 ข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของกระบวนการกักเก็บวิธีต่างๆ.....	38
ตารางที่ 4.1 ผลของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ด้วยวิธีแบตช์ ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร	54
ตารางที่ 4.2 ผลของการเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ด้วยวิธีเฟด-แบตช์ ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัม น้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12	57
ตารางที่ 4.3 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ <i>B. megaterium</i> BA-019	60
ตารางที่ 4.4 ผลของการย่อยเซลล์ด้วยสารเคมีประเภทดีเทอร์เจนต์ต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ <i>B. megaterium</i> BA-019	62
ตารางที่ 4.5 ผลของการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่างต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ <i>B. megaterium</i> BA-019.....	64
ตารางที่ 4.6 ผลของการ P(3HB) แยกและการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งของ <i>B. megaterium</i> BA-019	66
ตารางที่ 4.7 ผลของการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์เปียกของ <i>B. megaterium</i> BA-019	68
ตารางที่ 4.8 ข้อมูลของสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการกักเก็บ.....	70
ตารางที่ 4.9 ผลของการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลร่วมกับการใช้สารเคมีต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ <i>B. megaterium</i> BA-019.....	73
ตารางที่ 4.10 ผลของการฟริทริทเม้นต์ต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ <i>B. megaterium</i> BA-019	76
ตารางที่ 4.11 ผลของการพอลิซิงต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ <i>B. megaterium</i> BA-019	78
ตารางที่ 4.12 เปรียบเทียบความบริสุทธิ์และการกักเก็บ P(3HB) โดยใช้จุลินทรีย์และเทคนิคการแยก และทำให้บริสุทธิ์ที่แตกต่างกัน.....	79
ตารางที่ 4.13 ค่าเคมีคัลชิฟท์ของ ^1H NMR ของ P(3HB).....	83
ตารางที่ 4.14 ข้อมูลน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ P(3HB) ที่แยกได้จาก <i>B. megaterium</i> BA-019 เปรียบเทียบกับ commercial P(3HB).....	87

สารบัญญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1	แกรนูลของ PHAs ที่อยู่ในเซลล์แบคทีเรีย	17
รูปที่ 2.2	วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนขององค์ประกอบอินทรีย์ของพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ	18
รูปที่ 2.3	แกรนูลของ PHAs ภายในเซลล์ของแบคทีเรียในลักษณะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ (phase contrast microscope) (a) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) (b) กล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (atomic force microscope) (c) และโมเดลแกรนูลของ PHAs (d)	19
รูปที่ 2.4	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHAs	20
รูปที่ 2.5	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (a) เซลล์ที่ย้อมด้วยสีไนล์บลู เอ (b) และเซลล์ที่ย้อมด้วยสีชูดานแบล็ก บี (c)	24
รูปที่ 2.6	โครงสร้างผลึกของ P(3HB)	24
รูปที่ 2.7	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ 3-hydroxybutyrate-acid (a) และ P(3HB) (b)	24
รูปที่ 2.8	วิธีการสังเคราะห์ P(3HB)	25
รูปที่ 2.9	โครงสร้างของ <i>phbC-A-B</i> cluster ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ P(3HB)	25
รูปที่ 2.10	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากการประยุกต์ใช้ P(3HB)	29
รูปที่ 2.11	การบดด้วยเม็ดบีด	36
รูปที่ 3.1	<i>B. megaterium</i> BA-019 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า เมื่อย้อมสีแกรม	43
รูปที่ 3.2	<i>B. megaterium</i> BA-019 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า เมื่อย้อมสีชูดานแบล็ก บี	43
รูปที่ 3.3	<i>B. megaterium</i> BA-019 เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA)	44
รูปที่ 4.1	การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ด้วยวิธีแบตซ์ ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร (n=3)	55
รูปที่ 4.2	การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง <i>B. megaterium</i> BA-019 ด้วยวิธีเฟด-แบตซ์ ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัม น้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12 (n=3)	58
รูปที่ 4.3	การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ <i>B. megaterium</i> BA-019 โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (n=3)	60
รูปที่ 4.4	การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ <i>B. megaterium</i> BA-019 โดยการย่อยเซลล์ด้วยสารเคมีประเภททีเทอร์เจนต์ (n=3)	62

รูปที่ 4.5 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ต่าง (n=3)..... 64

รูปที่ 4.6 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 67

รูปที่ 4.7 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 ... 69

รูปที่ 4.8 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลรวมกับการใช้สารเคมี..... 74

รูปที่ 4.9 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 โดยการเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพรีทรีทเมนต์ 76

รูปที่ 4.10 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 โดยการเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพอลิซซิ่ง..... 78

รูปที่ 4.11 ลักษณะของ P(3HB) ในขั้นตอนพอลิซซิ่งโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็น ความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร ของ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (a) และ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (b)..... 80

รูปที่ 4.12 ลักษณะของ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ก่อนการพอลิซซิ่ง (a) P(3HB) ที่แยกจากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หลังการพอลิซซิ่ง (b) P(3HB) ที่แยกจากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงก่อนการพอลิซซิ่ง (c) และ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงหลังการพอลิซซิ่ง (d)..... 80

รูปที่ 4.13 ¹H NMR ที่ 400 MHz ของ P(3HB)..... 83

รูปที่ 4.14 ¹H NMR ที่ 400 MHz ของ commercial P(3HB) (a), P(3HB) ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (b), P(3HB) ที่แยกจากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ก่อนการพอลิซซิ่ง (c), P(3HB) ที่แยกจากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หลังการพอลิซซิ่ง (d), P(3HB) ที่แยกจากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงก่อนการพอลิซซิ่ง (e), และ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงหลังการพอลิซซิ่ง (f)..... 84

รูปที่ 4.15 โครมาโทแกรมจาก GPC ของ commercial P(3HB) (a) และ P(3HB) ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (b)..... 85

รูปที่ 4.16 โครมาโทแกรมจาก GPC ของ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หลังการพอลิซซิ่ง (a) และ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงหลังการพอลิซซิ่ง (b)..... 86

บทที่ 1

บทนำ

พลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้ (biodegradable plastics) ซึ่งผลิตโดยวิธีชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ชนิดที่รู้จักกันแพร่หลาย เช่น พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates; PHAs) พอลิแลคติกแอซิด (poly(lactic acid); PLA) และพอลิบิวทิรีน ซัคซิเนต (poly(butylene succinate); PBS) รวมทั้งโคพอลิเมอร์และอนุพันธ์ผสมของพอลิเมอร์ เหล่านี้ (Zakaria และคณะ, 2010) โดยพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเป็นพอลิเอสเตอร์สายตรง (linear polyester) ซึ่งสามารถขึ้นรูปได้ด้วยความร้อนและเป็นกลุ่มที่มีสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่ได้จาก อุตสาหกรรมปิโตรเคมีที่ใช้ทั่วไปในอุตสาหกรรม (Loo และ Sudesh, 2007) พลาสติกชีวภาพกลุ่มนี้ สังเคราะห์ได้จากเซลล์ของจุลินทรีย์ได้เป็นพอลิเมอร์และสะสมไว้ในเซลล์ได้ในขั้นตอนเดียว โดยมี จุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHAs ได้ในภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ แต่มีการจำกัดความเข้มข้นของสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือ ออกซิเจน เป็นต้น (Steinbüchel และ Fächtenbusch, 1998) โดยแหล่งคาร์บอนจะถูกเปลี่ยนเป็น สารประกอบไฮดรอกซีอัลคาโนเอต สะสมเป็นพอลิเมอร์อยู่ในไซโทพลาสซึมในรูปของแกรนูลอยู่ ภายในเซลล์ โดย PHAs ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของกรดไขมัน (3-hydroxy fatty acid) ขนาดของ สายพอลิเมอร์มีความยาว 10^3 - 10^4 มอนอเมอร์ (Suriyamongkol และคณะ, 2007) การศึกษาการผลิต PHAs สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด รวมทั้งสามารถใช้ทรัพยากรที่สามารถผลิต ทดแทนใหม่ได้ (renewable resources) เช่น กากน้ำตาล (Albuquerque และคณะ, 2007; Kulpreecha และคณะ, 2009) น้ำมันพืช (Bhubalan และคณะ, 2008) แป้ง (Chen และคณะ, 2006) กากตะกอนจากอุตสาหกรรม (Bengtsson และคณะ, 2008) และหางนม (Koller และคณะ, 2008) เป็นต้น โดย PHAs ชนิดที่มีการศึกษาชนิดแรก คือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) (poly(3-hydroxybutyrate); P(3HB)) ซึ่งประกอบด้วยมอนอเมอร์ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) ซึ่งสมบัติที่ดี ของ P(3HB) คือ สามารถถูกย่อยสลายได้และมีความสามารถเข้ากับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) ดังนั้นจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และเภสัชกรรม ได้แก่ การนำมาใช้เป็นวัสดุทางศัลยกรรม เช่น หลอดเลือดเทียม กระดูกเทียม เข็ม ไหมเย็บแผล แคลปซูลบรรจุยา เป็นต้น หรืออาจนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านเกษตรกรรม เช่น เป็นวัสดุทำแคลปซูล บรรจุยาฆ่าแมลง ปุ๋ย และฮอร์โมนพืช ใช้ทำแหจับปลาสำหรับใช้น้ำทะเล และสามารถใช้เป็นวัสดุคลุมดินในการเพาะเลี้ยงต้นกล้าได้ เป็นต้น นอกจากนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์หรืออุปกรณ์ใช้สอยอื่นๆ ได้แก่ ขวด ถุงพลาสติก แผ่นฟิล์มถนอมอาหาร เป็นต้น (Braunegg และคณะ, 1998; Steinbüchel และ Fächtenbusch, 1998) ทั้งนี้สมบัติที่สำคัญคือ P(3HB) เป็นพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์โดยธรรมชาติ และผลจากการย่อยสลาย ของพลาสติกนี้ได้สารที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ได้แก่ น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์และกรดคาร์บอกซิลิก ทำให้พลาสติกชีวภาพชนิดนี้ได้รับความสนใจที่จะนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกเพื่อใช้ทดแทน พลาสติกที่ใช้กันในปัจจุบัน (Jendrosseck และ Handrick, 2002)

จากปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งของการประยุกต์ใช้ P(3HB) คือ ต้นทุนในการผลิตที่สูงกว่าพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ การเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกสำหรับใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ กระบวนการหมักที่ได้ผลผลิตและอัตราการผลิตสูง วิธีแยกผลิตภัณฑ์และทำให้บริสุทธิ์ ในส่วนของกระบวนการหมักเพื่อลดต้นทุนการผลิต งานวิจัยนี้ได้ใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้ใหม่ (Kulprecha และคณะ, 2009) โดย รัตนศิริ มุทิตากุล (2538) คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต P(3HB) ได้จากแหล่งดินในธรรมชาติ ซึ่งได้คัดเลือกได้ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BA-019 ซึ่งมีความสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่น อติพล บุญเรืองถาวร (2543) ได้ศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และการผลิต P(3HB) ในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิต P(3HB) ได้ดี โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรีย ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก กุสุมา กมลจรัสโสภ (2547) ได้จัดจำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BA-019 โดยวิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมีและ 16s rDNA พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BA-019 คือ *B. megaterium* บุญฤทธิ์ เมฆศิริพร (2551) ได้ศึกษาเกณฑ์และปัจจัยที่สำคัญต่อการขยายส่วนการผลิต P(3HB) โดย *B. megaterium* BA-019 จากการศึกษาในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่าความเข้มข้นของเซลล์ ปริมาณ P(3HB) ผลผลิตของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อซับสเตรทที่ใช้ไป ($Y_{P/S}$) และอัตราการผลิต P(3HB) มีค่ามากที่สุดเมื่ออัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที (vvm) ปวดี กาญจนชุมพล (2553) ได้ศึกษาการขยายส่วนการผลิต P(3HB) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบเฟด-แบตช์ พบว่าการป้อนอาหารแบบ exponential ความเข้มข้นน้ำตาลของเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และใช้กากน้ำตาลและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัม น้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12 พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของ P(3HB) และอัตราการผลิต P(3HB) มีค่าเท่ากับ 90.71 กรัมต่อลิตร 41.58 กรัมต่อลิตร และ 1.73 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ

มูลเหตุจูงใจในการวิจัย

ในขั้นตอนการผลิต P(3HB) นั้นหลังจากการผลิต P(3HB) โดยการเพาะเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ด้วยกระบวนการหมัก ต้องแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการปั่นเหวี่ยงแล้วจึงแยก P(3HB) ออกจากเซลล์และทำให้บริสุทธิ์ (product recovery) วิธีการและสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการนี้ส่งผลต่อสมบัติและโครงสร้างของพอลิเมอร์ P(3HB) ที่แยกได้ รวมทั้งยังมีผลต่อต้นทุนการผลิต P(3HB) โดยตรง โดยทั่วไปเป็นการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (solvent extraction) และอาจมีวิธีทางกายภาพ เช่น ความร้อน การเขย่าหรือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมด้วยในการแยก P(3HB) ออกจากเซลล์ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ คือ คลอโรฟอร์ม ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้กันกว้างขวาง (Comeau และคณะ, 1988) วิธีการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีข้อได้เปรียบคือ P(3HB) ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง เหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ (Chen และ Wu, 2005)

แต่วิธีการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีข้อเสียคือ ตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และมีราคาแพงซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้ราคาต้นทุนการผลิต P(3HB) สูง ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการแยก P(3HB) โดยใช้สารอื่น เช่น การใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Ryu และคณะ, 2000) ซึ่งทำให้ P(3HB) มีความบริสุทธิ์สูง แต่มีข้อเสียคือ ทำให้มวลโมเลกุลของ P(3HB) ลดลง การใช้เอนไซม์ในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ (Kapritchkoff และคณะ, 2006) โดยปฏิกิริยาการแยกและทำให้บริสุทธิ์ไม่รุนแรงแต่มีราคาแพง งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาวิธีการแยก P(3HB) ซึ่งเป็นพลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้ จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 โดยวิธีอื่นๆ ได้แก่ การแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่ไม่มีฮาโลเจน (non-halogenated solvent) การย่อยเซลล์ด้วยสารประเภทดีเทอร์เจนต์ (detergent) การทำให้เซลล์แตกโดยวิธีเชิงกล (mechanical disruption) ด้วยเครื่องอัลตราโซนิก การทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่าง (cell fragility) ด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่าง โดยเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ (%purity) และการกู้คืน (%recovery) ของปริมาณ P(3HB) ในด้านราคาต้นทุนของสารเคมี ความเป็นพิษของสารเคมี และลักษณะสมบัติของ P(3HB) ที่ได้ เช่น น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (M_w) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (M_n) ค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (Polydispersity index; PDI) ของพอลิเมอร์ที่ได้ ในแต่ละกระบวนการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่า รายงานการวิจัยเรื่องการพัฒนากระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของ P(3HB) ที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิด PHAs ยังมีไม่มาก แสดงว่าการศึกษาวิจัยในด้านนี้เพิ่งเริ่มมีผู้สนใจศึกษาไม่มากนัก ส่วนใหญ่ยังเป็นการวิจัยในด้านการผลิตให้ได้ผลผลิตสูงและราคาต้นทุนการหมักต่ำลง ดังนั้นการวิจัยในเรื่องนี้จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ และยังคงมีการศึกษาวิจัยอยู่อย่างต่อเนื่อง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

พัฒนากระบวนการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งผลิตจาก *B. megaterium* BA-019

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. เลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 โดยวิธีเฟด-แบตช์ เพื่อให้ได้เซลล์ที่มี P(3HB)
2. แยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์
3. แยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ โดยการย่อยเซลล์ด้วยสารเคมีประเภทดีเทอร์เจนต์
4. แยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่าง
5. แยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลร่วมกับการใช้สารเคมี
6. เพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพรีทรีทเม้นต์
7. เพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพอลิซิง
8. พิสูจน์ทราบสมบัติและโครงสร้างของพอลิเมอร์ P(3HB) ที่แยกได้

9. วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบแต่ละกระบวนการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปพัฒนากระบวนการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งผลิตจาก *B. megaterium* ที่มีประสิทธิภาพ



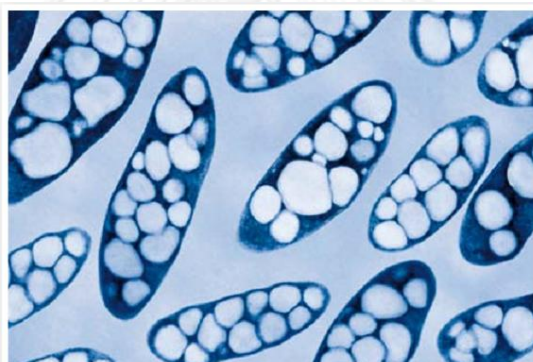
บทที่ 2

ปรีทรรศน์วรรณกรรม

2.1 พลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พลาสติกชีวภาพที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หมายถึง พลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้อันเนื่องมาจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น แบคทีเรีย รา สาหร่าย ในสภาวะและช่วงเวลาที่เหมาะสม เช่น การมีน้ำ และบางครั้งอาจต้องมีออกซิเจนด้วย (ราชบัณฑิตยสถาน, 2551)

พลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้ตามธรรมชาติโดยชนิดที่รู้จักกันแพร่หลาย เช่น พลาสติกชีวภาพชนิด PHAs, PLA และ PBS รวมทั้งอนุพันธ์ของพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์เหล่านี้ (Zakaria และคณะ, 2010) โดยพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพบางชนิด เช่น PHAs สามารถผลิตได้จากแบคทีเรีย ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในสารอาหาร เช่น น้ำตาลหรือชีวมวลอื่นๆ โดยแบคทีเรียจะใช้น้ำตาลเพื่อเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอนเพื่อนำไปผลิตเป็นพอลิเมอร์อยู่ในเซลล์ ดังรูปที่ 2.1 จากนั้นจึงใช้ความร้อนหรือการแช่แข็งเซลล์เพื่อสกัดเอาแกรนูล

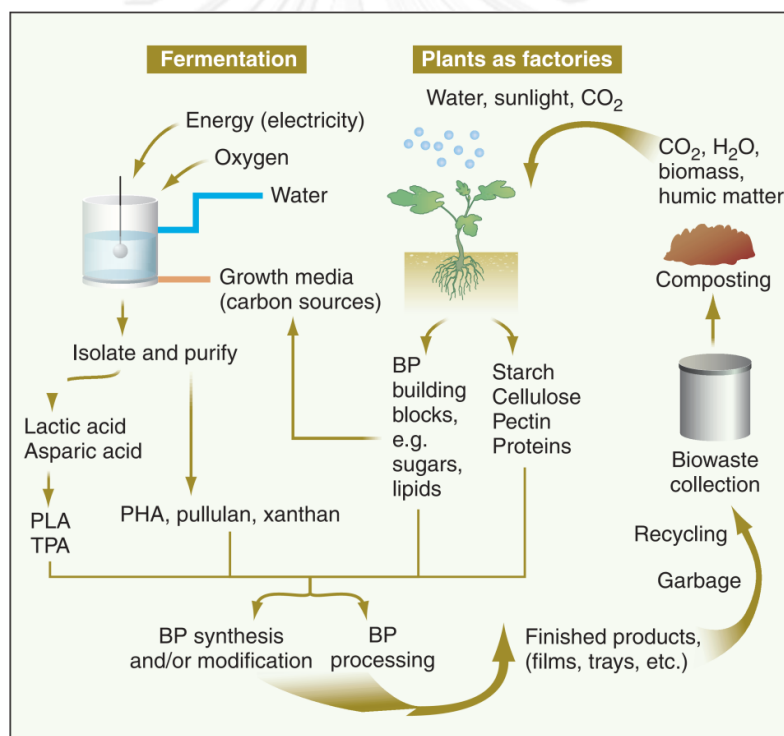


รูปที่ 2.1 แกรนูลของ PHAs ที่อยู่ในเซลล์แบคทีเรีย (Plastics Institute of Thailand, 2013)

วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของ PHAs เริ่มจากการผลิต PHAs ด้วยกระบวนการหมัก โดยสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิด และสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ด้วยการใช้ทรัพยากรที่ผลิตทดแทนใหม่ได้ เช่น กากน้ำตาล แป้ง และน้ำตาลซึ่งผลิตจากอ้อย ข้าวโพด หรือวัตถุดิบจากการเกษตรบางชนิด เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์จะนำไปใช้สร้างและสะสมแกรนูลของ PHAs ไว้ภายในเซลล์โดยอาศัยกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ เนื่องจาก PHAs เป็นผลิตภัณฑ์ที่ถูกสะสมไว้ภายในเซลล์ จึงต้องแยกแกรนูลของ PHAs ออกจากเซลล์ก่อน แล้วจึงนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกชนิดต่างๆ ต่อไป และภายหลังจากผ่านการใช้งานแล้ว PHAs อาจถูกกำจัดด้วยการนำไปฝังกลบในดิน ซึ่ง PHAs สามารถถูกย่อยสลายได้ตามธรรมชาติโดยอาศัยจุลินทรีย์ในดินบางชนิดได้เป็นปุ๋ยที่อุดมไปด้วยสารอินทรีย์ เมื่อการย่อยสลาย PHAs สมบูรณ์จะให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มปริมาณน้ำเพื่อรักษาอาหารในดิน โดยพืชสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อการเจริญ และสามารถนำวัตถุดิบจาก

การเกษตรเหล่านี้มาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักเพื่อผลิต PHAs ต่อไป ทำให้เกิดเป็นวัฏจักรต่อเนื่อง (Khanna และ Srivastava, 2005; Lee, 1996a) ดังรูปที่ 2.2

การย่อยสลายทางชีวภาพเป็นสมบัติของ PHAs ที่มีข้อได้เปรียบเหนือกว่าพลาสติกจากปิโตรเลียม โดยการย่อยสลายทางชีวภาพของ PHAs จะสลายตัวเมื่อสัมผัสกับดิน ปุ๋ยหมัก หรือตะกอนทะเล การย่อยสลายจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น จุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมนั้น พื้นที่ผิวสัมผัส ความชื้น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง น้ำหนักโมเลกุล (Boopathy, 2000) องค์ประกอบของพอลิเมอร์และการเกิดผลึกของ PHAs มีความสำคัญต่อการถูกย่อยสลาย (Lee, 1996b) โดยจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้โดยเอนไซม์ PHB depolymerase เช่น *Alcaligenes faecalis* *Rhodospirillum rubrum* *B. megaterium* *A. beijerinckii* และ *Pseudomonas lemoignei* การย่อยสลาย PHAs ในสภาวะที่มีออกซิเจน ทำให้ได้สารที่ไม่เป็นอันตรายคือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ในขณะที่การย่อยสลายในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จะได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สมีเทน (Gross และ Kalra, 2002; Tokiwa และคณะ, 2009)



รูปที่ 2.2 วัฏจักรแสดงการหมุนเวียนองค์ประกอบอินทรีย์ของพลาสติกที่สามารถถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Gross และ Kalra, 2002)

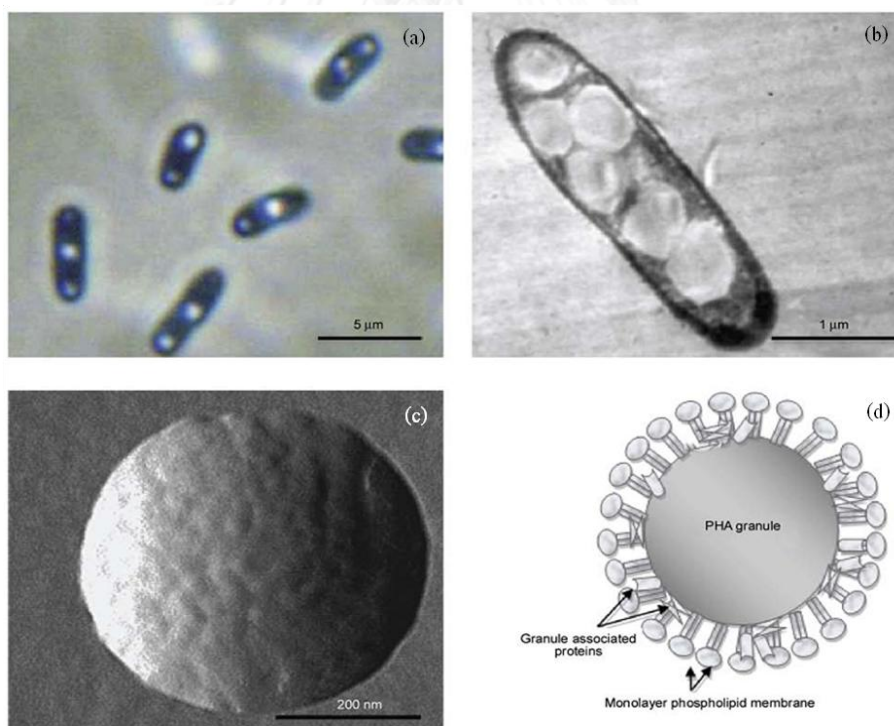
2.2 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

PHAs เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่ได้รับความสนใจมาก เนื่องจากเป็นเทอร์มอพลาสติกซึ่งมีสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิด PP และ PE ในด้านจุดหลอมเหลว น้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการต้านแรงดึง และการเกิดผลึก เป็นต้น จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย และมีข้อได้เปรียบกว่าพลาสติกสังเคราะห์ เนื่องจาก PHAs มีความเป็นมิตรต่อ

สิ่งแวดล้อม (eco-friendly) โดยพอลิเมอร์สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางธรรมชาติ (Jacquel และคณะ, 2008; Steinbüchel และ Fächtenbusch, 1998)

PHAs เป็นกลุ่มพอลิเมอร์ประเภทพอลิเอสเทอร์ซึ่งสามารถสังเคราะห์ภายในไซโตพลาสซึมของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ในสถานะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป แต่จำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส ออกซิเจน หรือเกลือแร่ (trace element) อื่นๆ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก เป็นต้น (Braunegg และคณะ, 1998) โดยสะสมในลักษณะแกรนูล เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำรองให้แก่เซลล์ โดยจะมีขนาดต่างๆ กัน โดยแกรนูลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 240 ถึง 720 นาโนเมตร (Dunlop และ Robards, 1973) ซึ่งถูกล้อมรอบด้วยชั้นของฟอสโฟลิปิดและโปรตีน phasin รวมถึงเอนไซม์พอลิเมอร์เอสและดีพอลิเมอร์เอสรวมทั้งโปรตีนชนิดต่างๆ (Gerngross และคณะ, 1993; Kunasundari และ Sudesh, 2011; Lundgren และคณะ, 1964) ดังแสดงในรูปที่ 2.3

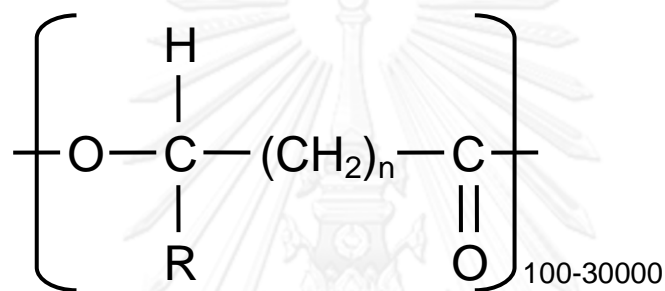
คุณสมบัติของ PHAs ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของมอนอเมอร์เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ชนิดของหมู่ฟังก์ชันและระดับความอิมิตัวของพันธะยังมีผลต่อสมบัติของพอลิเมอร์ โดยทั่วไป PHAs มีน้ำหนักโมเลกุลของอยู่ในช่วง 10^5 ถึง 10^6 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ ภาวะในการเจริญของเชื้อ วิธีการแยก PHAs และการทำให้บริสุทธิ์ (Anis และคณะ, 2012; Kunasundari และ Sudesh, 2011; Steinbüchel และ Fächtenbusch, 1998)



รูปที่ 2.3 แกรนูลของ PHAs ภายในเซลล์ของแบคทีเรียในลักษณะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอนทราสต์ (phase contrast microscope) (a), ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) (b), กล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (atomic force microscope) (c), และโมเดลแกรนูลของ PHAs (d) (Kunasundari และ Sudesh, 2011)

2.2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHAs

PHAs มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง (aliphatic polyester) ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซี เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของมอนอเมอร์ตัวที่หนึ่งกับหมู่ไฮดรอกซีของมอนอเมอร์ตัวที่สองที่ตำแหน่งปีต้า-คาร์บอน ซึ่งเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) ซึ่งการเชื่อมต่อกันของมอนอเมอร์เป็นแบบหัวต่อหาง (head-to-tail configuration) โครงสร้างเป็น R-configuration ในรูปของกรดไขมัน R-(3)-hydroxy fatty acid หรือ R-β-hydroxy fatty acid สำหรับหมู่ alkyl (R) อาจเป็นแบบพันธะไม่อิ่มตัว (unsaturated) แบบอะโรมาติก (aromatic) แบบฮาโลจีนิต (halogenate) หรือแบบแตกกิ่งก็ได้ (branched) (Loo และ Sudesh, 2007; Steinbüchel และ Fächtenbusch, 1998) ดังแสดงใน รูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ PHAs

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

2.2.2 การจัดจำแนกชนิดของ PHAs

2.2.2.1 การจัดจำแนกชนิดตามจำนวนคาร์บอนอะตอมในหน่วยมอนอเมอร์ (Kunasundari และ Sudesh, 2011; Wampfler และคณะ, 2010) สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม ดังนี้

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่สั้น (short-chain-length PHAs หรือ scl-PHAs) คือ พอลิเมอร์ที่มีมอนอเมอร์ ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 3-5 อะตอม เช่น P(3HB) และ P(3HV) เป็นต้น

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ยาวปานกลาง (medium-chain-length PHAs หรือ mcl-PHAs) คือ พอลิเมอร์ที่มีมอนอเมอร์ ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม 6-14 อะตอม เช่น P(3HHx), P(3HO) และ P(3HDD) เป็นต้น

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตสายโซ่ขนาดยาว (long-chain-length PHAs หรือ lcl-PHAs) คือ พอลิเมอร์ที่มีมอนอเมอร์ ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมมากกว่า 14 อะตอม

2.2.2.2 การจัดจำแนกชนิดตามชนิดของมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์ PHAs แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) คือ พอลิเมอร์ที่มีมอนอเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน ตัวอย่างเช่น P(3HB)

เฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) คือ พอลิเมอร์ที่มีมอนอเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน ได้แก่ โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น P(3HB-co-3HV) และเทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น P(3HB-co-3HV-co-4HB)

2.2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้

มีจุลินทรีย์หลายชนิดในธรรมชาติที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHAs ได้ แต่กลุ่มที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHAs ได้ในปริมาณสูง คือ แบคทีเรีย โดยมีแบคทีเรียหลากหลายชนิดที่สามารถผลิต PHAs ได้ เช่น *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha* หรือ *A. eutrophus*) เป็นแบคทีเรียที่ได้รับการศึกษามากที่สุด และมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงจนสามารถใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่สามารถผลิต PHAs ได้ เช่น *Bacillus* spp., *Alcaligenes* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Escherichia coli*, *Burkholderia sacchari* และ *Halomonas boliviensis* เป็นต้น (Han และคณะ, 2004; Lee และคณะ, 2000; Verlinden และคณะ, 2007; Wong และคณะ, 2004; Yang และคณะ, 2010) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ปัจจุบันมีการค้นพบอนุพันธ์ของพอลิเอสเทอร์ที่อยู่ในกลุ่ม PHAs นี้มากกว่า 90 ชนิด (Xu และคณะ, 2002) แต่มีไม่กี่ชนิดที่รู้จักกันแพร่หลาย และอนุพันธ์ของพอลิเมอร์ที่เป็นที่รู้จักมากที่สุดคือ P(3HB) ซึ่งเป็นชนิดแรกที่ศึกษากันอย่างกว้างขวาง

ตารางที่ 2.1 ชนิดของจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนและพอลิเมอร์ที่ผลิต (Verlinden และคณะ, 2007)

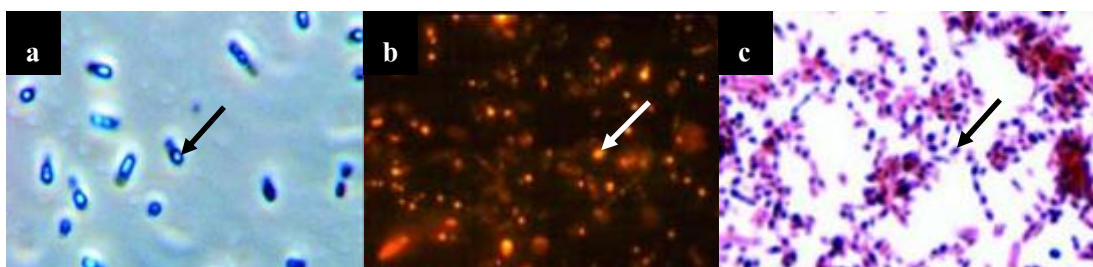
ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	พอลิเมอร์ที่ผลิต
<i>Aeromonas hydrophila</i>	กรดลอริก และกรดโอเลอิก	mcl-PHAs
<i>A. latus</i>	มอลต์, ของเหลือจากถั่วเหลือง, ของเหลือจากนม, ของเหลือจากน้ำส้มสายชูหมัก และน้ำมันงา	PHB
<i>B. cereus</i>	น้ำตาลกลูโคส, แอปซีลิน-คาโปรแลกโตน และกากน้ำตาลจากหัวบีท	PHB, terpolymer
<i>Bacillus</i> spp.	อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว nutrient broth (NB), น้ำตาลกลูโคส, อัลคาโนเอต, แอปซีลิน-คาโปรแลกโตน และกากน้ำตาลจากถั่วเหลือง	PHB, PHBV, copolymers
<i>Burkholderia sacchari</i> sp. nov.	น้ำตาลอะโดนิทอล, น้ำตาลอะราบิโนส, น้ำตาลอะราบิทอล, น้ำตาลเซลโลไบโอส, น้ำตาลฟรักโทส, น้ำตาลฟูโคส, น้ำตาลแลคโตส, น้ำตาลมอลโทส, น้ำตาลเมลิไบโอส, น้ำตาลแรฟพิโนส, น้ำตาลแรมโนส, น้ำตาลซอร์บิทอล, น้ำตาลซูโครส, น้ำตาลทรีฮาโลส, และน้ำตาลไซลิทอล	PHB, PHBV
<i>Burkholderia cepacia</i>	น้ำมันปาล์มโอลีอิน, น้ำมันปาล์มสเตียรีน, น้ำมันปาล์มดิบ, น้ำมันจากเนื้อในเมล็ดปาล์ม, กรดโอเลอิก, น้ำตาลไซโลส, กรดลิวูลินิก, และกากน้ำตาลจากหัวบีท	PHB, PHBV
<i>Caulobacter crescentus</i>	อาหารเลี้ยงเชื้อ caulobacter และน้ำตาลกลูโคส	PHB
<i>E. coli</i> mutants	น้ำตาลกลูโคส, กลีเซอรอล, น้ำมันปาล์ม, เอทานอล, น้ำตาลซูโครส และกากน้ำตาล	(UHMW)PHB
<i>Halomonas boliviensis</i>	สตาร์ชไฮโดรไลเสต, น้ำตาลมอลโทส, น้ำตาลมอลโตเตตราโอส และน้ำตาลมอลโทเฮกซาโอส	PHB
<i>Legionella pneumophila</i>	อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว nutrient broth (NB)	PHB
<i>Methylocystis</i> sp.	แก๊สมีเทน	PHB
<i>Microlunatus phosphovor</i>	น้ำตาลกลูโคส และอะซีเตต	PHB
<i>P. aeruginosa</i>	น้ำตาลกลูโคส, กรดโอเลอิก, ของเหลือจากกรดไขมันอิสระ และของเหลือจากน้ำมันทอดอาหาร	mcl-PHAs
<i>P. oleovorans</i>	กรดออกตะโนอิก	mcl-PHAs
<i>P. putida</i>	น้ำตาลกลูโคส, กรดออกตะโนอิก และกรดอันเดกคาโนอิก	mcl-PHAs

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอน	พอลิเมอร์ที่ผลิต
<i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. jessenii</i>	น้ำตาลกลูโคส และอะโรมาติกมอนอเมอร์	aromatic polymers
<i>P. stutzeri</i>	น้ำตาลกลูโคส, น้ำมันถั่วเหลือง, แอลกอฮอล์ และอัลคาโนเอต	mcl-PHAs
<i>Rhizobium meliloti</i> , <i>R. viciae</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกาแลคโตส, น้ำตาลแมนนิทอล, น้ำตาลทรีฮาโลส, น้ำตาลไซโลส, น้ำตาลแรฟฟิโนส, น้ำตาลมอลโทส, น้ำตาลเดกซ์โทรส, น้ำตาลแลคโตส, ไพรูเวต, กากน้ำตาลจากหัวบีท และเวย์โปรตีน	PHB
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	อะซีเตต, มาเลต, ฟูมาเรต, ซักซีเนต, โพรพิโอเนต, มาโลเนต, กลูโคเนต, บิวทิเรต, กลีเซอรอล และซีเตรต	PHB, PHBV
<i>Spirulina platensis</i> (cyanobacterium)	แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์	PHB
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	มอลต์, ของเหลือจากถั่วเหลือง, ของเหลือจากนม, ของเหลือจากน้ำส้มสายชูหมัก และน้ำมันงา	PHB
<i>C. necator</i>	น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลซูโครส, น้ำตาลฟรักโทส, วาเลอเรต, ออกตะโนเอต, กรดแลคติก, และน้ำมันถั่วเหลือง	PHB, copolymers
<i>C. necator</i> H16	แก๊สไฮโดรเจน, แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์	PHB

2.3 พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)

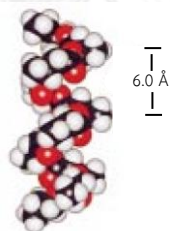
P(3HB) ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Lemoigne นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศส ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ *B. megaterium* ในปี ค.ศ. 1926 (Law และ Slepecky, 1961) โดย P(3HB) ที่ถูกสังเคราะห์และสะสมขึ้น มีความเกี่ยวข้องกับการสะสมของก้อนไขมัน (lipid inclusion) ในช่วงที่มีการเจริญของของแบคทีเรีย (Griebel และคณะ, 1968; Lee, 1996b; Williamson และ Wilkinson, 1958) สามารถตรวจหา PHAs ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เบื้องต้นได้ด้วยเทคนิคย้อมไขมัน ซึ่งเป็นการย้อมสีสารประเภทไขมันที่สะสมอยู่ในเซลล์ด้วยสีย้อมไนล์บลู เอ (Nile Blue A) (Ostle และ Holt, 1982) หรือสียูดานแบล็ก บี (Sudan black B) แสดงในรูปที่ 2.5



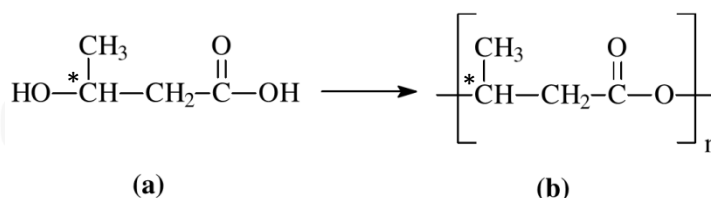
รูปที่ 2.5 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (a), เซลล์ที่ย้อมด้วยสีไนล์บลู เอ (b) และ เซลล์ที่ย้อมด้วยสีชูตาดานแบล็ก บี (c) (López-Cortés และคณะ, 2008)

2.3.1 โครงสร้างของ P(3HB)

โครงสร้างโมเลกุลของ P(3HB) เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค X-ray พบว่ามีลักษณะอัดตัวแน่น และเป็นเกลียวเวียนขวา (right-handed helix) มีความยาวหนึ่งรอบเกลียว (fiber repeat) เท่ากับ 6 อังสตรอม หรือ 0.6 นาโนเมตร และมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 10^3 - 10^6 ดาลตัน (Waser และคณะ, 2001) ซึ่งเกิดจากการเชื่อมต่อกันของ 3HB ที่มีหมู่เมทิล (methyl group) มาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่งคาร์บอน (*C) และมีมอนอเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ ได้เป็นสารประกอบ P(3HB) (Bucci และคณะ, 2005; Loo และ Sudesh, 2007) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 และ 2.7 ตามลำดับ



รูปที่ 2.6 โครงสร้างผลึกของ P(3HB) (Waser และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.7 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ 3-hydroxybutyrate-acid (a) และ P(3HB) (b) (Bucci และคณะ, 2005)

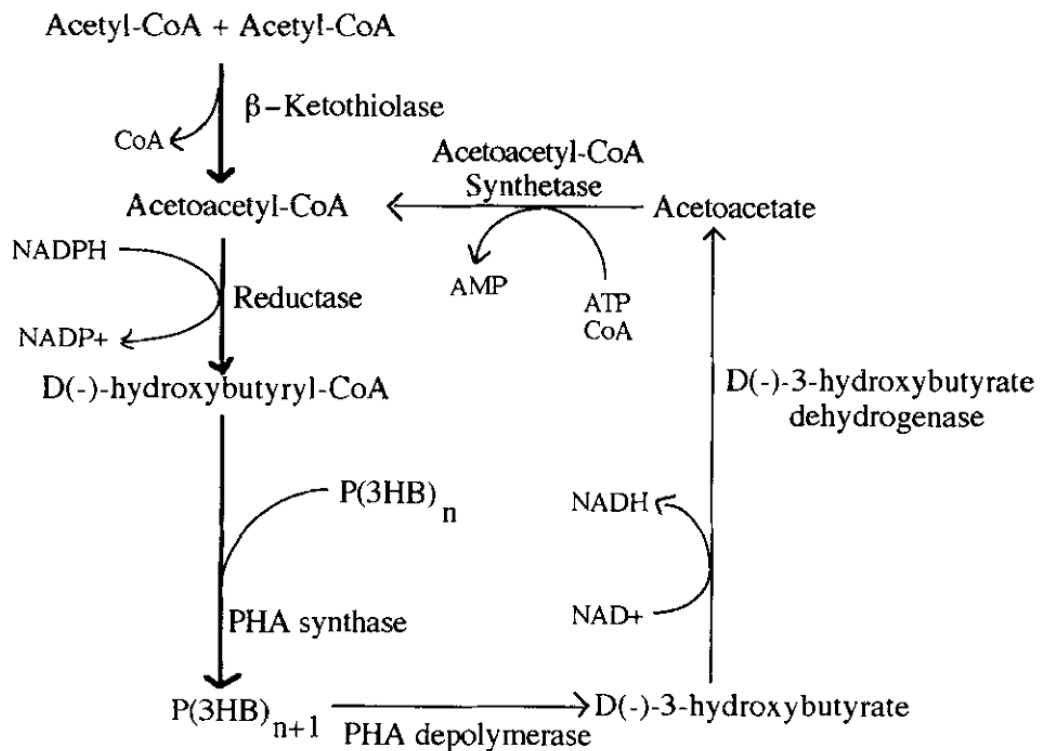
2.3.2 วิธีชีวสังเคราะห์ P(3HB)

กระบวนการสังเคราะห์และการควบคุมการสังเคราะห์ P(3HB) อาศัยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนไซม์ β -ketothiolase เอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase และเอนไซม์ P(3HB) synthase ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ เกิดจากการแสดงออกของ *pha* CBA cluster ประกอบด้วย ยีนและโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการสังเคราะห์ ได้แก่ PHA synthase (*pha* C) β -ketothiolase (*pha*

