



สถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-ไฮดรอกซีวาเลอเรตจากน้ำเสีย
โรงงานอาหารทะเล โดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากระบบเอสบีอาร์

**Optimization for Production of Poly - (hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate) from
Seafood Processing Wastewater Using Bacterial Strains Isolated from SBR System**

ศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด

Siriwan Raden-Ahmad

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biotechnology
Prince of Songkla University**

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีบีวทิเรด-โค-ไฮดรอกซีวาลูเอเรด
จากน้ำเสียโรงงานอาหารทะเล โดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากระบบเอสบีอาร์

ผู้เขียน นางศิริวรรณ ระเด่นอามัด

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง)

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาศ เขียรศิลป์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาศ เขียรศิลป์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิไฮดรอกซีบีวทิเรต-โค-ไฮดรอกซีวาเลอเรต
จากน้ำเสียโรงงานอาหารทะเล โดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากระบบเอสปีอาร์

ผู้เขียน นางศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต Polyhydroxyalkanoate (PHA) จากน้ำเสีย
โรงงานอาหารทะเล โดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบเอสปีอาร์ จากการศึกษา
การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ ที่สามารถสะสม PHA ไว้ภายในเซลล์ โดย
ทดสอบการติดสีของ Sudan Black B พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อได้ 4 ไอโซเลท คือ PSU-I, PSU-M,
PSU-V และ PSU-X หลังจากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ โดยใช้เทคนิค 16s
rDNA พบว่า PSU-I และ PSU-M เทียบเคียงได้เป็น *Achromobacter xylosoxidans* และ
Achromobacter sp. ตามลำดับ ส่วน PSU-V และ PSU-X เทียบเคียงได้เป็น *Acinetobacter*
baumannii จากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำเสียที่จะนำมาใช้ในการผลิต PHA พบว่ามีปริมาณกรด
และมีปริมาณซีโอดี (Chemical Oxygen Demand; COD) เท่ากับ 207.46 และ 1,875 มิลลิกรัมต่อลิตร
ตามลำดับ จากนั้นจึงนำเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทมาเลี้ยงในน้ำเสียจากถังสร้างกรดของโรงงานอาหารทะเล
ที่มีการเติมกรดโพรฟิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที
ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเชื้อ *A. xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ให้การผลิต PHA
สูงสุด (0.45 และ 0.41 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษาการผสมเชื้อจุลินทรีย์
พบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *A. xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ให้การผลิต
PHA สูงสุด (0.52 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้จากการศึกษาผลของอัตราการเขย่าและปริมาณเชื้อเริ่มต้น
พบว่าที่การเขย่า 200 รอบต่อนาที และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้
การผลิต PHA สูงสุด (0.50 กรัมต่อลิตร) หลังจากนั้นได้ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของ
แหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้กรดวาเลอริก 60 มิลลิโมลาร์ ให้การผลิต PHA สูงสุด (0.83 กรัมต่อ
ลิตร) และเมื่อศึกษาการปรับพีเอชเริ่มต้นน้ำเสีย พบว่าที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ให้การผลิต PHA
สูงสุด (0.78 กรัมต่อลิตร) หลังจากนั้นจากการศึกษาผลการฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อน้ำเสีย พบว่าการฆ่า
เชื้อน้ำเสียให้การผลิต PHA มากที่สุด เท่ากับ 0.78 กรัมต่อลิตร (41.8 เปอร์เซ็นต์ ของ PHA ต่อ
น้ำหนักเซลล์แห้ง)

จากการศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิต PHA ในถังหมักขนาด 3 ลิตร พบว่าการให้อากาศ 1 vvm และการกวน 200 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ของเชื้อ *A. xylooxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M โดยผลิต PHA ได้เท่ากับ 2.29 กรัมต่อลิตร และ 71.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดย PHA ที่ได้นี้ เป็นโคพอลิเมอร์ชนิด poly - (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) มีสัดส่วนของ HB และ HV เท่ากับ 30.56 และ 69.44 โมลเปอร์เซ็นต์

Thesis Title Optimization for Production of Poly - (hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate) from Seafood Processing Wastewater Using Bacterial Strains Isolated from SBR System

Author Mrs. Siriwan Raden-Ahmad

Major Program Biotechnology

Academic Year 2008

ABSTRACT

The optimum conditions for production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from seafood processing wastewater using bacterial strains isolated from SBR system were investigated. The isolated bacteria from consortium were screened for PHA accumulation in cell by staining with Sudan Black B. It was found that four isolates; PSU-I, PSU-M, PSU-V and PSU-X were positively stained. Afterward, the positive isolates were identified base on the 16s rDNA technique. The isolates PSU-I and PSU-M were *Achromobacter xylosoxidans* and *Achromobacter* sp., respectively, whereas PSU-V and PSU-X were *Acinetobacter baumannii*. Composition of wastewater used for PHA production in this research was composed of acid concentration and chemical oxygen demand (COD) about 207.46 and 1,875 mg/l, respectively. Furthermore, four isolates were cultivated in wastewater supplemented with 60 mM propionic acid under shaking flask (200 rpm) at room temperature. The cultivation of *A. xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M gave the maximum PHA production (0.45 and 0.41 g/L, respectively). Moreover, the mixed culture was investigated. It was found that the mixed culture of *A. xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M gave the maximum PHA production (0.52 g/L). In addition, the effect of shaking rate and inoculum concentration were examined. It was found that shaking rate of 200 rpm and 10% (v/v) inoculum concentration gave the maximum PHA production (0.50 g/L). Afterwards, the effect of carbon source and its concentration were examined. It was found that the medium containing 60 mM of valeric acid gave the highest PHA concentration (0.83 g/L). Then, the effect of initial pH of wastewater was studied. It was found that the initial pH of 7 gave the maximum PHA production (0.78 g/L). Furthermore, the effect of sterilization of wastewater was investigated. It was found that the sterilized wastewater gave the highest PHA concentration of 0.78 g/L (41.8% g PHA/g dry cell weight).

The optimum condition for PHA production was also studied in 3 L-fermentor. It was found that the aeration rate of 1.0 vvm and the agitation rate at 200 rpm were the optimum conditions for PHA production by *A. xylooxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M. The PHA concentration was 2.29 g/L and PHA content was 71.5%. This PHA was copolymer of poly - (hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate) (PHBV), consisting of 30.56 % HB fraction and 69.44 % HV fraction.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร. ปิยะรัตน์ บุญแสง ประธานกรรมการที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาศ เขียรศิลป์ กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ กำลังใจในการค้นคว้าและการวิจัย รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตรและเป็นประธานกรรมการสอบ รวมถึงรองศาสตราจารย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการค้นคว้าวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ในคณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกคนที่ให้บริการเป็นอย่างดี รวมถึงบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ และน้ำเสียที่ใช้ตลอดการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง สามิ และญาติ สำหรับการสนับสนุนด้านการเงิน และเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด และขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ บัณฑิตศึกษาภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม โดยเฉพาะสมาชิกในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อมทุกคน ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ศิริวรรณ ระเด่นอาหมัด