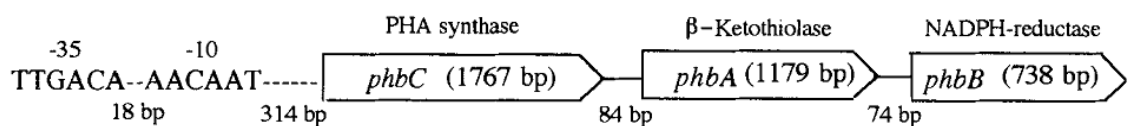
A) และ NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase ตามลำดับ (Lee, 1996a) ดังแสดงในรูปที่ 2.8 และ 2.9

ปฏิกิริยาของเอนไซม์เริ่มจากการรวม 2 โมเลกุลของ acetyl-CoA ด้วยเอนไซม์ β -ketothiolase ได้เป็น acetoacetyl-CoA และถูกรีดิวซ์ไปเป็น 3-hydroxybutyryl-CoA ด้วยเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase ซึ่ง 3-hydroxybutyryl-CoA เป็นมอนอเมอร์ในปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน จะถูกพอลิเมอร์ไรซ์ด้วยเอนไซม์ P(3HB) synthase ไปเป็นพอลิเมอร์ P(3HB) (Budde และคณะ, 2010; Kranz และคณะ, 1997)

P(3HB) มีสมบัติใกล้เคียงกับ PP ซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี โดย P(3HB) ความต้านทานต่อไขมันและน้ำมันได้ดีปานกลาง มีปริมาณผลึกในโครงสร้างสูงนอกจากนี้ยังมีความต้านทานต่อรังสี UV ดี แต่ไม่ทนต่อกรดและด่าง และ P(3HB) มีการแพร่ผ่านของแก๊สออกซิเจนต่ำ จึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ไวต่อออกซิเจนได้ อย่างไรก็ตาม P(3HB) ยังมีข้อจำกัดในการนำ P(3HB) ไปใช้งานเนื่องจากมีความแข็ง (stiffness) แต่เปราะ (brittleness) (Chen และคณะ, 2000; Lee, 1996b; Ojumu และคณะ, 2004) ดังแสดงในตารางที่ 2.4



รูปที่ 2.8 วิธีการสังเคราะห์ P(3HB) (Lee, 1996a)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของ *phbC-A-B* cluster ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์ P(3HB) (Lee, 1996a)

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพ เคมีและเชิงกลของ PP และ P(3HB) (Kosior และคณะ, 2006; Ojumu และคณะ, 2004)

สมบัติ	PP	P(3HB)
จุดหลอมเหลว (melting point) (°C)	176	175
อุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้ว (glass-transition temperature) (°C)	-10	15
การเกิดผลึก (crystalline) (%)	70	80
มอดูลัสของยัง (Young's modulus) (GPa)	1.7	3.5
ความสามารถในการต้านแรงดึง (tensile strength) (MPa)	34.5	40
การยืดสูงสุด ณ จุดขาด (elongation to break) (%)	400	6
การทนแรงกระแทก (impact strength) (v/m)	45	50
การทนทานต่อแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV resistance)	ไม่ดี	ดี
การทนทานต่อตัวทำละลาย (solvent resistance)	ดี	ไม่ดี
ความสามารถให้ออกซิเจนผ่าน (oxygen permeability) ($\text{cm}^{-1} \text{m}^{-2} \text{atm}^{-1} \text{d}^{-1}$)	1,700	45

2.4 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้เซลล์ที่มี P(3HB) ภายในเซลล์

2.4.1 ระดับขวดเขย่า (shake flask)

การเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าเป็นการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ทำให้ทราบผลของตัวแปรในการศึกษาโดยใช้เวลาน้อย เป็นวิธีที่ทำได้สะดวก ไม่ยุ่งยาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อย นิยม สามารถใช้หาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ได้ในการทดลองระดับห้องปฏิบัติการ

2.4.2 ระดับถังหมัก (fermenter)

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการเป็นการเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ และเพิ่มปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ข้อได้เปรียบของการเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมัก คือสามารถให้อากาศ (ออกซิเจน) ได้ดีกว่าระดับขวดเขย่า เนื่องจากมีการกวนและการให้อากาศแก่ระบบ ส่งผลให้มีการผสมระหว่างเซลล์ ออกซิเจน และสารอาหารได้ดี ทำให้สามารถควบคุมภาวะในการเลี้ยงเชื้อ และเซลล์มีการเจริญได้ดีกว่าการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า (Lemos และคณะ, 2006) เช่น ค่าออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen; DO) ค่าความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิ

ตลอดการเลี้ยงเชื้อ อีกทั้งยังสามารถทราบการเปลี่ยนแปลงของค่าตัวแปรเหล่านี้ได้ตลอด จากการบันทึกของเครื่องอัตโนมัติ และสามารถหลีกเลี่ยงการยับยั้งการเจริญ อันเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารเริ่มต้นได้ (feed back inhibition) นอกจากนี้สามารถเติมสารอาหารระหว่างการเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์และการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง ทำให้เลี้ยงเชื้อได้นานขึ้นโดย ทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้น (Thakor และคณะ, 2005)

งานวิจัยนี้ได้ใช้เชื้อ *B. megaterium* BA-019 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกได้ใหม่ (Kulpreecha และคณะ, 2009) โดยภาวะที่ดีที่สุดที่ได้จากการศึกษาโดยผู้วิจัยในกลุ่มผู้วิจัยเดียวกันมาก่อนหน้านี้ พบว่าการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิต P(3HB) ในการเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ซึ่งศึกษาจนได้กระบวนการเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพ และได้ความเข้มข้นของเซลล์และผลผลิตสูง (Kulpreecha และคณะ, 2009)

รัตนศิริ มูทิตากุล (2538) คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต P(3HB) ได้จากแหล่งดินในธรรมชาติ ซึ่งคัดเลือกได้ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BA-019 ซึ่งมีความสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่น

อดิพล บุญเรืองถาวร (2543) ได้ศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และการผลิต P(3HB) ในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ) และภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถผลิต P(3HB) ได้ดี โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรีย ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก เมื่อใช้กากน้ำตาลเปรียบเทียบกับน้ำตาลทรายที่มีปริมาณน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร กากน้ำตาลให้ผล การเจริญของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) ดีกว่าน้ำตาลทรายเท่ากับ 2.5 และ 4.0 เท่า ตามลำดับ พบว่า *Bacillus* sp. BA-019 สามารถใช้ยูเรียเพื่อการเจริญของเซลล์และการผลิต P(3HB) ได้ดีกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 แบบเฟด-แบตช์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีการควบคุมการป้อนสารอาหารด้วยวิธี pH-stat โดยการ ใช้กากน้ำตาลซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 400 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนคาร์บอนต่อ ไนโตรเจนเท่ากับ 10 โมลต่อโมลในสารป้อนเข้า โดยเริ่มมีการป้อนสารอาหารชั่วโมงที่ 7.5 ได้น้ำหนัก เซลล์แห้งเท่ากับ 72.57 กรัมต่อลิตร ปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 30.52 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 42.06% โดยน้ำหนัก ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ และมีอัตราการผลิต P(3HB) เท่ากับ 1.27 กรัมต่อ ลิตรต่อชั่วโมง

กุสุมา กมลจรัสโสภา (2547) ได้จัดจำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BA-019 โดย วิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมีและ 16s rDNA พบว่า *Bacillus* sp. สาย พันธุ์ BA-019 คือ *B. megaterium*

บุญฤทธิ เมฆศิริพร (2551) ได้ศึกษาเกณฑ์และปัจจัยที่สำคัญต่อการขยายส่วนการผลิต P(3HB) โดย *B. megaterium* BA-019 จากการศึกษาในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่าความเข้มข้น ของเซลล์ ปริมาณ P(3HB) ผลผลิตของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) ผลผลิตของ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อซับสเตรทที่ใช้ไป ($Y_{P/S}$) และอัตราการผลิต P(3HB) มีค่ามากที่สุดเมื่ออัตราการกวน เท่ากับ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยง เชื้อต่อนาที (vvm) จึงใช้ภาวะดังกล่าวในการผลิต P(3HB) แบบเฟด-แบตช์ โดยการป้อนอาหารด้วย

วิธี exponential feeding ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของ P(3HB) และอัตราการผลิต P(3HB) มีค่าเท่ากับ 90.42 กรัมต่อลิตร 35.45 กรัมต่อลิตร และ 1.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ที่ ชั่วโมงที่ 27 ของการเลี้ยงเชื้อและศึกษาการขยายส่วนการผลิต P(3HB) จากถังหมัก 10 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 300 ลิตร โดยใช้เกณฑ์คงที่ได้แก่ อัตราส่วนของกำลังมอเตอร์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ (P/V) ความเร็วรอบปลายใบพัด (πnD_i) และค่าเรย์โนลด์ส์นัมเบอร์ (N_{RE}) พบว่าอัตราส่วนของกำลังมอเตอร์ต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเกณฑ์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการขยายส่วน

ปวดี กาญจนชุมพล (2553) ได้ศึกษาการขยายส่วนการผลิต P(3HB) ในถังหมักขนาด 10 ลิตรไปสู่ถังหมักขนาด 90 ลิตร สำหรับการผลิตในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบเฟด-แบตช์ พบว่าการป้อนอาหาร แบบ exponential ความเข้มข้นน้ำตาลของเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และใช้กากน้ำตาลและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12 พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของ P(3HB) และอัตราการผลิต P(3HB) มีค่าเท่ากับ 90.71 กรัมต่อลิตร 41.58 กรัมต่อลิตร และ 1.73 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ การขยายส่วนการผลิตสู่ถังหมักขนาด 90 ลิตร อาศัยข้อมูลพื้นฐานด้านเทคนิคการหมักและภาวะการเลี้ยงเชื้อทั้งแบบแบตช์ และเฟด-แบตช์ที่เหมาะสมจากถังหมัก 10 ลิตร เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการหมักทั้ง 2 ระดับ พบว่า ความเร็วรอบปลายใบพัดเป็นปัจจัยทางวิศวกรรมที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้เป็นเกณฑ์คงที่ในการขยายส่วนการผลิต P(3HB) จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ

2.5 แนวทางการนำ PHAs ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์

PHAs มีสมบัติเชิงกลและทางกายภาพที่หลากหลาย ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง โดยสามารถผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลาย ดังแสดงในรูปที่ 2.10

2.5.1. ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม (Chen และ Wu, 2005)

ใช้เป็นวัสดุสิ้นเปลืองในงานด้านศัลยกรรม เช่น ผ้าก๊อซ วัสดุปิดแผล ตัวเย็บแผล ไหมเย็บแผล เป็นต้น วัสดุเพื่อการบำบัดและรักษาโรค ได้แก่ แคปซูลบรรจุยาหรือวัคซีนที่ต้องการให้ตัวยาค่อยๆ ถูกปล่อยออกมาในปริมาณน้อยๆ เป็นเวลานาน ใช้ทำเป็นอุปกรณ์ฝังในร่างกายหรือกระดูกเทียม โดยอาศัยสมบัติการมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกายมนุษย์ของ PHAs ซึ่งคล้ายกับสมบัติของกระดูกธรรมชาติ ด้านทันตกรรมนำ PHAs มาใช้เป็นวัสดุตัวนำที่ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นใหม่ในโรคด้านปริทันต์ (periodontitis) โดย PHAs สามารถนำมาใช้งานทางด้านทางการแพทย์ได้เนื่องจากมีความสามารถในการเข้ากันได้กับระบบชีวภาพหรือเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ความสามารถถูกดูดซึม (bioresorbable) และสามารถถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Philip และคณะ, 2007)

2.5.2. ด้านเกษตรกรรมและปศุสัตว์ (Steinbüchel และ Fuchtenbusch, 1998)

ใช้เป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยาโรคประเภทที่มีกลไกการออกฤทธิ์นาน และวัคซีนต่างๆ ในสัตว์เลี้ยง เช่น วัคซีนป้องกันโรคระบาด ยาถ่ายพยาธิ (Reddy และคณะ, 2003) แคปซูลสำหรับบรรจุปุ๋ย ฮอร์โมน growth factors ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช ซึ่งแคปซูลจะค่อยๆ สลายทีละน้อย โดยอาศัยจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินพร้อมกับปล่อยสารที่บรรจุข้างในออกมา ทำให้สารดังกล่าวคงอยู่ในดินหรือตำแหน่งที่ต้องการใช้งานได้เป็นเวลานาน นอกจากนี้ยังใช้เป็นพลาสติกคลุมดินรักษาความชื้น และใช้ทำถุงใส่ต้นกล้าพืชสำหรับนำไปปลูก ซึ่งเมื่อหมดเวลาการใช้งานจะค่อย ๆ ถูกย่อยสลายไปโดยธรรมชาติ (Lee, 1996a)

2.5.3. วัสดุประเภทบรรจุภัณฑ์ (Hocking และ Marchessault, 1994)

ใช้ผลิตขวดแชมพูที่ประกอบด้วยส่วนฝาที่ต้องการความแข็งแรงและปิดได้ดี ใช้ทำบรรจุภัณฑ์บรรจุอาหารประเภทถุง ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป ขวดน้ำ ถาด ช้อน และแผ่นฟิล์มสำหรับหีบห่อ เป็นต้น

2.5.4. วัสดุเส้นใยและแผ่นผ้าแบบ non-woven (Lee, 1996a)

ใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ ผ้าอ้อมสำเร็จรูป ผลิตภัณฑ์อนามัย เสื้อผ้าและเครื่องนุ่งห่ม เส้นใยสำหรับบรรจุในเครื่องนอน โดยการผสม P(3HB) ลงในเส้นใยฝ้าย จะช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับเส้นใย เป็นต้น

2.5.5. วัสดุด้านอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และการสื่อสาร (Khanna และ Srivastava, 2005)

ใช้ผลิตชิ้นส่วนประกอบของโทรศัพท์เคลื่อนที่ ชิ้นส่วนประกอบของคอมพิวเตอร์ และแผ่นซีดี เป็นต้น



รูปที่ 2.10 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากการประยุกต์ใช้ P(3HB) (Lenz และ Marchessault, 2005; Plastics Institute of Thailand, 2012; Plastics Institute of Thailand, 2013)

2.6 บริษัทผู้ผลิต PHAs

บริษัทผู้ผลิตพอลิเมอร์ P(3HB) ทั่วโลกมีอยู่หลายบริษัท โดยผลิตพอลิเมอร์ภายใต้ชื่อทางการค้าและกำลังการผลิตแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.5 ในปี ค.ศ.1976 บริษัท Imperial Chemical Industries Ltd. (ICI) ประเทศอังกฤษ ได้เริ่มให้ความสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับ P(3HB) เนื่องจากสามารถผลิตโดยใช้ทรัพยากรที่สามารถผลิตทดแทนใหม่ได้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสมบัติใกล้เคียงกับ PP สามารถถูกย่อยสลายได้โดยธรรมชาติและมีความสามารถเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต มีการพัฒนากระบวนการผลิต PHBV เพื่อการค้าจนกระทั่งมีการจดสิทธิบัตร ภายใต้ชื่อทางการค้าว่า Biopol[®] (Braunegg และคณะ, 1998; Choi และ Lee, 1999a) ต่อมาได้ขายสิทธิบัตรให้บริษัท Monsanto และ Metabolix ซึ่งได้ร่วมมือกันเพื่อพัฒนากระบวนการผลิต โดยใช้เชื้อ *E. coli* ในการผลิต P(3HB) จากน้ำตาล ต่อมาบริษัท Metabolix ได้ร่วมมือกับบริษัท Archer Daniels Midland (ADM) พัฒนาจนมีประสิทธิภาพการผลิต 50,000 ตันต่อปี ณ ปัจจุบัน บริษัท Metabolix ยังคงเป็นบริษัทที่มีประสิทธิภาพในการผลิต PHAs มากที่สุด สำหรับบริษัทผู้ผลิต PHAs เพื่อการค้าในปัจจุบัน ได้แก่ Metabolix, Procter, Gamble, Biomer, PHB Industrial และ Biomatera Mitsubishi Gas Chemical (MGC) (Jacquel และคณะ, 2008; Kosior และคณะ, 2006)

ตารางที่ 2.3 บริษัทผู้ผลิต PHAs (Jacquel และคณะ, 2008)

บริษัท	PHAs	ชื่อผลิตภัณฑ์	ราคา	กำลังผลิต (ตันต่อปี)
Homopolymers				
Biotechnoly Co., Germany	P(3HB)	Biomer [®]	20€/kg (2003) 3–5€/kg (2010)	50
PHB Industrial S/A company, Brazil	P(3HB)	Biocycle [®]	-	60
Mitsubishi GAS Chemical, Japan	P(3HB)	Biogreen [®]	10–12€/kg (2003) 2.5–3€/kg (2010)	1,400 (2003) 30–60,000 (2010)
Metabolix, USA (BASF, ADM)	P(3HB)	-	~2.20€/kg (2010)	-
Jiangsu Nantian Group, China	P(3HB)	-	-	-
Metabolix, USA (BASF, ADM)	P(3HO)	-	~2.20€/kg (2010)	-
Copolymers				
Metabolix, USA (BASF, AMD)	P(3HB-co-3HV)	Biopol [®]	10–12€/kg (2003) 3–5€/kg (2010)	1,100
PHB Industrial S/A company, Brazil	P(3HB-co-3HV)	-		50(2003) 10,000 (2006)

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

บริษัท	PHAs	ชื่อผลิตภัณฑ์	ราคา	กำลังผลิต (ตันต่อปี)
Tianan Biologic Material, China	P(3HB-co-3HV)	ENMAT [®]	-	1,000
Procter & Gamble, USA (Kaneka)	P(3HB-co-3HHx)	Nodax	2.50€/kg (2010)	250 (2003) 20–50,000 (2010)
Jiangsu Nantian Group, China	P(3HB-co-3HHx)	-		
Lianyi Biotech, China	P(3HB-co-3HHx)	-	>5 US\$/kg (2006)	2,000 (2006)

2.7 ข้อจำกัดในการนำ PHAs ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์และแนวทางในการแก้ปัญหา

ปัญหาที่สำคัญของการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพชนิด PHAs เพื่อใช้ทดแทนพอลิเมอร์สังเคราะห์จากปิโตรเคมี คือ ค่าใช้จ่ายในการผลิต PHAs ยังสูงกว่าการผลิตพอลิเมอร์สังเคราะห์อยู่ประมาณ 5-10 เท่า ปัจจัยสำคัญที่ทำให้การผลิต PHAs มีราคาสูง คือ แหล่งอาหารสำหรับการหมักและการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ (downteam process) ซึ่งเสียค่าใช้จ่ายประมาณ 40% และ 26% ของค่าใช้จ่ายในการผลิตทั้งหมด ตามลำดับ (Choi และ Lee, 1999b; Jacquel และคณะ, 2008; Lee, 1996b)

ดังนั้น แนวทางในการแก้ปัญหา คือ การวิจัยและพัฒนาเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถสังเคราะห์และสะสม PHAs ได้ปริมาณสูง โดยการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คุณสมบัติที่ดีคือ มีอัตราในการผลิต PHAs ได้ปริมาณสูง เซลล์สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว และใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกได้ สำหรับวิธีในการเลือกหาแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติดังกล่าว สามารถทำได้โดยการคัดแยกจากแหล่งธรรมชาติ หรือใช้วิธีทาง genetics เพื่อสร้างเป็นสายพันธุ์ผสม (recombinant strain) (Lee และคณะ, 2000) นอกจากนี้อีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มปริมาณ PHAs และลดราคาต้นทุนการผลิตลง คือ การปรับปรุงกระบวนการหมักและกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Choi และ Lee, 1999a; Lee, 1996a)

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อต้นทุนการผลิต P(3HB)

การผลิตพอลิเมอร์โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพนั้น จะต้องคำนึงถึงปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อปริมาณ คุณสมบัติและชนิดของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ซึ่งปัจจัยที่สำคัญต่อการสังเคราะห์ P(3HB) ได้แก่

2.8.1 ชนิดของจุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์มีผลต่อชนิดหรือสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ โดยมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิต P(3HB) ได้ และจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ที่มี

องค์ประกอบและปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลต่อสมบัติของพอลิเมอร์ (Lee, 1996a; Reddy และคณะ, 2003)

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาด้วยการนำเอาเทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ โดยการเพิ่มการแสดงออก (over expression) ของยีน *Pha* ชนิดต่างๆ (Pötter และคณะ, 2004) เช่น การตัดต่อยีน *Pha C* จาก *Pseudomonas* sp. ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ mcl-PHA synthase เพื่อให้ recombinant *E. coli* เกิดการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตชนิด mcl-PHAs เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตพอลิเมอร์ เป็นต้น (Suriyamongkol และคณะ, 2007)

2.8.2 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและองค์ประกอบเซลล์ โดยสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ในการผลิต P(3HB) มีหลายประเภทขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ (Divyashree และ Shamala, 2010) ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ทำให้ราคาของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก P(3HB) มีราคาสูงเมื่อเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเคมี โดยค่าใช้จ่ายสำหรับแหล่งคาร์บอน ส่งผลต่อราคาต้นทุนการผลิตอย่างมาก คิดเป็นประมาณ 50% ของค่าใช้จ่ายในการผลิต P(3HB) ทั้งหมด (Choi และ Lee, 1999a)

ดังนั้น เพื่อลดต้นทุนของการผลิต จึงมีความพยายามใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาไม่แพง ในกระบวนการสังเคราะห์ P(3HB) จาก เช่น กากน้ำตาล (Akaraonye และคณะ, 2012; Albuquerque และคณะ, 2007; Beaulieu และคณะ, 1995; Kulprecha และคณะ, 2009) แป้ง (Chen และคณะ, 2006) กลิเซอรอล (Sindhu และคณะ, 2011) ซีส (Nath และคณะ, 2008) หางนม (Koller และคณะ, 2008) กากตะกอนน้ำเสีย (Bengtsson และคณะ, 2008) น้ำมันพืช (Lee และคณะ, 2008) ของเหลือจากโรงงานแปรงไม้ (Haas และคณะ, 2008) และน้ำทิ้งจากโรงงานกระดาษ (Bengtsson และคณะ, 2008) ชีวภาพที่มีเนื้อเยื่อ (cellulosic biomass) (Yu และ Stahl, 2008) เป็นต้น มาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อลดต้นทุนในการผลิต P(3HB)

สำหรับงานวิจัยนี้ มีความสนใจที่จะใช้กากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตพอลิเมอร์ P(3HB) เพื่อให้ต้นทุนในการผลิตต่ำลง เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทราย มีลักษณะเป็นของเหลวข้นเหนียวสีน้ำตาลเข้ม ที่เหลือจากการแยกเอาผลึกน้ำตาลออก โดยประเทศไทยมีการปลูกอ้อยและมีโรงงานผลิตน้ำตาลทรายจำนวนมาก ดังนั้นการเลือกใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น จึงเป็นทางเลือกที่ดี เนื่องจากมีปริมาณมาก หาง่าย และราคาถูก ในกากน้ำตาลประกอบไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์อยู่หลายชนิด เช่น คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรักโตส รวมทั้งมีวิตามินและธาตุอาหารเป็นจำนวนมาก

2.8.3 แหล่งไนโตรเจน (Gouda และคณะ, 2001)

แหล่งไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8-10% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์จุลินทรีย์ ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน แหล่งไนโตรเจนที่ใช้สำหรับการผลิต P(3HB) สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท ดังนี้

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ กรดอะมิโน เปปโติน เคซีน ยีสต์สกัด สารสกัดจากเนื้อ หรือยูเรีย เป็นต้น

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนีย อาจใช้ในรูปแก๊สหรือสารละลายแอมโมเนีย และไนเตรตและเกลือแอมโมเนียม เช่น เกลือแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (Beaulieu และคณะ, 1995) เกลือแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) และเกลือแอมโมเนียมฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$) เป็นต้น

นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้วแหล่งไนโตรเจนก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อราคาการผลิต P(3HB) เช่นกัน โดยแหล่งไนโตรเจนที่นิยมนำมาใช้ในการผลิต P(3HB) ได้แก่ NH_4Cl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ NH_4NO_3 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ โมโนโซเดียมกลูตาเมต และยูเรีย โดยยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกที่สุด

2.8.4 แหล่งฟอสฟอรัสและเกลือแร่ (Gouda และคณะ, 2001)

การสะสม P(3HB) จะเกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารเกลือแร่ขาดความสมดุล เช่น ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ ซึ่งพบว่า ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และซัลเฟอร์ นั้นจัดเป็นแร่ธาตุหลักที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณมากพอสมควรโดยเฉพาะอย่างยิ่งฟอสฟอรัสและแมกนีเซียม ซึ่งจำเป็นมากเนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้างและการถ่ายเทพลังงานสำหรับจุลินทรีย์

2.8.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ค่าความเป็นกรด-ด่าง มีผลต่อการเจริญและการผลิต P(3HB) ของจุลินทรีย์ พบว่าการผลิต P(3HB) ควรควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าสูงกว่า 7.0 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะที่เป็นกรดมากเกินไป ซึ่งจะกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ P(3HB)

2.8.6 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ การผลิตและสะสม P(3HB) ของจุลินทรีย์ โดยอุณหภูมิจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการเจริญและสังเคราะห์ P(3HB) ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสม ได้แตกต่างกัน

2.8.7 ออกซิเจน (Steinbüchel และ Fuchtenbusch, 1998)

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต P(3HB) เนื่องจากสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดจะเกิดยับยั้งการทำงานของ NADH ทำให้ acetyl-CoA ไม่เข้าสู่วัฏจักร TCA แต่ถูกเปลี่ยนเป็น acetoacetyl-CoA เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ P(3HB) โดยอาศัยเอนไซม์ β -ketothiolase ทำให้เกิดการสะสม P(3HB) เกิดขึ้น ดังนั้นการจำกัดปริมาณออกซิเจนจึงช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์ P(3HB) ได้

ปริมาณออกซิเจนมีผลโดยตรงต่อการเจริญและสังเคราะห์ P(3HB) ของ *B. megaterium* BA-019 พบว่า ที่ปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 40% และ 80% ได้ปริมาณ P(3HB) ต่ำกว่าที่

ปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 60% โดยมีค่าเท่ากับ 47.02% และ 57.99% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 60% ได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 8.78 กรัมต่อลิตรและ 61.62% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (Kulpreecha และคณะ, 2009)

2.8.8 ปัจจัยทางด้านการผลิต

ปัจจัยทางด้านการผลิตประกอบด้วยอัตราการผลิต P(3HB) และขนาดการผลิต โดยอัตราการผลิต P(3HB) คือ ปริมาณการผลิต P(3HB) ต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อหนึ่งหน่วยเวลา ซึ่งจะมีผลต่อราคาการผลิต เนื่องจากอัตราการผลิตที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ต้นทุนการผลิตลดลง และเมื่อขนาดการผลิต (fermentation capacity) เปลี่ยนแปลง จะทำให้ต้นทุนการผลิตต่างๆ เปลี่ยนแปลงไปด้วย โดยขนาดการผลิตที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ราคาการผลิต P(3HB) ลดลง

2.9 กระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ หรือกระบวนการกู้คืน (recovery process)

กระบวนการกู้คืน เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายหลังจากการผลิต P(3HB) โดยการเพาะเลี้ยงแบบคทีเรียด้วยกระบวนการหมัก จากนั้นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการปั่นเหวี่ยง แล้วจึงแยก P(3HB) ออกจากเซลล์ เนื่องจาก P(3HB) เป็นผลิตภัณฑ์ที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular product) รวมทั้งการทำให้บริสุทธิ์ P(3HB) สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการนี้ส่งผลต่อสมบัติ โครงสร้าง และความบริสุทธิ์ของ P(3HB) รวมทั้งมีผลต่อต้นทุนการผลิต P(3HB) (Madkour และคณะ, 2013; Yu และ Chen, 2006)

2.9.1 วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

โดยทั่วไปกระบวนการกู้คืนผลิตภัณฑ์ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัด P(3HB) ออกจากเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่าย และใช้รวดเร็ว โดยตัวทำละลายอินทรีย์จะทำลายเซลล์เมมเบรนและละลาย P(3HB) ทำให้ถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ได้ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถใช้สกัด P(3HB) ได้แก่ กลุ่มคลอรีเนตไฮโดรคาร์บอน (chlorinated hydrocarbons) เป็นกลุ่มที่ประกอบด้วยธาตุไฮโดรเจน (H) คาร์บอน (C) และคลอรีน (Cl) เช่น คลอโรฟอร์ม (CHCl_3) 1,2-คลอโรอีเทน ($\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$) กลุ่มไซคลิกคาร์บอเนต (cyclic carbonates) เช่น เอทิลีนคาร์บอเนต ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$) โพรพิลีนคาร์บอเนต ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$) กลุ่มเชนคีโตน (chain ketone) เช่น อะซีโตน ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) (Jiang และคณะ, 2006) จากการศึกษาของ Riedel และคณะ (2013) พบว่าเมื่อสกัดสาร (P(HB-co-HHX)) จาก *R. eutropha* ด้วยสารเคมีที่ไม่มีฮาโลเจน (non-halogenated solvents) เมื่อสกัดเซลล์แห้งด้วยเอทิลอะซีเตต มีประสิทธิภาพการกู้คืนและความบริสุทธิ์ได้สูงถึง 99% โดยน้ำหนัก ในขณะที่สกัดเซลล์เปียกด้วยเมทิลไอโซบิวทิลคีโตน (methyl isobutyl ketone; MIBK) ได้ความบริสุทธิ์และการกู้คืนเท่ากับ 99% และ 84% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด P(3HB) คือ คลอโรฟอร์ม ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้กันกว้างขวาง (Comeau และคณะ, 1988) หลังจากนั้นอาจมีการตกตะกอน P(3HB) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล (CH_3OH) และเอทานอล ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) โดยวิธีการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีข้อได้เปรียบคือ P(3HB) ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง (Anis และคณะ, 2013; Estermann และคณะ, 1990; Jacquelin และคณะ, 2008)

มีผลกระทบต่อเล็กน้อยต่อน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ (Kunasundari และ Sudesh, 2011; Ramsay และคณะ, 1994) และสามารถนำ PHAs ไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ (Chen และ Wu, 2005) แต่วิธีการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งคลอโรฟอร์มมีข้อเสียเปรียบคือ ตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และมีราคาสูงซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ราคาต้นทุนการผลิต P(3HB) สูง (Hahn และคณะ, 1993; Hahn และคณะ, 1995)

2.9.2 วิธีการย่อย (digestion methods) (Harrison, 1991)

วิธีการย่อยมีหลักการตรงข้ามกับวิธีการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เป็นการละลายส่วนประกอบของเซลล์ที่ล้อมรอบ P(3HB) ออกไป สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ

การย่อยด้วยสารเคมี เป็นการใส่สารเคมีละลายส่วนประกอบอื่นๆ ในเซลล์ที่ไม่ใช่พอลิเมอร์ (non-polymer cellular material หรือ NPCM) ออกไป สารเคมีที่นิยมใช้ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaClO) และสารลดแรงตึงผิว (surfactants) การย่อยด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ทำให้ P(3HB) มีความบริสุทธิ์สูง แต่มีข้อเสียเปรียบคือ ส่งผลกระทบต่อน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) ลดลง (Berger และคณะ, 1989; Hahn และคณะ, 1993) ส่วนการย่อยด้วยสารลดแรงตึงผิว เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) (Kim และคณะ, 2003), Tween 80 และ Triton X-100 เป็นต้น P(3HB) ที่ได้แม้จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าการย่อยด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์แต่ความบริสุทธิ์ของ P(3HB) ที่ได้ต่ำ (Chen และคณะ, 1999; Ryu และคณะ, 2000) Yang และคณะ (2011) รายงานว่าสารดีเทอร์เจนต์ เช่น linear alkylbenzene sulfonates (LAS-99) สามารถใช้ย่อยเซลล์ของ *R. eutropha* H16 และได้ PHAs ที่มีความบริสุทธิ์สูง ใช้ปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ SDS และยังสามารถถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Larsson และคณะ, 2011)

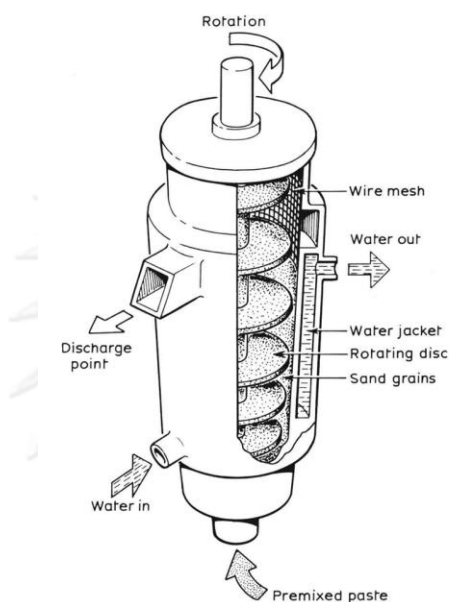
การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic digestion) อาจใช้ร่วมกับการให้ความร้อนและสารลดแรงตึงผิว โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้ ได้แก่ protease bromelain pancreatin alcalase neutrase lecitase และ lysozyme เป็นต้น การย่อยด้วยเอนไซม์มีข้อได้เปรียบคือ ปฏิบัติการย่อยที่ไม่รุนแรงและ P(3HB) มีความบริสุทธิ์สูง แต่มีข้อจำกัดคือการใช้เอนไซม์นั้นมีความจำเพาะต่อซับสเตรตและมีราคาแพง (Kapritchkoff และคณะ, 2006; Yasotha และคณะ, 2006)

2.9.3 วิธีการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกล

มีข้อได้เปรียบคือ ปฏิบัติการไม่รุนแรงต่อผลิตภัณฑ์ ไม่ใช่สารเคมี ทำให้ลดการปลดปล่อยสารพิษสู่สิ่งแวดล้อมและการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ นิยมใช้เพื่อการผลิต P(3HB) ในทางเชิงพาณิชย์ เช่นการผลิตยาและอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการลงทุนสูง ระยะเวลาดำเนินงานนาน วิธีดังกล่าวได้แก่

การบดด้วยเม็ดปัด (bead mill disruption) (รูปที่ 2.11) ประกอบด้วย grinding chamber ทรงกระบอกแนวตั้ง โรเตอร์ (rotor) เพื่อการปั่นแยกที่ศูนย์กลาง โดยเซลล์จะถูกป้อนเข้าที่ฐานและไหลขึ้นช่องว่างระหว่างวงแหวนโรเตอร์และสเตเตอร์ (stator) ซึ่งจะแยกเซลล์ออกและออกจากด้านบนสุด สามารถใช้แยกชีวมวล (biomass) ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 8-66 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการกระบวนการกักเก็บด้วยวิธีนี้คือ ระยะเวลาที่ใช้ (residence

time distribution; RTD) แรงเฉือน (shear forces) ชนิดของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของเซลล์ อัตราการป้อนเข้าของสารแขวนลอย (feed rate of the suspension) อัตราการกวน (agitator speed) และการออกแบบการกวน (design of the stirrer) จากการศึกษาของ Tamer และ Moo-Young (1998) รายงานว่าที่ความเร็ว 2,800 รอบต่อนาที ปริมาณการไหลอด 85% เมื่อใช้เม็ดบีด ขนาด 512 ไมโครเมตร ด้วยอัตราเร็ว 90 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถใช้กัวคีน P(3HB) ออกจากเซลล์ของ *A. latus* ได้



รูปที่ 2.11 การบดด้วยเม็ดบีด (Tamer และ Moo-Young, 1998)

การปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง (high-pressure homogenization) โดยอาศัยเครื่องปั่นอากาศซึ่งจะดันเซลล์เข้าผ่าน 2 ช่องคู่ขนาน (2×100 เมตร) ด้วยความดันสูงผ่าน vertical plate โดยปัจจัยที่มีผลต่อการกระบวนการกัวคีนด้วยวิธีนี้คือ ความดัน จำนวนแผ่นกรอง อุณหภูมิ และการออกแบบวาล์ว อีกปัจจัยหนึ่งคือ สรีรวิทยาของจุลินทรีย์ เช่น ชนิดและระยะการเจริญของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของเซลล์ โดยปัญหาที่มักเกิดขึ้นคือการอุดตันของแผ่นกรอง ซึ่งสามารถแก้ปัญหานี้ได้ด้วยการลดขนาดอนุภาคลงให้อยู่ในหน่วยไมโครเมตร โดยมักเกิดขึ้นกับแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมักมีขนาดเซลล์ใหญ่กว่าแบคทีเรียแกรมลบ จากการศึกษาพบว่าการใช้กัวคีน P(3HB) ออกจากเซลล์ของ *A. latus* ด้วยวิธีการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูงมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีบดด้วยเม็ดบีด (Tamer และ Moo-Young, 1998) จากการศึกษาของ Ghatnekar และคณะ (2002) พบว่าเมื่อใช้วิธีการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง ที่ความดันเท่ากับ 400 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 2 รอบ สามารถแยก P(3HB) จาก *Methylobacterium* sp. V49 ด้วย SDS ความเข้มข้นเท่ากับ 5% น้ำหนักต่อปริมาตร ได้ความบริสุทธิ์และการกัวคีนเท่ากับ 95% และ 98% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

อัลตราโซนิเคชัน (ultrasonication) โดยคลื่นอัลตราโซนิค หมายถึง คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงเกินกว่าที่มนุษย์จะได้ยิน มีความถี่สูงกว่า 20 kHz ขึ้นไป ซึ่งอาศัยหลักจลนพลศาสตร์ (kinetics) คือทำให้เซลล์แตกหรือเกิดรูรั่ว อันเนื่องมาจากคลื่นเสียงความถี่สูงที่ผลิตขึ้นมาจากแท่ง probe โลหะ แล้วถ่ายทอดไปยังเซลล์ Palacios และคณะ (1991) พบว่าสามารถใช้คลื่นอัลตราโซนิค เพื่อปลดปล่อยสารจำพวกไกลโคลิปิด (glycolipid) และ non-polar lipids จาก *B. megaterium* และสปอร์ของ *B. stearothermophilus* (Kaneda, 1967) Xiong และคณะ (2010) รายงานว่าคลื่นอัลตราโซนิคสามารถใช้เตรียมอนุภาคนาโน (nanoparticles) ของ P(3HB) ขนาด 150–300 นาโนเมตรได้ วิธีการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกล มีข้อจำกัดคือ อนุภาคทุกชนิดภายในเซลล์ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก และเศษเซลล์ (cell debris) จะออกมา ทำให้ยากต่อการทำให้บริสุทธิ์ ยากต่อการทำให้ใส อาจต้องใช้ร่วมกับสารเคมีเพื่อให้เซลล์แตกได้ดีขึ้น และความร้อนที่เกิดขึ้นจะทำลายผลิตภัณฑ์ที่ไม่ทนความร้อน

2.9.4 วิธีการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid)

เหมาะสำหรับการแยกและทำให้บริสุทธิ์สารที่มีความหนาแน่นสูงและความหนืดต่ำ ปัจจัยที่มีผลการแยกและทำให้บริสุทธิ์คือ ความดัน อุณหภูมิ และการออกแบบการเลี้ยงเชื้อ โดยอุณหภูมิและความดันสูงมีผลต่อคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสามารถใช้แอมโมเนีย เมทานอล แต่ที่นิยมใช้คือ supercritical-carbon dioxide (SC-CO₂) ซึ่งมีข้อได้เปรียบคือ ปลดปล่อยสารพิษต่ำ สามารถใช้ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ความดัน 73 บรรยากาศได้ ทำให้มีราคาถูก และไม่ใช้ความร้อนที่จะส่งผลต่อผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การเพิ่มตัวของคาร์บอนไดออกไซด์ จะช่วยเพิ่มการซึมผ่านเข้าออกผนังเซลล์ (cell wall permeability) ทำให้มีประสิทธิภาพในการแยกมากขึ้น (Kunasundari และ Sudesh, 2011)

2.9.5 วิธีการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมี

เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย โดยอาศัยหลักแรงดันออสโมซิส (osmotic pressure) ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ที่แตกต่างกันทำให้เซลล์แตก แบคทีเรียบางชนิด เช่น *Azotobacter vinelandii* UWD และ recombinant *E. Coli* เซลล์จะแตกได้เมื่อมีการสะสม PHAs ขนาดใหญ่ไว้ภายในเซลล์ (Choi และ Lee, 1999a; Lee และ Chang, 1994; Page และ Cornish, 1993) จากการศึกษาของ Page และ Cornish (1993) รายงานว่าเมื่อเซลล์ของ *A. vinelandii* UWD ในอาหารเลี้ยงเชื้อ fish peptone สามารถทำให้เซลล์แตกและปลดปล่อย P(3HB) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงได้ และเมื่อใช้สารละลาย NH₃ ความเข้มข้นเท่ากับ 1 นอร์มอล (pH 11.4) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที สามารถแยก P(3HB) ได้เท่ากับ 94% โดยน้ำหนัก โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 1.7x10⁶–2.0x10⁶ ดาลตัน Choi และ Lee (1999a) รายงานว่าเมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์ recombinant *E. coli* ที่มีปริมาณ P(3HB) เท่ากับ 77% โดยน้ำหนัก ที่บ่มด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 นอร์มอล อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ได้ความบริสุทธิ์ของ P(3HB) เท่ากับ 98.5% โดยน้ำหนัก Anis และคณะ (2012) รายงานว่าประสิทธิภาพของกระบวนการกักเก็บและการทำบริสุทธิ์ของโคพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HHx) จากเซลล์ของ

recombinant *C. necator* ความเข้มข้น 10-30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพอลิชซิง (polishing) ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร ได้ความบริสุทธิ์และการกักเก็บ ระหว่าง 80-90% โดยน้ำหนัก ต่อมาจึงพัฒนาการแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยการพรีทรีทเมนต์ (pretreatment) ด้วยโซเดียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 350 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และแยกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 350 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และพอลิชซิงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 350 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการกักเก็บและความบริสุทธิ์เท่ากับ 95% และ 90% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (Anis และคณะ, 2013)

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่า รายงานการวิจัยเรื่องการพัฒนาระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของพลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิด P(3HB) ยังมีไม่มาก แสดงว่าการศึกษาวิจัยในด้านนี้เพิ่งเริ่มมีผู้สนใจศึกษาไม่มากนัก ส่วนใหญ่ยังเป็นการวิจัยในด้านการผลิตให้ได้ผลผลิตสูงและราคาต้นทุนการหมักต่ำลง โดยการพัฒนาระบวนการผลิตสารกลุ่ม P(3HB) ด้วยวิธีการต่างๆ โดยกระบวนการกักเก็บในแต่ละวิธีนั้นมีข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบแตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2. 4 ข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของกระบวนการกักเก็บวิธีต่างๆ (Jacquel และคณะ, 2008; Kunasundari และ Sudesh, 2011)

วิธีการกักเก็บ	ข้อได้เปรียบ	ข้อเสียเปรียบ
การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	-กำจัดสารพิษเอนโดท็อกซินได้ -ประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์ -ความบริสุทธิ์สูง -ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างพอลิเมอร์ -พอลิเมอร์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลสูง	-ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นสารที่ระเหยได้และไม่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม -ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมาก -มีราคาแพง -ความเข้มข้นของ PHAs ที่ใช้ในการสกัดต้องมากกว่า 5% น้ำหนักต่อปริมาตร -ใช้เวลานาน
การย่อยด้วยสารเคมี		
สารลดแรงตึงผิว	-สามารถแยก PHAs จากเซลล์ที่มีความหนาแน่นได้ -ไม่ทำลายโครงสร้างของพอลิเมอร์	-ความบริสุทธิ์ต่ำ -จำเป็นต้องมีการบำบัดน้ำเสีย
โซเดียมไฮโปคลอไรท์	-ความบริสุทธิ์สูง	-ทำลายโครงสร้างของพอลิเมอร์
โซเดียมไฮโปคลอไรท์และคลอโรฟอร์ม	-ความบริสุทธิ์สูง -ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างพอลิเมอร์	-ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมาก
โซเดียมไฮโปคลอไรท์และสารลดแรงตึงผิว	-ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างพอลิเมอร์ -มีราคาถูก	-จำเป็นต้องมีการบำบัดน้ำเสีย