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพ	(13)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำตั้งเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
Polyhydroxyalkanoates (PHAs)	2
Polyhydroxybutyrate (PHB)	3
Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)	4
กระบวนการสังเคราะห์ PHA ที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์	7
เมตาบอลิซึมของกระบวนการสังเคราะห์ PHA ที่ผลิตจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์	10
ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHA ของจุลินทรีย์	13
สายพันธุ์จุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอน	13
แหล่งอาหารอื่นๆ	18
อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน	19
ออกซิเจน	20
พีเอช	20
อุณหภูมิ	21
การสกัด PHA และทำให้บริสุทธิ์	22
กระบวนการบำบัดน้ำเสีย	23
วัตถุประสงค์	27
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	28
วัสดุ	28
จุลินทรีย์	28
อาหารเลี้ยงเชื้อ	28
น้ำเสีย	28

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
อุปกรณ์	28
วิธีการวิเคราะห์	29
การหาปริมาณกรดไขมัน	29
การหาปริมาณซีไอดี	29
การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl method	29
การหาปริมาณฟอสเฟต (Ascorbic Acid Method)	30
การทดสอบกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการผลิต PHA โดยใช้ sudan black B	30
ปริมาณเซลล์	30
การวิเคราะห์ปริมาณ PHA ในเซลล์จุลินทรีย์	30
วิธีการทดลอง	32
2.1 การศึกษาลักษณะของน้ำเสีย	32
2.2 การศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิต PHA ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบ SBR	
ในอาหารสังเคราะห์	32
2.3 การศึกษาการแยกเชื้อที่สามารถผลิต PHA จากกลุ่มจุลินทรีย์จากระบบ SBR	33
2.3.1 การแยกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี enrichment technique	33
2.3.2 เทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกได้ ด้วยเทคนิค 16s rDNA	33
2.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิต PHA จากน้ำเสียโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์	
ในขวดรูปชมพู่	33
2.4.1 การเตรียมเชื้อสำหรับเป็นเชื้อเริ่มต้น	33
2.4.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์	34
2.4.3 ผลของอัตราการเขย่า	34
2.4.4 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น	34
2.4.5 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอน	34
2.4.6 ผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	35
2.4.7 ผลของพีเอชเริ่มต้น	35
2.4.8 ผลของการฆ่าเชื่อน้ำเสีย	35
2.5 การศึกษาผลของการให้อากาศและการกวนต่อการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์	35

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6 การศึกษาหน่วยย่อยของ PHA ด้วย GC-FID	35
3 ผลการทดลอง	36
3.1 องค์ประกอบของน้ำเสีย	36
3.2 ลักษณะการเจริญและการผลิต PHA ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบ SBR	37
3.3 การแยกเชื้อที่สามารถผลิต PHA จากกลุ่มจุลินทรีย์จากระบบ SBR	39
3.3.1 การแยกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี enrichment technique	40
3.3.2 เทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกได้ ด้วยเทคนิค 16s rDNA	41
3.4 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิต PHA จากน้ำเสียโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ ในขวดรูปชมพู่	42
3.4.1 การเตรียมเชื้อสำหรับเป็นเชื้อเริ่มต้น	45
3.4.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์	49
3.4.3 ผลของอัตราการเขย่า	50
3.4.4 ผลของการเติมเชื้อเริ่มต้น	51
3.4.5 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอน	53
3.4.6 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน	60
3.4.7 ผลของพีเอชเริ่มต้น	64
3.4.7 ผลของการฆ่าเชื้อน้ำเสีย	65
3.5 ผลของการให้อากาศและการกวนต่อการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์	68
3.6 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของ PHA ด้วย Gas chromatography	76
4 สรุปผลการทดลอง	78
สรุป	78
ข้อเสนอแนะ	79
เอกสารอ้างอิง	80
ภาคผนวก ก	87
ภาคผนวก ข	91
ประวัติผู้เขียน	96

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของ PHB เปรียบเทียบกับ PP	5
2	เปรียบเทียบคุณสมบัติของพอลิเมอร์	6
3	การผลิต PHA ของจุลินทรีย์บริสุทธิ์และใช้กลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบตะกอนเร่ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน	14
4	องค์ประกอบของน้ำเสียจากถังสร้างกรด โรงงานอาหารทะเล บริษัททรอปิคอล-แลนนิ่ง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)	37
5	คุณลักษณะของไอโซเลทในอาหารวุ้นสังเคราะห์ (GM1) ที่มีการเติมกรดอะซิติก 30 มิลลิโมลาร์	41
6	ผลการเทียบเคียงแบคทีเรีย <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I, <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M, <i>Acinetobacter baumannii</i> PSU-V และ <i>Acinetobacter baumannii</i> PSU-X กับฐานข้อมูลใน gene bank	44
7	ค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHA ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิก ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	48
8	ผลของอัตราการเขย่าต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราการเขย่าต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	52
9	ผลของการเติมเชื้อเริ่มต้นต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	59
10	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M ในน้ำเสีย เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	57

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
11	ค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีไอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M ในน้ำเสีย ที่มีการเติมกรดวาเลอริก ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 63
12	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีไอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 67
13	ผลของการฆ่าเชื้อน้ำเสียต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีไอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 70
14	ผลของอัตราการให้อากาศและอัตราการกวน ต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีไอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 73
15	การผลิต PHA โดยจุลินทรีย์ 75

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต	3
2	ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของ (A) P(HB-co-HV) and (B) P(HB-co-HHx)	6
3	ลักษณะ <i>phaCBA</i> cluster ของ <i>Ralstonia eutropha</i> H16	8
4	วิธีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและการย่อยสลายในแบคทีเรีย	9
5	การแสดงออกของ <i>phaCBA</i> cluster สำหรับการสังเคราะห์ PHB	9
6	วิธีความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ PHB และ PHBV	11
7	วิธีการผลิต Propionyl-CoA จากกรดอะมิโน threonine	11
8	กระบวนการสังเคราะห์ PHA ในระบบ PAO/GAO ภายใต้สภาวะไร้อากาศ	12
9	กระบวนการบำบัดน้ำเสียบริษัททรอปิคอลแคนนิง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)	23
10	แผนผังของระบบบำบัดน้ำเสีย	25
11	การเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากในอาหารสังเคราะห์ GM1 โดยเติมกรดอะซิติคความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับการใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น	39
12	ผลของอัตราการเขย่าต่อการเจริญจากการเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง	39
13	ลักษณะของ PHA granule ภายในเซลล์ โดยใช้ transmission electron microscope (a) <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I, (b) <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M, (c) <i>Acinetobacter baumannii</i> PSU-V และ (d) <i>Acinetobacter baumannii</i> PSU-X	43
14	การเจริญของจุลินทรีย์ที่ผ่านการแยกเชื้อ เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ GM1 โดยเติมกรดอะซิติคความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับการใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น	45
15	การเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHA ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิก ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	47
16	ผลของการเขย่าต่อการเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M ในน้ำเสียโดยเติมกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า	

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	51
17 ผลของการเติมเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จาก การเลี้ยงจุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M ในน้ำเสียโดยเติมกรดโพธิ์ฟอสฟอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบน เครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	54
18 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จาก การเลี้ยงจุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M ในน้ำเสีย เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	57
19 การเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ผสมระหว่าง <i>Achromobacter xylosoxidans</i> (pha-I) และ <i>Achromobacters</i> sp. (pha-M) ในน้ำเสียที่เติม กรดวาเลอริกที่ความเข้มข้นต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	62
20 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยง จุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	66
21 ผลของการฆ่าเชื้อต่อการเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยง จุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	69
22 ผลของอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนต่อการเจริญ(a) การผลิต PHA (b) และ ค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดโพธิ์ฟอสฟอริก 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที)	72
23 โครมาโตแกรมของ PHA ที่ผลิตจากการเลี้ยงจุลินทรีย์ผสม <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I และ <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M	77
24 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHA	77
25 ตัวอย่างการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS 16.0	91

บทที่ 1

บทนำ

บทนำด้านเรื่อง

พลาสติกมีประโยชน์หลากหลาย เช่น มีความทนทาน มีน้ำหนักเบา มีอายุการใช้งานนาน คงทนต่อสภาวะต่างๆ จึงถือเป็นสินค้าที่อำนวยความสะดวกให้กับคนในยุคปัจจุบันเป็นอย่างมาก อุตสาหกรรมพลาสติกจึงมีความสำคัญ และใช้ทดแทนบรรจุภัณฑ์พวกแก้วและกระดาษ ในปัจจุบันพลาสติกทำจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ซึ่งสะดวกในการเปลี่ยนรูปร่าง มีความคงทนต่อสารเคมีสูง มีความยืดหยุ่นได้ดี และสามารถนำไปขึ้นรูปเป็น ไฟเบอร์หรือแผ่นฟิล์มบางใส ซึ่งคุณสมบัติต่างๆ ของพลาสติกนี้ทำให้เป็นที่นิยมใช้เป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์ และปัญหาที่ตามมาก็คือ ปัญหาพลาสติกที่สะสมเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นปัญหาลิ่งแวดล้อมของโลก เนื่องจากพอลิเมอร์สังเคราะห์เป็นขยะที่ย่อยสลายได้ยากมาก ต้องใช้เวลายาวนานเป็นร้อยๆ ปีกว่าที่จะสลายได้หมด แนวทางการแก้ไขปัญหาการจัดการขยะพลาสติก ประกอบไปด้วย การลดแหล่งของพลาสติก การเผาทำลาย การรีไซเคิล การย่อยด้วยวิธีชีวภาพหรือด้วยแสง อย่างไรก็ตามการแก้ไขอาจเกิดปัญหาาร่วมได้ เช่น การเผาทำลายอาจมีอันตรายและมีราคาแพง สำหรับการรีไซเคิลเนื่องจากพลาสติกมีหลายชนิดทำให้เสียเวลาในกระบวนการมาก ดังที่ได้กล่าวมา จึงได้มีการผลิตพอลิเมอร์ชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงพอลิเมอร์สังเคราะห์ แต่มีคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายหรือสลายตัวโดยวิธีธรรมชาติได้ เรียกว่า พอลิเมอร์ชีวภาพ ตัวอย่างวัสดุเหล่านี้ ได้แก่ Polyhydroxyalkanoate (PHA), Polylactide, Polysaccharide เป็นต้น

Poly- β -hydroxyalkanoate (PHA) เป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ มีคุณสมบัติเทียบเคียงได้กับพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิดพอลิโพรพิลีน ซึ่งข้อดีของ PHA คือเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายด้วยกระบวนการทางธรรมชาติ PHA สามารถแบ่งได้ตามลักษณะการเชื่อมต่อกันของโมโนเมอร์ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ โฮโมพอลิเมอร์ ได้แก่ Polyhydroxybutyrate (PHB) และโคพอลิเมอร์ ได้แก่ Poly - (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) [P(HB-co- HV) หรือ PHBV] โดยสัดส่วนของ HV ยิ่งสูงจะช่วยให้โคพอลิเมอร์มีความแข็งแรงมากขึ้น มีความยืดหยุ่นมากขึ้น ค่า elongation เพิ่มขึ้น (Madden *et al.*, 2000; Khanna and Srivastava, 2005) ดังนั้นการปรับปรุงเพิ่มคุณภาพของพอลิเมอร์ชีวภาพ สามารถทำได้โดยการควบคุมสัดส่วนของ HV ให้มีปริมาณสูง

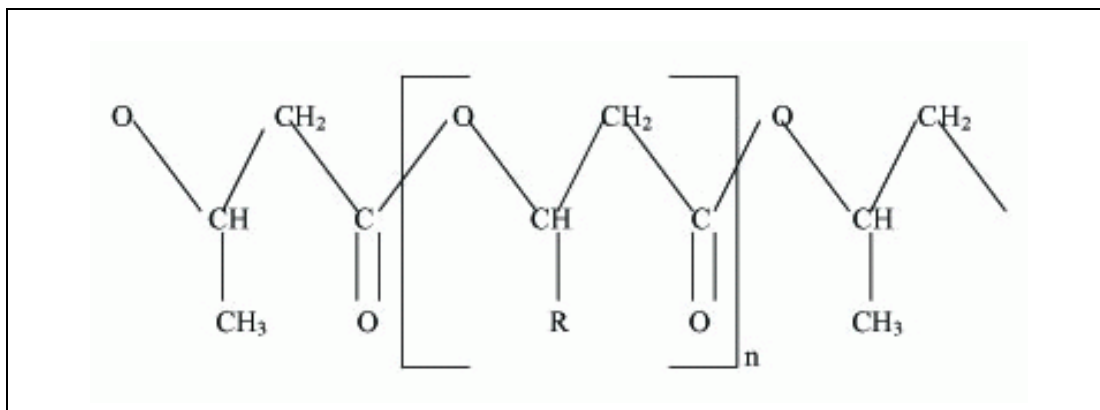
การวิจัยส่วนใหญ่ผลิต PHA โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์และอาหารสังเคราะห์ ซึ่งทำให้ต้นทุนการผลิตสูง จึงไม่คุ้มทุนในการนำมาผลิตเป็นทางการค้า ดังนั้นการใช้ของเสียที่ไม่มีมูลค่ามาเป็นสารอาหาร ทำให้ต้นทุนของวัตถุดิบลดลง แต่การใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ผลิตพอลิเมอร์

บทตรวจเอกสาร

1. Polyhydroxyalkanoates (PHAs)

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) เป็นพอลิเอสเทอร์ที่สะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดในลักษณะเม็ดแกรนูล ลักษณะของ PHA นั้นจะประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ 3-hydroxy-acid (HA) เช่น poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) พอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นเพื่อเป็นพลังงานสำรองสำหรับแบคทีเรีย และยังมีสาร HAs มากกว่า 80 ชนิด เป็นสารประกอบของ PHA ซึ่งสารเทอร์โมพลาสติกเหล่านี้จะมีคุณสมบัติเชิงกลต่างๆ ขึ้นอยู่กับการรวมตัวกันของหน่วยย่อยของโมโนเมอร์ (Lee, 1996; Doi, 1990)

สารประกอบพอลิเอสเทอร์ในกลุ่มของ PHA เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น โดยมีองค์ประกอบของโครงสร้างอยู่ในรูป R-(3)-hydroxy fatty acid หรือ R- β -hydroxy fatty acid โดยมีโครงสร้างทั่วไป ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

Figure 1. Chemical structure of polyhydroxyalkanoates.