ตารางที่ 2.7 (ต่อ)

วิธีการกักเก็บ	ข้อได้เปรียบ	ข้อเสียเปรียบ
สารเคลือบและสารลดแรงตึงผิว	-ความบริสุทธิ์สูง -ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างพอลิเมอร์	-มีน้ำเสียเกิดขึ้นปริมาณมาก
การย่อยด้วยเอนไซม์	-ปฏิกิริยาไม่รุนแรง -ความบริสุทธิ์สูง -การกักเก็บสูง	-มีราคาแพง -มีความจำเพาะต่อสับเสรด
การบดด้วยเม็ดบีด	-ไม่ใช่สารเคมี -ความบริสุทธิ์สูง -ไม่ไวต่อการอุดตัน	-ใช้เวลานาน -ต้องควบคุมพารามิเตอร์ต่างๆ ของกระบวนการให้เหมาะสม
การปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวความดันสูง	-ไม่ใช่สารเคมี -ความบริสุทธิ์สูง	-ต้องควบคุมพารามิเตอร์ต่างๆ ของกระบวนการให้เหมาะสมกับลักษณะทางกายภาพของเชื้อจุลินทรีย์ -ความร้อนที่เกิดขึ้นจะทำลายผลิตภัณฑ์ที่ไม่ทนความร้อน -อนุภาคทุกชนิดภายในเซลล์จะออกมา ทำให้ยากต่อการทำให้บริสุทธิ์
การแยกด้วยของไหลวิกฤติยิ่งยวด	-ง่าย -ราคาถูก -รวดเร็ว -เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม	-ต้องควบคุมพารามิเตอร์ต่างๆ ของกระบวนการให้เหมาะสม -จำเป็นที่จะต้องทำความสะอาดบ่อยขึ้น -มีข้อจำกัดในการสกัดสารที่มีขี้
การทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมี	-ง่าย -ปฏิกิริยาไม่รุนแรง	-อาจต้องเพิ่มขั้นตอนการเตรียมผนังเซลล์

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

- 3.1.1 ถังหมัก (fermentor) ขนาด 10 ลิตร ของบริษัท B.E. Marubishi ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.2 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) รุ่น 3400CX ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.3 เครื่องสำหรับฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (auto sampler) รุ่น 8200CX ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.4 แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด CP-WAX 52 CB เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม. ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.5 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psychotherm incubator shaker) รุ่น G27 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.6 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น AG285 ของบริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.1.7 เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น PG6002-S ของบริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P ของบริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น Allegra 25R ของบริษัท Beckman Coulter ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.10 เครื่องระเหิดแห้ง (lyophilizer) รุ่น Eyla FD1 ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (VIS spectrophotometer) รุ่น Novaspec II ของบริษัท Pharmacia Biotech ประเทศอังกฤษ
- 3.1.12 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 2000 ของบริษัท Cyberscan ประเทศสิงคโปร์
- 3.1.13 เครื่องกลั่น (Distillation Unit) รุ่น K-350 บริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.1.14 เครื่องย่อย (Digester) รุ่น K-424 บริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.1.15 เครื่องกลั่นสำหรับวิเคราะห์ไนโตรเจน รุ่น K-350 ของบริษัท BUCHI
- 3.1.16 ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL-60 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.17 ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124 ของบริษัท ISSCO ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.18 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น INE 500 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.19 ตู้อบแห้ง (dryer oven) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี

- 3.1.20 หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.21 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760 ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
- 3.1.22 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของบริษัท Forma Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.23 ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.24 ไมโครปิเปต ขนาด 100 200 1,000 และ 5,000 มิลลิลิตร ของบริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส
- 3.1.25 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ 2 ของบริษัท Whatman ประเทศอังกฤษ
- 3.1.26 หลอดทดลองฝาเกลียว (test tube with screw cap) ของบริษัท PYREX ประเทศเยอรมนี
- 3.1.27 ขวดเซนตริฟิวส์ (centrifuge bottles) ของบริษัท Nalgene ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.28 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH30RF200 ของบริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.29 ขวดฉีดยาตัวอย่างอัตโนมัติ (screw cap vial) ของบริษัท Agilent Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 เคมีภัณฑ์

- 3.2.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.2 กรดซิตริก ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.3 กรดบอริก (H_3BO_3) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.4 กรดบิวทิริก ($C_5H_{10}O_2$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.5 กรดเบนโซอิก ($C_7H_6O_2$) ของบริษัท Nacalai tesque ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.6 กรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.7 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.8 กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.9 กากน้ำตาล ของบริษัทมิตรผล ประเทศไทย
- 3.2.10 แก๊สไนโตรเจน (N_2) ของบริษัท PRAXAIR ประเทศไทย
- 3.2.11 แก๊สออกซิเจน (O_2) ของบริษัท TIG (Thai Industrial Gas) ประเทศไทย
- 3.2.12 แก๊สไฮโดรเจน (H_2) ของบริษัท PRAXAIR ประเทศไทย
- 3.2.13 คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.14 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ของบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.15 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

- 3.2.16 โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.17 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.18 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.19 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.20 โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.21 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.22 ไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.23 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมนี
- 3.2.24 ทวิน 80 (Tween 80) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.25 ไตรตัน เอกซ์ 100 (Triton X-100) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.26 น้ำตาลทราย ของบริษัทมิตรผล ประเทศไทย
- 3.2.27 นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.28 บริจ 58 (Brij[®] 58) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.29 แบคโตทริปโตส (Bacto tryptose) ของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.30 เปปโตน (peptone) ของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.31 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.32 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.33 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Unilab ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.34 เมทานอล (CH_3OH) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.35 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี
- 3.2.36 แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์ ($\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ของบริษัท Merck ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.37 ยูเรีย ($\text{N}_2\text{H}_6\text{CO}$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.38 ลิเนียร์อัลคิลเบนซีนซัลโฟเนต (linear alkyl benzene sulfonates; LAS-99) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.39 ผงวุ้น (agar) ของบริษัทบิกเบน โปรตักตอรา เดอ อะการ์ เอส. เอ ประเทศชิลี
- 3.2.40 สารมาตรฐานพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) (P(3HB)) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.41 สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Labscan Asia ประเทศไอร์แลนด์
- 3.2.42 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Springer ประเทศฝรั่งเศส
- 3.2.43 เอทานอล ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
- 3.2.44 เอทิลอะซิเตต ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

- 3.2.45 เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
 3.2.46 แอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี
 3.2.47 แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ของบริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา

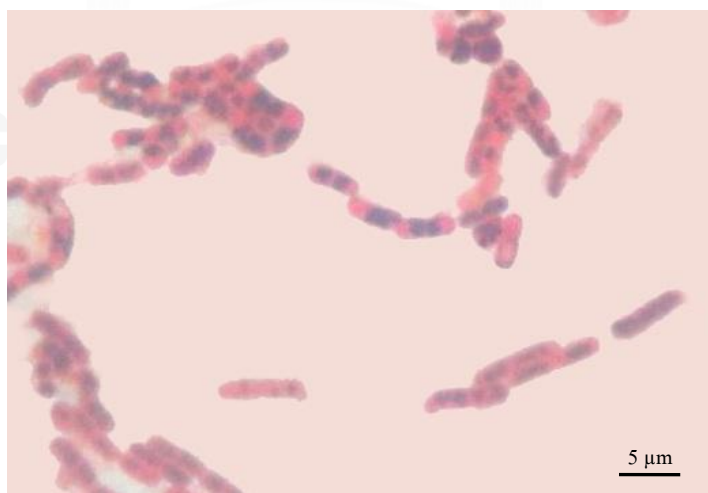
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *B. megaterium* BA-019 เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ใหม่จากแหล่งดินในธรรมชาติโดยรัตนศิริ มุทิตากุล (2538) ซึ่งสามารถสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ได้ในปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่นที่ศึกษา และได้จัดจำแนกสปีชีส์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA โดยกฤษฎา กมลจรัสโสภา (2547)



รูปที่ 3.1 *B. megaterium* BA-019 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า เมื่อย้อมสีแกรม



รูปที่ 3.2 *B. megaterium* BA-019 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า เมื่อย้อมสีชูดานแบล็ก บี



รูปที่ 3.3 *B. megaterium* BA-019 เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง nutrient agar (NA)

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.2.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
แบคโททริปโตส	5.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 นิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การนิ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

3.3.2.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) ใช้สูตรของ Doi และคณะ (1986) ซึ่งศึกษาปรับปรุงโดยสุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	10.0	กรัม
แบคโททริปโตส	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
น้ำตาลทราย	10.0	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 นิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายน้ำตาลนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3.2.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตและสะสมพอลิเมอร์ P(3HB) คือ อาหาร Mineral Salt Medium (MSM) (อติพล บุญเรืองถาวร, 2543) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

กากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar)	20.0	กรัม
ยูเรีย	0.8	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
กรดซิตริก	0.75	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร

แยกละลายเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตและสารละลาย trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย trace element ใน 1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.30	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.20	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต	0.60	กรัม
กรดบอริก	0.60	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เฮกซะคลอไรด์	0.08	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.50	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	0.05	กรัม
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.02	กรัม

3.3.2.4 การเตรียมกากน้ำตาลสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

1. เจือจางกากน้ำตาลด้วยน้ำ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1
2. นำกากน้ำตาลที่เจือจางแล้ว ปั่นแยกตะกอน ที่ความเร็ว 9,820 g เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำ จำนวน 2 รอบ)
3. นำกากน้ำตาลที่ผ่านการปั่นแยกตะกอนออกแล้วมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม

3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.3.3.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะสั้น

เชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อขีด (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ ป่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยเชื้อโดยขีดลงบนอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

3.3.3.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในระยะยาว

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.2.2 นำไปเลี้ยงในตู้ป่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ความเร็ว 9,820 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% น้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นปั่นแยกเซลล์และทำซ้ำอีกรอบ กระจายเซลล์ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% ปริมาตรต่อปริมาตร ที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและปรับให้อยู่ในช่วง 0.8-1.0 (จำนวน 10^9 CFU/ml) บรรจุลงในหลอดเยือกแข็ง (cryotube) ที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน หรือเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

3.3.4 การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ด้วยวิธีเฟด-แบตช์ เพื่อให้ได้เซลล์ของ *B. megaterium* ที่มี P(3HB) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

3.3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ในระดับขวดทดลอง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตเซลล์ในระดับถังหมัก

เตรียมกล้าเชื้อโดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 บนอาหารแข็งเอียง nutrient agar (NA) จากนั้นนำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% น้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อทำให้เป็นเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5

3.3.4.2 การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ด้วยวิธีแบตช์ เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญและการผลิต P(3HB)

ถ่ายกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.4.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ถ่ายกล้าเชื้อที่เลี้ยงไว้ปริมาตร 600 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว mineral salt medium (MSM) 6 ลิตร เมื่อใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 60 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณยูเรียที่มีในน้ำหมัก นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของผลผลิตของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป ($Y_{P/S}$) และค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เพื่อใช้ในการคำนวณอัตราการป้อนเข้าด้วยวิธีเฟด-แบตช์ แบบ

exponential feeding ในข้อ 3.3.4.3 คำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 1)

3.3.4.3 การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพื่อผลิต P(3HB) ด้วยวิธีเฟด-แบตช์ โดยการป้อนกากน้ำตาลและยูเรียแบบ exponential feeding

ถ่ายกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.4.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ถ่ายกล้าเชื้อที่เลี้ยงไว้ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10% ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว mineral salt medium (MSM) (อติพล บุญเรืองถาวร, 2543) ปริมาตรเริ่มต้น 4 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7 ± 0.1 โดยให้อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที (บุญฤทธิ์ เมฆศิริพร, 2551) โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัม น้ำตาลต่อกรัมยูเรีย ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรีย เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12 แบบ exponential feeding คำนวณโดยกำหนดให้การเจริญของเซลล์ การสะสม P(3HB) ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนเท่านั้น (limiting substrate) ซึ่งดัดแปลงมาจาก Yamanè และ Shimizu (1984) ดังสมการ และหยุดป้อนอาหารเมื่อปริมาตรในถังหมักเท่ากับ 6 ลิตร (ปวุติ กาญจนชุมพล, 2553) เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ P(3HB) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณยูเรียในน้ำหมัก

$$F(t) = \left[\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{Y_P/Y_P}{X/S} \right] (V_0 \mu X_0 e^{\mu t}) / S_F$$

เมื่อ	$F(t)$	=	อัตราการป้อนอาหารที่ชั่วโมงใดๆ (L/h)
	$Y_{X/S}$	=	ผลผลิตของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป
	$Y_{P/S}$	=	ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป
	$Y_{P/X}$	=	ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหนึ่งหน่วยเซลล์
	V_0	=	ปริมาตรเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (L)
	μ	=	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})
	X_0	=	ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น (g/L)
	S_F	=	ความเข้มข้นของน้ำตาลในสารอาหารป้อนเข้า (g/L)
	t	=	เวลา (h)

จากนั้นเก็บรักษาเซลล์ *B. megaterium* BA-019 เพื่อใช้ในการแยก P(3HB) ด้วย 2 วิธีคือการเก็บรักษาเซลล์แห้ง (dry cells)

ปั่นแยกเซลล์ *B. megaterium* BA-019 ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 9,820 g เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นเติมนมปราศจากไขมัน (skim milk) ความเข้มข้น 10%

น้ำหนักต่อปริมาตร นำไปหมუნในอ่างเมทานอล และทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (lyophilizer) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเก็บรักษาเซลล์เปียก (wet cells)

นำน้ำหมักมาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 9,820 g เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และเก็บไว้รักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.5 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

3.3.5.1 สกัด P(3HB) ด้วยตัวทำละลายชนิดที่มีธาตุฮาโลเจน

ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม และไดคลอโรมีเทน สำหรับการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยซังเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียว แล้วเติมตัวทำละลายอินทรีย์ 2 มิลลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3.5 ชั่วโมง โดยเขย่าทุกๆ 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,380 g นาน 10 นาที แยกชั้นพอลิเมอร์ไปทำแห้ง โดยใช้พอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเป็นชุดควบคุม (Comeau และคณะ, 1988)

3.3.5.2 สกัด P(3HB) ด้วยตัวทำละลายชนิดที่ไม่มีธาตุฮาโลเจน

ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เอทิลเอซิเตต และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ สำหรับการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยซังเซลล์ 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียว แล้วเติมตัวทำละลายอินทรีย์ 2 มิลลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง โดยเขย่าทุกๆ 30 นาที ที่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,380 g นาน 10 นาที แยกชั้นพอลิเมอร์ไปทำแห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) (Riedel และคณะ, 2013)

3.3.6 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการย่อยเซลล์ด้วยสารเคมีประเภทดีเทอร์เจนต์

ใช้สารเคมีประเภทดีเทอร์เจนต์ ได้แก่ LAS-99, SDS, Brij[®] 58, Tween 80 และ Triton-X 100 และสำหรับการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยบ่มเซลล์ 20 มิลลิกรัม กับสารดีเทอร์เจนต์ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 2 มิลลิตร ให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 1,380 g นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นทำแห้งพอลิเมอร์ แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) (Yang และคณะ, 2011)

3.3.7 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่าง

การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่าง คือ กรดซัลฟิวริก กรดไฮโดรคลอริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ โดยบ่มเซลล์ *B. megaterium* BA-019 ปริมาณ 20 มิลลิกรัม กับสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 2 มิลลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 1,380

g นาน 10 นาที จากนั้นทำแห้งพอลิเมอร์ แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) (Anis และคณะ, 2012)

3.3.8 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลร่วมกับการใช้สารเคมี

โดยการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยสารเคมีร่วมกับอัลตราโซนิเคชัน โดยการบ่มเซลล์โดยใช้สารเคมีเป็นตัวกลางส่งผ่านคลื่นเสียงความถี่สูงด้วยเครื่องอัลตราโซนิกที่ความถี่ 40% แอมพลิจูด เป็นเวลา 10 และ 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 1,380 g นาน 10 นาที จากนั้นทำแห้งพอลิเมอร์ แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) (Mohammadi และคณะ, 2012)

3.3.9 การเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการฟรียูทริทเมนต์

โดยการบ่มเซลล์กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปแยกและทำบริสุทธิ์ P(3HB) แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) (Anis และคณะ, 2013)

3.3.10 การเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพอลิชซึ่ง

นำพอลิเมอร์ที่ได้จากการแยกและทำให้บริสุทธิ์มาตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็น ความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นทำแห้งพอลิเมอร์ แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) (Anis และคณะ, 2012)

3.4 วิธีวิเคราะห์

3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำน้ำหนักปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 9,820 g เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ คำนวณปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

นำน้ำหนักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956) โดยเติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำตาลซูโครส และค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) คำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำหมัก (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณยูเรียในน้ำหมัก

โดยวิธีของ Kjeldahl (A.O.A.C., 1975) นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยโพแทสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟต อัตราส่วน 95:5 ลงไป 7 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนสารละลายใส เป็นเวลา 45 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจนและเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 32% น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 50-60 มิลลิลิตร หรือจนสารละลายเป็นสีดำ แล้วกลั่นจับแก๊สแอมโมเนียที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายบอริกความเข้มข้น 4% น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่เติมอินดิเคเตอร์เป็นเมทิลเรดเมทิลีนบลู (methyl red methylene blue) ปริมาณ 2 หยด กลั่นจนสารละลายบอริกมีปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่กลั่นได้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรต คำนวณปริมาณยูเรียในน้ำหมัก (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณของ P(3HB) โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography; GC)

โดยวิธีของ Comeau และคณะ (1988) โดยการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 9,820 g เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ไปอบแห้งประมาณ 10-12 ชั่วโมง แล้วชั่งเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดฝาเกลียว แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3% ปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสนาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,380 g นาน 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของมอนอเมอร์ไปสกัดแยกกรดและกากเซลล์ตามวิธีข้างต้นอีกครั้ง เก็บชั้นคลอโรฟอร์มใส่ในหลอดฝาเกลียวแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิเมอร์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี ภายใต้ภาวะ ดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด CP wax – 52 CB เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร
อุณหภูมิของ injector	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของคอลัมน์	: 130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียส ต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ Detector (FID)	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
Split ratio	: 50 ต่อ 1
แก๊สตัวพา (carrier gas)	: แก๊สไนโตรเจนอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	: 1 ไมโครลิตร

นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ P(3HB) และพื้นที่ใต้กราฟของ P(3HB) ต่อกรดเบนโซอิก (ภาคผนวก ค หมายเลข 2) คำนวณปริมาณ P(3HB) (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.4.5 การเปรียบเทียบความบริสุทธิ์และการกักคืน P(3HB)

โดยคำนวณความบริสุทธิ์และการกักคืน P(3HB) ของกระบวนการต่างๆ ที่ศึกษาได้จากวิธีการตามข้อที่ 3.3.5, 3.3.6, 3.3.7, 3.3.8, 3.3.9 และ 3.3.10 ตามสมการ ดังต่อไปนี้

$$\text{ความบริสุทธิ์ (โดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{น้ำหนักของ P(3HB) ที่แยกได้ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักของวัตถุแห้ง (กรัม)}}$$

$$\text{การกักคืน (โดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{น้ำหนักของ P(3HB) ที่แยกได้ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักของ P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ (กรัม)}}$$

การคำนวณความบริสุทธิ์ (โดยน้ำหนัก) คิดได้จากหาน้ำหนักของ P(3HB) ที่แยกได้ ซึ่งได้จากการนำวัตถุแห้ง (ที่มาจากกรแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีต่างๆ) ไปวิเคราะห์ปริมาณของ P(3HB) โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี เทียบกับน้ำหนักของวัตถุแห้งทั้งหมดที่ได้จากการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีต่างๆ คำนวณหาความบริสุทธิ์ของ P(3HB) ที่แยกได้ (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) หน่วยเป็น % โดยน้ำหนัก

การคำนวณการกักคืน (โดยน้ำหนัก) คิดได้จากหาน้ำหนักของ P(3HB) ที่แยกได้ ซึ่งได้จากการนำวัตถุแห้ง (ที่มาจากกรแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีต่างๆ) ไปวิเคราะห์ปริมาณของ P(3HB) โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี เทียบกับน้ำหนักของ P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี คำนวณหาการกักคืนของ P(3HB) ที่แยกได้ (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) หน่วยเป็น % โดยน้ำหนัก

3.4.6 การพิสูจน์ทราบสมบัติและโครงสร้างของพอลิเมอร์ P(3HB) ที่แยกได้จาก *B. megaterium* BA-019

3.4.6.1 การวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลของ P(3HB) โดยวิธีโปรตอน-นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ($^1\text{H NMR}$) สเปกโตรสโคปี

นำพอลิเมอร์ P(3HB) 5 มิลลิกรัม และละลายด้วยดิคลอโรฟอร์ม (deuteriochloroform; CDCl_3) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย Bruker Advance 400 NMR spectrometer ที่ 400 MHz 32 สแกน 1 นาที และวิเคราะห์หาโครงสร้างโมเลกุลของ P(3HB) (วิเคราะห์ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

3.4.6.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบซึมผ่านเจล (gel permeation chromatography; GPC)

เตรียมพอลิเมอร์ ด้วยความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม P(3HB) ต่อมิลลิลิตรคลอโรฟอร์ม วิเคราะห์ด้วย Shimadzu LC-10A dvp และใช้คลอโรฟอร์มเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ด้วยอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้พอลิสไตรีนเป็นสารมาตรฐาน วิเคราะห์น้ำหนัก

โมเลกุลเฉลี่ยและค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ (วิเคราะห์ที่วิทยาลัย
ปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

3.4.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.4.7.1. สถิติพรรณนา (Descriptive statistics) เช่น การคำนวณค่าเฉลี่ยและส่วน
เบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.7.2. สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวน (Covariance) เช่น ทดสอบความแตกต่าง
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Tukey test
(HSD) โดยใช้โปรแกรม SPSS (ภาคผนวก ฉ)

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ด้วยวิธีเฟด-แบตช์ เพื่อให้ได้เซลล์ของ *B. megaterium* ที่มี P(3HB) ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

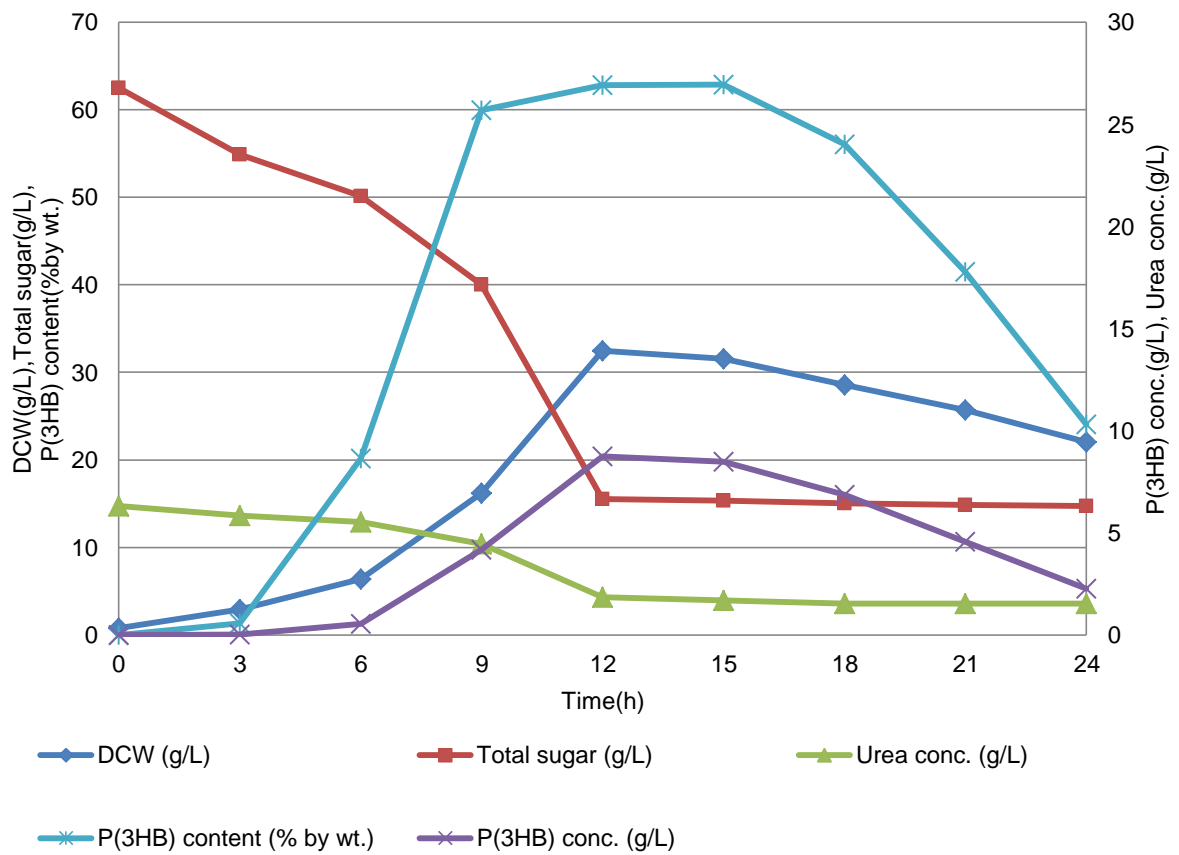
4.1.1 การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 ด้วยวิธีแบตช์ เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญและการผลิต P(3HB)

ปริมาณ P(3HB) ส่งผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการกักเก็บ เช่นเดียวกับผลได้ P(3HB) (P(3HB) yield) โดยส่งผลต่อความบริสุทธิ์และประสิทธิภาพการกักเก็บ P(3HB) ปริมาณการใช้สารที่ใช้สำหรับย่อยเซลล์ (digesting agent) เพื่อแยกแกรนูล P(3HB) โดยเซลล์ที่มีปริมาณ P(3HB) สูงจะทำให้ประสิทธิภาพของกระบวนการกักเก็บสูงกว่าเซลล์ที่มีปริมาณ P(3HB) ต่ำ (Mudliar และคณะ, 2007) จากการศึกษาของอดิพล บุญเรืองถาวร (2543) ซึ่งศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 โดยใช้อาหารสูตร MSM พบว่า การใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตรและการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกทำให้ได้ปริมาณ P(3HB) และความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุด

งานวิจัยในขั้นตอนนี้จึงเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญและการผลิต P(3HB) ตามวิธีในข้อ 3.3.4.2 จากการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 60 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 พบว่าความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 คือ 32.48 และ 8.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และค่าจลนพลศาสตร์ของผลผลิตของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.67 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.19 กรัม P(3HB) ต่อกรัมน้ำตาล ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหนึ่งหน่วยเซลล์ ($Y_{P/X}$) เท่ากับ 0.28 กรัม P(3HB) ต่อกรัมเซลล์และค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.23 ต่อชั่วโมง ซึ่งนำไปใช้ในการคำนวณอัตราการป้อนเข้าด้วยวิธีเฟด-แบตช์ แบบ exponential feeding ซึ่งจะแสดงผลในหัวข้อ 4.1.2

ตารางที่ 4.1 ผลของการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ด้วยวิธีแบตช์ ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/L)	P(3HB) conc. (g/l)	3HB content (% by wt.)
0	0.78±0.01	62.48±0.05	6.31±0.09	0.00±0.00	0.00±0.00
3	2.94±0.07	54.89±0.25	5.85±0.06	0.02±0.00	0.58±0.02
6	6.41±0.18	50.14±0.10	5.54±0.03	0.55±0.01	8.64±0.02
9	16.22±0.10	40.02±0.07	4.46±0.16	4.17±0.03	25.70±0.00
12	32.48±0.03	15.5±0.19	1.85±0.17	8.75±0.01	26.93±0.05
15	31.53±0.09	15.34±0.49	1.69±0.02	8.49±0.02	26.94±0.02
18	28.54±0.10	15.02±0.02	1.54±0.01	6.85±0.03	24.01±0.01
21	25.7±0.01	14.86±0.13	1.54±0.04	4.57±0.03	17.78±0.09
24	22.04±0.04	14.71±0.15	1.54±0.01	2.27±0.12	10.31±0.01



รูปที่ 4.1 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ด้วยวิธีแบตช์ ในอาหาร MSM ที่มี ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกาน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร (n=3)

4.1.2 การเลี้ยงเชื้อ *B. megaterium* BA-019 เพื่อผลิต P(3HB) ด้วยวิธีเฟด-แบตซ์ โดยการป้อนกากน้ำตาลและยูเรียแบบ exponential feeding

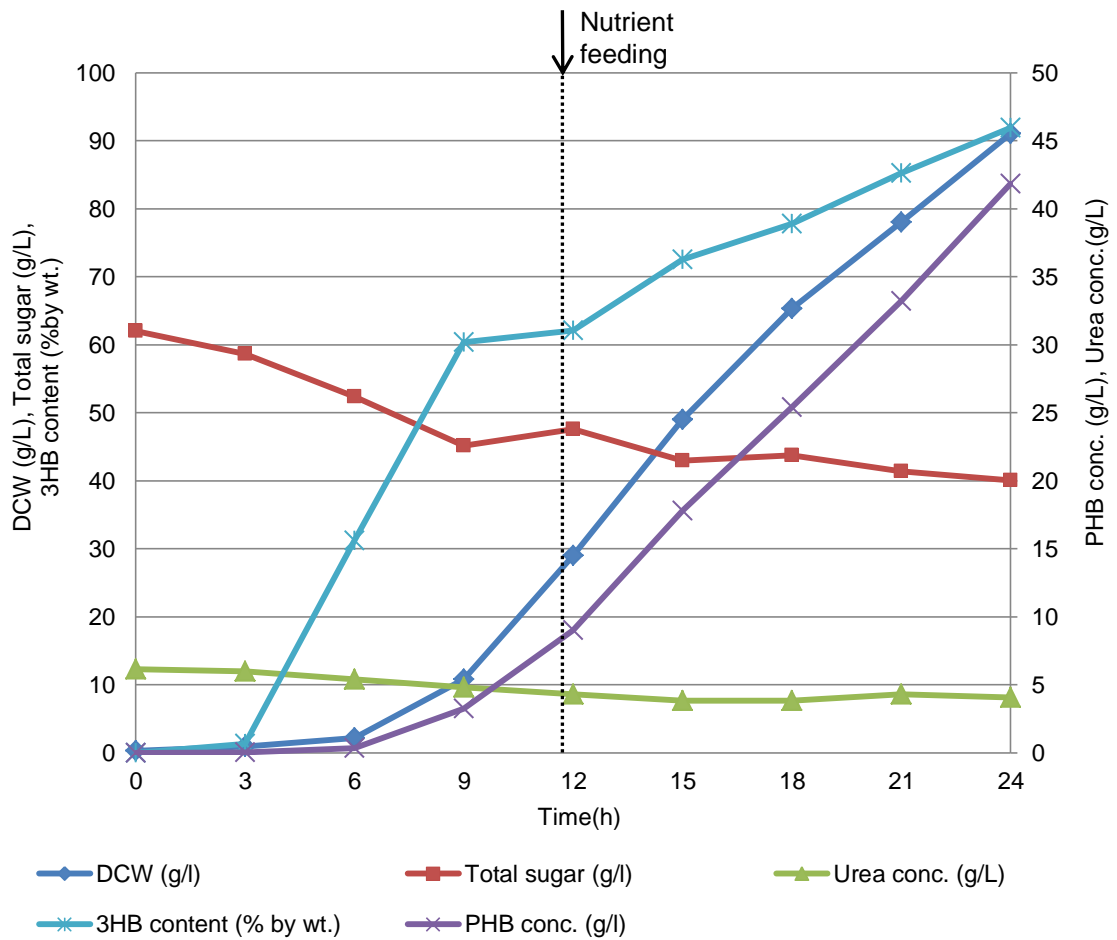
กระบวนการหมักแบบเฟด-แบตซ์ นิยมใช้เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์และทำให้ได้ผลผลิตที่สูง (Sun และคณะ, 2007) การสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ควรเป็นกระบวนการต่อเนื่องที่ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกจุลินทรีย์จะมีการเจริญในแหล่งคาร์บอนโดยการนำสารอาหารนั้นไปสร้างองค์ประกอบของเซลล์ ส่วนในขั้นตอนที่สอง มีการเติมสารอาหารเพื่อใช้ในการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) เซลล์ที่เจริญขึ้นในขั้นตอนแรกจะใช้สารอาหารนั้นเพื่อนำไปสังเคราะห์และสะสม P(3HB) โดยอาจมีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรืออาจไม่เจริญขึ้น แต่ขนาดของเซลล์จะใหญ่ขึ้น เนื่องจากการสังเคราะห์และสะสม P(3HB) ภายในเซลล์ เพราะฉะนั้นการเพิ่มปริมาณของเซลล์ในขั้นตอนแรกจะส่งผลทำให้ได้ปริมาณ P(3HB) เพิ่มขึ้นเช่นกัน (Keshavarz และ Roy, 2010) จึงทดลองผลิต P(3HB) ตามวิธีเดียวกัน ปวดี กาญจนชุมพล (2553) ได้ศึกษาการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 ด้วยวิธีเฟด-แบตซ์ พบว่าการป้อนกากน้ำตาลและยูเรีย แบบ exponential feeding โดยการป้อนอาหารเข้าที่ชั่วโมงที่ 12 เป็นสภาวะที่เหมาะสมทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูง อัตราการเจริญจำเพาะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 ได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ

ในงานวิจัยนี้จึงเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 เพื่อศึกษาการเจริญและการผลิต P(3HB) ตามวิธีในข้อ 3.3.4 และเริ่มต้นป้อนอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 12 โดยใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย ผลการทดลองแสดงผลในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2 พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) ที่ได้สูงสุดเท่ากับ 91.05 กรัมต่อลิตรและ 41.92 กรัมต่อลิตรตามลำดับ คิดเป็น 46.04% โดยน้ำหนัก ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของปวดี กาญจนชุมพล (2553) ที่ได้ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของ P(3HB) ที่ได้สูงสุดเท่ากับ 90.71 กรัมต่อลิตรและ 41.58 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็น 45.84% โดยน้ำหนัก ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ แสดงถึงการเจริญของเซลล์และการผลิต P(3HB) มีความสัมพันธ์กับการป้อนเข้าของอาหารที่เติมอย่างต่อเนื่อง ความเข้มข้นของน้ำตาลและยูเรียที่เหลือในน้ำหมักค่อนข้างคงที่ และเพียงพอต่อการนำไปใช้ในการเจริญและการสะสม P(3HB) จากปริมาณความหนาแน่นและความเข้มข้นของ P(3HB) ที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ แสดงถึงประสิทธิภาพของอัตราการป้อนเข้าอาหารด้วยวิธีเฟด-แบตซ์ แบบ exponential feeding เพื่อให้ได้เซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 ที่มี P(3HB) จากนั้นเก็บรักษาเซลล์ *B. megaterium* BA-019 ทั้งในรูปแบบเซลล์แห้งโดยการทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization และเซลล์เปียกด้วยการเก็บเซลล์ที่ได้จากการปั่นแยกและล้างด้วยน้ำกลั่น เพื่อนำไปใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีต่างๆ

ตารางที่ 4.2 ผลของการเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ด้วยวิธีเฟด-แบตช์ ในอาหาร MSM ที่มี ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กากน้ำตาลและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ ชั่วโมงที่ 12

Time (h)	DCW (g/l)	Total sugar (g/l)	Urea conc. (g/L)	P(3HB) conc. (g/l)	3HB content (% by wt.)
0	0.32±0.02	62.03±0.98	6.15±0.08	0.00±0.00	0.00±0.00
3	0.93±0.03	58.64±1.26	6.00±0.10	0.01±0.01	0.67±0.04
6	2.18±0.15	52.37±0.56	5.40±0.11	0.34±0.05	15.58±0.57
9	10.77±0.69	45.12±0.97	4.80±0.17	3.25±0.11	30.20±0.86
12	29.00±0.04	47.54±2.17	4.28±0.28	9.01±0.24	31.06±1.23
15	49.01±1.06	42.97±1.09	3.83±0.10	17.77±0.76	36.27±0.55
18	65.29±1.15	43.75±2.36	3.83±0.06	25.38±0.57	38.88±0.84
21	77.99±1.04	41.40±0.53	4.28±0.11	33.22±1.57	42.60±0.61
24	91.05±1.32	40.05±1.08	4.08±0.43	41.92±1.04	46.04±1.09





รูปที่ 4.2 การผลิต P(3HB) โดยเลี้ยง *B. megaterium* BA-019 ด้วยวิธีเฟด-แบตช์ ในอาหาร MSM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในกาน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้กาน้ำตาลและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัม น้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ ชั่วโมงที่ 12 (n=3)

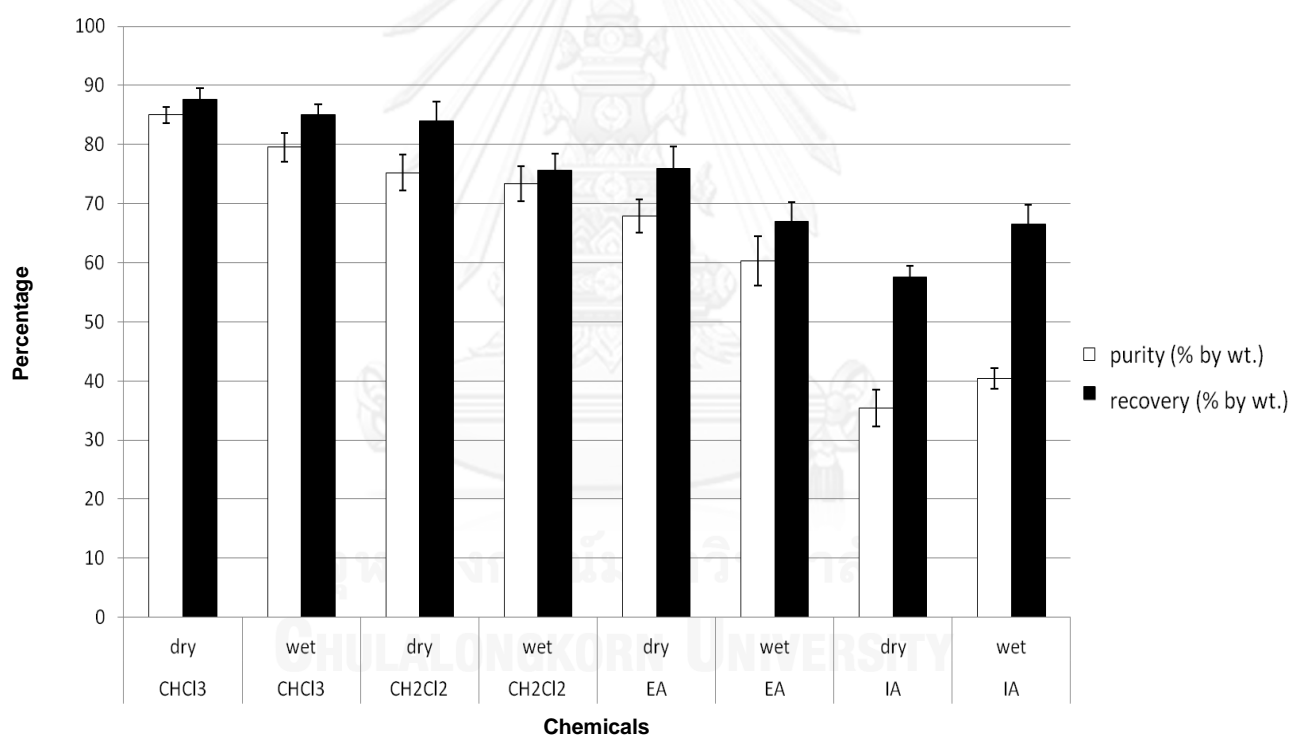
4.2 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

งานวิจัยในขั้นตอนนี้สกัด P(3HB) จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 ตามวิธีในข้อ 3.3.5 โดยการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยตัวทำละลายชนิดที่มีธาตุฮาโลเจน ได้แก่ คลอโรฟอร์ม และไดคลอโรมีเทน และสกัด P(3HB) ด้วยตัวทำละลายชนิดชนิดที่ไม่มีธาตุฮาโลเจน ได้แก่ เอทิลเอซิเตต และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ โดยเติมตัวทำละลายอินทรีย์และนำไปให้ความร้อน ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์จะทำลายเซลล์เมมเบรนและละลาย P(3HB) ทำให้ถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ได้ พบว่าจากผลการทดลองดังกล่าว สกัด P(3HB) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีประสิทธิภาพสูงเมื่อการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยคลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน เอทิลเอซิเตต และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ตามลำดับ โดยเมื่อสกัด P(3HB) ด้วยคลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทนและเอทิลเอซิเตต ประสิทธิภาพการแยกและทำให้บริสุทธิ์เซลล์แห้งสูงกว่าเซลล์เปียก แต่เมื่อใช้ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์สกัด P(3HB) ด้วยเซลล์เปียกมีประสิทธิภาพสูงกว่า

จากการทดลองนี้แสดงผลในตารางที่ 4.3 รูปที่ 4.3 พบว่าเมื่อใช้เซลล์แห้งมีประสิทธิภาพสูงกว่าเซลล์เปียก อาจเนื่องมาจากความสามารถในการละลายในน้ำ (solubility in water) ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการสกัด P(3HB) ในสถานะที่ยังคงมีน้ำอยู่ข้างของเซลล์เปียก ทำให้ประสิทธิภาพการสกัดจะลดลง ทั้งในด้านความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) โดยการมีน้ำปนเปื้อนในระบบการกู้คืน ทำให้สารเคมีที่ใช้ในการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ มีประสิทธิภาพของได้ลดลง (Chen และคณะ, 2001; Riedel และคณะ, 2013) เมื่อใช้เซลล์แห้งสกัด P(3HB) ด้วยคลอโรฟอร์มโดยความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) สูงสุด เท่ากับ 85.02% และ 87.61% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพการกู้คืนสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Valappil และคณะ (2007) เมื่อสกัด P(3HB) ด้วยคลอโรฟอร์มจาก *B. cereus* SPV ได้การกู้คืน P(3HB) เท่ากับ 31% โดยน้ำหนัก เมื่อใช้ไดคลอโรมีเทนสกัด P(3HB) ได้ความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) เท่ากับ 75.19% และ 83.95% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ การสกัด P(3HB) ด้วยเอทิลเอซิเตต ได้ความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) เท่ากับ 67.92% และ 75.95% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และเมื่อสกัด P(3HB) จากเซลล์เปียกด้วยไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ได้ความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) สูงกว่าจากเซลล์แห้งเท่ากับ 40.42% และ 66.58% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เปรียบเทียบผลการกู้คืน P(3HB) ที่ได้กับการกู้คืนด้วยวิธีอื่นๆ ในการศึกษาในขั้นตอนนี้ต่อไป

ตารางที่ 4.3 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้ง และเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019