ที่มา : [Khanna และ Srivastava \(2005\)](#)

PHA สามารถแบ่งได้ตามลักษณะการเชื่อมต่อกันของโมโนเมอร์ ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1.1 โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer)

โฮโมพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบของโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อรวมกันซึ่งในกรณีนี้จะยกตัวอย่างของการเชื่อมต่อกันของ R- β -hydroxy fatty acid ชนิด β -hydroxybutyrate ซึ่งมีหมู่เมธิลมาต่อกับสายพอลิเมอร์หลักตรงตำแหน่ง β หรือตำแหน่งที่ 3 และมีโมโนเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์เกิดเป็นสารประกอบพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยมีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์คือ พอลิโพรพิลีน

1.2 โคพอลิเมอร์ (copolymer)

โคพอลิเมอร์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบขึ้นด้วยหน่วยย่อยของโมโนเมอร์หลายชนิดมาต่อรวมกัน ในกรณีของโคพอลิเมอร์ของสารพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโควาริเรต นอกจากโมโนเมอร์ที่เป็น β -hydroxybutyrate แล้วจะมีการเชื่อมต่อกับโมโนเมอร์ของไฮดรอกซีวารีเรตทำให้เกิดเป็นโคพอลิเมอร์ P(3HB-3HV) หรือที่เรียกว่า poly(3-hydroxybutyrate-copolymer-3-hydroxyvalerate)

2. Polyhydroxybutyrate (PHB)

PHB ได้ค้นพบครั้งแรกในปี 1926 จากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* จาก PHAs ที่มีจำนวนถึง 125 ชนิด คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของ PHB พบว่ามีความเหมือนกับพอลิโพรพิลีน แต่ยังมีความเปราะกว่า โดย PHB สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดังนี้ ([Jogdand, 2004](#))

1. ใช้เป็นตัวห่อหุ้มยาที่ย่อยสลายได้ เพื่อค่อยๆ ปลดปล่อยยาที่บรรจุอยู่ภายในออกมาอย่างช้าๆ
2. ใช้เป็นสารกำจัดแมลง วัชพืชหรือใช้เป็นปุ๋ย

3. อุปกรณ์ที่ใช้เพียงครั้งเดียว ตัวอย่างเช่น มีดโกน เครื่องใช้ในครัวเรือน ฝ้ายอ้อม ขวดแชมพู ก่อขงบรรจุเครื่องสำอาง ถ้วยพลาสติก เป็นต้น
4. ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์สารพวก chiral compound
5. การประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์

PHB สามารถสังเคราะห์ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งของแบคทีเรีย ซึ่งคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมือนกับพอลิโพรพิลีน หรือพอลิเอทิลีน ยังสามารถนำมาอัด ปั่น ให้เป็นเส้นใยเพื่อทำเป็นแผ่นฟิล์มได้ แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถนำมาผลิตเป็นระดับอุตสาหกรรมในจำนวนมากได้เนื่องจากราคาสูงกว่าพลาสติกสังเคราะห์ (Khanna and Srivastava, 2005) คุณสมบัติโดยทั่วไปของ PHB สามารถสรุปได้ดังนี้ (Jogdand, 2004)

1. PHB ไม่ละลายน้ำและสามารถต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำให้ PHB ต่างจากพลาสติกที่ย่อยสลายได้ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้หรือมีความไวต่อความชื้น
2. PHB สามารถต้านทานต่อรังสีอัลตราไวโอเลตและออกซิเจนสามารถซึมผ่านได้ดี แต่มีความต้านทานต่อกรดและเบสต่ำ
3. PHB ละลายได้ในคลอโรฟอร์มและสารประกอบคลอริเนตไฮโดรคาร์บอนอื่นๆ
4. PHB มีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต (biocompatible) และในขณะนี้มีการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์
5. PHB มีจุดหลอมเหลวที่ 175 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิทรานซิชัน 15 องศาเซลเซียส และมีความทนแรงดึง 40 MPa
6. PHB จมน้ำในขณะที่พอลิโพรพิลีนลอยตัว แต่การจมน้ำของ PHB ก่อให้เกิดการย่อยสลายโดยไม่ใช้ออกซิเจนในการตกตะกอนและไม่มีความเป็นพิษ

นอกจากคุณสมบัติต่างๆ ของสาร PHB ที่กล่าวมาแล้ว PHB ยังมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพใกล้เคียงกับพอลิโพรพิลีนซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 1

3. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

Poly - (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) [P(HB-co- HV)] เป็นโคพอลิเมอร์ที่เกิดแบบสุ่ม ซึ่งมีโอกาสเกิดได้สูง (~50 เปอร์เซ็นต์) โดยเฉพาะ 3-hydroxyvalerate (3-HV) เกิดได้ตั้งแต่ 0-95 เปอร์เซ็นต์โมล ระหว่างการเกิดพอลิโมโนเมอร์ของ 3-hydroxybutyrate (3-HB) และ 3-HV นอกจากนี้ยังมีการเกิดโคพอลิเมอร์แบบสุ่มชนิดอื่นๆ ประกอบด้วย 3-HB and 3-hydroxyhexanoate (3-HHx) (ภาพที่ 2) ซึ่งจะช่วยปรับปรุงลักษณะทางกายภาพของพลาสติกชีวภาพให้ดีขึ้น

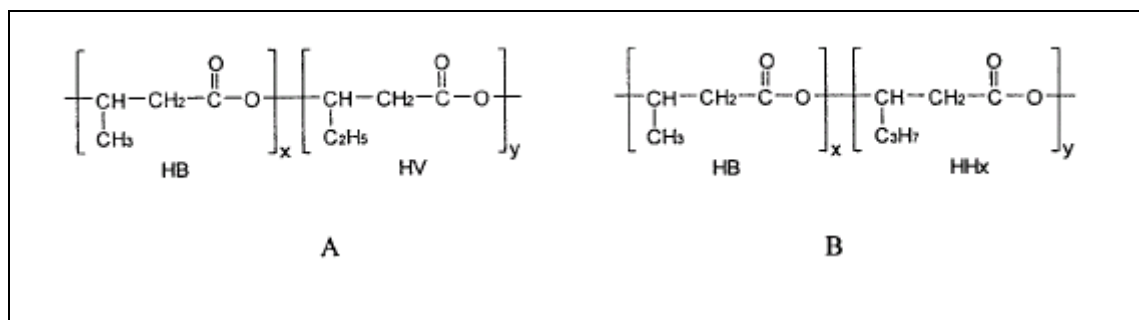
โครงสร้างและคุณสมบัติของ โคลิพอลิเมอร์ของ 3HB และ 3HV ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง โคลิพอลิเมอร์ P(3HB-co-3HV) มีจำนวนโพลิเมอร์ที่ใกล้เคียงกันประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ โคลิพอลิเมอร์ของ 3HB และ 3HV เป็นลักษณะ isodimorphic พบว่าสัดส่วนของ 3HV ยิ่งสูงจะช่วยให้โคลิพอลิเมอร์มีความแข็งแรงมากขึ้น มีความยืดหยุ่น ดังตารางที่ 2 พบว่าค่า elongation จะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้พบว่าเมื่อเพิ่มสัดส่วนของ 3HV จุดหลอมเหลวจะลดลง ดังนั้น สามารถเพิ่มคุณภาพของพอลิเมอร์ได้โดยการควบคุมสัดส่วนของ 3HV ให้เหมาะสมได้

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของ PHB เปรียบเทียบกับ PP

Table 1. Comparison properties between PHB with PP.

Parameter	PHB	Polypropylene (pp)
Melting point Tm [$^{\circ}$ C]	171-182	171-186
Glass Transition Temperature Tg [$^{\circ}$ C]	5-10	-15
Crystallinity [%]	65-80	65-70
Density [g cm $^{-3}$]	1.23 - 1.25	0.905 - 0.94
Molecular weight Mw ($\times 10^{-5}$)	1 – 8	2.2 - 7
Molecular weight distribution	2.2 – 3	5 - 12
Flexural modulus [GPa]	3.5 – 4	1.7
Tensile strength [MPa]	40	39
Extension to break [%]	6 – 8	400
UV resistance	Good	poor
Solvent resistance	Poor	good
Oxygen permeability [cm 3 m $^{-2}$ atm $^{-1}$ d $^{-1}$]	45	1700
Biodegradability	Good	-
US Annual production M. tones	not determined	1.8
Other	due to more density goes to the sediment in aquatic system.	due to low density floats in aquatic system

ที่มา : Jogdand (2004)



ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของ (A) P(HB-co-HV) and (B) P(HB-co-HHx)

Figure 2. Chemical structure of (A) P(HB-co-HV) and (B) P(HB-co-HHx).

ที่มา : Tian และคณะ (2002)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติของพอลิเมอร์

Table 2. Comparison properties of polymer.

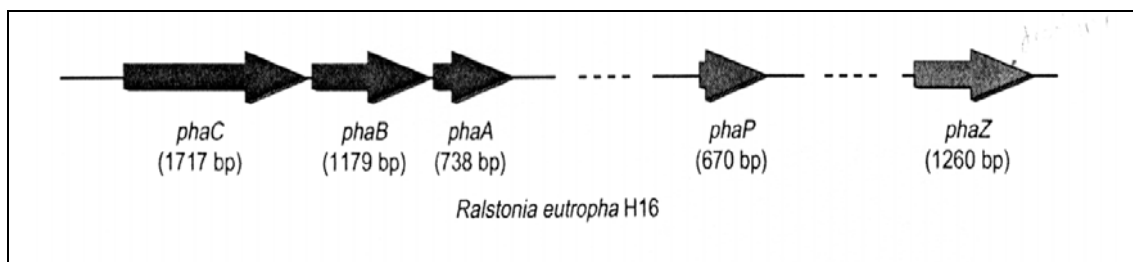
Polymer	Melting point (°C)	Young's modulus (GPa)	Tensile strength (MPa)	Elongation to break (%)	Glass transition temperature (°C)
P(3HB)	179	3.5	40	5	4
P(3HB-co-3HV)					
3 mol% 3HV	170	2.9	38	-	-
9 mol% 3HV	162	1.9	37	-	-
14 mol% 3HV	150	1.5	35	-	-
20 mol% 3HV	145	1.2	32	-	-
25 mol% 3HV	137	0.7	30	-	-
P(3HB-co-4HB)					
3 mol% 4HB	166	-	28	45	-
10 mol% 4HB	159	-	24	242	-
16 mol% 4HB	-	-	26	444	-
64 mol% 4HB	50	30	17	591	-
90 mol% 4HB	50	100	65	1080	-
P(4HB)	53	149	104	1000	-
P(3HHx-co-3HO)	61	-	10	300	-
P(3HB)-co-6mol% 3HA	133	0.2	17	680	-8
P(3HB)-co-67mol% HP	44	-	-	-	-19
P(3HB)-co-3HHx	52	-	20	850	-4
Polypropylene	170	1.7	34.5	400	45

ที่มา : Khanna และ Srivastava (2005)

4. กระบวนการสังเคราะห์ PHA ที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์

PHA เป็นสารกลุ่มพอลิเอสเทอร์ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ (R)-3HA ซึ่งสารจะอยู่ในรูป R Configuration ทำให้มีความจำเพาะของสเตอริโอไอโซเมอร์ของการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของเอนไซม์ PHA synthase และมีเพียงส่วนน้อยที่มีลักษณะเป็นส่วนหนึ่งของเอสโมโนเมอร์ที่ตรวจพบ โดยส่วนใหญ่จะรู้จักพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตกันดีในชื่อของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ประกอบขึ้นจากหน่วยของ (R)-3HB โมโนเมอร์จะถูกสังเคราะห์ไปเป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงอยู่ในช่วง 200,000 – 3,000,000 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะในการเจริญของเชื้อ (Sudesh *et al.*, 2000)

การควบคุมการผลิต PHA นั้นพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับ *phaCBA* cluster ดังภาพที่ 3 ซึ่งประกอบด้วย *phaA*, *phaB* และ *phaC* โดย *phaA* เป็นส่วนที่ควบคุมสำหรับการผลิตเอนไซม์ β -ketothiolase โดยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลง acetyl-coA ไปเป็น acetoacetyl-coA สำหรับ *phaB* เป็นส่วนที่ควบคุมการผลิตหรือสร้างเอนไซม์ NADPH-oxidoreductase ซึ่งทำการเปลี่ยน acetoacetyl-coA ให้เป็น R-3-hydroxybutyryl-coA และสำหรับ *phaC* เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ PHA polymerase โดยทำการสังเคราะห์พอลิเมอร์จาก R-3-hydroxybutyryl-coA ส่วน *phaP* ทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของ PHA granule นั่นคือโปรตีน phasin ซึ่งเป็น low-molecular weight protein โดยมีการสะสมเมื่อเกิดกระบวนการสังเคราะห์ และมีหน้าที่ส่งเสริมการผลิตด้วยการเชื่อมกับ granule เพื่อทำการควบคุมขนาด จำนวน และพื้นที่ผิวของ PHA inclusion การสังเคราะห์และการสะสม phasin เป็นกลไกที่เกิดขึ้นร่วมกับ *phaR* ซึ่งเป็น autoregulate repressor อย่างไรก็ตาม การควบคุมขนาด และจำนวนของ PHA inclusion ก็ยังขึ้นกับปริมาณของ *phaC* ที่มีอยู่ในเซลล์อีกด้วย และยังมี *phaZ* ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ depolymerase เพื่อใช้ปลดปล่อย R-3-hydroxybutyrate เมื่อมีการขาดไฮดรอกซีบิวทิเรต พบว่า *phaZ* จะทำการผลิตเอนไซม์ออกมาในรูปแบบที่ไม่สามารถก่อให้เกิดกิจกรรมได้ ซึ่งต้องอาศัยตัวกระตุ้น เช่น ทริปซิน เป็นตัวกระตุ้นทำให้มีข้อสังเกตว่า *phaZ* จะผลิตเอนไซม์ออกมาในรูปแบบของ proenzyme ในขณะที่เดียวกันการสลาย PHB granule จำเป็นต้องอาศัย proteolytic enzyme ร่วมเช่นกัน มีการคาดการณ์ว่า depolymerase น่าจะทำงานร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ อีกหลายชนิด (Luengo *et al.*, 2003)