Chemicals	Cell	Purity (% by wt.)	Recovery (% by wt.)
CHCl ₃	dry	85.02 ± 1.37	87.61 ± 1.93
CHCl ₃	wet	79.51 ± 2.37	85.00 ± 1.82
CH ₂ Cl ₂	dry	75.19 ± 3.04	83.95 ± 3.24
CH ₂ Cl ₂	wet	73.41 ± 2.99	75.57 ± 2.86
EA	dry	67.92 ± 2.79	75.95 ± 3.72
EA	wet	60.29 ± 4.20	67.06 ± 3.16
IA	dry	35.41 ± 3.07	57.53 ± 1.98
IA	wet	40.42 ± 1.73	66.58 ± 3.23



รูปที่ 4.3 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (n=3)

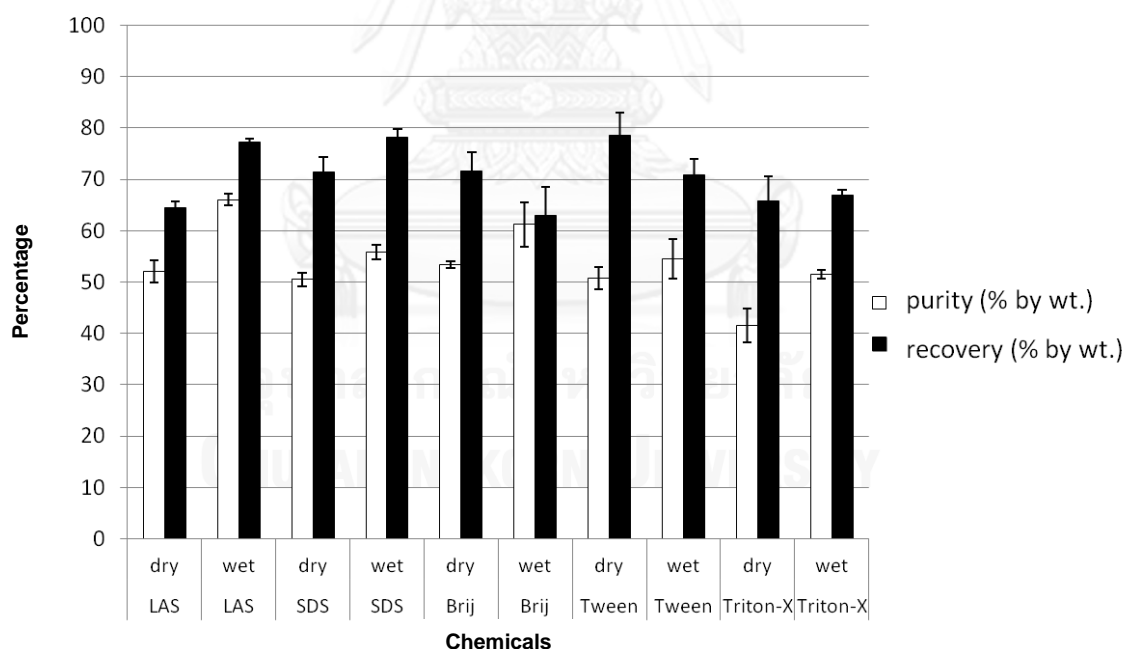
4.3 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการย่อยเซลล์ด้วยสารเคมีประเภทดีเทอร์เจนต์

การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 โดยการย่อยเซลล์ด้วยสารเคมีประเภทดีเทอร์เจนต์ ได้แก่ LAS-99, SDS, Brij[®] 58, Tween 80 และ Triton-X 100 โดยการบ่มเซลล์กับสารดีเทอร์เจนต์ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร และให้ความร้อน ตามวิธีในข้อ 3.3.6 ในงานวิจัยนี้เลือกใช้สารดีเทอร์เจนต์ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร เนื่องจากจากงานวิจัยของ Yang และคณะ (2011) ศึกษาการแยก PHAs ด้วยสารดีเทอร์เจนต์ความเข้มข้น 0.625-5% น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าประสิทธิภาพการกู้คืนสูงสุดเมื่อแยก PHAs ด้วยการใช้สารดีเทอร์เจนต์ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร จากผลการทดลองพบว่า การแยก P(3HB) โดยการย่อยเซลล์ด้วยสารเคมีประเภทดีเทอร์เจนต์มีประสิทธิภาพสูงเมื่อการแยกโดยใช้เซลล์เปียกคือ LAS-99, SDS และ Triton-X 100 โดยมีความบริสุทธิ์และการกู้คืนสูงกว่าเซลล์แห้ง ส่วน Brij[®] 58 และ Tween 80 เมื่อใช้เซลล์เปียกได้ความบริสุทธิ์สูงกว่าเซลล์แห้ง แต่การกู้คืน P(3HB) จากเซลล์เปียกต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์แห้ง

จากการทดลองนี้แสดงผลในตารางที่ 4.4 รูปที่ 4.4 พบว่าเมื่อแยก P(3HB) ด้วยเซลล์เปียก ได้ผลดีกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์แห้ง อาจเนื่องมาจากโดยการแยกด้วยสารดีเทอร์เจนต์อาศัยหลักการตรงข้ามกับการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ สารดีเทอร์เจนต์จะละลายส่วนประกอบของเซลล์ที่ล้อมรอบ P(3HB) ออกไป ทำให้ถ้าใช้เซลล์เปียกแล้วจะมีประสิทธิภาพการแยก P(3HB) ได้ดีกว่าเซลล์แห้ง เนื่องจากสารดีเทอร์เจนต์จะสามารถแทรกเข้าไปละลายส่วนประกอบของเซลล์ได้ง่ายกว่าเซลล์แห้ง โดยสาร LAS-99 ได้ความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) สูงสุดเท่ากับ 66.07% และ 77.20% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ สาร SDS แยก P(3HB) ได้ความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) เท่ากับ 55.80% และ 78.14% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และการแยก P(3HB) ด้วย Triton-X 100 ความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) เท่ากับ 51.54% และ 66.90% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และเมื่อแยก P(3HB) ด้วย Brij[®] 58 โดยแยกจากด้วยเซลล์แห้ง ได้ความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) เท่ากับ 53.34% และ 71.59% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อแยกจากด้วยเซลล์เปียกความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) เท่ากับ 61.21% และ 62.95% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ส่วนเมื่อใช้ Tween 80 แยก P(3HB) จากเซลล์แห้ง ได้ความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) เท่ากับ 50.74% และ 78.64% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อใช้เซลล์เปียกมีความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) เท่ากับ 54.48% และ 70.82% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ประสิทธิภาพที่ดีของการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ด้วย LAS-99 อาจเนื่องมาจากสาร LAS-99 มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไอออนลบ (anionic) โดยประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วจะยึดกับน้ำโดยมีโมเลกุลน้ำล้อมรอบ และส่วนที่ไม่มีขั้วเป็นกลุ่มไฮโดรคาร์บอนจะหันเข้าหากัน ซึ่งมีผลต่อความสามารถของการซึมผ่านเข้าออกผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยแทรกผ่านเยื่อหุ้มลิพิดไบเลเยอร์ (lipid bilayer membrane) เกิดเป็นไมเซลล์ (micelle) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ยอมให้สารผ่านเข้าออกเพิ่มขึ้นและ P(3HB) ถูกปลดปล่อยออกมาได้ (Jacquel และคณะ, 2008) นอกจากนี้ ข้อดีของการเลือกใช้ LAS-99 คือ สามารถถูกย่อยได้ทางชีวภาพ ถูกย่อยสลายได้รวดเร็วในสภาวะที่มีออกซิเจน และที่สำคัญที่สุดคือ เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Kunasundari และ Sudesh, 2011; Larsson และคณะ, 2011) เปรียบเทียบผลการกู้คืน P(3HB) ที่ได้กับการกู้คืนด้วยวิธีอื่นๆ ในการศึกษาในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.4 ผลของการย่อยเซลล์ด้วยสารเคมีประเภทดีเทอร์เจนต์ต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019

Chemicals	Cell	Purity (% by wt.)	Recovery (% by wt.)
LAS-99	Dry	52.03 ± 2.19	64.42 ± 1.31
LAS-99	Wet	66.07 ± 1.18	77.20 ± 0.79
SDS	Dry	50.48 ± 1.25	71.47 ± 2.81
SDS	Wet	55.80 ± 1.42	78.14 ± 1.71
Brij [®] 58	Dry	53.34 ± 0.68	71.59 ± 3.71
Brij [®] 58	Wet	61.21 ± 4.38	62.95 ± 5.61
Tween 80	Dry	50.74 ± 2.10	78.64 ± 4.43
Tween 80	Wet	54.48 ± 3.81	70.82 ± 3.22
Triton-X 100	Dry	41.49 ± 3.27	65.73 ± 4.94
Triton-X 100	Wet	51.54 ± 0.89	66.90 ± 1.00



รูปที่ 4.4 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 โดยการย่อยเซลล์ด้วยสารเคมีประเภทดีเทอร์เจนต์ (n=3)

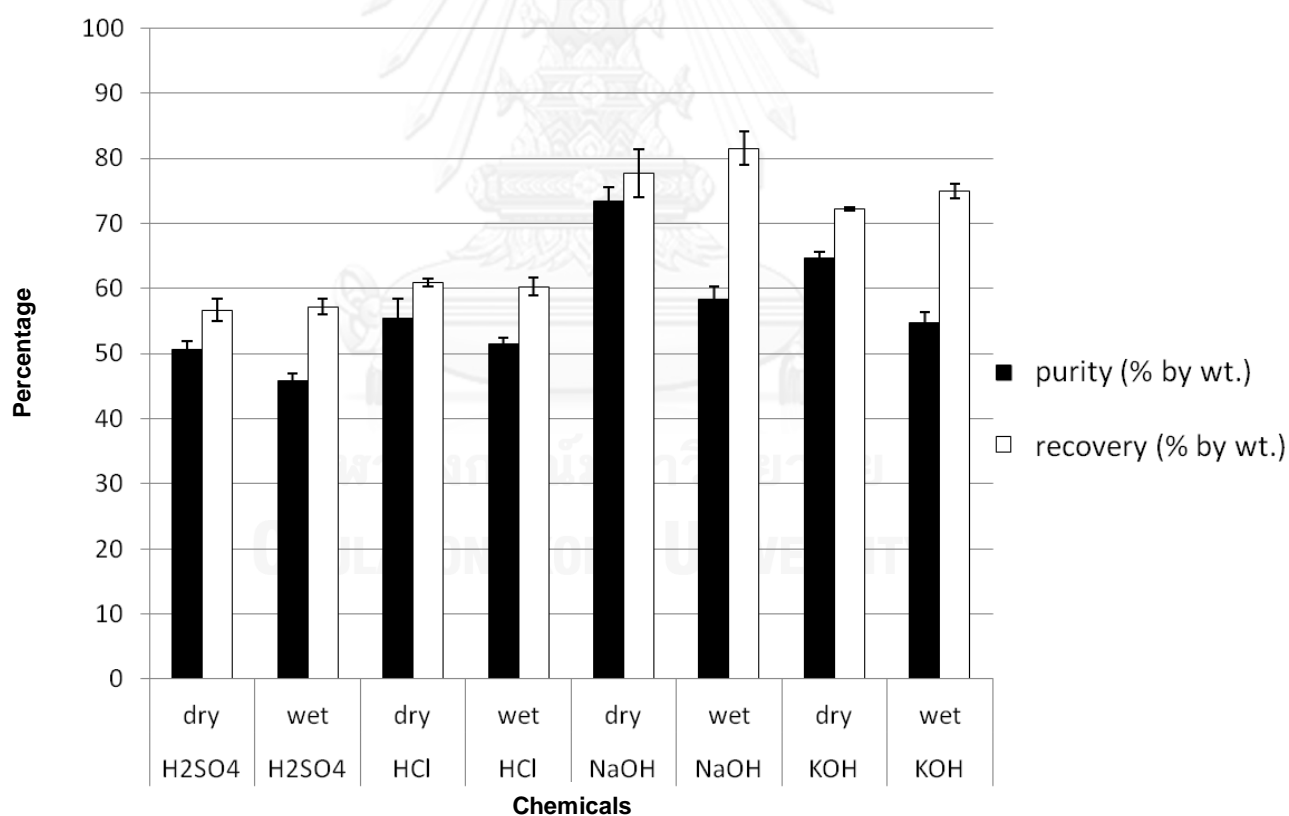
4.4 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่าง

ผลการศึกษาการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 จากการแยก P(3HB) โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่าง ได้แก่ กรดซัลฟิวริก กรดไฮโดรคลอริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ตามวิธีในข้อ 3.3.7 ในงานวิจัยนี้เลือกใช้สารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่าง ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เนื่องจากงานวิจัยของ Anis และคณะ (2012) ศึกษาการแยก P(3HB-co-3HHx) จาก *C. necator* ด้วยการใช้สารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่างและดีเทอร์เจนต์ พบว่าประสิทธิภาพการกักเก็บสูงสุดเมื่อใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พบว่าการแยก P(3HB) โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีจากการใช้เซลล์แห้งมีประสิทธิภาพสูงกว่าเซลล์เปียก อาจเนื่องมาจากแรงดันออสโมซิส (osmotic pressure) ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ที่แตกต่างกัน ทำให้เซลล์แห้งเมื่ออยู่สารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าภายในเซลล์ ไม่สามารถรับแรงดันที่แตกต่างได้ มีผลทำให้เซลล์แตกและปล่อย P(3HB) ได้ดีกว่าเซลล์เปียก

จากการทดลองนี้แสดงผลในตารางที่ 4.5 รูปที่ 4.5 พบว่าการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 ด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นด่างนั้นมีประสิทธิภาพสูงเมื่อแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ตามลำดับวิธีนี้ใช้ได้ผลดีในการเตรียมผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ยีสต์และรา ทั้งในกระบวนการแยกที่มีปริมาณน้อยและปริมาณมาก (Anis และคณะ, 2013) โดยเมื่อแยก P(3HB) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จากเซลล์แห้งได้ความบริสุทธิ์และการกักเก็บ P(3HB) สูง เท่ากับ 73.39% และ 77.72% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และการกักเก็บสูงสุดเมื่อแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จากเซลล์เปียก เท่ากับ 81.49% โดยน้ำหนัก โดยการแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในงานวิจัยนี้ มีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Divyashree และ Shamala (2010) เมื่อแยก PHAs ด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นด่าง คือ แอมโมเนีย จากเซลล์ของ *B. flexus* ได้การกักเก็บ PHAs เท่ากับ 50% โดยน้ำหนัก และเมื่อแยก PHAs จากเซลล์ของ *C. necator* H16 ได้ความบริสุทธิ์และการกักเก็บเท่ากับ 78% และ 45% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (Yang และคณะ, 2011) และเมื่อใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์แยกจากเซลล์แห้งได้ความบริสุทธิ์และการกักเก็บ P(3HB) เท่ากับ 64.71% และ 72.18% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และจากเซลล์เปียกได้ความบริสุทธิ์และการกักเก็บ P(3HB) เท่ากับ 54.66% และ 74.91% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเนื่องจากสมบัติประการหนึ่งของ P(3HB) คือ ไม่ทนต่อกรดและด่าง (Chen และคณะ, 2000; Lee, 1996b; Ojumu และคณะ, 2004) ดังนั้นการแยก P(3HB) ด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่าง อาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) ซึ่งจะแสดงผลในหัวข้อ 4.8 และเปรียบเทียบผลการกักเก็บ P(3HB) ที่ได้กับการกักเก็บด้วยวิธีอื่นๆ ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.5 ผลของการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่างต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019

Chemicals	Cell	Purity (% by wt.)	Recovery (% by wt.)
H ₂ SO ₄	dry	50.54 ± 1.36	56.65 ± 1.72
H ₂ SO ₄	wet	45.84 ± 1.08	57.16 ± 1.21
HCl	dry	55.37 ± 3.11	60.87 ± 0.60
HCl	wet	51.46 ± 0.90	60.23 ± 1.37
NaOH	dry	73.39 ± 2.14	77.72 ± 3.65
NaOH	wet	58.40 ± 1.83	81.49 ± 2.54
KOH	dry	64.71 ± 0.90	72.18 ± 0.26
KOH	wet	54.66 ± 1.62	74.91 ± 1.11



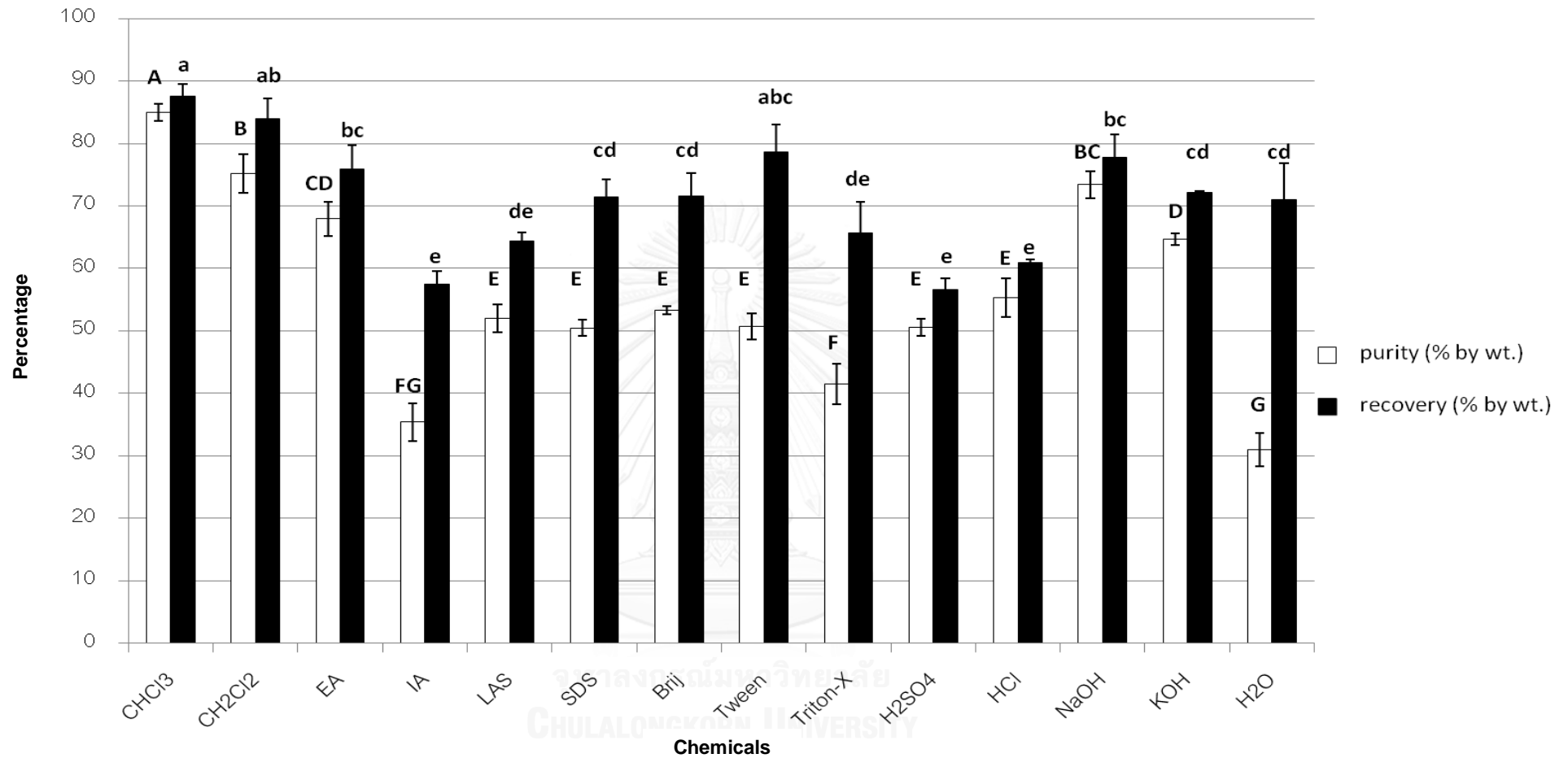
รูปที่ 4.5 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่าง (n=3)

จากผลการศึกษาข้างต้นในหัวข้อ 4.2, 4.3 และ 4.4 สามารถสรุปได้ว่า การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้เซลล์แห้งเปรียบเทียบกับเซลล์เปียก พบว่าเมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ดังตารางที่ 4.6 รูปที่ 4.6 มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อแยก P(3HB) ด้วยคลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทนและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยได้ความบริสุทธิ์เท่ากับ 85.02% 75.19% และ 73.39% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และการกักเก็บเท่ากับ 87.61% 83.95% และ 77.72% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และเมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 ดังตารางที่ 4.7 รูปที่ 4.7 มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อแยก P(3HB) ด้วย คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน และ LAS-99 โดยได้ความบริสุทธิ์เท่ากับ 79.51% 73.41% และ 66.07% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และการกักเก็บ P(3HB) เท่ากับ 85.00% 75.57% และ 77.20% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าแม้คลอโรฟอร์ม และไดคลอโรมีเทนจะมีประสิทธิภาพในการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ได้ดี แต่เมื่อใช้สกัดเซลล์เปียก ในสภาวะที่ยังคงมีน้ำอยู่บ้าง ประสิทธิภาพการสกัดจะลดลง ทั้งในด้านความบริสุทธิ์และการกักเก็บ P(3HB) อาจเนื่องมาจากสมบัติของสารเคมีที่ใช้ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 ได้แก่ จุดเดือด ความหนาแน่น และความสามารถในการละลายน้ำ ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยการมีน้ำปนเปื้อนในระบบการกักเก็บ ทำให้ประสิทธิภาพของสารเคมีลดลง (Chen และคณะ, 2001) แต่การใช้เซลล์เปียกในกระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์นั้น ช่วยลดต้นทุนการผลิตในด้านระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการทำแห้งเซลล์ลงได้ (Riedel และคณะ, 2013) นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงค่าจำกัดการสัมผัสที่ยอมรับได้ (permissible exposure limit) ระดับความเป็นพิษของสารเคมี (FDA class) และราคาของสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วว่าคลอโรฟอร์มและไดคลอโรมีเทนแม้จะมีประสิทธิภาพในการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ และเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้กันกว้างขวาง (Comeau และคณะ, 1988) ทำให้ได้ P(3HB) ที่มีความบริสุทธิ์และการกักเก็บสูง แต่เนื่องจากคลอโรฟอร์มและไดคลอโรมีเทนทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นสารที่มีธาตุฮาโลเจนที่มีคลอรีน (Cl) เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างและมีราคาสูง ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ราคาต้นทุนการผลิต P(3HB) สูง จึงเลือกใช้สารที่มีประสิทธิภาพการแยก P(3HB) ได้สูงรองลงมา อีกทั้งยังมีราคาถูกและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์สำหรับกระบวนการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้ง และ LAS-99 สำหรับการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 แม้ว่าความบริสุทธิ์และการกักเก็บ P(3HB) ที่ได้จะมีค่าต่ำกว่า แต่อาจเพิ่มประสิทธิภาพสูงขึ้นได้โดยการเพิ่มขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลร่วมกับการใช้สารเคมี การเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยการพรีทรีทเม้นต์ และการเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยการพอลิชซึ่ง ซึ่งจะแสดงผลในหัวข้อ 4.5, 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.6 ผลของการ P(3HB) แยกและการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019

Chemicals	Purity (% by wt.)	Recovery (% by wt.)
CHCl ₃	85.02 ± 1.37	87.61 ± 1.93
CH ₂ Cl ₂	75.19 ± 3.04	83.95 ± 3.24
EA	67.92 ± 2.79	75.95 ± 3.72
IA	35.41 ± 3.07	57.53 ± 1.98
LAS-99	52.03 ± 2.19	64.42 ± 1.31
SDS	50.48 ± 1.25	71.47 ± 2.81
Brij [®] 58	53.34 ± 0.68	71.59 ± 3.71
Tween 80	50.74 ± 2.10	78.64 ± 4.43
Triton-X	41.49 ± 3.27	65.73 ± 4.94
H ₂ SO ₄	50.54 ± 1.36	56.65 ± 1.72
HCl	55.37 ± 3.11	60.87 ± 0.60
NaOH	73.39 ± 2.14	77.72 ± 3.65
KOH	64.71 ± 0.90	72.18 ± 0.26
H ₂ O	30.98 ± 2.65	70.99 ± 5.90

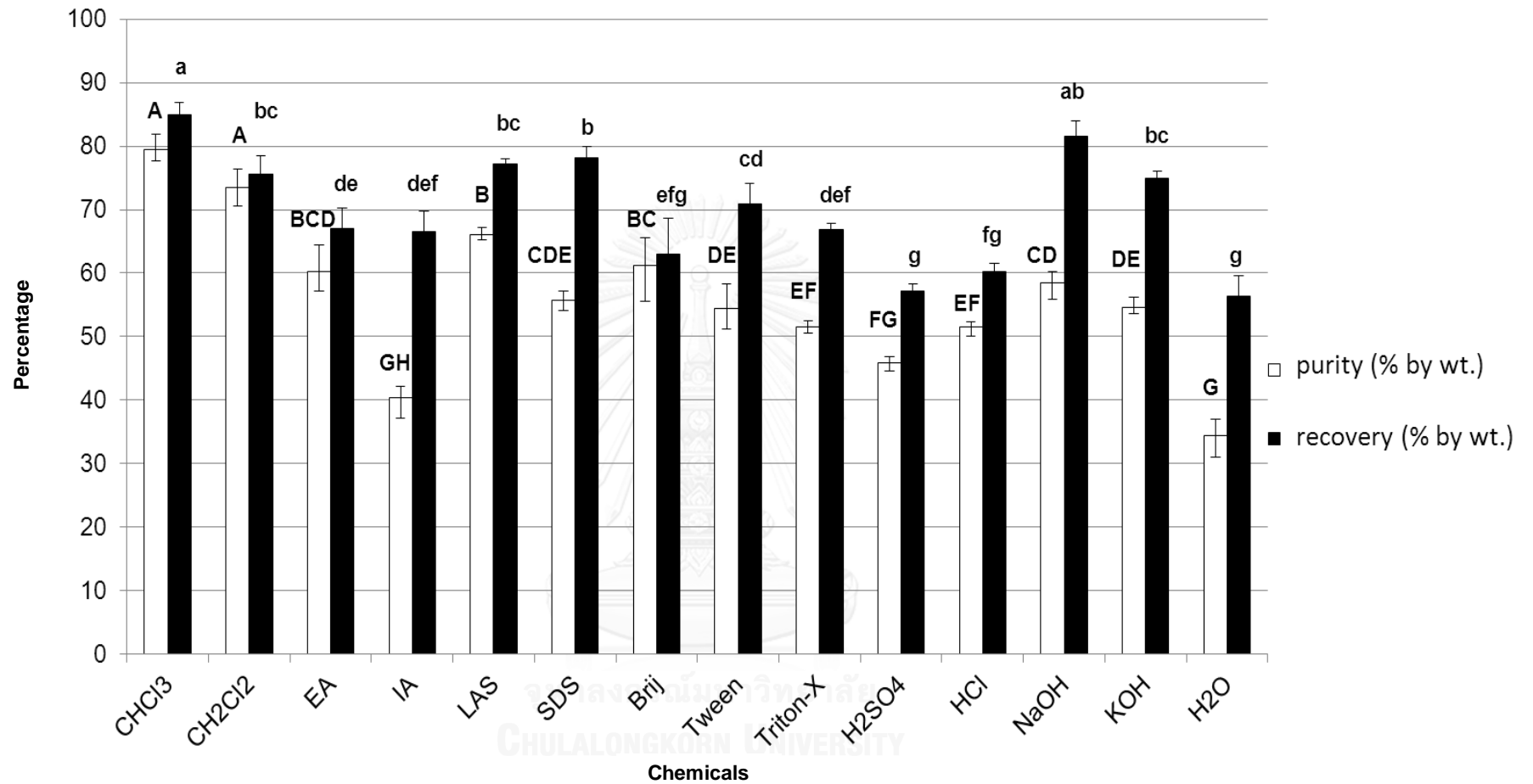


รูปที่ 4.6 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ตัวอักษรใหญ่ (A-G) หมายถึงค่าเฉลี่ยของความบริสุทธิ์ และสัญลักษณ์ตัวอักษรเล็ก (a-e) หมายถึงค่าเฉลี่ยของการกักเก็บ ของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ($n=3$) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Tukey test (HSD) โดยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงค่าเฉลี่ยของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.7 ผลของการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019

Chemicals	Purity (% by wt.)	Recovery (% by wt.)
CHCl ₃	79.51 ± 2.37	85.00 ± 1.82
CH ₂ Cl ₂	73.41 ± 2.99	75.57 ± 2.86
EA	60.29 ± 4.20	67.06 ± 3.16
IA	40.42 ± 1.73	66.58 ± 3.23
LAS-99	66.07 ± 1.18	77.20 ± 0.79
SDS	55.80 ± 1.42	78.14 ± 1.71
Brij [®] 58	61.21 ± 4.38	62.95 ± 5.61
Tween 80	54.48 ± 3.81	70.82 ± 3.22
Triton-X	51.54 ± 0.89	66.90 ± 1.00
H ₂ SO ₄	45.84 ± 1.08	57.16 ± 1.21
HCl	51.46 ± 0.90	60.23 ± 1.37
NaOH	58.40 ± 1.83	81.49 ± 2.54
KOH	54.66 ± 1.62	74.91 ± 1.11
H ₂ O	34.35 ± 2.70	56.34 ± 3.25



รูปที่ 4.7 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ตัวอักษรใหญ่ (A-H) หมายถึงค่าเฉลี่ยของความบริสุทธิ์ และสัญลักษณ์ตัวอักษรเล็ก (a-g) หมายถึงค่าเฉลี่ยของการกักเก็บ ของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ($n = 3$) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Tukey test (HSD) โดยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงค่าเฉลี่ยของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.8 ข้อมูลของสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการกู้คืน

Compound	Boiling point (°C) ^a	Density (g/cm ³) ^a	Solubility in water (ppmw) ^a	PEL (ppm) ^b	FDA class ^c	Price (\$US/L,kg) ^d
Water	100	1.03	N.D.	N.D.	Safe	<0.01 ^e
Chloroform	61	1.48	7.50E+03	50	2	0.54-0.62
Dichloromethane	40	1.33	1.3E+04	25	2	0.48-0.58
Ethyl acetate	77	0.89	7.37E+04	400	3	1.00-1.05
Isoamyl alcohol	131	0.81	2.70E+04	100	3	nd ^d
Linear alkylbenzene sulfonates-99	444	1.06	2.50E+05	N.D.	3	1.04-1.32
Sodium dodecyl sulfate	101	1.11	2.93E+05	N.D.	3	1.12-1.14
Brij [®] 58	40	1.04	5E+04	N.D.	3	2.45-3.65
Tween 80	> 100	1.06	soluble	N.D.	3	0.20-0.36
Triton-X 100	270	1.07	soluble	N.D.	3	2.30-2.60
Sulfuric acid	337	1.84	soluble	1*	3	0.05-0.16
Hydrochloric acid	51	1.18	soluble	N.D.	3	0.10-0.15
Sodium chloride	1,413	2.16	3.59E+05	N.D.	3	0.11-0.18
Sodium hydroxide	1,390	2.13	1.09E+06	2*	3	0.29-0.32
Potassium hydroxide	1,327	2.04	1.21E+06	N.D.	3	0.80-1.0
Ethanol	78	0.8	soluble	1000	3	0.24-0.31

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

หมายเหตุ:

N.D. indicates no data was available.

Source: American Water Works Association (www.awwa.org). Does not include price of wastewater treatment.

^aPhysical property data is from (Yaws, 1999), measured at 25°C and 1 atm.

^bPEL is the permissible exposure limit established by the United States Occupational Safety and Health Administration (OSHA, standard number:1910.1000 TABLE Z-1).; * = mg/m³

^cThe FDA rates chemicals for use in manufacturing of biomedical products, where 1 is most toxic and 3 is least toxic, Q3C February 12

(<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm128290.htm>).

^dPrice data from www.icis.com (2006–2008 prices); na=data not available.

^eAverage US pricing per gallon (US\$1.50 per 1,000 gallons).

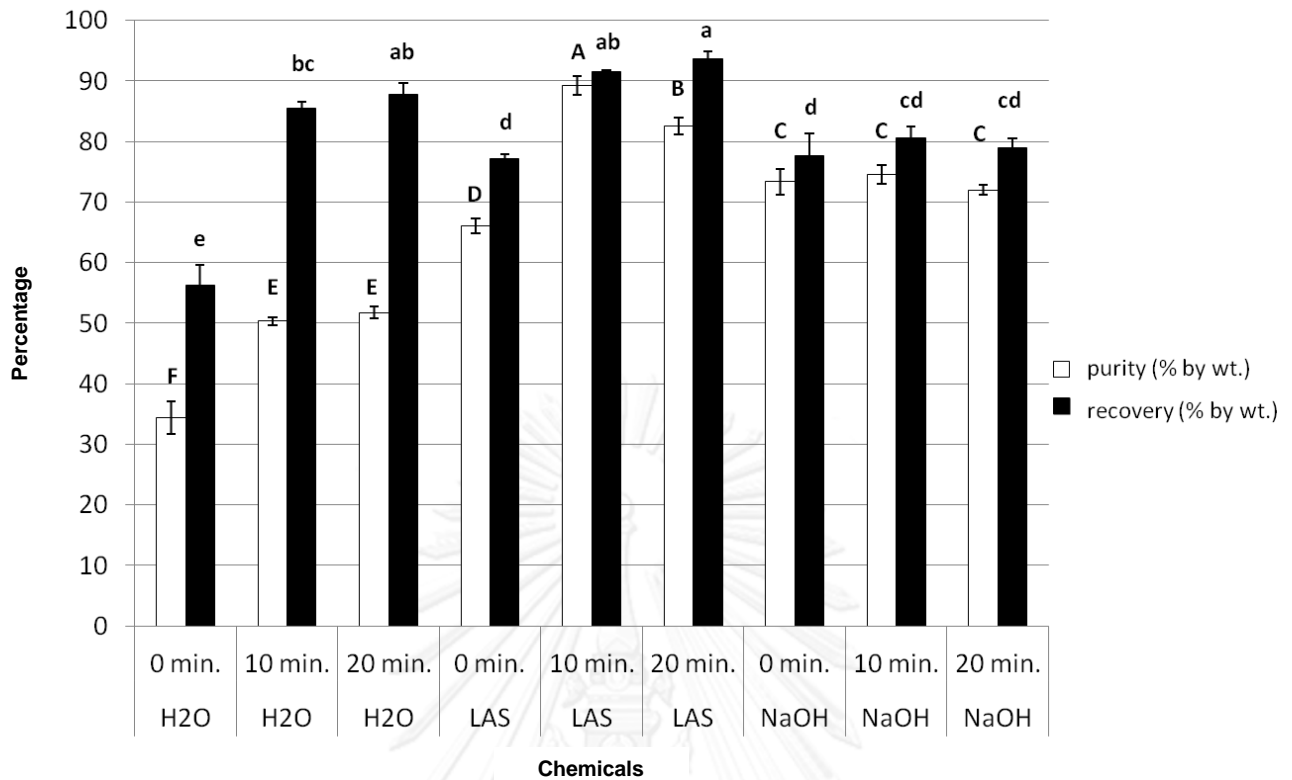
4.5 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลร่วมกับการใช้สารเคมี

งานวิจัยในขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกล โดยการใช้การส่งผ่านคลื่นเสียงความถี่สูงที่มีความถี่ 40% แอมพลิจูด ด้วยเครื่องอัลตราโซนิค ระยะเวลา 10 และ 20 นาที ตามวิธีในข้อ 3.3.8 จากการศึกษาของ Mohammadi และคณะ (2012) โดยการใช้ น้ำ และเอทานอลเป็นตัวกลางในการส่งผ่านคลื่นเสียงความถี่สูงด้วยเครื่องอัลตราโซนิค สามารถแยก PHAs และทำให้บริสุทธิ์ได้ ในงานวิจัยนี้จึงเปรียบเทียบกับตัวกลางที่นิยมใช้ในการส่งผ่านคลื่นเสียงความถี่สูงคือ น้ำ และจากผลการทดลองข้างต้นเลือกใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการแยก P(3HB) จากเซลล์แห้ง และ LAS-99 สำหรับแยก P(3HB) จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 จากผลการทดลองพบว่า การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกล โดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและทำให้บริสุทธิ์ P(3HB) เพิ่มสูงขึ้นในตัวกลางที่เป็นน้ำ และ LAS-99 ที่ระยะเวลา 10-20 นาที และไม่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) ในตัวกลางที่เป็นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

จากผลการทดลองนี้ แสดงผลในตารางที่ 4.9 รูปที่ 4.8 พบว่าการแยก P(3HB) จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 การทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกล โดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 10-20 นาที มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) ได้เมื่อใช้น้ำ และ LAS-99 เป็นตัวกลางในการส่งผ่าน โดยเมื่อใช้น้ำเป็นตัวกลางความบริสุทธิ์เพิ่มจาก 34% เป็น 50-52% โดยน้ำหนัก และการกักเก็บเพิ่มจาก 56% เป็น 86-88% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และเมื่อใช้ LAS-99 เป็นตัวกลางความบริสุทธิ์เพิ่มจาก 66% เป็น 83-89% โดยน้ำหนัก และการกักเก็บเพิ่มจาก 77% เป็น 92-94% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยสาร LAS-99 มีประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยเครื่องอัลตราโซนิคได้ดีกว่าน้ำ อย่างไรก็ตามการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวกลางไม่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องอัลตราโซนิค โดยความบริสุทธิ์และการกักเก็บที่ได้อยู่ในช่วง 72-75% โดยน้ำหนัก และ 78-81% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากสาร LAS-99 ที่ใช้เป็นตัวกลาง มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวทำให้สามารถแทรกเข้าไปละลายส่วนประกอบของเซลล์ได้ดีกว่าการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่มีน้ำเป็นตัวกลาง และการใช้เซลล์เปียกซึ่งมีน้ำล้อมรอบเซลล์น้ำที่อยู่รอบๆ เซลล์อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการส่งผ่านคลื่นเสียงความถี่สูงได้ดีกว่าเซลล์แห้ง ดังนั้นการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 จะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เมื่อแยกด้วยสารดีเทอร์เจนต์ที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว คือ LAS-99 ที่ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกล โดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่มีความถี่ 40% แอมพลิจูด เป็นเวลา 10-20 นาที ซึ่งทำให้ได้ความบริสุทธิ์และการกักเก็บเพิ่มขึ้น 23% และ 17% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

ตารางที่ 4.9 ผลของการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลร่วมกับการใช้สารเคมีต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019

Chemicals	Time (min.)	Purity (% by wt.)	Recovery (% by wt.)
H ₂ O	0	34.35 ± 2.70	56.34 ± 3.25
H ₂ O	10	50.35 ± 0.68	85.50 ± 1.10
H ₂ O	20	51.74 ± 0.96	87.82 ± 1.84
LAS-99	0	66.07 ± 1.18	77.20 ± 0.79
LAS-99	10	89.29 ± 1.56	91.50 ± 0.35
LAS-99	20	82.50 ± 1.38	93.64 ± 1.26
NaOH	0	73.39 ± 2.14	77.72 ± 3.65
NaOH	10	74.60 ± 1.59	80.60 ± 1.86
NaOH	20	72.01 ± 0.76	78.98 ± 1.61



รูปที่ 4.8 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลร่วมกับการใช้สารเคมี

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ตัวอักษรใหญ่ (A-F) หมายถึงค่าเฉลี่ยของความบริสุทธิ์ และสัญลักษณ์ตัวอักษรเล็ก (a-e) หมายถึงค่าเฉลี่ยของการกักเก็บ ของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ($n=3$) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Tukey test (HSD) โดยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงค่าเฉลี่ยของตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

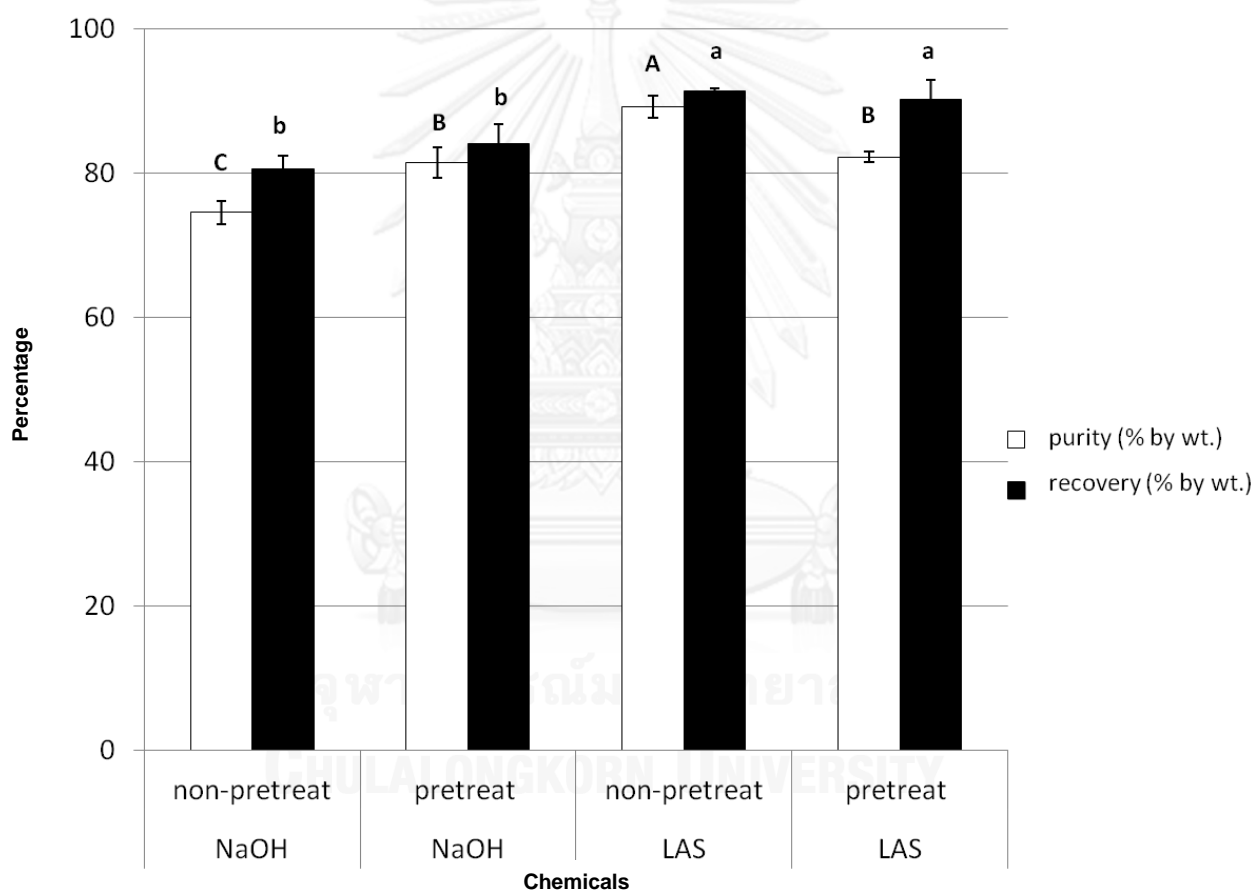
4.6 การเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพรีทรีทเมนต์

การใช้ออสโมติกช็อก (osmotic shock) เป็นวิธีทางเคมีที่ง่ายที่สุด ในการเตรียมผนังเซลล์ โดยทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลอย่างรวดเร็ว โดยการศึกษาการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในขั้นตอนการพรีทรีทเมนต์เซลล์ ทำให้เกิดความไม่สมดุลของความดันภายในและภายนอกเซลล์ โดยเซลล์จะสูญเสียน้ำในการปรับสมดุลเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียสามารถถูกทำลายได้ง่ายขึ้น เมื่อถูกบ่มต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Anis และคณะ, 2013) โดยผนังเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีเปปทิโดไกลแคนที่หนา จึงสามารถช่วยรักษาแรงดันออสโมซิสภายในเซลล์ให้คงที่ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ถ้าการเพิ่มขึ้นขั้นตอนการพรีทรีทเมนต์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์แล้วทำให้มีประสิทธิภาพการแยกและทำให้บริสุทธิ์สูงขึ้น จากการศึกษาโดยการบ่มเซลล์กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปแยกและทำบริสุทธิ์ P(3HB) ตามวิธีในข้อ 3.3.9 ในงานวิจัยนี้เลือกใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เนื่องจากงานวิจัยของ Anis และคณะ (2013) ศึกษาการแยก P(3HB-co-3HHx) จาก *C. necator* พบว่าการพรีทรีทเมนต์เซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกู้คืนได้ โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการแยก P(3HB) จากเซลล์แห้ง และ LAS-99 สำหรับเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 จากผลการทดลองพบว่า การพรีทรีทเมนต์เซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ไม่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกและทำให้บริสุทธิ์จากเซลล์เปียก แต่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกและทำให้บริสุทธิ์เมื่อใช้เซลล์แห้ง

จากผลการทดลองนี้แสดงผลในตารางที่ 4.10 รูปที่ 4.9 พบว่า เมื่อใช้เซลล์แห้งโดยการเพิ่มขึ้นขั้นตอนการพรีทรีทเมนต์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปแยก P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและทำให้บริสุทธิ์ได้ โดยความบริสุทธิ์และการกู้คืนเพิ่มขึ้นจาก 74.60% เป็น 81.49% โดยน้ำหนัก และ 80.60% เป็น 84.20% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ในขณะที่การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ด้วย LAS-99 จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 ไม่จำเป็นต้องอาศัยขั้นตอนการพรีทรีทเมนต์เซลล์ก่อน โดยการพรีทรีทเมนต์เซลล์ก่อนนั้นไม่ช่วยให้ประสิทธิภาพการแยกและทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น และอาจส่งผลต่อความบริสุทธิ์และการกู้คืนโดยความบริสุทธิ์และการกู้คืนลดลงจาก 89.29% เป็น 82.31% โดยน้ำหนัก และ 91.50% เป็น 90.32% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ดังนั้นการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 จะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มขึ้นขั้นตอนการพรีทรีทเมนต์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปแยก P(3HB) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ซึ่งทำให้ได้ความบริสุทธิ์และการกู้คืนเพิ่มขึ้น 6.89% และ 3.60% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

ตารางที่ 4.10 ผลของการพรีทรีทเมนต์ต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019

Chemicals	Condition	Purity (% by wt.)	Recovery (% by wt.)
NaOH	non-pretreat	74.60 ± 1.59	80.60 ± 1.86
NaOH	pretreat	81.49 ± 2.13	84.20 ± 2.59
LAS-99	non-pretreat	89.29 ± 1.56	91.50 ± 0.35
LAS-99	pretreat	82.31 ± 0.73	90.32 ± 2.62



รูปที่ 4.9 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 โดยการเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพรีทรีทเมนต์
 หมายเหตุ: สัญลักษณ์ตัวอักษรใหญ่ (A-C) หมายถึงค่าเฉลี่ยของความบริสุทธิ์ และสัญลักษณ์ตัวอักษรเล็ก (a-b) หมายถึงค่าเฉลี่ยของการกู้คืน ของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ($n=3$) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Tukey test (HSD) โดยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงค่าเฉลี่ยของตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

4.7 การเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพอลิซิง

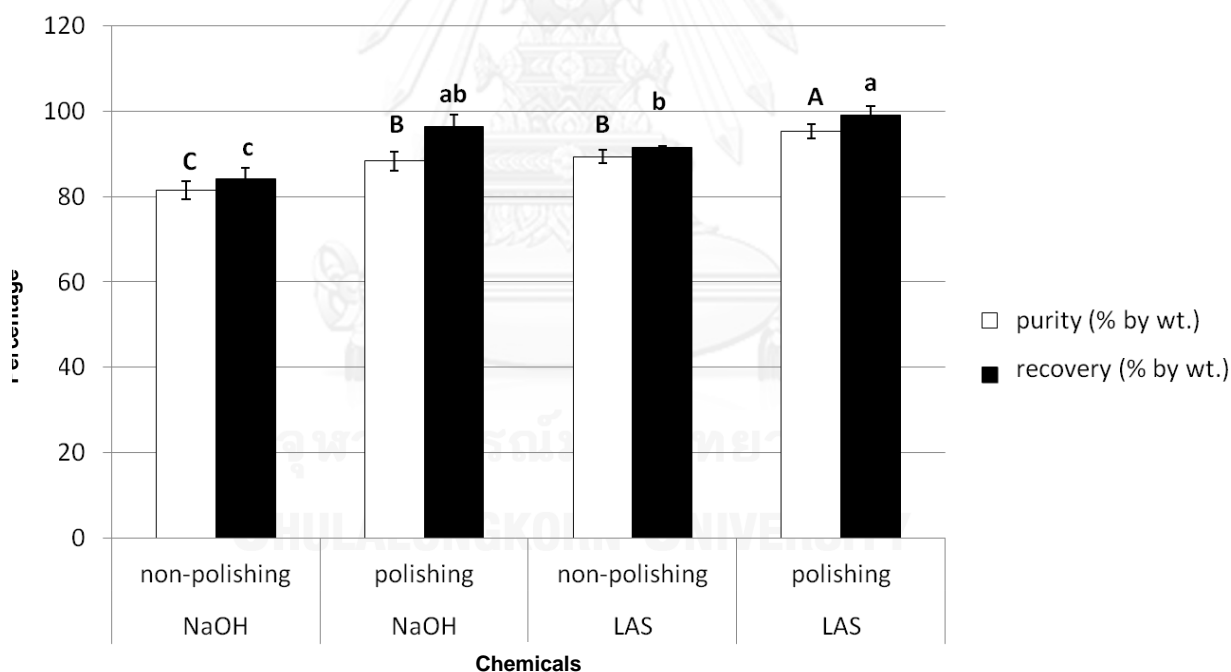
จากการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้พอลิเมอร์ที่ได้จากเซลล์แห้งที่ผ่านขั้นตอนการพรีทริทเมนต์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปแยก P(3HB) จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง และพอลิเมอร์ที่ได้จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วยสารดีเทอร์เจนต์ที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว คือ LAS-99 ที่ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกล โดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่ความถี่ 40% แอมพลิจูด เป็นเวลา 10-20 นาที โดยนำพอลิเมอร์ที่ได้จากการแยกมาผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร ตามวิธีในข้อ 3.3.10 จากนั้นทำแห้งพอลิเมอร์ แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) ในงานวิจัยนี้เลือกใช้การพอลิซิงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร เนื่องจากงานวิจัยของ Anis และคณะ (2012) ศึกษาการแยก P(3HB-co-3HHx) จาก *C. necator* พบว่าการพอลิซิงด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร ทำให้พอลิเมอร์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น พบว่าเอทานอลความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร ช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์และการกักเก็บของ P(3HB) โดย P(3HB) ไม่สามารถละลายได้ในเอทานอลและจะตกตะกอนอยู่ด้านล่าง ในขณะที่สิ่งเจือปนและส่วนประกอบอื่นๆ ในเซลล์ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในพอลิเมอร์ จะถูกละลายอยู่ในชั้นเอทานอล ทำให้พอลิเมอร์ที่ผ่านขั้นตอนการพอลิซิงแล้วมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น

การทดลองนี้แสดงผลในตารางที่ 4.11 รูปที่ 4.10 พบว่าการเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร ในขั้นตอนการพอลิซิง P(3HB) ที่แยกได้จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทริทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจาก 81.49% เป็น 88.30% โดยน้ำหนัก และการกักเก็บเพิ่มขึ้นจาก 84.20% เป็น 96.31% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ P(3HB) ที่ได้จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง ได้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจาก 89.29% เป็น 95.27% โดยน้ำหนัก และการกักเก็บเพิ่มขึ้นจาก 91.50% เป็น 99.01% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ดังนั้นการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 จะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เมื่อนำ P(3HB) ที่ได้จากการแยกมาผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร ซึ่งทำให้ได้ความบริสุทธิ์และการกักเก็บเพิ่มขึ้น 6.81-12.11% และ 5.98-7.51% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ซึ่งสามารถเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ได้ดังตารางที่ 4.12 โดย P(3HB) ที่แยกได้จากงานวิจัยนี้เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kapritchkoff และคณะ (2006) และ Fiorese และคณะ (2009) พบว่า P(3HB) ที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพของความบริสุทธิ์และการกักเก็บสูงกว่า P(3HB) ที่แยกได้จาก *C. necator* สายพันธุ์ DSM 545 โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ bromelain และ pancreatin และการสกัดด้วย 1,2-propylene carbonate ตามลำดับ โดยขั้นตอนพอลิซิงด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็น ความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร ดังแสดงในรูปที่ 4.11 ทำให้ลักษณะการทางกายภาพของพอลิเมอร์ P(3HB) ที่ผ่านขั้นตอนพอลิซิง รูปที่ 4.12(b) และ 4.12(d) มีสีขาวและมีลักษณะเป็นผง

ละเอียดมากขึ้น เมื่อเทียบกับพอลิเมอร์ P(3HB) ที่ไม่ผ่านขั้นตอนพอลิชซึ่ง รูปที่ 4.12(a) และ 4.12(c) จึงนำพอลิเมอร์ที่ผ่านขั้นตอนพอลิชซึ่งไปศึกษาการพิสูจน์ทราบสมบัติและโครงสร้างของพอลิเมอร์ P(3HB) ที่แยกได้จาก *B. megaterium* BA-019 โดยเปรียบเทียบกับ commercial P(3HB) และ P(3HB) ที่แยกได้จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ด้วยคลอโรฟอร์ม

ตารางที่ 4.11 ผลของการพอลิชซึ่งต่อการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งและเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019

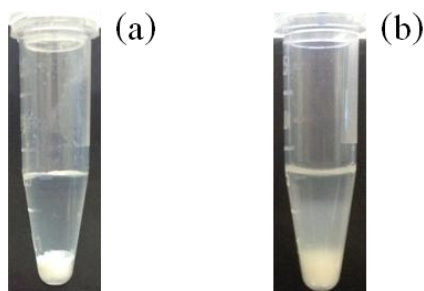
Chemicals	Condition	Purity (% by wt.)	Recovery (% by wt.)
NaOH	non-polishing	81.49 ± 2.13	84.20 ± 2.59
NaOH	polishing	88.30 ± 2.17	96.31 ± 2.78
LAS-99	non-polishing	89.29 ± 1.56	91.50 ± 0.35
LAS-99	polishing	95.27 ± 1.60	99.01 ± 2.17



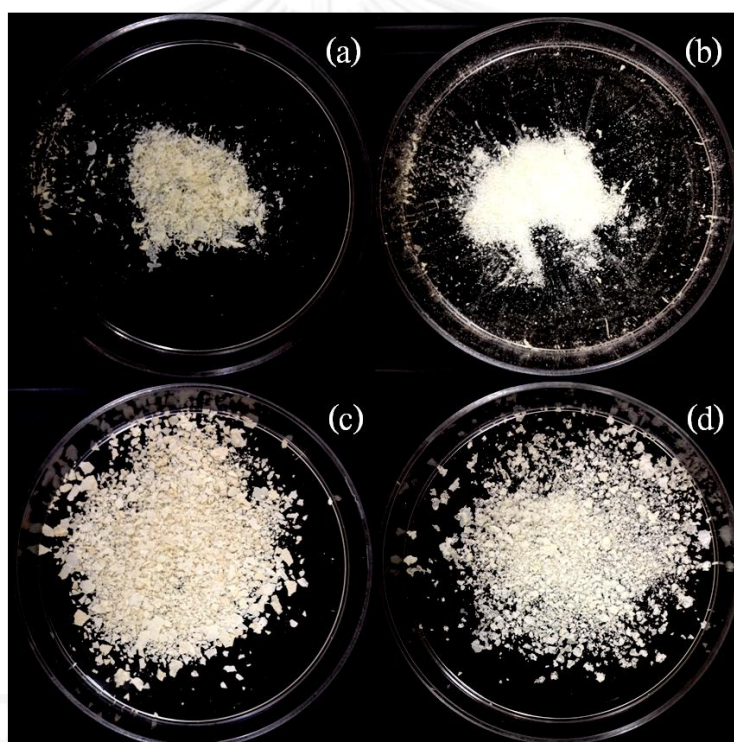
รูปที่ 4.10 การแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 โดยการเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพอลิชซึ่ง
 หมายเหตุ: สัญลักษณ์ตัวอักษรใหญ่ (A-C) หมายถึงค่าเฉลี่ยของความบริสุทธิ์ และสัญลักษณ์ตัวอักษรเล็ก (a-c) หมายถึงค่าเฉลี่ยของการกักเก็บ ของตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ($n = 3$) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Tukey test (HSD) โดยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงค่าเฉลี่ยของตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.12 เปรียบเทียบความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) โดยใช้จุลินทรีย์และเทคนิคการแยกและทำให้บริสุทธิ์ที่แตกต่างกัน

Bacteria strain	Method	Purity (% by wt.)	Recovery (% by wt.)	Reference
<i>B. megaterium</i> BA-019	pretreatment + digestion by sodium hydroxide + polishing	88.3	96.3	งานวิจัยนี้
<i>B. megaterium</i> BA-019	digestion by surfactant (LAS-99) and mechanical treatment by ultrasonication + polishing	95.3	99.0	งานวิจัยนี้
<i>C. necator</i> DSM 545	pretreatment + enzymatic digestion by bromelain + enzymatic digestion by pancreatin	88.8	90.0	Kapritchkoff และคณะ (2006)
<i>C. necator</i> DSM 545	pretreatment + solvent extraction by 1,2-propylene carbonate + polishing	84.0	95.0	Fiorese และคณะ (2009)



รูปที่ 4.11 ลักษณะของ P(3HB) ในขั้นตอนพอลิซิงซึ่งโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็น ความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร ของ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (a) และ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง (b)



รูปที่ 4.12 ลักษณะของ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ก่อนการพอลิซิง (a), P(3HB) ที่แยกจากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หลังการพอลิซิง (b), P(3HB) ที่แยกจากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงก่อนการพอลิซิง (c), และ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงหลังการพอลิซิง (d)

4.8 การพิสูจน์ทราบสมบัติและโครงสร้างของพอลิเมอร์ P(3HB) ที่แยกได้จาก *B. megaterium* BA-019

จากการทดลองวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลของ P(3HB) โดยวิธี ^1H NMR พบว่าโครงสร้างโมเลกุลของ P(3HB) ที่แยกได้จาก *B. megaterium* BA-019 เทียบกับ commercial P(3HB) เมื่อศึกษาด้วย ^1H NMR มีองค์ประกอบของโครงสร้างหลักคือ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต โดยประกอบด้วยโปรตอนที่ตำแหน่งหมู่เมทิล ($-\text{CH}_3$) จะเกิด double resonance ที่ตำแหน่ง 1.27 ppm โปรตอนที่ตำแหน่งหมู่เมทิลีน ($-\text{CH}_2$) เกิด multiplet resonance ที่ตำแหน่ง 2.52 ppm และโปรตอนที่ตำแหน่งหมู่เมทไนด์ ($-\text{CH}$) เกิด multiplet resonance ที่ตำแหน่ง 5.26 ppm ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Doi และคณะ (1986) และ Reddy และคณะ (2008) แสดงผลในตารางที่ 4.13 จากผลการทดลองแสดงผลใน รูปที่ 4.13 พบว่าโปรตอนที่ตำแหน่งหมู่เมทิล ($-\text{CH}_3$) (พีคหมายเลข 3) มีค่าเคมีคัลชิฟท์ (chemical shift; δ) ต่ำกว่าโปรตอนที่ตำแหน่งหมู่เมทิลีน ($-\text{CH}_2$) (พีคหมายเลข 2) และโปรตอนที่ตำแหน่งหมู่เมทไนด์ ($-\text{CH}$) (พีคหมายเลข 1) ตามลำดับ (Sindhu และคณะ, 2011) และมีอัตราส่วนของโปรตอนที่ตำแหน่งหมู่เมทไนด์ ($-\text{CH}$):โปรตอนที่ตำแหน่งหมู่เมทิลีน ($-\text{CH}_2$):โปรตอนที่ตำแหน่งหมู่เมทิล ($-\text{CH}_3$) อยู่ที่ 1:2:3 สอดคล้องตามโครงสร้างของ P(3HB)

ผลการศึกษาวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลของ P(3HB) โดยพบว่าสเปกตรัม ^1H NMR ที่ 400 MHz ของ P(3HB) แสดงผลในรูปที่ 4.14 พบว่า commercial P(3HB) (รูป 4.14(a)) และ P(3HB) ที่แยกได้จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ด้วยคลอโรฟอร์ม (รูป 4.14(b)) เป็น P(3HB) ที่มีความบริสุทธิ์สูงทำให้ไม่พบพีคของสิ่งเจือปน เมื่อเทียบกับ (รูป 4.14(c-f)) และ P(3HB) ที่ผ่านขั้นตอนการพอลิซิงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร แล้ว มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยสังเกตได้จาก P(3HB) ที่แยกได้จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทริทเม้นต์และแยกด้วยสารละลายไซโตเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ไม่ผ่านขั้นตอนพอลิซิง (รูป 4.14(c)) จะพบพีคของสิ่งเจือปน เมื่อเทียบกับ P(3HB) ที่ผ่านขั้นตอนพอลิซิงแล้ว (รูป 4.14 (d)) จะไม่พบพีคของสิ่งเจือปนหรือมีปริมาณลดลง เช่นเดียวกับ P(3HB) ที่แยกได้จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารดีเทอร์เจนต์ที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวคือ LAS-99 ที่ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีทางกายภาพ ที่ไม่ผ่านขั้นตอนพอลิซิง (รูป 4.14 (e)) เมื่อเทียบกับ P(3HB) ที่ผ่านขั้นตอนพอลิซิงแล้ว (รูป 4.14 (f)) ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ขั้นตอนการพอลิซิงเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญในกระบวนการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ P(3HB) ได้ อย่างไรก็ตาม P(3HB) ที่แยกได้จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 มักพบพีคที่ตำแหน่ง 0.85, 1.42 และ 2.16 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งการเกิด resonance ของบิวทิเรต ซึ่งสอดคล้องกับ Doi และคณะ (1989) ที่ใช้ ^1H NMR ในการศึกษาเมตาบอลิซึมของสารแขวนลอย *A. eutrophus* ระบุว่าเมทาบอลิซึมที่ถูกสร้างและปล่อยออกนอกเซลล์คือ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นหลัก และพบบิวทิเรต แล็กเตต และเอทานอลซึ่งเป็นเมตาบอลิซึมรองได้อีกด้วย

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบซึมผ่านเจล (gel permeation chromatography; GPC) ของ P(3HB) ที่แยกได้จาก *B. megaterium* BA-019 เทียบกับ commercial P(3HB) เมื่อศึกษาด้วย GPC ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.14 รูปที่ 4.15 และ

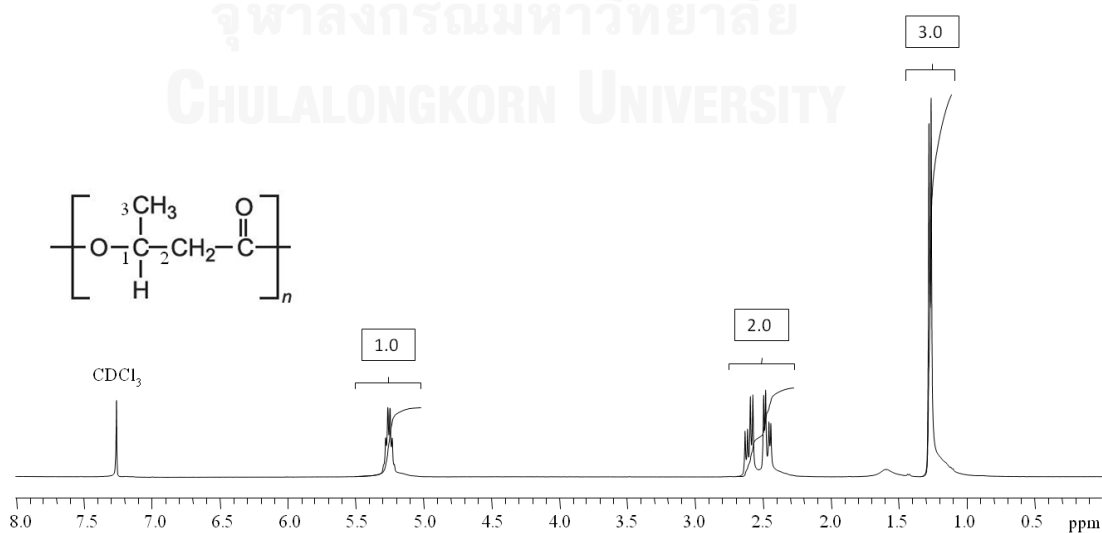
4.16 พบว่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (M_w) และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (M_n) ของ commercial P(3HB) (รูปที่ 4.15(a)) เท่ากับ 11.5×10^5 ดาลตัน และ 5.9×10^5 ดาลตัน ตามลำดับ คิดเป็นค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล (Polydispersity index, PDI) เท่ากับ 1.93 เมื่อเทียบกับ P(3HB) ที่แยกได้จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ด้วยคลอโรฟอร์ม (รูปที่ 4.15(b)) ซึ่งมีค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนเท่ากับ 3.1×10^5 ดาลตัน และ 1.0×10^5 ดาลตัน ตามลำดับ และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3.00 ส่วน P(3HB) ที่แยกได้จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และผ่านขั้นตอนพอลิซิง (รูปที่ 4.16(a)) มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนเท่ากับ เท่ากับ 2.6×10^5 ดาลตัน และ 1.4×10^5 ดาลตัน ตามลำดับ และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.86 และ P(3HB) ที่แยกได้จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารดีเทอร์เจนต์ที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวคือ LAS-99 ที่ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีทางกายภาพ และผ่านขั้นตอนพอลิซิง (รูปที่ 4.16(b)) มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนเท่ากับ 0.9×10^5 ดาลตัน และ 0.6×10^5 ดาลตัน ตามลำดับ และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.46 โดยน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 ที่แยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และ LAS-99 มีค่าน้อยกว่า P(3HB) จากการแยกด้วยคลอโรฟอร์ม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ ^1H NMR ที่พบพีคที่บริเวณตำแหน่ง 4.18 ppm แต่ไม่พบในการแยกด้วยคลอโรฟอร์ม ซึ่งอาจเกิดจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งมีสมบัติเป็นด่างทำให้การแยก P(3HB) ในสภาวะที่เป็นด่างสูง (pH 13) และการใช้ LAS-99 ที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว ทำให้พันธะของพอลิเมอร์ถูกตัดออกเป็นสายสั้นลง ส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของ P(3HB) ลดลง (Anis และคณะ, 2013; Yang และคณะ, 2011) อย่างไรก็ตาม P(3HB) จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 ที่แยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยใกล้เคียงกับ P(3HB) จากการแยกด้วยคลอโรฟอร์มและเมื่อพิจารณา ค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งเป็นค่าที่บอกการกระจายตัวของพอลิเมอร์ ถ้าค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลมีค่าใกล้เคียง 1 แล้วสายโซ่ของพอลิเมอร์มีความยาวเท่าๆ กัน ถ้ายิ่งสูงกว่า 1 มาก แล้วมีสายสั้น-ยาว ต่างกันมาก จากผลการทดลองพบว่า P(3HB) จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 ที่แยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียง 1 มากกว่า P(3HB) จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม นอกจากนี้ P(3HB) จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 ที่แยกด้วย LAS-99 แม้จะมีน้ำหนักโมเลกุลที่น้อยที่สุด แต่มีค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียง 1 มากที่สุดเมื่อเทียบกับ commercial P(3HB) และ P(3HB) จากการแยกด้วยคลอโรฟอร์มและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งบ่งบอกถึงขนาดโมเลกุลของสายพอลิเมอร์ใกล้เคียงกัน ขนาดโมเลกุลในสายพอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีความใกล้เคียงกันมากกว่า

เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลา ประสิทธิภาพ ราคา และระดับความเป็นพิษของสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ที่ผลิตได้จาก *B. megaterium* BA-019 ดังแสดงในตารางที่ 4.15 พบว่า สำหรับการให้เซลล์แห้งในกระบวนการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ที่ผ่านขั้นตอนการพรีทรีทเมนต์จากนั้นแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และการพอลิซิง เป็น

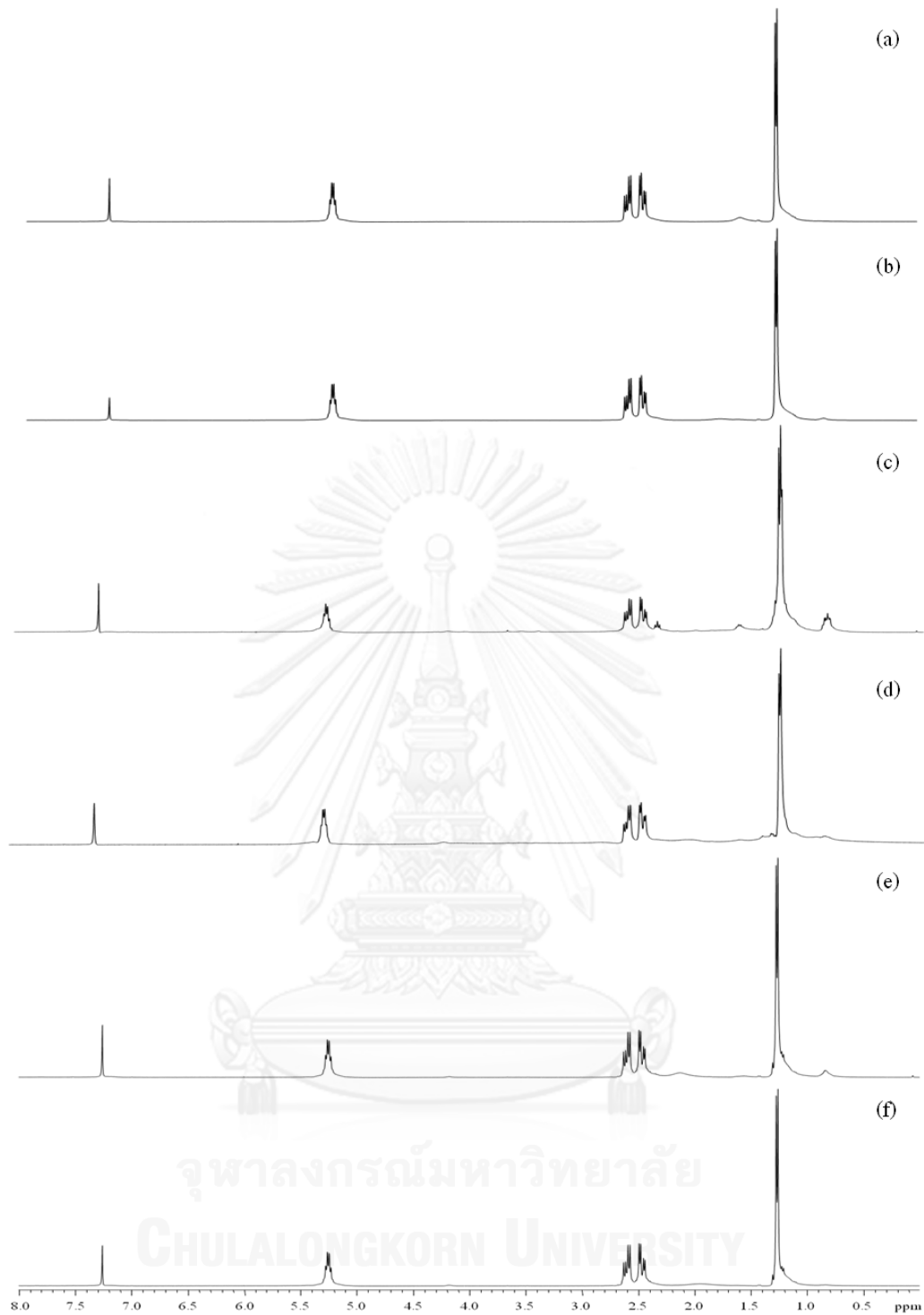
วิธีการที่มีข้อได้เปรียบคือ มีประสิทธิภาพในการแยก P(3HB) ได้แก่ ได้รับความบริสุทธิ์และการกักเก็บสูง น้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) ที่ได้มีค่าสูง สารเคมีที่ใช้มีราคาถูกและมีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม แต่มีข้อเสียเปรียบคือ ใช้ระยะเวลาในกระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์มาก อีกทั้งต้องมีขั้นตอนการทำแห้งเซลล์ก่อนนำมาใช้ในกระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลานาน ทำให้ราคาต้นทุนของผลิตภัณฑ์ที่ได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์เปียก สำหรับการ ใช้เซลล์เปียกในกระบวนการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก ด้วยวิธีเชิงกลโดยการใช้ LAS-99 ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงและการพอลิซิง เป็นวิธีการที่มีข้อได้เปรียบคือ สามารถลดต้นทุนการผลิตในด้านระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการทำแห้งเซลล์ ใช้ระยะเวลาในกระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์น้อย มีประสิทธิภาพในการแยก P(3HB) ได้แก่ ได้รับความบริสุทธิ์และการกักเก็บสูง และใช้สารเคมีที่มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม แม้ว่าสารเคมีที่ใช้มีราคาแพงแต่อาจทำให้ราคาต้นทุนการผลิตถูกกว่าเมื่อเทียบกับค่าใช้จ่ายในการทำแห้งเซลล์ และมีข้อเสียเปรียบคือ สารเคมีที่ใช้คือ LAS-99 ส่งผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) ที่ได้ลดลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

ตารางที่ 4.13 ค่าเคมีคัลซิฟท์ของ ^1H NMR ของ P(3HB)

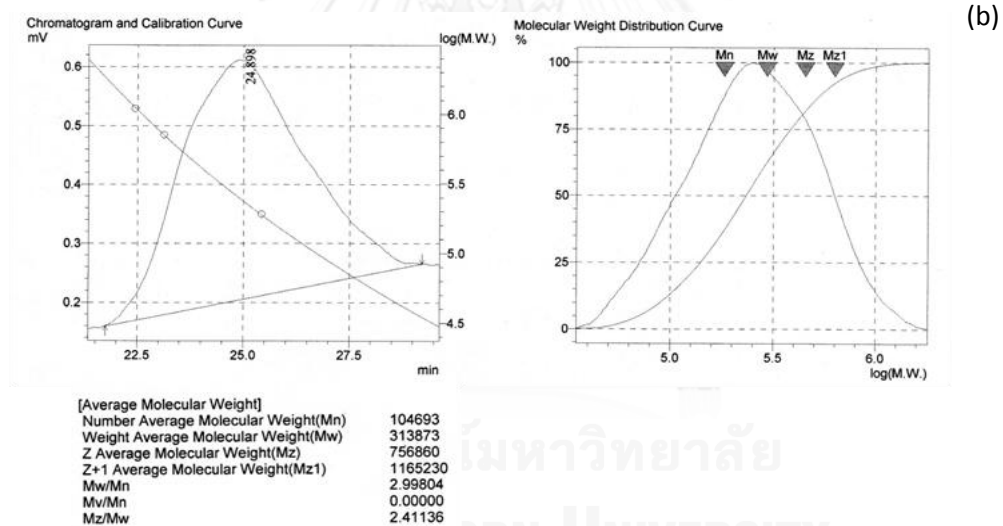
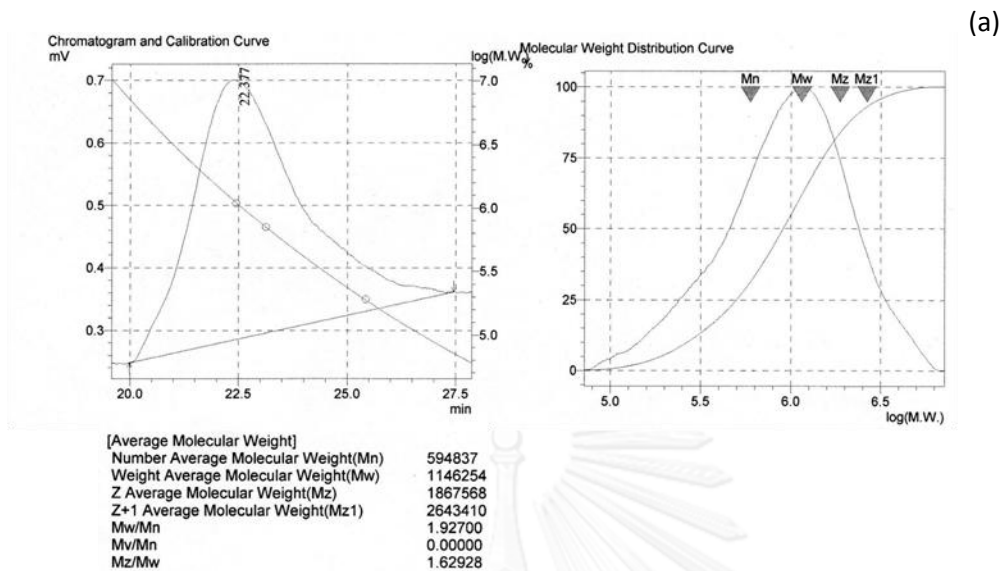
H atom	Chemical shift (ppm)			
	CH ₃	CH ₂	CH	Reference
Commercial P(3HB)	1.27	2.45-2.65	5.26	งานวิจัยนี้
P(3HB) sample	1.27	2.45-2.65	5.26	งานวิจัยนี้
P(3HB)	1.27	2.45-2.65	5.26	Doi และคณะ (1986)
P(3HB)	1.27	2.52	5.26	Reddy และคณะ (2008)



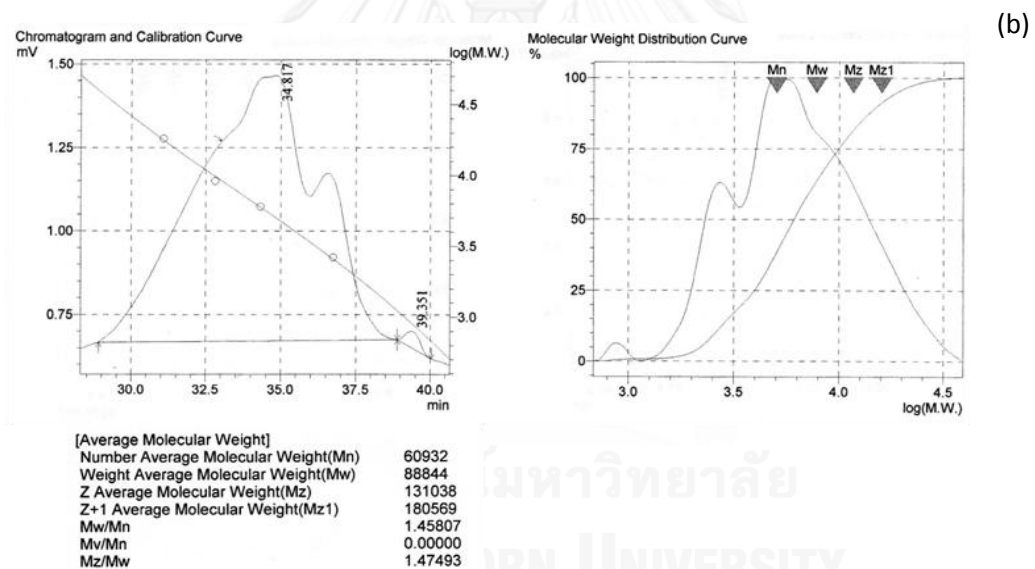
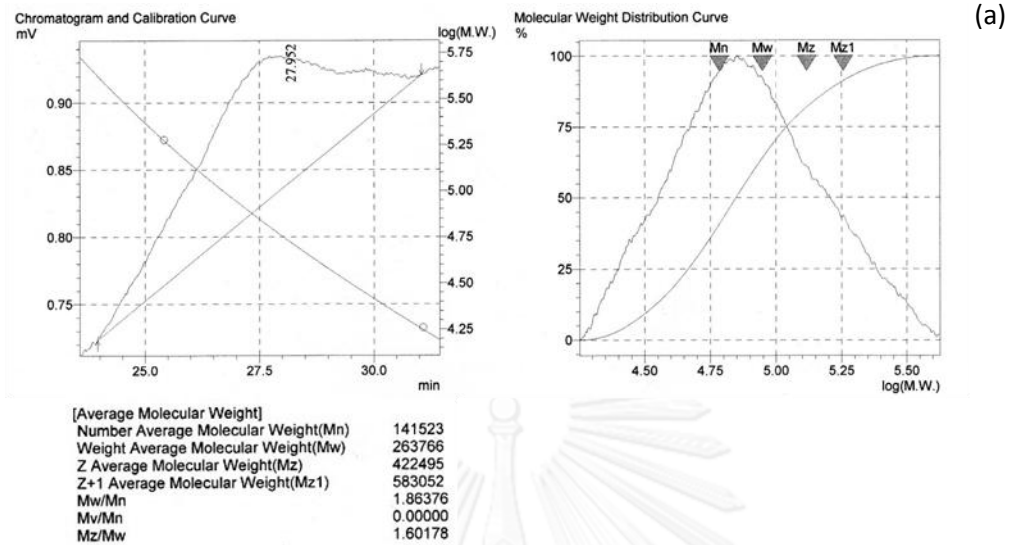
รูปที่ 4.13 ^1H NMR ที่ 400 MHz ของ P(3HB)



รูปที่ 4.14 ^1H NMR ที่ 400 MHz ของ commercial P(3HB) (a), P(3HB) ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (b), P(3HB) ที่แยกจากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ก่อนการพอลิซซิ่ง (c), P(3HB) ที่แยกจากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หลังการพอลิซซิ่ง (d), P(3HB) ที่แยกจากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงก่อนการพอลิซซิ่ง (e), และ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงหลังการพอลิซซิ่ง (f)



รูปที่ 4.15 โครมาโทแกรมจาก GPC ของ commercial P(3HB) (a) และ P(3HB) ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (b)



รูปที่ 4.16 โครมาโทแกรมจาก GPC ของ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายไซโตเดียมไฮดรอกไซด์หลังการพอลิซิง (a) และ P(3HB) ที่แยกจากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงหลังการพอลิซิง (b)

ตารางที่ 4.14 ข้อมูลน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ P(3HB) ที่แยกได้จาก *B. megaterium* BA-019 เปรียบเทียบกับ commercial P(3HB)

Type of sample	Molecular weight (Da)		Polydispersity index (M_w/M_n)
	Weight average molecular weight (M_w)	Number average molecular weight (M_n)	
Commercial P(3HB)	1,146,254	594,837	1.93
P(3HB) extract by CHCl_3	313,873	104,693	3.00
P(3HB) isolated by pretreatment +NaOH+polishing	263,766	141,523	1.86
P(3HB) isolated by LAS-99+ultrasonication+polishing	88,844	60,932	1.46

ตารางที่ 4.15 เปรียบเทียบระยะเวลา ประสิทธิภาพ ราคา และระดับความเป็นพิษของสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ ที่ผลิตได้จาก *B. megaterium* BA-019

Method	Operation time (min.)	Efficiency			Price (\$US/kg) ^a	FDA class ^b
		Purity (% by wt.)	Recovery (% by wt.)	M _w		
Conventional (CHCl ₃)	210	85.02	87.61	313,873	0.54-0.62	2
Isolated by pretreatment+NaOH+polishing	240	88.30	96.31	263,766	0.29-0.32	3
Isolated by LAS-99+ultrasonication+polishing	10-20	95.27	99.01	88,844	1.04-1.32	3

หมายเหตุ:

^aPrice data from www.icis.com (2006–2008 prices); na=data not available.

^bThe FDA rates chemicals for use in manufacturing of biomedical products, where 1 is most toxic and 3 is least toxic, Q3C February 12 (<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm128290.htm>).