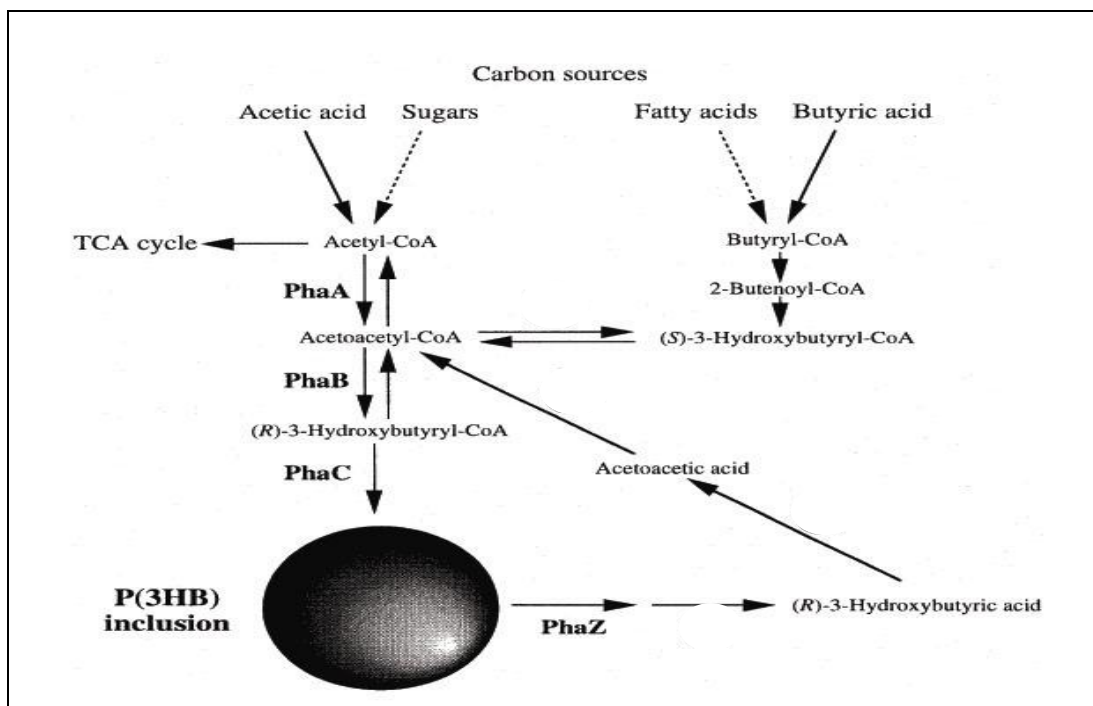


ภาพที่ 3 ลักษณะ *phaCBA* cluster ของ *Ralstonia eutropha* H16

Figure 3. Characteristic of *phaCBA* cluster of *Ralstonia eutropha* H16.

ที่มา : Luengo และคณะ (2003)

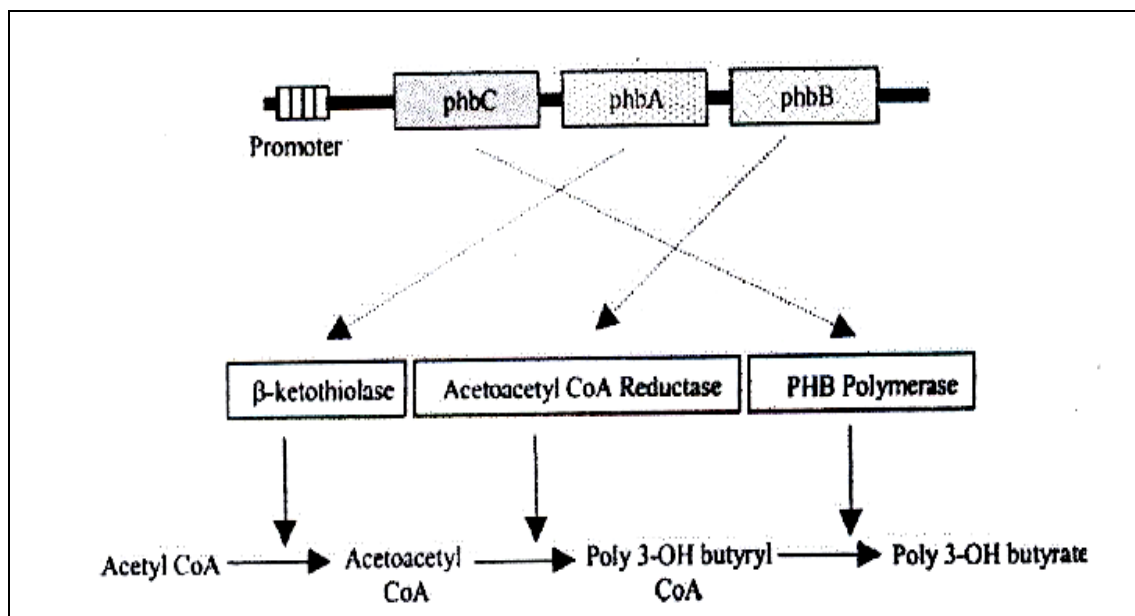
วิถีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต ดังแสดงในภาพที่ 4 มีความเกี่ยวข้องกับสารตัวกลางที่จะเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ (TCA cycle) โดยเริ่มต้นจากอะซิติลโคเอนไซม์เอ เปลี่ยนไปเป็นอะซิโตะซิติลโคเอนไซม์เอ และไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ ด้วยการทำงานของเอนไซม์เบต้า-คีโธไซโอเลส (β -ketothiolase) และอะซิโตะซิติลโคเออริคเตส (acetoacetyl-coA reductase) ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) ไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอไปเป็น PHB โดยเอนไซม์ PHB synthase อย่างไรก็ตาม PHB ที่เกิดขึ้นสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลุ่ม PHA depolymerase (Sudesh *et al.*, 2000) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ของแต่ละขั้นตอนในการสังเคราะห์ PHB นั้นเกิดจากการแสดงออกของ *phaCBA* cluster (Reddy *et al.*, 2003) ดังแสดงในภาพที่ 5 PHB ถูกสะสมไว้ภายใน granule ที่มีขนาดต่างๆ กัน โดยถูกล้อมรอบด้วย phospholipid monolayer และ phasin รวมถึงเอนไซม์ polymerase และ depolymerase รวมถึง unknown protein สำหรับหน้าที่ของ phospholipid envelope คาดว่าเพื่อหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับน้ำ ซึ่งเป็นการป้องกันการเปลี่ยนแปลงจาก amorphous lipid state ไปเป็น crystalline form และแสดงให้เห็นถึงหน้าที่ในการเป็น protective barrier ป้องกันตัวเซลล์ถูกทำลายจากการมีปฏิสัมพันธ์กับ PHB และโครงสร้างอื่นๆ รวมถึง cytosolic protein (unknown protein) ถ้า phospholipid monolayer มีความจำเป็นต่อการป้องกันตัวเซลล์จากกระบวนการสร้าง PHB ในช่วงเริ่มต้น แล้วสามารถตั้งข้อสังเกตได้ว่า envelope ที่เกิดขึ้น จะถูกเพิ่มขึ้นรอบๆ PHB granule ดังนั้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ monolayer ก็ย่อมมีส่วนร่วมกับการเอนไซม์ polymerase



ภาพที่ 4 วิธีการสังเคราะห์พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตและการย่อยสลายในแบคทีเรีย

Figure 4. Poly – hydroxybutyrate synthesis pathways and degradation in bacteria.

ที่มา : [Sudesh และคณะ \(2000\)](#)



ภาพที่ 5 การแสดงออกของ *phaCBA* cluster สำหรับการสังเคราะห์ PHB

Figure 5. Expression of *phaCBA* cluster for poly – hydroxybutyrate synthesis.

ที่มา : [Reddy และคณะ \(2003\)](#)

สำหรับกระบวนการเกิดโคพอลิเมอร์ของ PHB เช่น PHBV มีกระบวนการเกิดดัง **ภาพที่ 6** สามารถเกิดขึ้นได้ด้วยการใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดหน่วยย่อย 2 ชนิดต่างกัน คือ β -hydroxybutyrate และ β -hydroxyvalerate ในการเกิดโคพอลิเมอร์ชนิด PHBV นั้นจำเป็นต้องอาศัยสารตัวกลางที่สำคัญคือ Propionyl-CoA โดยการผลิต Propionyl-CoA สามารถทำได้โดยการเติมกรดโพรพิโอนิก กรดวาเลอริก หรือกรดไขมันระเหยง่าย สายสั้นๆที่มีจำนวนคาร์บอนเลขคี่ รวมถึงสามารถใช้กรดอะมิโนตัวอื่นได้เช่นกัน ซึ่งกรดอะมิโนที่สามารถเป็นสารตั้งต้นได้นั้น เช่น isoleucine, valine, methionine และ threonine ซึ่ง isoleucine, valine และ methionine ต้องผ่านกระบวนการสลาย (catabolic step) หลายขั้นตอนในการเกิดเป็น Propionyl-CoA ซึ่งในทางตรงกันข้ามกับ threonine ที่เกิดเพียง 2 ขั้นตอนใหญ่ โดยกระบวนการสังเคราะห์เกิดขึ้นดังนี้

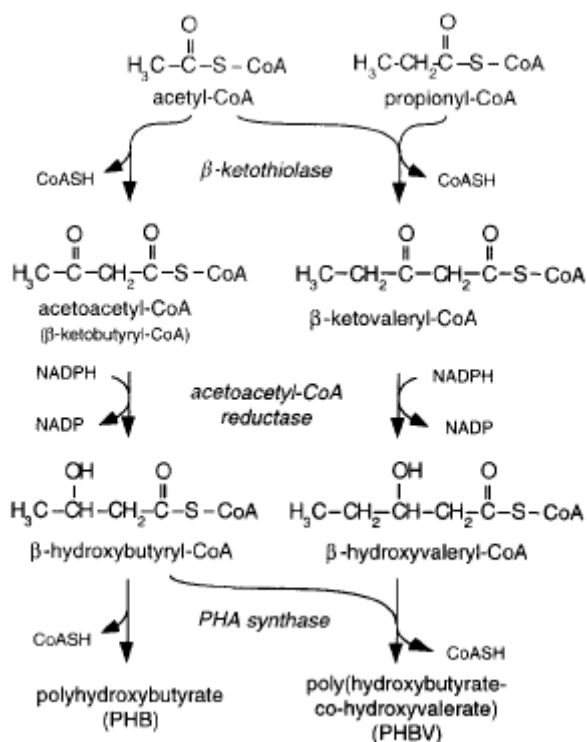
- กระบวนการ Deamination ซึ่งเป็นการดึงหมู่อะมิโนออกจากโครงสร้างของ threonine โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ threonine dehydratase (TD, EC 4.2.1.16) เพื่อเปลี่ยน threonine ให้เกิดเป็น α -ketobutyric acid (α -KB)

- กระบวนการเกิด Propionyl-CoA ในขั้นตอนนี้ต้องอาศัยกลุ่มเอนไซม์ในการเปลี่ยน α -ketobutyric acid มาเป็น Propionyl-CoA ซึ่งกลุ่มเอนไซม์ดังกล่าวเรียกว่า α -ketoacid oxidative decarboxylase enzyme complexes อันประกอบด้วย branched-chain α -ketoacid oxidative dehydrogenase complex (BCKD), α -ketoglutarate dehydrogenase complex (KGD) และ pyruvate dehydrogenase complex (PD) ซึ่งจะเป็นตัวเร่งกระบวนการการกำจัดหมู่คาร์บอกซิลจาก α -ketoacid และทำให้เกิดพันธะ thioester bond ระหว่าง CoA อิสระกับหมู่ ketoacyl ของ α -ketoacid วิธีการผลิต Propionyl-CoA จากกรดอะมิโน threonine แสดงดัง **ภาพที่ 7** (Eschenlauer *et al.*, 1996)

5. เมตาบอลิซึมของกระบวนการสังเคราะห์ PHA ที่ผลิตจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์

PHA สามารถผลิตได้ในกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะกระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศ-ให้อากาศ โดยมีจุลินทรีย์ 2 ชนิดที่สามารถสะสม PHA ในสภาวะไร้อากาศคือจุลินทรีย์ชนิดที่สะสมพอลิฟอสเฟต (polyphosphate-accumulating organisms; PAOs) และสะสมไกลโคเจน (glycogen-accumulating organisms; GAOs)

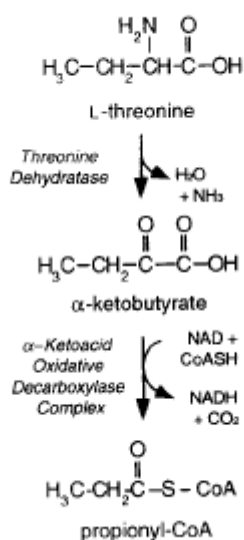
จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมพอลิฟอสเฟต (PAOs) ได้แก่ *Accumulibacter phosphatis* (Wikipedia, 2008), *Rhodocyclus* spp., *Propionibacter pelophilus* (Crocetti *et al.*, 2000), *Acinetobacter baumannii* (Jorgensen and Pauli, 1995)



ภาพที่ 6 วิธีความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ PHB และ PHBV

Figure 6. The relationship pathway of PHB and PHBV biosynthesis.

ที่มา : Eschenlauer และคณะ (1996)



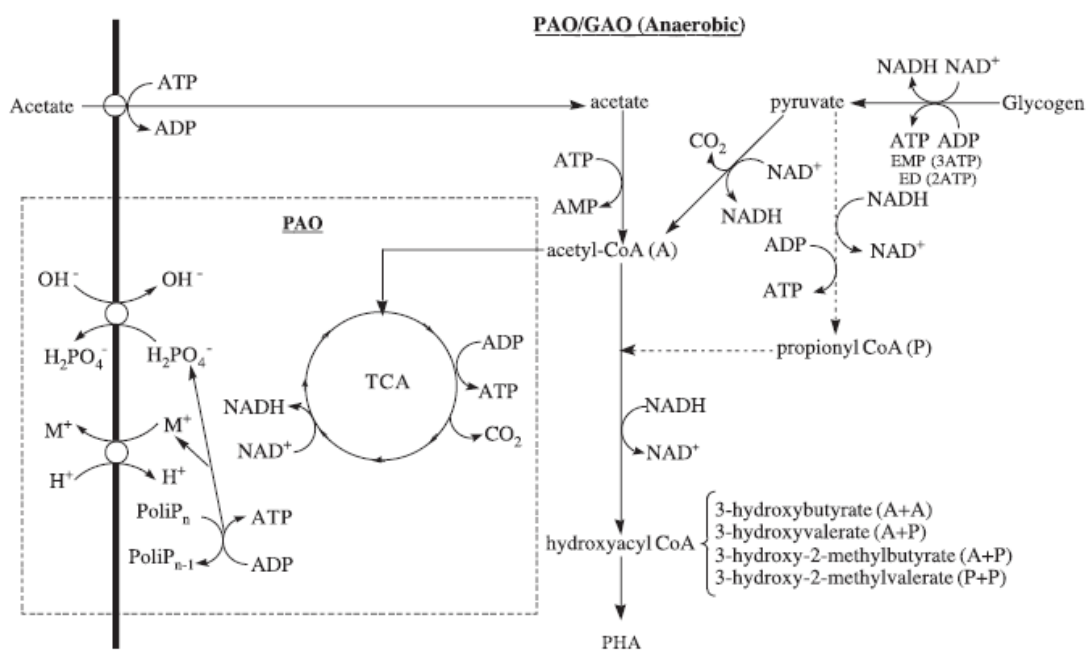
ภาพที่ 7 วิธีการผลิต Propionyl-CoA จากกรดอะมิโน threonine

Figure 7. The pathway of propionyl-CoA synthesis from L-threonine.