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการพัฒนากระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของ P(3HB) ซึ่งผลิตจาก *B. megaterium* BA-019 ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการเลี้ยงเชื้อแบบเฟด-แบตช์ใช้กากน้ำตาลและยูเรียซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีราคาถูก จากการศึกษาในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่าการผลิต P(3HB) แบบเฟด-แบตช์ โดยการป้อนอาหารด้วยวิธี exponential feeding โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในกากน้ำตาลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และใช้กากน้ำตาลและยูเรีย (อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 12.5 กรัมน้ำตาลต่อกรัมยูเรีย) เป็นสารอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 12 ควบคุมอัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ได้ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของ P(3HB) และอัตราการผลิต P(3HB) มีค่าเท่ากับ 91.05 กรัมต่อลิตร 41.92 กรัมต่อลิตร และ 1.75 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ คิดเป็น 46.04% โดยน้ำหนัก ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้เซลล์ที่มี P(3HB) แล้วจึงนำไปใช้ในขั้นตอนการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระบวนการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่างๆ

จากผลการศึกษากระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของ P(3HB) เมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อแยกด้วย คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ตามลำดับ และเมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019 มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อแยกด้วย คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน และ LAS-99 ตามลำดับ แม้ว่าคลอโรฟอร์มและไดคลอโรมีเทนจะมีประสิทธิภาพในการแยก P(3HB) ทำให้ได้ P(3HB) ที่มีความบริสุทธิ์และการกักเก็บสูง แต่เนื่องจากคลอโรฟอร์มและไดคลอโรมีเทนทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นสารที่มีธาตุฮาโลเจนที่มีคลอรีน (Cl) เป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง และมีราคาสูง ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ราคาต้นทุนการผลิต P(3HB) สูง จึงเลือกใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการแยก P(3HB) จากเซลล์แห้ง และ LAS-99 ในการแยก P(3HB) จากเซลล์เปียก ของ *B. megaterium* BA-019 แม้ว่าความบริสุทธิ์และการกักเก็บ P(3HB) ที่ได้จะมีค่าต่ำกว่า แต่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพสูงขึ้นได้โดยการเพิ่มขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลร่วมกับการใช้สารเคมี การเพิ่มประสิทธิภาพการแยกด้วยการฟริทริทเม้นต์ และการเพิ่มประสิทธิภาพการแยกด้วยการพอลิชซึ่ง

สำหรับเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการฟริทริทเม้นต์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปแยก P(3HB) จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง และผ่านขั้นตอนการพอลิชซึ่งโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร ทำให้ได้ P(3HB) ที่มีความบริสุทธิ์และการกักเก็บเท่ากับ 88.30% และ 96.31% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย

โดยน้ำหนักและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนเท่ากับ 2.6×10^5 ดาลตัน และ 1.4×10^5 ดาลตัน ตามลำดับ และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.86

สำหรับเซลล์เป็ยกของ *B. megaterium* BA-019 เมื่อแยก P(3HB) ด้วยสารดีเทอร์เจนต์ที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวคือ LAS-99 ที่ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีทางกายภาพโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่ความถี่ 40% แอมพลิจูด เป็นเวลา 10-20 นาที และผ่านขั้นตอนการพอลิซซึ่งโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร แล้ว ทำให้ได้ P(3HB) ที่มีความบริสุทธิ์และการกักเก็บเท่ากับ 95.27% และ 99.01% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวนเท่ากับ 0.9×10^5 ดาลตัน และ 0.6×10^5 ดาลตัน ตามลำดับ และค่าดัชนีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.46

พอลิเมอร์ P(3HB) ที่แยกได้มีสีขาวและมีลักษณะเป็นผงละเอียด แม้ว่าวิธีการดังกล่าวแม้จะให้ความบริสุทธิ์และการกักเก็บสูง แต่มีผลกระทบต่อสมบัติและโครงสร้างของพอลิเมอร์ เช่น โครงสร้างของ P(3HB) และน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ อาจเนื่องมาจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และ LAS-99 ที่ใช้ในกระบวนการแยก มีผลกระทบต่อโครงสร้างของ P(3HB) โดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งมีสมบัติเป็นด่าง ทำให้การแยก P(3HB) ในสภาวะที่เป็นด่างสูง (pH 13) และการใช้ LAS-99 ที่มีสมบัติเป็นดีเทอร์เจนต์ อาจมีผลต่อการย่อยสลายพันธะของพอลิเมอร์ โดยตัดสายของพอลิเมอร์ออกเป็นสายสั้น ส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของ P(3HB) ลดลง แต่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นพลาสติกทางการแพทย์ได้ (Ceccorulli และคณะ, 1993) ซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะรูปร่างผิวสัมผัส และสมบัติทางเคมีของ P(3HB) เช่น สามารถนำไปใช้ในการผลิตเป็นแคปซูลบรรจุยาหรือวัคซีนที่ต้องการควบคุมการปลดปล่อยยาให้ตัวช้าๆ ถูกปล่อยออกมาในปริมาณน้อยๆ เป็นเวลานาน (Reusch, 1995; Zinn และคณะ, 2001) โดยการย่อยสลาย P(3HB) ในร่างกายมนุษย์จะไดักรดอาร์-3-ไฮดรอกซีปิวิริกที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์ เนื่องจากปกติจะพบเป็นองค์ประกอบในเลือด โดยมีความเข้มข้น 0.3-1.3 มิลลิโมลาร์ และสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต (Zinn และคณะ, 2001)

งานวิจัยนี้เป็นการค้นพบวิธีการกักเก็บ P(3HB) ด้วยวิธีการใหม่ที่ใช้สารที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยสามารถได้กับทั้งเซลล์แห้งและเซลล์เปียกดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น และอาจนำไปประยุกต์ไปใช้กักเก็บพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ เช่น โคพอลิเมอร์ของ P(3HB-co-3HV) และ P(3HB-co-3HHx) เป็นต้น รวมทั้งอาจสามารถนำไปประยุกต์ในการกักเก็บในเซลล์ของแบคทีเรียชนิดอื่นได้ อย่างไรก็ตามสำหรับการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ในงานวิจัย อาจสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บได้อีก จึงควรต้องพิจารณาปัจจัยอื่นๆ ให้เหมาะสม เช่น

1. อัตราส่วนของเซลล์ต่อสารเคมีที่ใช้ในการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์

จากการศึกษาของ Yang และคณะ (2011) และ Riedel และคณะ (2013) ระบุว่าอัตราส่วนของน้ำหนักของเซลล์ต่อปริมาตรของสารเคมีที่ใช้ในการกักเก็บ P(3HB) ที่เหมาะสมควรมีความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งทำให้ได้ความบริสุทธิ์และการกักเก็บสูงถึงมากกว่า 95% โดยน้ำหนัก แต่ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ที่ความเข้มข้น 10% น้ำหนักต่อปริมาตร เนื่องจากจากงานวิจัยของ Comeau และคณะ (1988) ซึ่งศึกษาวิธีการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ โดยการสกัดด้วย

คลอโรฟอร์ม เพื่อใช้ในกระบวนการวิเคราะห์หาปริมาณ P(3HB) ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นที่ยอมรับและใช้กันมาอย่างแพร่หลายและเป็นวิธีที่คณะผู้วิจัยใช้กันมาอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นหากศึกษาอัตราส่วนของน้ำหนักเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 ต่อปริมาตรของสารเคมีที่เหมาะสมคือ 5-10% น้ำหนักต่อปริมาตร อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการกักเก็บ P(3HB) ให้สูงขึ้น

2. ความเข้มข้นของสารเคมี

สำหรับขั้นตอนการศึกษาประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการย่อยเซลล์ด้วยสารดีเทอร์เจนต์ที่มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว ในงานวิจัยนี้เลือกใช้สารดีเทอร์เจนต์ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร เนื่องจากจากงานวิจัยของ Yang และคณะ (2011) ศึกษาการแยก PHAs ด้วยสารดีเทอร์เจนต์ความเข้มข้น 0.625-5% น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าประสิทธิภาพการกักเก็บสูงสุดเมื่อแยก PHAs ด้วยการดีเทอร์เจนต์ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร แต่เนื่องจากงานวิจัยของ Kim และคณะ (2003) ศึกษาการกักเก็บ P(3HB) ด้วยสาร SDS สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บ P(3HB) ได้สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร SDS เป็น 10% น้ำหนักต่อปริมาตร จากงานวิจัยนี้พบว่าการแยก P(3HB) จากเซลล์เป็ยกด้วยสาร LAS-99 ความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตร ให้ประสิทธิภาพการกักเก็บสูง ดังนั้นหากศึกษาความเข้มข้นของสาร LAS-99 ที่เหมาะสมคือ 5-10% น้ำหนักต่อปริมาตร อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการกักเก็บ P(3HB) ให้สูงขึ้น

สำหรับขั้นตอนการศึกษาประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยสารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่าง ในงานวิจัยนี้เลือกใช้สารเคมีที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่าง ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เนื่องจากงานวิจัยของ Anis และคณะ (2012) ศึกษาการแยก P(3HB-co-3HHx) จาก *C. necator* ด้วยการดีเทอร์เจนต์ที่มีสมบัติเป็นกรด-ด่างและดีเทอร์เจนต์ พบว่าประสิทธิภาพการกักเก็บสูงสุดเมื่อใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และไม่แตกต่างกับผลของการศึกษาเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.3 โมลาร์ อาจเนื่องจาก *C. necator* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งแตกต่างจาก *B. megaterium* ในงานวิจัยนี้ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยแบคทีเรียแกรมบวกมีโครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์ต่างกับแบคทีเรียแกรมลบ เช่น ชั้นของเปปทิโดไกลแคนของแบคทีเรียแกรมบวกหนากว่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรียแกรมลบ (Chen และคณะ, 1999) เป็นต้น ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบถูกทำลายได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมบวก จากงานวิจัยนี้พบว่าการแยก P(3HB) จากเซลล์แห้งด้วยสารที่มีสมบัติเป็นด่าง คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ได้ประสิทธิภาพการกักเก็บสูง แต่หากศึกษาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมต่อการแยก P(3HB) จาก *B. megaterium* BA-019 คือ 0.1-0.3 โมลาร์ อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการกักเก็บ P(3HB) ให้สูงขึ้น

สำหรับขั้นตอนการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการเพิ่มขั้นตอนการฟรียทรีทเมนต์เซลล์แห้ง ในงานวิจัยนี้เลือกใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ หรือ 5.84 กรัมต่อลิตร เนื่องจากงานวิจัยของ Anis และคณะ (2013) ศึกษาการแยก P(3HB-co-3HHx) จาก *C. necator* พบว่าการฟรียทรีทเมนต์เซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บได้ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกักเก็บ P(3HB-co-3HHx) สูงขึ้น ดังนั้นหากศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย

โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมคือ 2-10 กรัมต่อลิตร อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการกักคืน P(3HB) ให้สูงขึ้น

สำหรับขั้นตอนการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพอลิซิงพอลิเมอร์ P(3HB) ที่แยกได้ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้การพอลิซิงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร เนื่องจากงานวิจัยของ Anis และคณะ (2012) ศึกษาการแยก P(3HB-co-3HHx) จาก *C. necator* พบว่าการพอลิซิงด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 20% ปริมาตรต่อปริมาตร ทำให้พอลิเมอร์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น แต่เมื่อพอลิซิงด้วยเอทานอลความเข้มข้น 50% ปริมาตรต่อปริมาตร พอลิเมอร์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงแต่การกักคืนลดลง ดังนั้นหากศึกษาความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมคือ 10-50% ปริมาตรต่อปริมาตร อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการกักคืน P(3HB) ให้สูงขึ้น

3. ระยะเวลาในการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์

จากการศึกษาประสิทธิภาพการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 โดยการเพิ่มขั้นตอนการพรีทรีทเมนต์เซลล์ก่อนนำไปแยก P(3HB) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แม้ว่าประสิทธิภาพการกักคืนสูงแต่ใช้เวลานาน ในขั้นตอนการพรีทรีทเมนต์เซลล์ในงานวิจัยนี้เลือกใช้การบ่มเซลล์กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำไปแยก P(3HB) โดยการบ่มด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เนื่องจากงานวิจัยของ Anis และคณะ (2013) ศึกษาการแยก P(3HB-co-3HHx) จาก *C. necator* พบว่าภาวะดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการกักคืน P(3HB-co-3HHx) ได้สูง ดังนั้นหากศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการแยก P(3HB) และการทำให้บริสุทธิ์ โดยการปรับขั้นตอนการพรีทรีทเมนต์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์และการแยก P(3HB) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ใช้ระยะเวลาลดลง แต่คงประสิทธิภาพในการกักคืน P(3HB) สามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตในด้านระยะเวลาและค่าใช้จ่ายลงได้อีกทั้งอาจช่วยลดผลกระทบของสารเคมีต่อโครงสร้างของพอลิเมอร์ โดยอาจทำให้ P(3HB) ที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มขึ้นกว่า P(3HB) ที่แยกได้จากในงานวิจัยนี้ซึ่งใช้ระยะเวลามากกว่า

รายการอ้างอิง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

- A.O.A.C., 1975. Official Methods of Analysis, 12th ed. The Association of Official Analytical Chemists.
- Akaraonye, E., Moreno, C., Knowles, J.C., Keshavarz, T. and Roy, I., 2012. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus cereus* SPV using sugarcane molasses as the main carbon source. *Biotechnol Journal*, 7: 293-303.
- Albuquerque, M.G., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R. and Reis, M.A., 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*, 130: 411-21.
- Anis, S.N., Nurhezreen, M.I., Sudesh, K. and Amirul, A.A., 2012. Enhanced recovery and purification of P(3HB-co-3HHx) from recombinant *Cupriavidus necator* using alkaline digestion method. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167: 524-535.
- Anis, S.N., Nurhezreen, M.I., Sudesh, K. and Amirul, A.A., 2013. Effect of different recovery strategies of P(3HB-co-3HHx) copolymer from *Cupriavidus necator* recombinant harboring the PHA synthase of *Chromobacterium* sp. *USM2. Separation and Purification Technology*, 102: 111-117.
- Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S. and Goulet, J., 1995. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 165-169.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M. and Welander, T., 2008. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology*, 99: 509-516.
- Berger, E., Ramsay, B.A., Ramsay, J.A., Chavarie, C. and Braunegg, G., 1989. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnology Techniques*, 3: 227-232.
- Bhubalan, K. et al., 2008. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. *Polymer Degradation and Stability*, 93: 17-23.
- Boopathy, R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74: 63-67.
- Braunegg, G., Lefebvre, G. and Genser, K.F., 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, 65: 127-161.

- Bucci, D.Z., Tavares, L.B.B. and Sell, I., 2005. PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing*, 24: 564-571.
- Budde, C.F., Mahan, A.E., Lu, J., Rha, C. and Sinskey, A.J., 2010. Roles of multiple acetoacetyl coenzyme A reductases in polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Bacteriology*, 192: 5319-28.
- Ceccorulli, G., Pizzoli, M. and Scandola, M., 1993. Effect of a low-molecular-weight plasticizer on the thermal and viscoelastic properties of miscible blends of bacterial poly (3-hydroxybutyrate) with cellulose acetate butyrate. *Macromolecules*, 26: 6722-6726.
- Chen, C.W., Don, T.-M. and Yen, H.-F., 2006. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *Process Biochemistry*, 41: 2289-2296.
- Chen, G., Wu, Q., Zhao, K. and Peter, H.Y., 2000. Functional polyhydroxyalkanoates synthesized by microorganisms. *高分子科学*, 18: 389-396.
- Chen, G.Q. and Wu, Q., 2005. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 592-599.
- Chen, G.Q., Zhang, G., Park, S.J. and Lee, S.Y., 2001. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 50-55.
- Chen, Y., Chen, J., Yu, C., Du, G. and Lun, S., 1999. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant-chelate aqueous system. *Process Biochemistry*, 34: 153-157.
- Choi, J. and Lee, S.Y., 1999a. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnology and Bioengineering*, 62: 546-553.
- Choi, J. and Lee, S.Y., 1999b. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 13-21.
- Comeau, Y., Hall, K.J. and Oldham, W.K., 1988. Determination of poly- β -hydroxybutyrate and poly- β -hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2325-2327.
- Divyashree, M.S. and Shamala, T.R., 2010. Extractability of polyhydroxyalkanoate synthesized by *Bacillus flexus* cultivated in organic and inorganic nutrient media. *Indian Journal of Microbiology*, 50: 63-69.
- Doi, Y., Kawaguchi, Y., Nakamura, Y. and Kunioka, M., 1989. Nuclear magnetic resonance studies of poly (3-hydroxybutyrate) and polyphosphate

- metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. Applied and Environmental Microbiology, 55: 2932-2938.
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K., 1986. Nuclear magnetic resonance studies on poly(β -hydroxybutyrate) and a copolyester of β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* h16. Macromolecules, 19: 2860-2864.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.T. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356.
- Dunlop, W.F. and Robards, A.W., 1973. Ultrastructural study of poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*. Journal of Bacteriology, 114: 1271-1280.
- Estermann, R., Kloimstein, E., Kroath, H. and Traussnig, H., 1990. Extracting agents for poly-D (-)-3-hydroxybutyric acid. Google Patents.
- Fiorese, M.L. et al., 2009. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. Engineering in Life Sciences, 9: 454-461.
- Gerngross, T.U., Reilly, P., Stubbe, J., Sinskey, A.J. and Peoples, O.P., 1993. Immunocytochemical analysis of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthase in *Alcaligenes eutrophus* H16: Localization of the synthase enzyme at the surface of PHB granules. Journal of Bacteriology, 175: 5289-5293.
- Ghatnekar, M.S., Pai, J.S. and Ganesh, M., 2002. Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp. V49. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 77: 444-448.
- Gouda, M.K., Swellam, A.E. and Omar, S.H., 2001. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. Microbiological Research, 156: 201-207.
- Griebel, R., Smith, Z. and Merrick, J.M., 1968. Metabolism of poly (β -hydroxybutyrate). I. Purification, composition, and properties of native poly (β -hydroxybutyrate) granules from *Bacillus megaterium*. Biochemistry, 7: 3676-3681.
- Gross, R.A. and Kalra, B., 2002. Biodegradable polymers for the environment. Science, 297: 803-807.
- Haas, R., Jin, B. and Zepf, F.T., 2008. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 72: 253-256.

- Hahn, S.K., Chang, Y.K., Kim, B.S., Lee, K.M. and Chang, H.N., 1993. The recovery of poly (3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology Techniques*, 7: 209-212.
- Hahn, S.K., Chang, Y.K. and Lee, S.Y., 1995. Recovery and characterization of poly (3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 34-39.
- Han, J., Qiu, Y.Z., Liu, D.C. and Chen, G.Q., 2004. Engineered *Aeromonas hydrophila* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with alterable monomers composition. *FEMS Microbiology Letters*, 239: 195-201.
- Harrison, S.T.L., 1991. Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnology Advances*, 9: 217-240.
- Hocking, P.J. and Marchessault, R.H., 1994. Enzymatic degradability of isotactic versus syndiotactic poly(β -hydroxybutyrate). *Macromolecular Rapid Communications*, 15: 447-452
- Jacquel, N., Lo, C.-W., Wei, Y.-H., Wu, H.-S. and Wang, S.S., 2008. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39: 15-27.
- Jendrossek, D. and Handrick, R., 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual Reviews in Microbiology*, 56: 403-432.
- Jiang, X., Ramsay, J.A. and Ramsay, B.A., 2006. Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Microbiological Methods*, 67: 212-219.
- Kaneda, T., 1967. Fatty acids in the genus *Bacillus* I. iso- and anteiso-fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. *Journal of Bacteriology*, 93: 894-903.
- Kapritchkoff, F.M. et al., 2006. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, 122: 453-462.
- Keshavarz, T. and Roy, I., 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, 13: 321-326.
- Khanna, S. and Srivastava, A.K., 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40: 607-619.
- Kim, M., Cho, K.S., Ryu, H.W., Lee, E.G. and Chang, Y.K., 2003. Recovery of poly (3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. *Biotechnology Letters*, 25: 55-59.

- Koller, M. et al., 2008. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresource Technology*, 99: 4854–4863.
- Kosior, E., Braganca, R.M. and Fowler, P., 2006. Lightweight compostable packaging: Literature review. Oxon: The Waste & Resources Action Programme.
- Kranz, R.G., Gabbert, K.K. and Madigan, M.T., 1997. Positive selection systems for discovery of novel polyester biosynthesis genes based on fatty acid detoxification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3010-3013.
- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B. and Thongchul, N., 2009. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107: 240-245.
- Kunasundari, B. and Sudesh, K., 2011. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, 5: 620-634.
- Larsson, N., Otremska, P., Villar, M. and Jönsson, J.Å., 2011. Liquid phase micro-extraction of linear alkylbenzene sulfonate anionic surfactants in aqueous samples. *Membranes*, 1: 299-313.
- Law, J.H. and Slepecky, R.A., 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*, 82: 33-36.
- Lee, S.H. et al., 2000. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnology and Bioengineering*, 67: 240-244.
- Lee, S.Y., 1996a. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 1-14
- Lee, S.Y., 1996b. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *TIBTECH*, 14: 431-438.
- Lee, S.Y. and Chang, H.N., 1994. Effect of complex nitrogen source on the synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* in flask and fed-batch cultures. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 2: 169-176.
- Lee, W.H., Loo, C.Y., Nomura, C.T. and Sudesh, K., 2008. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresource Technology*, 99: 6844-6851.
- Lemos, P.C., Serafim, L.S. and Reis, M.A., 2006. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *Journal of Biotechnology*, 122: 226-238.

- Lenz, R.W. and Marchessault, R.H., 2005. Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. American Chemical Society, 6: 1-8.
- Loo, C.Y. and Sudesh, K., 2007. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. Malaysian Polymer Journal, 2: 31-57.
- López-Cortés, A., Lanz-Landázuri, A. and García-Maldonado, J.Q., 2008. Screening and isolation of PHB-producing bacteria in a polluted marine microbial mat. Microbial Ecology, 56: 112-120.
- Lundgren, D.G., Pfister, R.M. and Merrick, J.M., 1964. Structure of poly- β -hydroxybutyric acid granules. Journal of General Microbiology, 34: 441-446.
- Madkour, M.H., Heinrich, D., Alghamdi, M.A., Shabbaj, I.I. and Steinbüchel, A., 2013. PHA recovery from biomass. Biomacromolecules, 14: 2963-2972.
- Mohammadi, M. et al., 2012. Recovery and purification of intracellular polyhydroxyalkanoates from recombinant *Cupriavidus necator* using water and ethanol. Biotechnology Letters, 34: 253-259.
- Mudliar, S.N., Vaidya, A.N., Kumar, M.S., Dahikar, S. and Chakrabarti, T., 2007. Techno-economic evaluation of PHB production from activated sludge. Clean Technologies and Environmental Policy, 10: 255-262.
- Nath, A., Dixit, M., Bandiya, A., Chavda, S. and Desai, A.J., 2008. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. Bioresource Technology, 99: 5749-5755.
- Ojumu, T.V., Yu, J. and Solomon, B.O., 2004. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer African Journal of Biotechnology, 3: 18-24.
- Ostle, A.G. and Holt, J.G., 1982. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. Applied and Environmental Microbiology, 44: 238-241.
- Page, W.J. and Cornish, A., 1993. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. Applied and Environmental Microbiology, 59: 4236-4244.
- Palacios, P., Burgosl, J., HOZ, L., Sanz, B. and Ordóñez, J.A., 1991. Study of substances released by ultrasonic treatment from *Bacillus stearothermophilus* spores. Journal of Applied Bacteriology, 71: 445-451
- Philip, S., Keshavarz, T. and Roy, I., 2007. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 82: 233-247.
- Plastics Institute of Thailand, 2012. Plastics packaging and the trend in food industry, Plastics Foresight. Buffet famous Co.,Ltd., MIDI Building, 86/6 Soi Treemit, Rama 4 Road, Klongtoey, Bangkok 10110.

- Plastics Institute of Thailand, 2013. Bioplastics polymer of the future, Plastics Foresight. Buffet Famous Co.,Ltd., MIDI Building, 86/6 Soi Treemit, Rama 4 Road, Klongtoey, Bangkok 10110.
- Pötter, M. et al., 2004. The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology*, 150: 2301-2311.
- Ramsay, J.A., Berger, E., Voyer, R., Chavarie, C. and Ramsay, B.A., 1994. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnology Techniques*, 8: 589-594.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi and Kalia, V.C., 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87: 137-146.
- Reddy, S.V., Thirumala, M. and Mahmood, S.K., 2008. Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 391-397.
- Reusch, R.N., 1995. Low molecular weight complexed poly (3-hydroxybutyrate): a dynamic and versatile molecule in vivo. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 50-54.
- Riedel, S.L. et al., 2013. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from *Ralstonia eutropha* cultures with non-halogenated solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 110: 461-470.
- Ryu, H.W., Cho, K.-S., Lee, E.G. and Chang, Y.K., 2000. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from coagulated *Ralstonia eutropha* using a chemical digestion method. *Biotechnology Progress*, 16: 676-679.
- Sindhu, R. et al., 2011. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from crude glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and improving its thermal properties by blending with other polymers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54: 783-794.
- Steinbüchel, A. and Fuchtenbusch, B., 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. *TIBTECH*, 16: 419-427.
- Sun, Z., Ramsay, J.A., Guay, M. and Ramsay, B.A., 2007. Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 69-77.

- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. and Shah, S., 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. *Biotechnology Advances*, 25: 148-175.
- Tamer, I.M. and Moo-Young, M., 1998. Disruption of *Alcaligenes latus* for recovery of poly(β -hydroxybutyric acid): Comparison of high-pressure homogenization, bead milling, and chemically induced lysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 37: 1807-1814.
- Thakor, N., Lutke-Eversloh, T. and Steinbuchel, A., 2005. Application of the BPEC pathway for large-scale biotechnological production of poly(3-mercaptopropionate) by recombinant *Escherichia coli*, including a novel in situ isolation method. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 835-841.
- Tokiwa, Y., Calabia, B.P., Ugwu, C.U. and Aiba, S., 2009. Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 3722-3742.
- Valappil, S.P. et al., 2007. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *Journal of Biotechnology*, 132: 251-8.
- Verlinden, R.A., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D. and Radecka, I., 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1437-1449.
- Wampfler, B. et al., 2010. Isolation and purification of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHA) for medical applications using nonchlorinated solvents. *Biomacromolecules*, 11: 2716-2723.
- Waser, P., Rueping, M. and Seebach, D., 2001. On the Solution Structure of PHB: Preparation and NMR Analysis of Isotopically Labeled Oligo[(R)-3-hydroxybutanoic Acids] (OHBs). *Helvetica Chimica Acta*, 84: 1821-1845.
- Williamson, D.H. and Wilkinson, J.F., 1958. The isolation and estimation of the poly- β -hydroxybutyrate inclusions of *Bucillus* species. *Journal of General Microbiology*, 19: 198-209.
- Wong, P.A.L., Cheung, M.K., Lo, W.-H., Chua, H. and Yu, P.H.F., 2004. Investigation of the effects of the types of food waste utilized as carbon source on the molecular weight distributions and thermal properties of polyhydroxybutyrate produced by two strains of microorganisms. *e-Polymers*, 31.
- Xiong, Y.C., Yao, Y.C., Zhan, X.Y. and Chen, G.Q., 2010. Application of polyhydroxyalkanoates nanoparticles as intracellular sustained drug-release vectors. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 21: 127-140.

- Xu, J. et al., 2002. In situ FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates. *Polymer*, 43: 6893–6899.
- Yamanè, T. and Shimizu, S., 1984. Fed-batch techniques in microbial processes. Springer.
- Yang, Y.H., Brigham, C., Willis, L., Rha, C. and Sinskey, A., 2011. Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Biotechnology Letters*, 33: 937-942.
- Yang, Y.H. et al., 2010. Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by *Ralstonia eutropha*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 2037-2045.
- Yasothea, K., Aroua, M.K., Ramachandran, K. and Tan, I.K.P., 2006. Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration. *Biochemical Engineering Journal*, 30: 260-268.
- Yaws, C.L., 1999. Chemical properties handbook: Physical, thermodynamic, environmental, transport, safety, and health related properties for organic and inorganic chemicals. Mc-Graw Hill, New York.
- Yu, J. and Chen, L.X.L., 2006. Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass. *Biotechnology Progress*, 22: 547-553.
- Yu, J. and Stahl, H., 2008. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource Technology*, 99: 8042-8048.
- Zakaria, M.R. et al., 2010. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer from wild-type *Comamonas* sp. EB172. *Polymer Degradation and Stability*, 95: 1382-1386.
- Zinn, M., Witholt, B. and Egli, T.H., 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53: 5-21.
- กฤษมา กมลจรัสโสภา, 2547. การผลิตกรดอาร์(-)-3-ไฮดรอกซีบิวไทริกโดยการตีพอลิเมอร์ในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บุญฤทธิ์ เมฆศิริพร, 2551. การขยายส่วนการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต โดย *Bacillus megaterium* BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปวดี กาญจนชุมพล, 2553. การขยายส่วนการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพชนิดพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต)ในเฟด-แบตช์โดย *Bacillus megaterium* BA-019. วิทยานิพนธ์ปริญญา

- มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัตนศิริ มุกิตากุล, 2538. การผลิตพอลิปีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ BA-019 ที่แยก
ได้. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุล
ชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ราชบัณฑิตยสถาน, 2551. พจนานุกรมศัพท์พอลิเมอร์ ฉบับราชบัณฑิตยสถาน. บริษัท แปลนปริทัศน์
จำกัด, 228 pp.
- สุดา สุภาชินสวัสดิ์, 2542. ผลของซัสเตรทต่อสัดส่วนของของ 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรตในพอลิ(3-ไฮด
รอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต) ซึ่งผลิตจาก *Bacillus* sp. BA-019. วิทยานิพนธ์
ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิต
วิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อดิพล บุญเรืองถาวร, 2543. การผลิตพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดยการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp.
BA-019 แบบป้อนเป็นงวดภายใต้การจำกัดปริมาณไนโตรเจน. วิทยานิพนธ์ปริญญา
มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การเตรียมวัตถุดิบและสารที่ใช้ในการวิจัย

1. การเตรียมสารที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาล

1.1. สารละลายฟีนอล 5% น้ำหนักต่อปริมาตร

เตรียมจากการละลายฟีนอล 25 กรัมในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียมสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยูเรีย

2.1. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N

เตรียมจากการละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.2. สารละลาย potassium hydrogen phthalate (KHP)

เตรียมจากการละลาย KHP 20.4 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.3. หาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำสารละลาย KHP ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ฟีนอล์ฟทาลีน 2 หยด จากนั้นนำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 เมื่อถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต แล้วคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนี้

$$N \text{ ของ NaOH} = (\text{ปริมาตรของ KHP} \times 1000) / M.W. \times \text{ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไทเทรต}$$

2.4. สารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล

เตรียมจากการปิเปตกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 37% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) มาปริมาตร 8.176 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.5. หาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก

นำสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริกที่เตรียมได้จากข้อ 2.4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ฟีนอล์ฟทาลีน 2 หยด จากนั้นนำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจากข้อ 2.3 เมื่อถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต แล้วคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก ดังนี้

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นที่แน่นอนของ NaOH

V_1 = ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไทเทรต

N_2 = ความเข้มข้นของ HCl ที่ต้องการทราบ

V_2 = ปริมาตรของ HCl ที่นำมาไทเทรต

- 2.6. สารละลายกรดบอริกความเข้มข้น 4% น้ำหนักต่อปริมาตร
เตรียมจากการละลายกรดบอริก 40 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น
- 2.7. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 32% น้ำหนักต่อปริมาตร
เตรียมจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 32 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น



ภาคผนวก ข

สูตรคำนวณ

1. การคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t}$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_t - P_0}{X_t - X_0}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t}$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$$

$$\text{Productivity} = \frac{P_t - P_0}{t}$$

เมื่อ	μ	คือ	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
	$Y_{P/X}$	คือ	ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหนึ่งหน่วยเซลล์
	$Y_{P/S}$	คือ	ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อซับสเตรทที่ใช้ไป
	$Y_{X/S}$	คือ	ผลผลิตของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยซับสเตรทที่ใช้ไป
	Productivity	คือ	ค่าอัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
กำหนดให้	X_0	=	น้ำหนักรวมของเซลล์แห้งเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	X_t	=	น้ำหนักรวมของเซลล์แห้ง ณ เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)
	P_0	=	ปริมาณพอลิเมอร์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	P_t	=	ปริมาณพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ณ เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)
	S_0	=	ปริมาณซับสเตรทเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	S_t	=	ปริมาณซับสเตรทที่ถูกใช้ไป ณ เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)
	t	=	เวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)

2. การคำนวณน้ำหนักรวมของเซลล์แห้ง

$$\text{น้ำหนักรวมของเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักรวมของเซลล์ที่มีเซลล์} - \text{น้ำหนักรวมของเซลล์เปล่า}}{\text{น้ำหนักรวมของเซลล์เปล่า}} \times 1000$$

10

3. การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำหมัก

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรวม (กรัมต่อลิตร)} = \text{OD}_{490} \times \text{ความชัน}^{-1} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

4. การคำนวณปริมาณยูเรียในน้ำหมัก

ปริมาณยูเรีย (กรัมต่อลิตร) = $\frac{\text{ความเข้มข้นของยูเรีย 1 กรัมต่อลิตร} \times \% \text{ไนโตรเจน}}{\% \text{ไนโตรเจนในยูเรีย 1 กรัมต่อลิตร}}$

5. การคำนวณปริมาณ P(3HB) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

การคำนวณปริมาณ P(3HB) (กรัมต่อลิตร ต่อเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม) ทำการประมวลผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Star chromatogram: version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณ P(3HB) (กรัมต่อลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในสถานะเดียวกัน ดังนี้

ปริมาณ P(3HB) (กรัมต่อลิตร) = $\frac{\text{ค่าจากการวิเคราะห์(กรัมต่อลิตร)} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร)}}{20}$

6. การหาความบริสุทธิ์และการกู้คืน P(3HB) ที่แยกได้

ตัวอย่างเช่น การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

นำเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม นำไปสกัด P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ ด้วยการเติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร และเติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3% ปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสนาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่าง แรงนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,380 g นาน 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม นำไป วิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

นำเซลล์ที่คิดเป็นน้ำหนักแห้ง 20 มิลลิกรัม นำไปสกัด P(3HB) ด้วยการเติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสนาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่า อย่างแรงนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,380 g นาน 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์มไปทำ แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ทำให้ทราบค่าของ น้ำหนักวัตถุแห้ง คือ P(3HB) ที่อาจมีการปนเปื้อนของ NPCMs และนำวัตถุแห้งที่ได้ไปวิเคราะห์ ปริมาณ P(3HB) ที่แยกได้ ด้วยการเติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร และเติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรด ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3% ปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดเบนโซอิกเป็น สารมาตรฐานภายใน ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 80 องศา เซลเซียสนาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ ความเร็ว 1,380 g นาน 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม นำไปวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB)) ที่แยกได้ โดย วิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

จากผลการทดลองแสดงในภาคผนวก จ โดยเซลล์แห้ง 20 มิลลิกรัม เมื่อสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม ได้ปริมาณ P(3HB) ที่แยกได้ ปริมาณ P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ และน้ำหนักวัตถุแห้ง เท่ากับ 8.50, 9.71 และ 10.00 กรัม ตามลำดับ สามารถคำนวณความบริสุทธิ์และการกู้คืนได้จาก

ความบริสุทธิ์ (โดยน้ำหนัก) = $\frac{\text{น้ำหนักของ P(3HB) ที่แยกได้ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักของวัตถุแห้ง (กรัม)}}$

$$= \frac{8.50 \times 100}{10.00}$$

$$= 85\% \text{ โดยน้ำหนัก}$$

ดังนั้น ความบริสุทธิ์ของ P(3HB) จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มประมาณ 85% โดยน้ำหนัก

$$\text{การกู้คืน (โดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{น้ำหนักของ P(3HB) ที่แยกได้ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักของ P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ (กรัม)}}$$

$$= \frac{8.50 \times 100}{9.71}$$

$$= 87\% \text{ โดยน้ำหนัก}$$

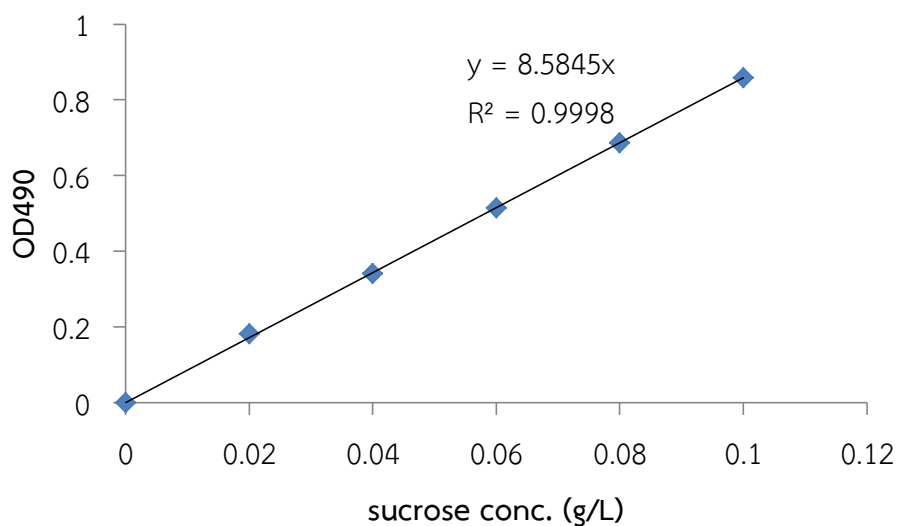
ดังนั้น การกู้คืนของ P(3HB) จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มประมาณ 87% โดยน้ำหนัก



ภาคผนวก ค

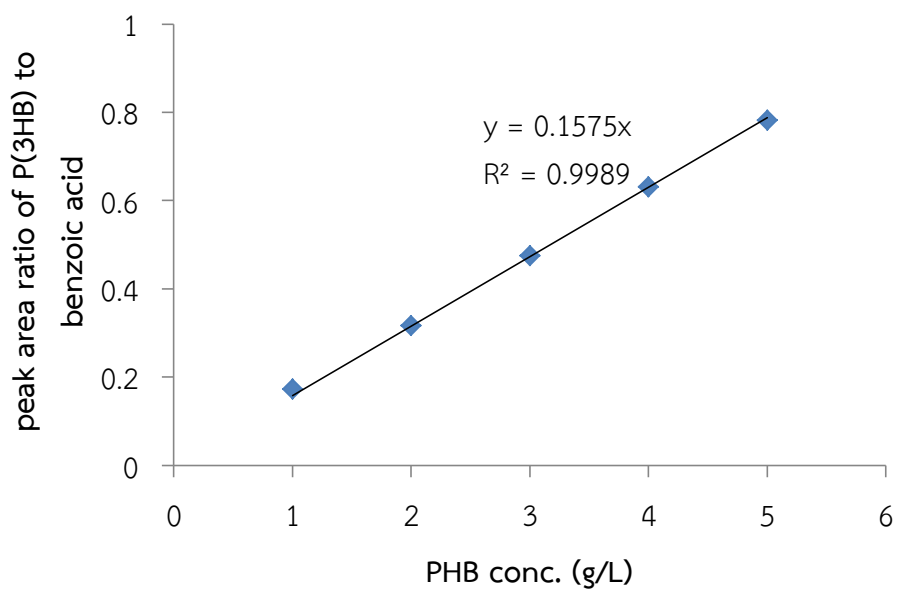
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรวม



กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสในช่วง 0-1.0 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 8.5845

2. กราฟมาตรฐาน P(3HB) วิเคราะห์ด้วยวิธี GC

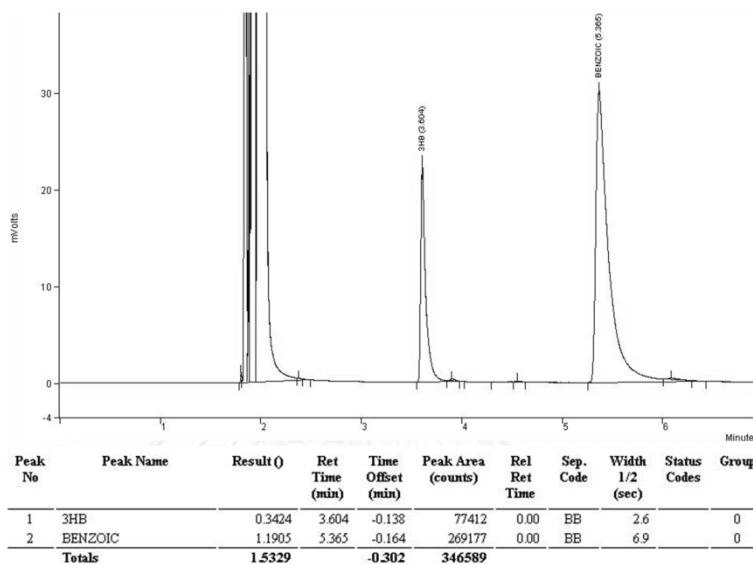


กราฟมาตรฐานของ P(3HB) ความเข้มข้น 0-5 กรัมต่อลิตร มีค่าความชันเท่ากับ 0.1575

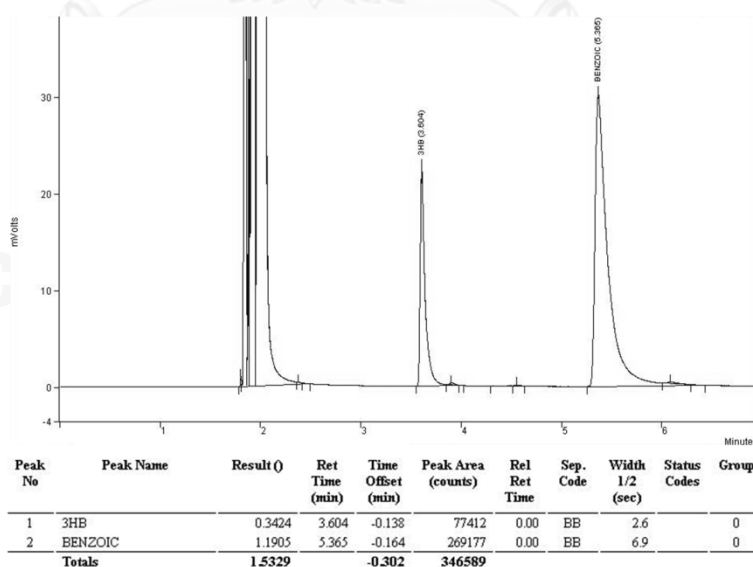
ภาคผนวก ง

โครมาโทแกรม

1. โครมาโทแกรมการวิเคราะห์ปริมาณ P(3HB) โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

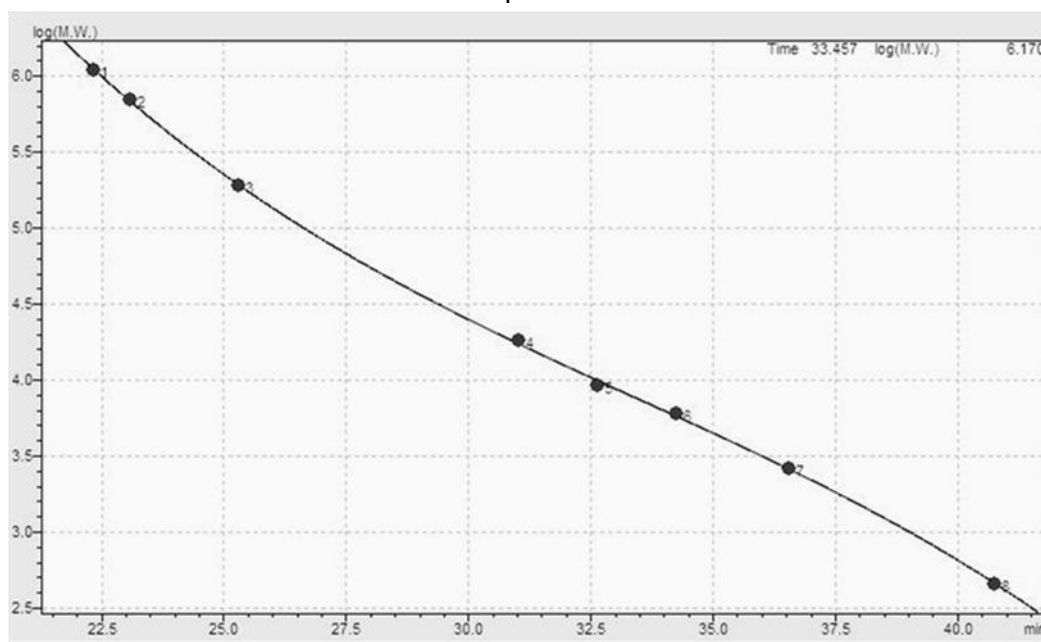


โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (3HB) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน

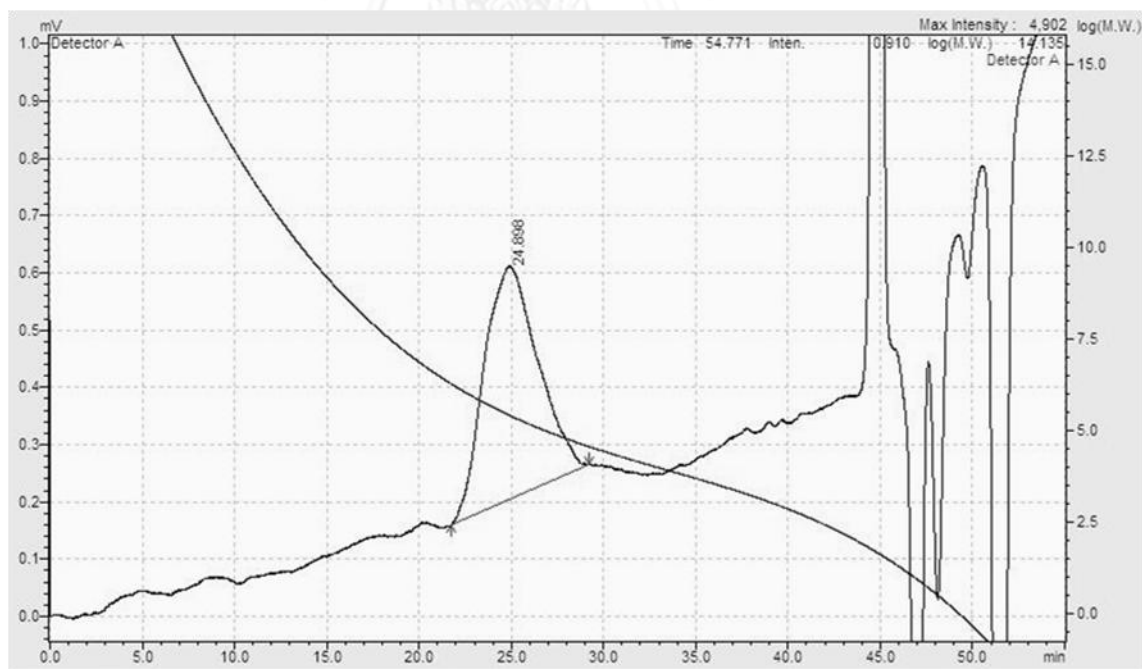


โครมาโทแกรมของ P(3HB) ซึ่งผลิตได้จาก *B. megaterium* BA-019 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GC โดยใช้กรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายใน

2. โครมาโทแกรมการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล P(3HB) โดยวิธี GPC



โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน PS ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GPC



โครมาโทแกรมของ P(3HB) ซึ่งผลิตได้จาก *B. megaterium* BA-019 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี GPC

ภาคผนวก จ

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 ปริมาณ P(3HB) ที่แยกได้ ปริมาณ P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ และปริมาณของวัตถุแห้ง เมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019

สารเคมี	P(3HB) ที่แยกได้ (g)	P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ (g)	น้ำหนักวัตถุแห้ง (g)
CHCl ₃	8.50 ± 0.45	9.71 ± 1.43	10.00 ± 1.20
CH ₂ Cl ₂	7.67 ± 1.14	9.13 ± 0.26	10.20 ± 1.20
EA	6.43 ± 1.89	8.47 ± 0.69	9.47 ± 1.14
IA	3.45 ± 0.88	6.00 ± 0.79	9.78 ± 2.24
LAS-99	4.53 ± 0.30	7.03 ± 0.52	8.71 ± 1.20
SDS	5.17 ± 0.69	7.23 ± 1.05	10.24 ± 1.40
Brij [®] 58	5.37 ± 0.94	7.50 ± 0.45	10.06 ± 1.25
Tween 80	4.77 ± 0.69	6.07 ± 0.69	9.40 ± 0.59
Triton-X	4.27 ± 0.94	6.50 ± 0.91	10.30 ± 1.35
H ₂ SO ₄	2.06 ± 0.18	3.63 ± 0.69	4.07 ± 0.21
HCl	2.44 ± 0.09	4.00 ± 0.09	4.41 ± 1.11
NaOH	5.96 ± 1.02	7.67 ± 0.54	8.12 ± 0.80
KOH	5.10 ± 0.23	7.07 ± 0.21	7.89 ± 0.25
H ₂ O	3.50 ± 1.20	4.93 ± 0.69	11.31 ± 1.41

ตารางที่ 2 ปริมาณ P(3HB) ที่แยกได้ ปริมาณ P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ และปริมาณของวัตถุแห้ง เมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์เปียกของ *B. megaterium* BA-019

สารเคมี	P(3HB) ที่แยกได้ (g)	P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ (g)	น้ำหนักวัตถุแห้ง (g)
CHCl ₃	9.82 ± 0.57	11.55 ± 0.45	12.35 ± 0.95
CH ₂ Cl ₂	7.64 ± 0.95	10.12 ± 0.48	10.42 ± 0.95
EA	6.87 ± 1.59	10.24 ± 0.98	11.40 ± 1.00
IA	3.87 ± 0.49	5.82 ± 0.71	9.58 ± 0.97
LAS-99	4.96 ± 0.07	6.43 ± 0.39	7.51 ± 0.54
SDS	4.49 ± 0.51	5.75 ± 1.20	8.05 ± 0.07
Brij [®] 58	4.29 ± 1.34	6.82 ± 0.67	7.01 ± 0.20
Tween 80	2.47 ± 0.57	3.49 ± 0.95	4.53 ± 0.78
Triton-X	1.35 ± 0.07	2.01 ± 0.21	2.61 ± 0.13
H ₂ SO ₄	2.29 ± 0.18	4.01 ± 0.07	5.00 ± 0.15
HCl	2.36 ± 0.16	3.91 ± 0.15	4.58 ± 0.20
NaOH	4.17 ± 0.19	5.12 ± 0.81	7.14 ± 1.10
KOH	4.01 ± 0.12	5.35 ± 0.20	7.34 ± 1.00
H ₂ O	1.12 ± 0.34	1.99 ± 0.16	3.28 ± 1.23

ตารางที่ 3 ปริมาณ P(3HB) ที่แยกได้ ปริมาณ P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ และปริมาณของวัตถุแห้ง เมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลร่วมกับการใช้สารเคมี

สารเคมี	เวลา (นาที)	P(3HB) ที่แยกได้ (g)	P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ (g)	น้ำหนักวัตถุแห้ง (g)
H ₂ O	0	1.12 ± 0.34	1.99 ± 0.16	3.28 ± 1.23
H ₂ O	10	4.28 ± 0.35	5.01 ± 0.46	8.51 ± 0.23
H ₂ O	20	4.45 ± 0.45	5.06 ± 0.16	8.59 ± 0.23
LAS-99	0	4.96 ± 0.07	6.43 ± 0.39	7.51 ± 0.54
LAS-99	10	7.29 ± 1.11	7.97 ± 1.14	8.17 ± 1.46
LAS-99	20	7.40 ± 0.23	7.90 ± 0.39	8.97 ± 0.42
NaOH	0	5.96 ± 1.02	7.67 ± 0.54	8.12 ± 0.80
NaOH	10	5.94 ± 0.37	7.37 ± 0.33	7.96 ± 0.29
NaOH	20	5.77 ± 0.39	7.31 ± 0.24	8.02 ± 0.16

ตารางที่ 4 ปริมาณ P(3HB) ที่แยกได้ ปริมาณ P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ และปริมาณของวัตถุแห้ง เมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 โดยการเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพรีทรีทเมนต์

สารเคมี	สถานะ	P(3HB) ที่แยกได้ (g)	P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ (g)	น้ำหนักวัตถุแห้ง (g)
NaOH	non-pretreat	5.94 ± 0.37	7.37 ± 0.33	7.96 ± 0.29
NaOH	pretreat	7.19 ± 0.83	8.54 ± 0.26	8.82 ± 0.08
LAS-99	non-pretreat	7.29 ± 1.11	7.97 ± 1.14	8.17 ± 1.46
LAS-99	pretreat	7.16 ± 0.44	7.93 ± 0.59	8.70 ± 0.42

ตารางที่ 5 ปริมาณ P(3HB) ที่แยกได้ ปริมาณ P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ และปริมาณของวัตถุแห้ง เมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019 ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยการเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการพอลิชซึ่ง

สารเคมี	สถานะ	P(3HB) ที่แยกได้ (g)	P(3HB) ที่สะสมในเซลล์ (g)	น้ำหนักวัตถุแห้ง (g)
NaOH	non-polishing	7.19 ± 0.83	8.54 ± 0.226	8.82 ± 0.09
NaOH	polishing	7.80 ± 0.87	8.10 ± 0.37	8.83 ± 0.06
LAS-99	non-polishing	7.29 ± 1.11	7.97 ± 1.14	8.12 ± 1.46
LAS-99	polishing	7.77 ± 1.14	7.84 ± 0.53	8.15 ± 0.58

ภาคผนวก ฉ

ผลการทดสอบทางสถิติ

1. ข้อมูลทางสถิติของความบริสุทธิ์และการกักคืน เมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์แห้งของ *B. megaterium* BA-019

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
						Purity	1		
	2	3	75.1947	3.03999	1.75514	67.6429	82.7464	71.84	77.78
	3	3	67.9181	2.78512	1.60799	60.9994	74.8367	66.30	71.13
	4	3	35.4067	3.06782	1.77121	27.7858	43.0276	31.87	37.30
	5	3	52.0333	2.19293	1.26609	46.5858	57.4809	49.56	53.74
	6	3	50.4833	1.25731	.72591	47.3600	53.6067	49.50	51.90
	7	3	53.3367	.67870	.39185	51.6507	55.0227	52.84	54.11
	8	3	50.7433	2.10182	1.21348	45.5221	55.9645	48.32	52.07
	9	3	41.4867	3.26794	1.88675	33.3687	49.6047	38.97	45.18
	10	3	50.5400	1.35967	.78501	47.1624	53.9176	49.75	52.11
	11	3	55.3667	3.11001	1.79556	47.6410	63.0923	52.84	58.84
	12	3	73.3867	2.14526	1.23857	68.0575	78.7158	71.16	75.44
	13	3	64.7133	.89768	.51828	62.4834	66.9433	64.03	65.73
	14	3	30.9833	2.65429	1.53245	24.3897	37.5769	27.95	32.88
	Total	42	56.1869	15.18588	2.34323	51.4546	60.9191	27.95	86.60
Recovery	1	3	87.6100	1.93233	1.11563	82.8098	92.4102	86.43	89.84
	2	3	83.9533	3.24183	1.87167	75.9002	92.0065	80.43	86.81
	3	3	75.9467	3.72283	2.14937	66.6987	85.1947	73.49	80.23

4	3	57.5300	1.98464	1.14583	52.5999	62.4601	55.25	58.87
5	3	64.4200	1.31465	.75901	61.1542	67.6858	62.96	65.51
6	3	71.4667	2.81020	1.62247	64.4857	78.4476	69.33	74.65
7	3	71.5900	3.71641	2.14567	62.3579	80.8221	68.42	75.68
8	3	78.6433	4.43018	2.55777	67.6381	89.6485	74.19	83.05
9	3	65.7333	4.93731	2.85056	53.4684	77.9983	62.69	71.43
10	3	56.6467	1.71902	.99248	52.3764	60.9170	55.26	58.57
11	3	60.8700	.59808	.34530	59.3843	62.3557	60.20	61.35
12	3	77.7233	3.65433	2.10983	68.6455	86.8012	73.55	80.35
13	3	72.1833	.25541	.14746	71.5489	72.8178	71.98	72.47
14	3	70.9933	5.89536	3.40369	56.3485	85.6382	65.31	77.08
Total	42	71.0936	9.50754	1.46704	68.1308	74.0563	55.25	89.84

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Purity	1.673	13	28	.123
Recovery	1.914	13	28	.073

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Purity	Between Groups	9306.659	13	715.897	135.080	.000
	Within Groups	148.394	28	5.300		
	Total	9455.053	41			
Recovery	Between Groups	3404.184	13	261.860	24.283	.000
	Within Groups	301.939	28	10.784		
	Total	3706.123	41			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
purity	1	2	9.82870*	1.87968	.001	2.9483	16.7091
		3	17.10531*	1.87968	.000	10.2249	23.9857
		4	49.61663*	1.87968	.000	42.7363	56.4970
		5	32.99003*	1.87968	.000	26.1096	39.8704
		6	34.54003*	1.87968	.000	27.6596	41.4204
		7	31.68669*	1.87968	.000	24.8063	38.5671
		8	34.28003*	1.87968	.000	27.3996	41.1604
		9	43.53669*	1.87968	.000	36.6563	50.4171
		10	34.48336*	1.87968	.000	27.6030	41.3637
		11	29.65669*	1.87968	.000	22.7763	36.5371
		12	11.63669*	1.87968	.000	4.7563	18.5171
		13	20.31003*	1.87968	.000	13.4296	27.1904
		14	54.04003*	1.87968	.000	47.1596	60.9204
		2	1	-9.82870*	1.87968	.001	-16.7091
	3		7.27661*	1.87968	.031	.3962	14.1570
	4		39.78793*	1.87968	.000	32.9076	46.6683
	5		23.16133*	1.87968	.000	16.2809	30.0417
	6		24.71133*	1.87968	.000	17.8309	31.5917
	7		21.85799*	1.87968	.000	14.9776	28.7384
	8		24.45133*	1.87968	.000	17.5709	31.3317
	9		33.70799*	1.87968	.000	26.8276	40.5884
	10		24.65466*	1.87968	.000	17.7743	31.5350
	11		19.82799*	1.87968	.000	12.9476	26.7084
		12	1.80799	1.87968	.999	-5.0724	8.6884

	13	10.48133*	1.87968	.000	3.6009	17.3617
	14	44.21133*	1.87968	.000	37.3309	51.0917
3	1	-17.10531*	1.87968	.000	-23.9857	-10.2249
	2	-7.27661*	1.87968	.031	-14.1570	-.3962
	4	32.51132*	1.87968	.000	25.6309	39.3917
	5	15.88472*	1.87968	.000	9.0043	22.7651
	6	17.43472*	1.87968	.000	10.5543	24.3151
	7	14.58139*	1.87968	.000	7.7010	21.4618
	8	17.17472*	1.87968	.000	10.2943	24.0551
	9	26.43139*	1.87968	.000	19.5510	33.3118
	10	17.37805*	1.87968	.000	10.4977	24.2584
	11	12.55139*	1.87968	.000	5.6710	19.4318
	12	-5.46861	1.87968	.232	-12.3490	1.4118
	13	3.20472	1.87968	.897	-3.6757	10.0851
	14	36.93472*	1.87968	.000	30.0543	43.8151
4	1	-49.61663*	1.87968	.000	-56.4970	-42.7363
	2	-39.78793*	1.87968	.000	-46.6683	-32.9076
	3	-32.51132*	1.87968	.000	-39.3917	-25.6309
	5	-16.62660*	1.87968	.000	-23.5070	-9.7462
	6	-15.07660*	1.87968	.000	-21.9570	-8.1962
	7	-17.92994*	1.87968	.000	-24.8103	-11.0496
	8	-15.33660*	1.87968	.000	-22.2170	-8.4562
	9	-6.07994	1.87968	.125	-12.9603	.8004
	10	-15.13327*	1.87968	.000	-22.0136	-8.2529
	11	-19.95994*	1.87968	.000	-26.8403	-13.0796
	12	-37.97994*	1.87968	.000	-44.8603	-31.0996
	13	-29.30660*	1.87968	.000	-36.1870	-22.4262
	14	4.42340	1.87968	.534	-2.4570	11.3038

5	1	-32.99003*	1.87968	.000	-39.8704	-26.1096
	2	-23.16133*	1.87968	.000	-30.0417	-16.2809
	3	-15.88472*	1.87968	.000	-22.7651	-9.0043
	4	16.62660*	1.87968	.000	9.7462	23.5070
	6	1.55000	1.87968	1.000	-5.3304	8.4304
	7	-1.30333	1.87968	1.000	-8.1837	5.5770
	8	1.29000	1.87968	1.000	-5.5904	8.1704
	9	10.54667*	1.87968	.000	3.6663	17.4270
	10	1.49333	1.87968	1.000	-5.3870	8.3737
	11	-3.33333	1.87968	.870	-10.2137	3.5470
	12	-21.35333*	1.87968	.000	-28.2337	-14.4730
	13	-12.68000*	1.87968	.000	-19.5604	-5.7996
	14	21.05000*	1.87968	.000	14.1696	27.9304
	6	1	-34.54003*	1.87968	.000	-41.4204
2		-24.71133*	1.87968	.000	-31.5917	-17.8309
3		-17.43472*	1.87968	.000	-24.3151	-10.5543
4		15.07660*	1.87968	.000	8.1962	21.9570
5		-1.55000	1.87968	1.000	-8.4304	5.3304
7		-2.85333	1.87968	.953	-9.7337	4.0270
8		-.26000	1.87968	1.000	-7.1404	6.6204
9		8.99667*	1.87968	.003	2.1163	15.8770
10		-.05667	1.87968	1.000	-6.9370	6.8237
11		-4.88333	1.87968	.384	-11.7637	1.9970
12		-22.90333*	1.87968	.000	-29.7837	-16.0230
13		-14.23000*	1.87968	.000	-21.1104	-7.3496
14		19.50000*	1.87968	.000	12.6196	26.3804
7		1	-31.68669*	1.87968	.000	-38.5671
	2	-21.85799*	1.87968	.000	-28.7384	-14.9776

	3	-14.58139*	1.87968	.000	-21.4618	-7.7010
	4	17.92994*	1.87968	.000	11.0496	24.8103
	5	1.30333	1.87968	1.000	-5.5770	8.1837
	6	2.85333	1.87968	.953	-4.0270	9.7337
	8	2.59333	1.87968	.977	-4.2870	9.4737
	9	11.85000*	1.87968	.000	4.9696	18.7304
	10	2.79667	1.87968	.959	-4.0837	9.6770
	11	-2.03000	1.87968	.997	-8.9104	4.8504
	12	-20.05000*	1.87968	.000	-26.9304	-13.1696
	13	-11.37667*	1.87968	.000	-18.2570	-4.4963
	14	22.35333*	1.87968	.000	15.4730	29.2337
8	1	-34.28003*	1.87968	.000	-41.1604	-27.3996
	2	-24.45133*	1.87968	.000	-31.3317	-17.5709
	3	-17.17472*	1.87968	.000	-24.0551	-10.2943
	4	15.33660*	1.87968	.000	8.4562	22.2170
	5	-1.29000	1.87968	1.000	-8.1704	5.5904
	6	.26000	1.87968	1.000	-6.6204	7.1404
	7	-2.59333	1.87968	.977	-9.4737	4.2870
	9	9.25667*	1.87968	.002	2.3763	16.1370
	10	.20333	1.87968	1.000	-6.6770	7.0837
	11	-4.62333	1.87968	.467	-11.5037	2.2570
	12	-22.64333*	1.87968	.000	-29.5237	-15.7630
	13	-13.97000*	1.87968	.000	-20.8504	-7.0896
	14	19.76000*	1.87968	.000	12.8796	26.6404
9	1	-43.53669*	1.87968	.000	-50.4171	-36.6563
	2	-33.70799*	1.87968	.000	-40.5884	-26.8276
	3	-26.43139*	1.87968	.000	-33.3118	-19.5510
	4	6.07994	1.87968	.125	-.8004	12.9603

	5	-10.54667*	1.87968	.000	-17.4270	-3.6663
	6	-8.99667*	1.87968	.003	-15.8770	-2.1163
	7	-11.85000*	1.87968	.000	-18.7304	-4.9696
	8	-9.25667*	1.87968	.002	-16.1370	-2.3763
	10	-9.05333*	1.87968	.003	-15.9337	-2.1730
	11	-13.88000*	1.87968	.000	-20.7604	-6.9996
	12	-31.90000*	1.87968	.000	-38.7804	-25.0196
	13	-23.22667*	1.87968	.000	-30.1070	-16.3463
	14	10.50333*	1.87968	.000	3.6230	17.3837
10	1	-34.48336*	1.87968	.000	-41.3637	-27.6030
	2	-24.65466*	1.87968	.000	-31.5350	-17.7743
	3	-17.37805*	1.87968	.000	-24.2584	-10.4977
	4	15.13327*	1.87968	.000	8.2529	22.0136
	5	-1.49333	1.87968	1.000	-8.3737	5.3870
	6	.05667	1.87968	1.000	-6.8237	6.9370
	7	-2.79667	1.87968	.959	-9.6770	4.0837
	8	-.20333	1.87968	1.000	-7.0837	6.6770
	9	9.05333*	1.87968	.003	2.1730	15.9337
	11	-4.82667	1.87968	.402	-11.7070	2.0537
	12	-22.84667*	1.87968	.000	-29.7270	-15.9663
	13	-14.17333*	1.87968	.000	-21.0537	-7.2930
	14	19.55667*	1.87968	.000	12.6763	26.4370
11	1	-29.65669*	1.87968	.000	-36.5371	-22.7763
	2	-19.82799*	1.87968	.000	-26.7084	-12.9476
	3	-12.55139*	1.87968	.000	-19.4318	-5.6710
	4	19.95994*	1.87968	.000	13.0796	26.8403
	5	3.33333	1.87968	.870	-3.5470	10.2137
	6	4.88333	1.87968	.384	-1.9970	11.7637

	7	2.03000	1.87968	.997	-4.8504	8.9104
	8	4.62333	1.87968	.467	-2.2570	11.5037
	9	13.88000 *	1.87968	.000	6.9996	20.7604
	10	4.82667	1.87968	.402	-2.0537	11.7070
	12	-18.02000 *	1.87968	.000	-24.9004	-11.1396
	13	-9.34667 *	1.87968	.002	-16.2270	-2.4663
	14	24.38333 *	1.87968	.000	17.5030	31.2637
12	1	-11.63669 *	1.87968	.000	-18.5171	-4.7563
	2	-1.80799	1.87968	.999	-8.6884	5.0724
	3	5.46861	1.87968	.232	-1.4118	12.3490
	4	37.97994 *	1.87968	.000	31.0996	44.8603
	5	21.35333 *	1.87968	.000	14.4730	28.2337
	6	22.90333 *	1.87968	.000	16.0230	29.7837
	7	20.05000 *	1.87968	.000	13.1696	26.9304
	8	22.64333 *	1.87968	.000	15.7630	29.5237
	9	31.90000 *	1.87968	.000	25.0196	38.7804
	10	22.84667 *	1.87968	.000	15.9663	29.7270
	11	18.02000 *	1.87968	.000	11.1396	24.9004
	13	8.67333 *	1.87968	.005	1.7930	15.5537
	14	42.40333 *	1.87968	.000	35.5230	49.2837
13	1	-20.31003 *	1.87968	.000	-27.1904	-13.4296
	2	-10.48133 *	1.87968	.000	-17.3617	-3.6009
	3	-3.20472	1.87968	.897	-10.0851	3.6757
	4	29.30660 *	1.87968	.000	22.4262	36.1870
	5	12.68000 *	1.87968	.000	5.7996	19.5604
	6	14.23000 *	1.87968	.000	7.3496	21.1104
	7	11.37667 *	1.87968	.000	4.4963	18.2570
	8	13.97000 *	1.87968	.000	7.0896	20.8504

	9	23.22667*	1.87968	.000	16.3463	30.1070	
	10	14.17333*	1.87968	.000	7.2930	21.0537	
	11	9.34667*	1.87968	.002	2.4663	16.2270	
	12	-8.67333*	1.87968	.005	-15.5537	-1.7930	
	14	33.73000*	1.87968	.000	26.8496	40.6104	
14	1	-54.04003*	1.87968	.000	-60.9204	-47.1596	
	2	-44.21133*	1.87968	.000	-51.0917	-37.3309	
	3	-36.93472*	1.87968	.000	-43.8151	-30.0543	
	4	-4.42340	1.87968	.534	-11.3038	2.4570	
	5	-21.05000*	1.87968	.000	-27.9304	-14.1696	
	6	-19.50000*	1.87968	.000	-26.3804	-12.6196	
	7	-22.35333*	1.87968	.000	-29.2337	-15.4730	
	8	-19.76000*	1.87968	.000	-26.6404	-12.8796	
	9	-10.50333*	1.87968	.000	-17.3837	-3.6230	
	10	-19.55667*	1.87968	.000	-26.4370	-12.6763	
	11	-24.38333*	1.87968	.000	-31.2637	-17.5030	
	12	-42.40333*	1.87968	.000	-49.2837	-35.5230	
	13	-33.73000*	1.87968	.000	-40.6104	-26.8496	
recovery	1	2	3.65667	2.68124	.979	-6.1577	13.4711
		3	11.66333*	2.68124	.010	1.8489	21.4777
		4	30.08000*	2.68124	.000	20.2656	39.8944
		5	23.19000*	2.68124	.000	13.3756	33.0044
		6	16.14333*	2.68124	.000	6.3289	25.9577
		7	16.02000*	2.68124	.000	6.2056	25.8344
		8	8.96667	2.68124	.100	-.8477	18.7811
		9	21.87667*	2.68124	.000	12.0623	31.6911
		10	30.96333*	2.68124	.000	21.1489	40.7777
		11	26.74000*	2.68124	.000	16.9256	36.5544
		12	9.88667*	2.68124	.047	.0723	19.7011

	13	15.42667*	2.68124	.000	5.6123	25.2411
	14	16.61667*	2.68124	.000	6.8023	26.4311
2	1	-3.65667	2.68124	.979	-13.4711	6.1577
	3	8.00667	2.68124	.202	-1.8077	17.8211
	4	26.42333*	2.68124	.000	16.6089	36.2377
	5	19.53333*	2.68124	.000	9.7189	29.3477
	6	12.48667*	2.68124	.004	2.6723	22.3011
	7	12.36333*	2.68124	.005	2.5489	22.1777
	8	5.31000	2.68124	.766	-4.5044	15.1244
	9	18.22000*	2.68124	.000	8.4056	28.0344
	10	27.30667*	2.68124	.000	17.4923	37.1211
	11	23.08333*	2.68124	.000	13.2689	32.8977
	12	6.23000	2.68124	.553	-3.5844	16.0444
	13	11.77000*	2.68124	.009	1.9556	21.5844
	14	12.96000*	2.68124	.003	3.1456	22.7744
3	1	-11.66333*	2.68124	.010	-21.4777	-1.8489
	2	-8.00667	2.68124	.202	-17.8211	1.8077
	4	18.41667*	2.68124	.000	8.6023	28.2311
	5	11.52667*	2.68124	.011	1.7123	21.3411
	6	4.48000	2.68124	.909	-5.3344	14.2944
	7	4.35667	2.68124	.924	-5.4577	14.1711
	8	-2.69667	2.68124	.999	-12.5111	7.1177
	9	10.21333*	2.68124	.036	.3989	20.0277
	10	19.30000*	2.68124	.000	9.4856	29.1144
	11	15.07667*	2.68124	.000	5.2623	24.8911
	12	-1.77667	2.68124	1.000	-11.5911	8.0377
	13	3.76333	2.68124	.974	-6.0511	13.5777

	14	4.95333	2.68124	.836	-4.8611	14.7677
4	1	-30.08000*	2.68124	.000	-39.8944	-20.2656
	2	-26.42333*	2.68124	.000	-36.2377	-16.6089
	3	-18.41667*	2.68124	.000	-28.2311	-8.6023
	5	-6.89000	2.68124	.401	-16.7044	2.9244
	6	-13.93667*	2.68124	.001	-23.7511	-4.1223
	7	-14.06000*	2.68124	.001	-23.8744	-4.2456
	8	-21.11333*	2.68124	.000	-30.9277	-11.2989
	9	-8.20333	2.68124	.176	-18.0177	1.6111
	10	.88333	2.68124	1.000	-8.9311	10.6977
	11	-3.34000	2.68124	.990	-13.1544	6.4744
	12	-20.19333*	2.68124	.000	-30.0077	-10.3789
	13	-14.65333*	2.68124	.001	-24.4677	-4.8389
	14	-13.46333*	2.68124	.002	-23.2777	-3.6489
5	1	-23.19000*	2.68124	.000	-33.0044	-13.3756
	2	-19.53333*	2.68124	.000	-29.3477	-9.7189
	3	-11.52667*	2.68124	.011	-21.3411	-1.7123
	4	6.89000	2.68124	.401	-2.9244	16.7044
	6	-7.04667	2.68124	.368	-16.8611	2.7677
	7	-7.17000	2.68124	.343	-16.9844	2.6444
	8	-14.22333*	2.68124	.001	-24.0377	-4.4089
	9	-1.31333	2.68124	1.000	-11.1277	8.5011
	10	7.77333	2.68124	.236	-2.0411	17.5877
	11	3.55000	2.68124	.983	-6.2644	13.3644
	12	-13.30333*	2.68124	.002	-23.1177	-3.4889
	13	-7.76333	2.68124	.237	-17.5777	2.0511
	14	-6.57333	2.68124	.471	-16.3877	3.2411
6	1	-16.14333*	2.68124	.000	-25.9577	-6.3289
	2	-12.48667*	2.68124	.004	-22.3011	-2.6723

	3	-4.48000	2.68124	.909	-14.2944	5.3344
	4	13.93667*	2.68124	.001	4.1223	23.7511
	5	7.04667	2.68124	.368	-2.7677	16.8611
	7	-.12333	2.68124	1.000	-9.9377	9.6911
	8	-7.17667	2.68124	.341	-16.9911	2.6377
	9	5.73333	2.68124	.671	-4.0811	15.5477
	10	14.82000*	2.68124	.000	5.0056	24.6344
	11	10.59667*	2.68124	.025	.7823	20.4111
	12	-6.25667	2.68124	.546	-16.0711	3.5577
	13	-.71667	2.68124	1.000	-10.5311	9.0977
	14	.47333	2.68124	1.000	-9.3411	10.2877
7	1	-16.02000*	2.68124	.000	-25.8344	-6.2056
	2	-12.36333*	2.68124	.005	-22.1777	-2.5489
	3	-4.35667	2.68124	.924	-14.1711	5.4577
	4	14.06000*	2.68124	.001	4.2456	23.8744
	5	7.17000	2.68124	.343	-2.6444	16.9844
	6	.12333	2.68124	1.000	-9.6911	9.9377
	8	-7.05333	2.68124	.366	-16.8677	2.7611
	9	5.85667	2.68124	.642	-3.9577	15.6711
	10	14.94333*	2.68124	.000	5.1289	24.7577
	11	10.72000*	2.68124	.023	.9056	20.5344
	12	-6.13333	2.68124	.576	-15.9477	3.6811
	13	-.59333	2.68124	1.000	-10.4077	9.2211
	14	.59667	2.68124	1.000	-9.2177	10.4111
8	1	-8.96667	2.68124	.100	-18.7811	.8477
	2	-5.31000	2.68124	.766	-15.1244	4.5044
	3	2.69667	2.68124	.999	-7.1177	12.5111
	4	21.11333*	2.68124	.000	11.2989	30.9277
	5	14.22333*	2.68124	.001	4.4089	24.0377

	6	7.17667	2.68124	.341	-2.6377	16.9911
	7	7.05333	2.68124	.366	-2.7611	16.8677
	9	12.91000*	2.68124	.003	3.0956	22.7244
	10	21.99667*	2.68124	.000	12.1823	31.8111
	11	17.77333*	2.68124	.000	7.9589	27.5877
	12	.92000	2.68124	1.000	-8.8944	10.7344
	13	6.46000	2.68124	.498	-3.3544	16.2744
	14	7.65000	2.68124	.255	-2.1644	17.4644
9	1	-21.87667*	2.68124	.000	-31.6911	-12.0623
	2	-18.22000*	2.68124	.000	-28.0344	-8.4056
	3	-10.21333*	2.68124	.036	-20.0277	-.3989
	4	8.20333	2.68124	.176	-1.6111	18.0177
	5	1.31333	2.68124	1.000	-8.5011	11.1277
	6	-5.73333	2.68124	.671	-15.5477	4.0811
	7	-5.85667	2.68124	.642	-15.6711	3.9577
	8	-12.91000*	2.68124	.003	-22.7244	-3.0956
	10	9.08667	2.68124	.091	-.7277	18.9011
	11	4.86333	2.68124	.852	-4.9511	14.6777
	12	-11.99000*	2.68124	.007	-21.8044	-2.1756
	13	-6.45000	2.68124	.500	-16.2644	3.3644
	14	-5.26000	2.68124	.777	-15.0744	4.5544
10	1	-30.96333*	2.68124	.000	-40.7777	-21.1489
	2	-27.30667*	2.68124	.000	-37.1211	-17.4923
	3	-19.30000*	2.68124	.000	-29.1144	-9.4856
	4	-.88333	2.68124	1.000	-10.6977	8.9311
	5	-7.77333	2.68124	.236	-17.5877	2.0411
	6	-14.82000*	2.68124	.000	-24.6344	-5.0056
	7	-14.94333*	2.68124	.000	-24.7577	-5.1289
	8	-21.99667*	2.68124	.000	-31.8111	-12.1823

	9	-9.08667	2.68124	.091	-18.9011	.7277
	11	-4.22333	2.68124	.939	-14.0377	5.5911
	12	-21.07667*	2.68124	.000	-30.8911	-11.2623
	13	-15.53667*	2.68124	.000	-25.3511	-5.7223
	14	-14.34667*	2.68124	.001	-24.1611	-4.5323
11	1	-26.74000*	2.68124	.000	-36.5544	-16.9256
	2	-23.08333*	2.68124	.000	-32.8977	-13.2689
	3	-15.07667*	2.68124	.000	-24.8911	-5.2623
	4	3.34000	2.68124	.990	-6.4744	13.1544
	5	-3.55000	2.68124	.983	-13.3644	6.2644
	6	-10.59667*	2.68124	.025	-20.4111	-.7823
	7	-10.72000*	2.68124	.023	-20.5344	-.9056
	8	-17.77333*	2.68124	.000	-27.5877	-7.9589
	9	-4.86333	2.68124	.852	-14.6777	4.9511
	10	4.22333	2.68124	.939	-5.5911	14.0377
	12	-16.85333*	2.68124	.000	-26.6677	-7.0389
	13	-11.31333*	2.68124	.013	-21.1277	-1.4989
	14	-10.12333*	2.68124	.038	-19.9377	-.3089
12	1	-9.88667*	2.68124	.047	-19.7011	-.0723
	2	-6.23000	2.68124	.553	-16.0444	3.5844
	3	1.77667	2.68124	1.000	-8.0377	11.5911
	4	20.19333*	2.68124	.000	10.3789	30.0077
	5	13.30333*	2.68124	.002	3.4889	23.1177
	6	6.25667	2.68124	.546	-3.5577	16.0711
	7	6.13333	2.68124	.576	-3.6811	15.9477
	8	-.92000	2.68124	1.000	-10.7344	8.8944
	9	11.99000*	2.68124	.007	2.1756	21.8044
	10	21.07667*	2.68124	.000	11.2623	30.8911
	11	16.85333*	2.68124	.000	7.0389	26.6677

	13	5.54000	2.68124	.716	-4.2744	15.3544
	14	6.73000	2.68124	.436	-3.0844	16.5444
13	1	-15.42667*	2.68124	.000	-25.2411	-5.6123
	2	-11.77000*	2.68124	.009	-21.5844	-1.9556
	3	-3.76333	2.68124	.974	-13.5777	6.0511
	4	14.65333*	2.68124	.001	4.8389	24.4677
	5	7.76333	2.68124	.237	-2.0511	17.5777
	6	.71667	2.68124	1.000	-9.0977	10.5311
	7	.59333	2.68124	1.000	-9.2211	10.4077
	8	-6.46000	2.68124	.498	-16.2744	3.3544
	9	6.45000	2.68124	.500	-3.3644	16.2644
	10	15.53667*	2.68124	.000	5.7223	25.3511
	11	11.31333*	2.68124	.013	1.4989	21.1277
	12	-5.54000	2.68124	.716	-15.3544	4.2744
	14	1.19000	2.68124	1.000	-8.6244	11.0044
14	1	-16.61667*	2.68124	.000	-26.4311	-6.8023
	2	-12.96000*	2.68124	.003	-22.7744	-3.1456
	3	-4.95333	2.68124	.836	-14.7677	4.8611
	4	13.46333*	2.68124	.002	3.6489	23.2777
	5	6.57333	2.68124	.471	-3.2411	16.3877
	6	-.47333	2.68124	1.000	-10.2877	9.3411
	7	-.59667	2.68124	1.000	-10.4111	9.2177
	8	-7.65000	2.68124	.255	-17.4644	2.1644
	9	5.26000	2.68124	.777	-4.5544	15.0744
	10	14.34667*	2.68124	.001	4.5323	24.1611
	11	10.12333*	2.68124	.038	.3089	19.9377
	12	-6.73000	2.68124	.436	-16.5444	3.0844
	13	-1.19000	2.68124	1.000	-11.0044	8.6244

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(เมื่อ 1: คลอโรฟอร์ม/2: ไตคลอโรมีเทน/3: เอทิลแอลกอฮอล์/4: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์/5: LAS-99/6: SDS /7: Brij[®] 58/8: Tween 80/9: Triton-X 100/10: กรดซัลฟิวริก/11: กรดไฮโดรคลอริก/12: สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์/13: สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และ /14: น้ำ)

Homogeneous Subsets

purity

Tukey HSD^a

chem	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
14	3	30.9833						
4	3	35.4067	35.4067					
9	3		41.4867					
6	3			50.4833				
10	3			50.5400				
8	3			50.7433				
5	3			52.0333				
7	3			53.3367				
11	3			55.3667				
13	3				64.7133			
3	3				67.9181	67.9181		
12	3					73.3867	73.3867	
2	3						75.1947	
1	3							85.0234
Sig.		.534	.125	.384	.897	.232	.999	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Recovery

Tukey HSD^a

chem	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
10	3	56.6467				

4	3	57.5300				
11	3	60.8700				
5	3	64.4200	64.4200			
9	3	65.7333	65.7333			
14	3		70.9933	70.9933		
6	3		71.4667	71.4667		
7	3		71.5900	71.5900		
13	3		72.1833	72.1833		
3	3			75.9467	75.9467	
12	3			77.7233	77.7233	
8	3			78.6433	78.6433	78.6433
2	3				83.9533	83.9533
1	3					87.6100
Sig.		.091	.237	.255	.202	.100

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



2. ข้อมูลทางสถิติของความบริสุทธิ์และการกักคืน เมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์เป็ยกของ *B. megaterium* BA-019

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
						Purity	1		
	2	3	73.4133	.74809	.43191	71.5550	75.2717	72.61	74.09
	3	3	60.2900	1.87200	1.08080	55.6397	64.9403	58.47	62.21
	4	3	40.4167	.64291	.37118	38.8196	42.0137	39.95	41.15
	5	3	66.0767	1.18357	.68333	63.1365	69.0168	64.71	66.76
	6	3	55.8000	1.42084	.82033	52.2704	59.3296	54.16	56.66
	7	3	61.2067	4.38473	2.53152	50.3144	72.0989	57.94	66.19
	8	3	54.4833	3.80356	2.19598	45.0348	63.9319	50.11	57.02
	9	3	51.5367	.89271	.51541	49.3190	53.7543	50.57	52.33
	10	3	45.8367	1.08556	.62675	43.1400	48.5333	44.82	46.98
	11	3	51.4567	.89857	.51879	49.2245	53.6888	50.43	52.10
	12	3	58.3967	1.83394	1.05883	53.8409	62.9524	56.33	59.83
	13	3	54.6633	1.62112	.93595	50.6362	58.6904	53.31	56.46
	14	3	34.3467	2.70001	1.55885	27.6395	41.0539	31.46	36.81
	Total	42	56.2457	11.81450	1.82302	52.5641	59.9274	31.46	80.98
Recovery	1	3	85.0033	.86153	.49740	82.8632	87.1435	84.04	85.70
	2	3	75.5700	.76374	.44095	73.6728	77.4672	74.69	76.06
	3	3	67.0600	1.01000	.58312	64.5510	69.5690	66.05	68.07
	4	3	66.5800	.77949	.45004	64.6436	68.5164	65.92	67.44
	5	3	77.1967	.78691	.45432	75.2419	79.1515	76.38	77.95
	6	3	78.1400	1.70868	.98651	73.8954	82.3846	76.64	80.00

7	3	62.9467	5.60602	3.23664	49.0205	76.8728	59.04	69.37
8	3	70.8200	3.22445	1.86164	62.8100	78.8300	67.12	73.03
9	3	66.9033	1.00848	.58225	64.3981	69.4085	65.85	67.86
10	3	57.1600	1.21577	.70193	54.1399	60.1801	55.97	58.40
11	3	60.2267	1.37704	.79503	56.8059	63.6474	58.73	61.44
12	3	81.4900	2.53835	1.46551	75.1844	87.7956	78.57	83.17
13	3	74.9100	1.11297	.64257	72.1452	77.6748	73.70	75.89
14	3	56.3367	3.25033	1.87658	48.2624	64.4109	52.76	59.11
Total	42	70.0245	8.99195	1.38749	67.2224	72.8266	52.76	85.70

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
purity	3.206	13	28	.005
recovery	4.536	13	28	.000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
purity	Between Groups	5603.700	13	431.054	101.270	.000
	Within Groups	119.181	28	4.256		
	Total	5722.881	41			
recovery	Between Groups	3173.154	13	244.089	48.161	.000
	Within Groups	141.909	28	5.068		
	Total	3315.063	41			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
chem	chem						

purity	1	2	6.10333	1.68453	.054	-.0627	12.2694
		3	19.22667*	1.68453	.000	13.0606	25.3927
		4	39.10000*	1.68453	.000	32.9339	45.2661
		5	13.44000*	1.68453	.000	7.2739	19.6061
		6	23.71667*	1.68453	.000	17.5506	29.8827
		7	18.31000*	1.68453	.000	12.1439	24.4761
		8	25.03333*	1.68453	.000	18.8673	31.1994
		9	27.98000*	1.68453	.000	21.8139	34.1461
		10	33.68000*	1.68453	.000	27.5139	39.8461
		11	28.06000*	1.68453	.000	21.8939	34.2261
		12	21.12000*	1.68453	.000	14.9539	27.2861
		13	24.85333*	1.68453	.000	18.6873	31.0194
		14	45.17000*	1.68453	.000	39.0039	51.3361
		2	1	-6.10333	1.68453	.054	-12.2694
		3	13.12333*	1.68453	.000	6.9573	19.2894
		4	32.99667*	1.68453	.000	26.8306	39.1627
		5	7.33667*	1.68453	.009	1.1706	13.5027
		6	17.61333*	1.68453	.000	11.4473	23.7794
		7	12.20667*	1.68453	.000	6.0406	18.3727
		8	18.93000*	1.68453	.000	12.7639	25.0961
		9	21.87667*	1.68453	.000	15.7106	28.0427
		10	27.57667*	1.68453	.000	21.4106	33.7427
		11	21.95667*	1.68453	.000	15.7906	28.1227
		12	15.01667*	1.68453	.000	8.8506	21.1827
		13	18.75000*	1.68453	.000	12.5839	24.9161
		14	39.06667*	1.68453	.000	32.9006	45.2327
	3	1	-19.22667*	1.68453	.000	-25.3927	-13.0606
		2	-13.12333*	1.68453	.000	-19.2894	-6.9573

	4	19.87333*	1.68453	.000	13.7073	26.0394
	5	-5.78667	1.68453	.082	-11.9527	.3794
	6	4.49000	1.68453	.347	-1.6761	10.6561
	7	-.91667	1.68453	1.000	-7.0827	5.2494
	8	5.80667	1.68453	.080	-.3594	11.9727
	9	8.75333*	1.68453	.001	2.5873	14.9194
	10	14.45333*	1.68453	.000	8.2873	20.6194
	11	8.83333*	1.68453	.001	2.6673	14.9994
	12	1.89333	1.68453	.996	-4.2727	8.0594
	13	5.62667	1.68453	.100	-.5394	11.7927
	14	25.94333*	1.68453	.000	19.7773	32.1094
4	1	-39.10000*	1.68453	.000	-45.2661	-32.9339
	2	-32.99667*	1.68453	.000	-39.1627	-26.8306
	3	-19.87333*	1.68453	.000	-26.0394	-13.7073
	5	-25.66000*	1.68453	.000	-31.8261	-19.4939
	6	-15.38333*	1.68453	.000	-21.5494	-9.2173
	7	-20.79000*	1.68453	.000	-26.9561	-14.6239
	8	-14.06667*	1.68453	.000	-20.2327	-7.9006
	9	-11.12000*	1.68453	.000	-17.2861	-4.9539
	10	-5.42000	1.68453	.129	-11.5861	.7461
	11	-11.04000*	1.68453	.000	-17.2061	-4.8739
	12	-17.98000*	1.68453	.000	-24.1461	-11.8139
	13	-14.24667*	1.68453	.000	-20.4127	-8.0806
	14	6.07000	1.68453	.057	-.0961	12.2361
5	1	-13.44000*	1.68453	.000	-19.6061	-7.2739
	2	-7.33667*	1.68453	.009	-13.5027	-1.1706
	3	5.78667	1.68453	.082	-.3794	11.9527
	4	25.66000*	1.68453	.000	19.4939	31.8261