ที่มา : Eschenlauer และคณะ (1996)

จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมไกลโคเจน (GAOs) ได้แก่ *Acidobacteria* subphylum (Crocetti *et al.*, 2002), *Deftuviicoccus vamus* (Dai *et al.*, 2007)

ในสภาวะไร้อากาศจุลินทรีย์ชนิดที่สะสมพอลิฟอสเฟต จะใช้พอลิฟอสเฟตเป็นแหล่งพลังงานและไกลโคเจนภายในเซลล์เป็นแหล่งรีดิวซิงให้อิเล็กตรอน ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดที่สะสมไกลโคเจน จะใช้ไกลโคเจนภายในเซลล์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งรีดิวซิงให้อิเล็กตรอน ในการรับสารอินทรีย์ โดยเฉพาะกรดไขมันระเหยง่ายมาเก็บสะสมไว้ในรูปของ PHA จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดสามารถใช้อะซิเตรต และกระตุ้นให้เกิด acetyl-CoA ซึ่ง acetyl-CoA ถูกใช้ในการสังเคราะห์ PHA โดย acetyl-CoA จะเปลี่ยนเป็น acetoacetyl-CoA (ใช้ NADPH) และเปลี่ยนเป็น hydroxyacyl-CoA สุดท้ายมีกระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์ได้เป็น PHA ดังภาพที่ 8 (Salehizadeh and Van Loosdrecht, 2004)



ภาพที่ 8 กระบวนการสังเคราะห์ PHA ในระบบ PAO/GAO ภายใต้สภาวะไร้อากาศ

Figure 8 PHA synthesis pathways under anaerobic conditions for PAOs and GAOs.

ที่มา : Salehizadeh และ Van Loosdrecht (2004)

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHA ของจุลินทรีย์

การผลิตหรือสังเคราะห์พอลิเมอร์ โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพนั้นจะต้องคำนึงถึงหลายๆปัจจัยที่จะมีผลต่อชนิดและคุณสมบัติของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ เนื่องจากมีกลไกการสังเคราะห์ที่ซับซ้อน ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ PHA ที่ต้องการ มีปัจจัยที่สำคัญดังนี้

6.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอน

สายพันธุ์จุลินทรีย์ต่างชนิดกัน มีผลให้ชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกัน จากตารางที่ 3 (Punrattanasin,2001) เห็นได้ว่าการใช้จุลินทรีย์ต่างชนิดกันคือ *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126 และ *Corynebacterium Hydrocarboxydans* ATCC 21767 แต่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันคืออะซิเตต 10 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต PHA พบว่ามีจุลินทรีย์ทั้งสองมีความสามารถในการผลิต PHA ในเซลล์ต่างกันเท่ากับ 29 และ 21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สัดส่วนของ HB และ HV ใน PHA ก็แตกต่างกันด้วย เท่ากับ 31:69 และ 50:50 ตามลำดับ และเมื่อนำเปรียบเทียบกับสัดส่วน HB และ HV ในการผลิต PHA จากการใช้อะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ *Ralstonia eutropha* H16 พบว่า PHA ที่ผลิตได้มีเพียงสัดส่วน HB (100 เปอร์เซ็นต์) เท่านั้น

จุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่แหล่งคาร์บอนต่างกัน มีผลให้ชนิดและปริมาณของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้แตกต่างกัน เช่นจากการเลี้ยง *Ralstonia eutropha* H16 เพื่อผลิต PHA โดยใช้อะซิเตตเปรียบเทียบกับโพรพิโอเนต อย่างละ 22 กรัมต่อลิตร พบว่าความสามารถในการผลิต PHA ของจุลินทรีย์แตกต่างกัน เท่ากับ 53 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าชนิดของพอลิเมอร์ก็แตกต่างกันด้วย โดยอะซิเตตจะส่งเสริมให้ผลิตโฮโมพอลิเมอร์ ซึ่งมีสัดส่วนของ HB และ HV ใน PHA เท่ากับ 100:0 ส่วนโพรพิโอเนตส่งเสริมให้ผลิตโคพอลิเมอร์ มีสัดส่วน HB และ HV เท่ากับ 57:43 และเมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นของจุลินทรีย์ ก็คือกรดบิวทิริก และ วาเลอเรต พบว่ากรดบิวทิริก ส่งเสริมให้ได้โฮโมพอลิเมอร์ ซึ่งมีสัดส่วน HB ใน PHA 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวาเลอเรตเมื่อมีการใช้ร่วมกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นเช่นกลูโคส ส่งเสริมให้เกิดทั้งสัดส่วน HB และ HV โดยสัดส่วน HB และ HV ที่เกิดขึ้น ขึ้นกับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนด้วย (ตารางที่ 3)

จุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน แต่ความเข้มข้นต่างกันมีผลให้ปริมาณของพอลิเมอร์แตกต่างกันดังตารางที่ 3 การเลี้ยง *Azotobacter beijerinckii* โดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร พบว่าจุลินทรีย์ผลิต PHA ได้แตกต่างกันเท่ากับ 35 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเลี้ยง *Ralstonia eutropha* H16 โดยการใช้โพรพิโอเนตที่ความเข้มข้นต่างกัน ส่งผลให้การผลิต PHA ในเซลล์ และสัดส่วนของ HB และ HV ที่

ตารางที่ 3 การผลิต PHA ของจุลินทรีย์บริสุทธิ์และใช้กลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบตะกอนเร่ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

Table 3. PHA production of pure microorganisms and mixed culture from activated sludge using different carbon source.

Organisms	Substrate, conc.	PHA	Composition of PHA	
		(%w/w)	HB (%)	HV (%)
<i>Azotobacter</i>	G, 5g/L,	35	NR	NR
<i>beijerinckii</i>	G, 20 g/L	75	NR	NR
<i>Azotobacter vinelandii</i>	V, 10mM + G, NR	94	72	18
UWD	V, 20mM + G, NR	64	78	22
	V, 30mM + G, NR	74	75	25
	V, 10mM	67	84	16
	V, 20mM	36	79	21
	V, 30mM	29	72	28
<i>Rhodococcus</i> sp.	A, 10 g/L	29	31	69
NCIMB 40126	L, 10 g/L	25	22	78
	G, 10 g/L	21	25	75
<i>Rhodococcus ruber</i>	G, NR	16.2	30.3	69.7
NCIMB 40126	VA, NR	26.2	18	82
	G+VA, NR	27.7	21.9	78.1
<i>Corynebacterium</i>	A, 10 g/L	21	50	50
<i>hydrocarboxydans</i>	L, 10 g/L	2	61	39
ATCC 21767	G, 10 g/L	8	28