	6	10.27667*	1.68453	.000	4.1106	16.4427
	7	4.87000	1.68453	.239	-1.2961	11.0361
	8	11.59333*	1.68453	.000	5.4273	17.7594
	9	14.54000*	1.68453	.000	8.3739	20.7061
	10	20.24000*	1.68453	.000	14.0739	26.4061
	11	14.62000*	1.68453	.000	8.4539	20.7861
	12	7.68000*	1.68453	.006	1.5139	13.8461
	13	11.41333*	1.68453	.000	5.2473	17.5794
	14	31.73000*	1.68453	.000	25.5639	37.8961
6	1	-23.71667*	1.68453	.000	-29.8827	-17.5506
	2	-17.61333*	1.68453	.000	-23.7794	-11.4473
	3	-4.49000	1.68453	.347	-10.6561	1.6761
	4	15.38333*	1.68453	.000	9.2173	21.5494
	5	-10.27667*	1.68453	.000	-16.4427	-4.1106
	7	-5.40667	1.68453	.131	-11.5727	.7594
	8	1.31667	1.68453	1.000	-4.8494	7.4827
	9	4.26333	1.68453	.423	-1.9027	10.4294
	10	9.96333*	1.68453	.000	3.7973	16.1294
	11	4.34333	1.68453	.396	-1.8227	10.5094
	12	-2.59667	1.68453	.947	-8.7627	3.5694
	13	1.13667	1.68453	1.000	-5.0294	7.3027
	14	21.45333*	1.68453	.000	15.2873	27.6194
7	1	-18.31000*	1.68453	.000	-24.4761	-12.1439
	2	-12.20667*	1.68453	.000	-18.3727	-6.0406
	3	.91667	1.68453	1.000	-5.2494	7.0827
	4	20.79000*	1.68453	.000	14.6239	26.9561
	5	-4.87000	1.68453	.239	-11.0361	1.2961
	6	5.40667	1.68453	.131	-.7594	11.5727

	8	6.72333*	1.68453	.023	.5573	12.8894
	9	9.67000*	1.68453	.000	3.5039	15.8361
	10	15.37000*	1.68453	.000	9.2039	21.5361
	11	9.75000*	1.68453	.000	3.5839	15.9161
	12	2.81000	1.68453	.910	-3.3561	8.9761
	13	6.54333*	1.68453	.030	.3773	12.7094
	14	26.86000*	1.68453	.000	20.6939	33.0261
8	1	-25.03333*	1.68453	.000	-31.1994	-18.8673
	2	-18.93000*	1.68453	.000	-25.0961	-12.7639
	3	-5.80667	1.68453	.080	-11.9727	.3594
	4	14.06667*	1.68453	.000	7.9006	20.2327
	5	-11.59333*	1.68453	.000	-17.7594	-5.4273
	6	-1.31667	1.68453	1.000	-7.4827	4.8494
	7	-6.72333*	1.68453	.023	-12.8894	-.5573
	9	2.94667	1.68453	.880	-3.2194	9.1127
	10	8.64667*	1.68453	.001	2.4806	14.8127
	11	3.02667	1.68453	.860	-3.1394	9.1927
	12	-3.91333	1.68453	.553	-10.0794	2.2527
	13	-.18000	1.68453	1.000	-6.3461	5.9861
	14	20.13667*	1.68453	.000	13.9706	26.3027
9	1	-27.98000*	1.68453	.000	-34.1461	-21.8139
	2	-21.87667*	1.68453	.000	-28.0427	-15.7106
	3	-8.75333*	1.68453	.001	-14.9194	-2.5873
	4	11.12000*	1.68453	.000	4.9539	17.2861
	5	-14.54000*	1.68453	.000	-20.7061	-8.3739
	6	-4.26333	1.68453	.423	-10.4294	1.9027
	7	-9.67000*	1.68453	.000	-15.8361	-3.5039
	8	-2.94667	1.68453	.880	-9.1127	3.2194

	10	5.70000	1.68453	.092	-.4661	11.8661
	11	.08000	1.68453	1.000	-6.0861	6.2461
	12	-6.86000 *	1.68453	.019	-13.0261	-.6939
	13	-3.12667 *	1.68453	.832	-9.2927	3.0394
	14	17.19000 *	1.68453	.000	11.0239	23.3561
10	1	-33.68000 *	1.68453	.000	-39.8461	-27.5139
	2	-27.57667 *	1.68453	.000	-33.7427	-21.4106
	3	-14.45333 *	1.68453	.000	-20.6194	-8.2873
	4	5.42000	1.68453	.129	-.7461	11.5861
	5	-20.24000 *	1.68453	.000	-26.4061	-14.0739
	6	-9.96333 *	1.68453	.000	-16.1294	-3.7973
	7	-15.37000 *	1.68453	.000	-21.5361	-9.2039
	8	-8.64667 *	1.68453	.001	-14.8127	-2.4806
	9	-5.70000	1.68453	.092	-11.8661	.4661
	11	-5.62000	1.68453	.101	-11.7861	.5461
	12	-12.56000 *	1.68453	.000	-18.7261	-6.3939
	13	-8.82667 *	1.68453	.001	-14.9927	-2.6606
	14	11.49000 *	1.68453	.000	5.3239	17.6561
11	1	-28.06000 *	1.68453	.000	-34.2261	-21.8939
	2	-21.95667 *	1.68453	.000	-28.1227	-15.7906
	3	-8.83333 *	1.68453	.001	-14.9994	-2.6673
	4	11.04000 *	1.68453	.000	4.8739	17.2061
	5	-14.62000 *	1.68453	.000	-20.7861	-8.4539
	6	-4.34333 *	1.68453	.396	-10.5094	1.8227
	7	-9.75000 *	1.68453	.000	-15.9161	-3.5839
	8	-3.02667 *	1.68453	.860	-9.1927	3.1394
	9	-.08000	1.68453	1.000	-6.2461	6.0861
	10	5.62000	1.68453	.101	-.5461	11.7861

	12	-6.94000*	1.68453	.017	-13.1061	-.7739
	13	-3.20667	1.68453	.808	-9.3727	2.9594
	14	17.11000*	1.68453	.000	10.9439	23.2761
12	1	-21.12000*	1.68453	.000	-27.2861	-14.9539
	2	-15.01667*	1.68453	.000	-21.1827	-8.8506
	3	-1.89333	1.68453	.996	-8.0594	4.2727
	4	17.98000*	1.68453	.000	11.8139	24.1461
	5	-7.68000*	1.68453	.006	-13.8461	-1.5139
	6	2.59667	1.68453	.947	-3.5694	8.7627
	7	-2.81000	1.68453	.910	-8.9761	3.3561
	8	3.91333	1.68453	.553	-2.2527	10.0794
	9	6.86000*	1.68453	.019	.6939	13.0261
	10	12.56000*	1.68453	.000	6.3939	18.7261
	11	6.94000*	1.68453	.017	.7739	13.1061
	13	3.73333	1.68453	.622	-2.4327	9.8994
	14	24.05000*	1.68453	.000	17.8839	30.2161
13	1	-24.85333*	1.68453	.000	-31.0194	-18.6873
	2	-18.75000*	1.68453	.000	-24.9161	-12.5839
	3	-5.62667	1.68453	.100	-11.7927	.5394
	4	14.24667*	1.68453	.000	8.0806	20.4127
	5	-11.41333*	1.68453	.000	-17.5794	-5.2473
	6	-1.13667	1.68453	1.000	-7.3027	5.0294
	7	-6.54333*	1.68453	.030	-12.7094	-.3773
	8	.18000	1.68453	1.000	-5.9861	6.3461
	9	3.12667	1.68453	.832	-3.0394	9.2927
	10	8.82667*	1.68453	.001	2.6606	14.9927
	11	3.20667	1.68453	.808	-2.9594	9.3727
	12	-3.73333	1.68453	.622	-9.8994	2.4327

		14	20.31667*	1.68453	.000	14.1506	26.4827
	14	1	-45.17000*	1.68453	.000	-51.3361	-39.0039
		2	-39.06667*	1.68453	.000	-45.2327	-32.9006
		3	-25.94333*	1.68453	.000	-32.1094	-19.7773
		4	-6.07000	1.68453	.057	-12.2361	.0961
		5	-31.73000*	1.68453	.000	-37.8961	-25.5639
		6	-21.45333*	1.68453	.000	-27.6194	-15.2873
		7	-26.86000*	1.68453	.000	-33.0261	-20.6939
		8	-20.13667*	1.68453	.000	-26.3027	-13.9706
		9	-17.19000*	1.68453	.000	-23.3561	-11.0239
		10	-11.49000*	1.68453	.000	-17.6561	-5.3239
		11	-17.11000*	1.68453	.000	-23.2761	-10.9439
		12	-24.05000*	1.68453	.000	-30.2161	-17.8839
		13	-20.31667*	1.68453	.000	-26.4827	-14.1506
recovery	1	2	9.43333*	1.83815	.001	2.7050	16.1617
		3	17.94333*	1.83815	.000	11.2150	24.6717
		4	18.42333*	1.83815	.000	11.6950	25.1517
		5	7.80667*	1.83815	.012	1.0783	14.5350
		6	6.86333*	1.83815	.042	.1350	13.5917
		7	22.05667*	1.83815	.000	15.3283	28.7850
		8	14.18333*	1.83815	.000	7.4550	20.9117
		9	18.10000*	1.83815	.000	11.3716	24.8284
		10	27.84333*	1.83815	.000	21.1150	34.5717
		11	24.77667*	1.83815	.000	18.0483	31.5050
		12	3.51333*	1.83815	.804	-3.2150	10.2417
		13	10.09333*	1.83815	.001	3.3650	16.8217
		14	28.66667*	1.83815	.000	21.9383	35.3950
	2	1	-9.43333*	1.83815	.001	-16.1617	-2.7050
		3	8.51000*	1.83815	.005	1.7816	15.2384

	4	8.99000*	1.83815	.002	2.2616	15.7184
	5	-1.62667	1.83815	1.000	-8.3550	5.1017
	6	-2.57000	1.83815	.974	-9.2984	4.1584
	7	12.62333*	1.83815	.000	5.8950	19.3517
	8	4.75000	1.83815	.392	-1.9784	11.4784
	9	8.66667*	1.83815	.004	1.9383	15.3950
	10	18.41000*	1.83815	.000	11.6816	25.1384
	11	15.34333*	1.83815	.000	8.6150	22.0717
	12	-5.92000	1.83815	.128	-12.6484	.8084
	13	.66000	1.83815	1.000	-6.0684	7.3884
	14	19.23333*	1.83815	.000	12.5050	25.9617
3	1	-17.94333*	1.83815	.000	-24.6717	-11.2150
	2	-8.51000*	1.83815	.005	-15.2384	-1.7816
	4	.48000	1.83815	1.000	-6.2484	7.2084
	5	-10.13667*	1.83815	.000	-16.8650	-3.4083
	6	-11.08000*	1.83815	.000	-17.8084	-4.3516
	7	4.11333	1.83815	.608	-2.6150	10.8417
	8	-3.76000	1.83815	.728	-10.4884	2.9684
	9	.15667	1.83815	1.000	-6.5717	6.8850
	10	9.90000*	1.83815	.001	3.1716	16.6284
	11	6.83333*	1.83815	.044	.1050	13.5617
	12	-14.43000*	1.83815	.000	-21.1584	-7.7016
	13	-7.85000*	1.83815	.012	-14.5784	-1.1216
	14	10.72333*	1.83815	.000	3.9950	17.4517
4	1	-18.42333*	1.83815	.000	-25.1517	-11.6950
	2	-8.99000*	1.83815	.002	-15.7184	-2.2616
	3	-.48000	1.83815	1.000	-7.2084	6.2484
	5	-10.61667*	1.83815	.000	-17.3450	-3.8883
	6	-11.56000*	1.83815	.000	-18.2884	-4.8316

	7	3.63333	1.83815	.769	-3.0950	10.3617
	8	-4.24000	1.83815	.563	-10.9684	2.4884
	9	-.32333	1.83815	1.000	-7.0517	6.4050
	10	9.42000*	1.83815	.001	2.6916	16.1484
	11	6.35333	1.83815	.078	-.3750	13.0817
	12	-14.91000*	1.83815	.000	-21.6384	-8.1816
	13	-8.33000*	1.83815	.006	-15.0584	-1.6016
	14	10.24333*	1.83815	.000	3.5150	16.9717
5	1	-7.80667*	1.83815	.012	-14.5350	-1.0783
	2	1.62667	1.83815	1.000	-5.1017	8.3550
	3	10.13667*	1.83815	.000	3.4083	16.8650
	4	10.61667*	1.83815	.000	3.8883	17.3450
	6	-.94333	1.83815	1.000	-7.6717	5.7850
	7	14.25000*	1.83815	.000	7.5216	20.9784
	8	6.37667	1.83815	.076	-.3517	13.1050
	9	10.29333*	1.83815	.000	3.5650	17.0217
	10	20.03667*	1.83815	.000	13.3083	26.7650
	11	16.97000*	1.83815	.000	10.2416	23.6984
	12	-4.29333	1.83815	.545	-11.0217	2.4350
	13	2.28667	1.83815	.990	-4.4417	9.0150
	14	20.86000*	1.83815	.000	14.1316	27.5884
6	1	-6.86333*	1.83815	.042	-13.5917	-.1350
	2	2.57000	1.83815	.974	-4.1584	9.2984
	3	11.08000*	1.83815	.000	4.3516	17.8084
	4	11.56000*	1.83815	.000	4.8316	18.2884
	5	.94333	1.83815	1.000	-5.7850	7.6717
	7	15.19333*	1.83815	.000	8.4650	21.9217
	8	7.32000*	1.83815	.024	.5916	14.0484
	9	11.23667*	1.83815	.000	4.5083	17.9650

	10	20.98000*	1.83815	.000	14.2516	27.7084
	11	17.91333*	1.83815	.000	11.1850	24.6417
	12	-3.35000	1.83815	.848	-10.0784	3.3784
	13	3.23000	1.83815	.877	-3.4984	9.9584
	14	21.80333*	1.83815	.000	15.0750	28.5317
7	1	-22.05667*	1.83815	.000	-28.7850	-15.3283
	2	-12.62333*	1.83815	.000	-19.3517	-5.8950
	3	-4.11333	1.83815	.608	-10.8417	2.6150
	4	-3.63333	1.83815	.769	-10.3617	3.0950
	5	-14.25000*	1.83815	.000	-20.9784	-7.5216
	6	-15.19333*	1.83815	.000	-21.9217	-8.4650
	8	-7.87333*	1.83815	.011	-14.6017	-1.1450
	9	-3.95667	1.83815	.662	-10.6850	2.7717
	10	5.78667	1.83815	.148	-.9417	12.5150
	11	2.72000	1.83815	.961	-4.0084	9.4484
	12	-18.54333*	1.83815	.000	-25.2717	-11.8150
	13	-11.96333*	1.83815	.000	-18.6917	-5.2350
	14	6.61000	1.83815	.058	-.1184	13.3384
8	1	-14.18333*	1.83815	.000	-20.9117	-7.4550
	2	-4.75000	1.83815	.392	-11.4784	1.9784
	3	3.76000	1.83815	.728	-2.9684	10.4884
	4	4.24000	1.83815	.563	-2.4884	10.9684
	5	-6.37667	1.83815	.076	-13.1050	.3517
	6	-7.32000*	1.83815	.024	-14.0484	-.5916
	7	7.87333*	1.83815	.011	1.1450	14.6017
	9	3.91667	1.83815	.676	-2.8117	10.6450
	10	13.66000*	1.83815	.000	6.9316	20.3884
	11	10.59333*	1.83815	.000	3.8650	17.3217
	12	-10.67000*	1.83815	.000	-17.3984	-3.9416

	13	-4.09000	1.83815	.616	-10.8184	2.6384
	14	14.48333*	1.83815	.000	7.7550	21.2117
9	1	-18.10000	1.83815	.000	-24.8284	-11.3716
	2	-8.66667*	1.83815	.004	-15.3950	-1.9383
	3	-.15667	1.83815	1.000	-6.8850	6.5717
	4	.32333	1.83815	1.000	-6.4050	7.0517
	5	-10.29333*	1.83815	.000	-17.0217	-3.5650
	6	-11.23667*	1.83815	.000	-17.9650	-4.5083
	7	3.95667	1.83815	.662	-2.7717	10.6850
	8	-3.91667	1.83815	.676	-10.6450	2.8117
	10	9.74333*	1.83815	.001	3.0150	16.4717
	11	6.67667	1.83815	.053	-.0517	13.4050
	12	-14.58667*	1.83815	.000	-21.3150	-7.8583
	13	-8.00667*	1.83815	.009	-14.7350	-1.2783
	14	10.56667*	1.83815	.000	3.8383	17.2950
10	1	-27.84333*	1.83815	.000	-34.5717	-21.1150
	2	-18.41000*	1.83815	.000	-25.1384	-11.6816
	3	-9.90000*	1.83815	.001	-16.6284	-3.1716
	4	-9.42000*	1.83815	.001	-16.1484	-2.6916
	5	-20.03667*	1.83815	.000	-26.7650	-13.3083
	6	-20.98000*	1.83815	.000	-27.7084	-14.2516
	7	-5.78667	1.83815	.148	-12.5150	.9417
	8	-13.66000*	1.83815	.000	-20.3884	-6.9316
	9	-9.74333*	1.83815	.001	-16.4717	-3.0150
	11	-3.06667	1.83815	.910	-9.7950	3.6617
	12	-24.33000*	1.83815	.000	-31.0584	-17.6016
	13	-17.75000*	1.83815	.000	-24.4784	-11.0216
	14	.82333	1.83815	1.000	-5.9050	7.5517
11	1	-24.77667*	1.83815	.000	-31.5050	-18.0483

	2	-15.34333*	1.83815	.000	-22.0717	-8.6150
	3	-6.83333*	1.83815	.044	-13.5617	-1.1050
	4	-6.35333	1.83815	.078	-13.0817	.3750
	5	-16.97000*	1.83815	.000	-23.6984	-10.2416
	6	-17.91333*	1.83815	.000	-24.6417	-11.1850
	7	-2.72000	1.83815	.961	-9.4484	4.0084
	8	-10.59333*	1.83815	.000	-17.3217	-3.8650
	9	-6.67667	1.83815	.053	-13.4050	.0517
	10	3.06667	1.83815	.910	-3.6617	9.7950
	12	-21.26333*	1.83815	.000	-27.9917	-14.5350
	13	-14.68333*	1.83815	.000	-21.4117	-7.9550
	14	3.89000	1.83815	.685	-2.8384	10.6184
12	1	-3.51333	1.83815	.804	-10.2417	3.2150
	2	5.92000	1.83815	.128	-.8084	12.6484
	3	14.43000*	1.83815	.000	7.7016	21.1584
	4	14.91000*	1.83815	.000	8.1816	21.6384
	5	4.29333	1.83815	.545	-2.4350	11.0217
	6	3.35000	1.83815	.848	-3.3784	10.0784
	7	18.54333*	1.83815	.000	11.8150	25.2717
	8	10.67000*	1.83815	.000	3.9416	17.3984
	9	14.58667*	1.83815	.000	7.8583	21.3150
	10	24.33000*	1.83815	.000	17.6016	31.0584
	11	21.26333*	1.83815	.000	14.5350	27.9917
	13	6.58000	1.83815	.060	-.1484	13.3084
	14	25.15333*	1.83815	.000	18.4250	31.8817
13	1	-10.09333*	1.83815	.001	-16.8217	-3.3650
	2	-.66000	1.83815	1.000	-7.3884	6.0684
	3	7.85000*	1.83815	.012	1.1216	14.5784
	4	8.33000*	1.83815	.006	1.6016	15.0584

	5	-2.28667	1.83815	.990	-9.0150	4.4417
	6	-3.23000	1.83815	.877	-9.9584	3.4984
	7	11.96333*	1.83815	.000	5.2350	18.6917
	8	4.09000	1.83815	.616	-2.6384	10.8184
	9	8.00667*	1.83815	.009	1.2783	14.7350
	10	17.75000*	1.83815	.000	11.0216	24.4784
	11	14.68333*	1.83815	.000	7.9550	21.4117
	12	-6.58000	1.83815	.060	-13.3084	.1484
	14	18.57333*	1.83815	.000	11.8450	25.3017
14	1	-28.66667*	1.83815	.000	-35.3950	-21.9383
	2	-19.23333*	1.83815	.000	-25.9617	-12.5050
	3	-10.72333*	1.83815	.000	-17.4517	-3.9950
	4	-10.24333*	1.83815	.000	-16.9717	-3.5150
	5	-20.86000*	1.83815	.000	-27.5884	-14.1316
	6	-21.80333*	1.83815	.000	-28.5317	-15.0750
	7	-6.61000	1.83815	.058	-13.3384	.1184
	8	-14.48333*	1.83815	.000	-21.2117	-7.7550
	9	-10.56667*	1.83815	.000	-17.2950	-3.8383
	10	-.82333	1.83815	1.000	-7.5517	5.9050
	11	-3.89000	1.83815	.685	-10.6184	2.8384
	12	-25.15333*	1.83815	.000	-31.8817	-18.4250
	13	-18.57333*	1.83815	.000	-25.3017	-11.8450

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(เมื่อ 1: คลอโรฟอร์ม/2: ไดคลอโรมีเทน/3: เอทิลแอลกอฮอล์/4: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์/5: LAS-99/6: SDS /7: Brij[®] 58/8: Tween 80/9: Triton-X 100/10: กรดซัลฟิวริก/11: กรดไฮโดรคลอริก/12: สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์/13: สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และ /14: น้ำ)

Homogeneous Subsets

Purity

Tukey HSD^a

chem	N	Subset for alpha = 0.05
------	---	-------------------------

		1	2	3	4	5	6	7	8
14	3	34.3467							
4	3	40.4167	40.4167						
10	3		45.8367	45.8367					
11	3			51.4567	51.4567				
9	3			51.5367	51.5367				
8	3				54.4833	54.4833			
13	3				54.6633	54.6633			
6	3				55.8000	55.8000	55.8000		
12	3					58.3967	58.3967		
3	3					60.2900	60.2900	60.2900	
7	3						61.2067	61.2067	
5	3							66.0767	
2	3								73.4133
1	3								79.5167
Sig.		.057	.129	.092	.396	.080	.131	.082	.054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

recovery

Tukey HSD^a

chem	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
14	3	56.3367						
10	3	57.1600						
11	3	60.2267	60.2267					
7	3	62.9467	62.9467	62.9467				
4	3		66.5800	66.5800	66.5800			
9	3		66.9033	66.9033	66.9033			
3	3			67.0600	67.0600			
8	3				70.8200	70.8200		

13	3					74.9100	74.9100	
2	3					75.5700	75.5700	
5	3					77.1967	77.1967	
6	3						78.1400	
12	3						81.4900	81.4900
1	3							85.0033
Sig.		.058	.053	.608	.563	.076	.060	.804

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



3. ข้อมูลทางสถิติของความบริสุทธิ์และการกักคืน เมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีเชิงกลร่วมกับการใช้สารเคมี

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
						Purity	1		
	2	3	50.2300	.35791	.20664	49.3409	51.1191	49.94	50.63
	3	3	51.5367	.89271	.51541	49.3190	53.7543	50.57	52.33
	4	3	66.0767	1.18357	.68333	63.1365	69.0168	64.71	66.76
	5	3	89.2867	1.55773	.89936	85.4170	93.1563	87.50	90.36
	6	3	82.5033	1.38023	.79688	79.0747	85.9320	81.58	84.09
	7	3	73.3867	2.14526	1.23857	68.0575	78.7158	71.16	75.44
	8	3	74.6000	1.59038	.91820	70.6493	78.5507	73.03	76.21
	9	3	72.0133	.76055	.43910	70.1240	73.9026	71.18	72.67
	Total	27	65.9978	16.82570	3.23811	59.3418	72.6538	31.46	90.36
Recovery	1	3	56.3367	3.25033	1.87658	48.2624	64.4109	52.76	59.11
	2	3	85.4800	2.06807	1.19400	80.3426	90.6174	83.16	87.13
	3	3	87.6700	3.86249	2.23001	78.0751	97.2649	83.33	90.73
	4	3	77.1967	.78691	.45432	75.2419	79.1515	76.38	77.95
	5	3	91.5033	.35698	.20610	90.6166	92.3901	91.17	91.88
	6	3	93.6367	1.26001	.72747	90.5066	96.7667	92.38	94.90
	7	3	77.7233	3.65433	2.10983	68.6455	86.8012	73.55	80.35
	8	3	80.5967	1.85759	1.07248	75.9822	85.2112	78.52	82.10
	9	3	78.9867	1.60998	.92952	74.9873	82.9861	77.49	80.69
	Total	27	81.0144	10.77705	2.07404	76.7512	85.2777	52.76	94.90

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
purity	1.401	8	18	.262
recovery	2.845	8	18	.031

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
purity	Between Groups	7317.396	8	914.675	380.105	.000
	Within Groups	43.315	18	2.406		
	Total	7360.711	26			
recovery	Between Groups	2916.783	8	364.598	63.727	.000
	Within Groups	102.983	18	5.721		
	Total	3019.765	26			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) condition	(J) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
purity	1	2	-15.88333*	1.26659	.000	-20.3213	-11.4454
		3	-17.19000*	1.26659	.000	-21.6280	-12.7520
		4	-31.73000*	1.26659	.000	-36.1680	-27.2920
		5	-54.94000*	1.26659	.000	-59.3780	-50.5020
		6	-48.15667*	1.26659	.000	-52.5946	-43.7187
		7	-39.04000*	1.26659	.000	-43.4780	-34.6020
		8	-40.25333*	1.26659	.000	-44.6913	-35.8154
		9	-37.66667*	1.26659	.000	-42.1046	-33.2287
	2	1	15.88333*	1.26659	.000	11.4454	20.3213

	3	-1.30667	1.26659	.977	-5.7446	3.1313
	4	-15.84667*	1.26659	.000	-20.2846	-11.4087
	5	-39.05667*	1.26659	.000	-43.4946	-34.6187
	6	-32.27333*	1.26659	.000	-36.7113	-27.8354
	7	-23.15667*	1.26659	.000	-27.5946	-18.7187
	8	-24.37000*	1.26659	.000	-28.8080	-19.9320
	9	-21.78333*	1.26659	.000	-26.2213	-17.3454
3	1	17.19000*	1.26659	.000	12.7520	21.6280
	2	1.30667	1.26659	.977	-3.1313	5.7446
	4	-14.54000*	1.26659	.000	-18.9780	-10.1020
	5	-37.75000*	1.26659	.000	-42.1880	-33.3120
	6	-30.96667*	1.26659	.000	-35.4046	-26.5287
	7	-21.85000*	1.26659	.000	-26.2880	-17.4120
	8	-23.06333*	1.26659	.000	-27.5013	-18.6254
	9	-20.47667*	1.26659	.000	-24.9146	-16.0387
4	1	31.73000*	1.26659	.000	27.2920	36.1680
	2	15.84667*	1.26659	.000	11.4087	20.2846
	3	14.54000*	1.26659	.000	10.1020	18.9780
	5	-23.21000*	1.26659	.000	-27.6480	-18.7720
	6	-16.42667*	1.26659	.000	-20.8646	-11.9887
	7	-7.31000*	1.26659	.000	-11.7480	-2.8720
	8	-8.52333*	1.26659	.000	-12.9613	-4.0854
	9	-5.93667*	1.26659	.004	-10.3746	-1.4987
5	1	54.94000*	1.26659	.000	50.5020	59.3780
	2	39.05667*	1.26659	.000	34.6187	43.4946
	3	37.75000*	1.26659	.000	33.3120	42.1880
	4	23.21000*	1.26659	.000	18.7720	27.6480
	6	6.78333*	1.26659	.001	2.3454	11.2213

	7	15.90000*	1.26659	.000	11.4620	20.3380
	8	14.68667*	1.26659	.000	10.2487	19.1246
	9	17.27333*	1.26659	.000	12.8354	21.7113
6	1	48.15667*	1.26659	.000	43.7187	52.5946
	2	32.27333*	1.26659	.000	27.8354	36.7113
	3	30.96667*	1.26659	.000	26.5287	35.4046
	4	16.42667*	1.26659	.000	11.9887	20.8646
	5	-6.78333*	1.26659	.001	-11.2213	-2.3454
	7	9.11667*	1.26659	.000	4.6787	13.5546
	8	7.90333*	1.26659	.000	3.4654	12.3413
	9	10.49000*	1.26659	.000	6.0520	14.9280
7	1	39.04000*	1.26659	.000	34.6020	43.4780
	2	23.15667*	1.26659	.000	18.7187	27.5946
	3	21.85000*	1.26659	.000	17.4120	26.2880
	4	7.31000*	1.26659	.000	2.8720	11.7480
	5	-15.90000*	1.26659	.000	-20.3380	-11.4620
	6	-9.11667*	1.26659	.000	-13.5546	-4.6787
	8	-1.21333	1.26659	.985	-5.6513	3.2246
	9	1.37333	1.26659	.969	-3.0646	5.8113
8	1	40.25333*	1.26659	.000	35.8154	44.6913
	2	24.37000*	1.26659	.000	19.9320	28.8080
	3	23.06333*	1.26659	.000	18.6254	27.5013
	4	8.52333*	1.26659	.000	4.0854	12.9613
	5	-14.68667*	1.26659	.000	-19.1246	-10.2487
	6	-7.90333*	1.26659	.000	-12.3413	-3.4654
	7	1.21333	1.26659	.985	-3.2246	5.6513
	9	2.58667	1.26659	.536	-1.8513	7.0246
9	1	37.66667*	1.26659	.000	33.2287	42.1046

		2	21.78333*	1.26659	.000	17.3454	26.2213
		3	20.47667*	1.26659	.000	16.0387	24.9146
		4	5.93667*	1.26659	.004	1.4987	10.3746
		5	-17.27333*	1.26659	.000	-21.7113	-12.8354
		6	-10.49000*	1.26659	.000	-14.9280	-6.0520
		7	-1.37333	1.26659	.969	-5.8113	3.0646
		8	-2.58667	1.26659	.536	-7.0246	1.8513
recovery	1	2	-29.14333*	1.95299	.000	-35.9864	-22.3003
		3	-31.33333*	1.95299	.000	-38.1764	-24.4903
		4	-20.86000*	1.95299	.000	-27.7030	-14.0170
		5	-35.16667*	1.95299	.000	-42.0097	-28.3236
		6	-37.30000*	1.95299	.000	-44.1430	-30.4570
		7	-21.38667*	1.95299	.000	-28.2297	-14.5436
		8	-24.26000*	1.95299	.000	-31.1030	-17.4170
		9	-22.65000*	1.95299	.000	-29.4930	-15.8070
	2	1	29.14333*	1.95299	.000	22.3003	35.9864
		3	-2.19000	1.95299	.963	-9.0330	4.6530
		4	8.28333*	1.95299	.011	1.4403	15.1264
		5	-6.02333	1.95299	.111	-12.8664	.8197
		6	-8.15667*	1.95299	.013	-14.9997	-1.3136
		7	7.75667*	1.95299	.020	.9136	14.5997
		8	4.88333	1.95299	.294	-1.9597	11.7264
		9	6.49333	1.95299	.071	-.3497	13.3364
	3	1	31.33333*	1.95299	.000	24.4903	38.1764
		2	2.19000	1.95299	.963	-4.6530	9.0330
		4	10.47333*	1.95299	.001	3.6303	17.3164
		5	-3.83333	1.95299	.584	-10.6764	3.0097
		6	-5.96667	1.95299	.117	-12.8097	.8764
		7	9.94667*	1.95299	.002	3.1036	16.7897

	8	7.07333*	1.95299	.040	.2303	13.9164
	9	8.68333*	1.95299	.007	1.8403	15.5264
4	1	20.86000*	1.95299	.000	14.0170	27.7030
	2	-8.28333*	1.95299	.011	-15.1264	-1.4403
	3	-10.47333*	1.95299	.001	-17.3164	-3.6303
	5	-14.30667*	1.95299	.000	-21.1497	-7.4636
	6	-16.44000*	1.95299	.000	-23.2830	-9.5970
	7	-.52667	1.95299	1.000	-7.3697	6.3164
	8	-3.40000	1.95299	.716	-10.2430	3.4430
	9	-1.79000	1.95299	.989	-8.6330	5.0530
5	1	35.16667*	1.95299	.000	28.3236	42.0097
	2	6.02333	1.95299	.111	-.8197	12.8664
	3	3.83333	1.95299	.584	-3.0097	10.6764
	4	14.30667*	1.95299	.000	7.4636	21.1497
	6	-2.13333	1.95299	.968	-8.9764	4.7097
	7	13.78000*	1.95299	.000	6.9370	20.6230
	8	10.90667*	1.95299	.001	4.0636	17.7497
	9	12.51667*	1.95299	.000	5.6736	19.3597
6	1	37.30000*	1.95299	.000	30.4570	44.1430
	2	8.15667*	1.95299	.013	1.3136	14.9997
	3	5.96667	1.95299	.117	-.8764	12.8097
	4	16.44000*	1.95299	.000	9.5970	23.2830
	5	2.13333	1.95299	.968	-4.7097	8.9764
	7	15.91333*	1.95299	.000	9.0703	22.7564
	8	13.04000*	1.95299	.000	6.1970	19.8830
	9	14.65000*	1.95299	.000	7.8070	21.4930
7	1	21.38667*	1.95299	.000	14.5436	28.2297
	2	-7.75667*	1.95299	.020	-14.5997	-.9136
	3	-9.94667*	1.95299	.002	-16.7897	-3.1036

1	3	34.3467					
2	3		50.2300				
3	3		51.5367				
4	3			66.0767			
9	3				72.0133		
7	3				73.3867		
8	3				74.6000		
6	3					82.5033	
5	3						89.2867
Sig.		1.000	.977	1.000	.536	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Recovery

Tukey HSD^a

condition	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
1	3	56.3367				
4	3		77.1967			
7	3		77.7233			
9	3		78.9867	78.9867		
8	3		80.5967	80.5967		
2	3			85.4800	85.4800	
3	3				87.6700	87.6700
5	3				91.5033	91.5033
6	3					93.6367
Sig.		1.000	.716	.071	.111	.117

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

purity

Tukey HSD^a

condition	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
1	3	34.3467					
2	3		50.2300				
3	3		51.5367				
4	3			66.0767			
9	3				72.0133		
7	3				73.3867		
8	3				74.6000		
6	3					82.5033	
5	3						89.2867
Sig.		1.000	.977	1.000	.536	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4. ข้อมูลทางสถิติของความบริสุทธิ์และการกักคืน เมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 โดยการเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) ด้วยการพรีทรีทเม้นต์

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
purity	1	3	74.6000	1.59038	.91820	70.6493	78.5507	73.03	76.21
	2	3	81.4867	2.12994	1.22972	76.1956	86.7777	80.11	83.94
	3	3	89.2867	1.55773	.89936	85.4170	93.1563	87.50	90.36
	4	3	82.3067	.73569	.42475	80.4791	84.1342	81.46	82.79
	Total	12	81.9200	5.59732	1.61581	78.3636	85.4764	73.03	90.36
recovery	1	3	80.5967	1.85759	1.07248	75.9822	85.2112	78.52	82.10
	2	3	84.2000	2.59081	1.49581	77.7641	90.6359	82.01	87.06
	3	3	91.5033	.35698	.20610	90.6166	92.3901	91.17	91.88
	4	3	90.3167	2.61382	1.50909	83.8236	96.8097	88.08	93.19
	Total	12	86.6542	4.98341	1.43859	83.4879	89.8205	78.52	93.19

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
purity	1.379	3	8	.317
recovery	2.300	3	8	.154

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
purity	Between Groups	324.562	3	108.187	43.130	.000
	Within Groups	20.067	8	2.508		
	Total	344.630	11			
recovery	Between Groups	238.934	3	79.645	18.606	.001
	Within Groups	34.245	8	4.281		

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
purity	1	3	74.6000	1.59038	.91820	70.6493	78.5507	73.03	76.21
	2	3	81.4867	2.12994	1.22972	76.1956	86.7777	80.11	83.94
	3	3	89.2867	1.55773	.89936	85.4170	93.1563	87.50	90.36
	4	3	82.3067	.73569	.42475	80.4791	84.1342	81.46	82.79
	Total	12	81.9200	5.59732	1.61581	78.3636	85.4764	73.03	90.36
recovery	1	3	80.5967	1.85759	1.07248	75.9822	85.2112	78.52	82.10
	2	3	84.2000	2.59081	1.49581	77.7641	90.6359	82.01	87.06
	3	3	91.5033	.35698	.20610	90.6166	92.3901	91.17	91.88
	4	3	90.3167	2.61382	1.50909	83.8236	96.8097	88.08	93.19
	Total	11		273.178					

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) condition	(J) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
purity	1	2	-6.88667*	1.29317	.003	-11.0278	-2.7455
		3	-14.68667*	1.29317	.000	-18.8278	-10.5455
		4	-7.70667*	1.29317	.002	-11.8478	-3.5655
	2	1	6.88667*	1.29317	.003	2.7455	11.0278
		3	-7.80000*	1.29317	.001	-11.9412	-3.6588
		4	-.82000	1.29317	.918	-4.9612	3.3212
	3	1	14.68667*	1.29317	.000	10.5455	18.8278
		2	7.80000*	1.29317	.001	3.6588	11.9412
		4	6.98000*	1.29317	.003	2.8388	11.1212

	4	1	7.70667*	1.29317	.002	3.5655	11.8478
		2	.82000	1.29317	.918	-3.3212	4.9612
		3	-6.98000*	1.29317	.003	-11.1212	-2.8388
recovery	1	2	-3.60333	1.68930	.222	-9.0131	1.8064
		3	-10.90667*	1.68930	.001	-16.3164	-5.4969
		4	-9.72000*	1.68930	.002	-15.1297	-4.3103
	2	1	3.60333	1.68930	.222	-1.8064	9.0131
		3	-7.30333*	1.68930	.011	-12.7131	-1.8936
		4	-6.11667*	1.68930	.028	-11.5264	-.7069
	3	1	10.90667*	1.68930	.001	5.4969	16.3164
		2	7.30333*	1.68930	.011	1.8936	12.7131
		4	1.18667	1.68930	.893	-4.2231	6.5964
	4	1	9.72000*	1.68930	.002	4.3103	15.1297
		2	6.11667*	1.68930	.028	.7069	11.5264
		3	-1.18667	1.68930	.893	-6.5964	4.2231

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(เมื่อ 1: พอลิเมอร์ที่แยกด้วย NaOH/2: พอลิเมอร์ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วย NaOH /3: พอลิเมอร์ที่แยกด้วย LAS-99 และ /4: พอลิเมอร์ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วย LAS-99)

Homogeneous Subsets

purity

Tukey HSD^a

condition	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	3	74.6000		
2	3		81.4867	
4	3		82.3067	
3	3			89.2867
Sig.		1.000	.918	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

recovery

Tukey HSD^a

condition	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	80.5967	
2	3	84.2000	
4	3		90.3167
3	3		91.5033
Sig.		.222	.893

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



5. ข้อมูลทางสถิติของความบริสุทธิ์และการกู้คืน เมื่อแยก P(3HB) จากเซลล์ของ *B. megaterium* BA-019 โดยการเพิ่มประสิทธิภาพการแยก P(3HB) ด้วยการพอลิซิง

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
purity	1	3	81.4853	2.13296	1.23147	76.1867	86.7839	80.11	83.94
	2	3	88.2982	2.17133	1.25362	82.9043	93.6920	86.38	90.65
	3	3	89.2871	1.55823	.89965	85.4163	93.1580	87.50	90.36
	4	3	95.2709	1.60165	.92472	91.2921	99.2496	93.51	96.64
	Total	12	88.5854	5.35607	1.54616	85.1823	91.9884	80.11	96.64
recovery	1	3	84.2005	2.58662	1.49338	77.7750	90.6260	82.01	87.06
	2	3	96.3071	2.77627	1.60288	89.4105	103.2038	94.53	99.51
	3	3	91.5024	.35470	.20478	90.6213	92.3835	91.17	91.88
	4	3	99.0067	2.17084	1.25333	93.6140	104.3993	96.50	100.26
	Total	12	92.7542	6.16310	1.77913	88.8383	96.6700	82.01	100.26

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
purity	.309	3	8	.819
recovery	3.201	3	8	.084

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
purity	Between Groups	287.047	3	95.682	26.844	.000
	Within Groups	28.515	8	3.564		
	Total	315.562	11			
recovery	Between Groups	379.349	3	126.450	26.294	.000
	Within Groups	38.473	8	4.809		

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
purity	1	3	81.4853	2.13296	1.23147	76.1867	86.7839	80.11	83.94
	2	3	88.2982	2.17133	1.25362	82.9043	93.6920	86.38	90.65
	3	3	89.2871	1.55823	.89965	85.4163	93.1580	87.50	90.36
	4	3	95.2709	1.60165	.92472	91.2921	99.2496	93.51	96.64
	Total	12	88.5854	5.35607	1.54616	85.1823	91.9884	80.11	96.64
recovery	1	3	84.2005	2.58662	1.49338	77.7750	90.6260	82.01	87.06
	2	3	96.3071	2.77627	1.60288	89.4105	103.2038	94.53	99.51
	3	3	91.5024	.35470	.20478	90.6213	92.3835	91.17	91.88
	4	3	99.0067	2.17084	1.25333	93.6140	104.3993	96.50	100.26
	Total			417.822		11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent (I) Variable	(J) condition	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
purity	1	2	-6.81288*	1.54151	.010	-11.7494	-1.8764
		3	-7.80187*	1.54151	.004	-12.7383	-2.8654
		4	-13.78559*	1.54151	.000	-18.7221	-8.8491
	2	1	6.81288*	1.54151	.010	1.8764	11.7494
		3	-.98898	1.54151	.916	-5.9255	3.9475
		4	-6.97271*	1.54151	.008	-11.9092	-2.0362
	3	1	7.80187*	1.54151	.004	2.8654	12.7383
		2	.98898	1.54151	.916	-3.9475	5.9255
		4	-5.98373*	1.54151	.020	-10.9202	-1.0473

	4	1	13.78559*	1.54151	.000	8.8491	18.7221
		2	6.97271*	1.54151	.008	2.0362	11.9092
		3	5.98373*	1.54151	.020	1.0473	10.9202
recovery	1	2	-12.10666*	1.79056	.001	-17.8407	-6.3727
		3	-7.30193*	1.79056	.015	-13.0359	-1.5679
		4	-14.80618*	1.79056	.000	-20.5402	-9.0722
	2	1	12.10666*	1.79056	.001	6.3727	17.8407
		3	4.80473	1.79056	.104	-.9293	10.5387
		4	-2.69951	1.79056	.476	-8.4335	3.0345
	3	1	7.30193*	1.79056	.015	1.5679	13.0359
		2	-4.80473	1.79056	.104	-10.5387	.9293
		4	-7.50425*	1.79056	.013	-13.2382	-1.7703
	4	1	14.80618*	1.79056	.000	9.0722	20.5402
		2	2.69951	1.79056	.476	-3.0345	8.4335
		3	7.50425*	1.79056	.013	1.7703	13.2382

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

(เมื่อ 1: พอลิเมอร์ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วย NaOH ก่อนการพอลิซิง/2: พอลิเมอร์ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์และแยกด้วย NaOH หลังการพอลิซิง/3: พอลิเมอร์ที่แยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงก่อนการพอลิซิง และ /4: พอลิเมอร์ที่แยกด้วย LAS-99 ร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงหลังการพอลิซิง)

Homogeneous Subsets

purity

Tukey HSD^a

condition	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	3	81.4853		
2	3		88.2982	
3	3		89.2871	
4	3			95.2709
Sig.		1.000	.916	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

recovery

Tukey HSD^a

condition	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	3	84.2005		
3	3		91.5024	
2	3		96.3071	96.3071
4	3			99.0067
Sig.		1.000	.104	.476

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุชฎทัย พันศิริพัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 10 กันยายน พ.ศ. 2530 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2553 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาหลักสูตร จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 ในระหว่างการศึกษาก็ได้เข้าร่วมเสนอผลงานบางส่วนในงาน The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2013) “Agro-Industrial Biotechnology for Global Sustainable Prosperity” ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต บางเขน ระหว่างวันที่ 16-19 ตุลาคม 2556 ในหัวข้อ Development of recovery processes of Poly(3-hydroxybutyrate), the biodegradable plastic resin produced by *Bacillus megaterium* BA-019 โดยได้รับรางวัล Complimentary Award in Poster Competition ในหมวด Industrial Biotechnology and Bioprocess Engineering



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY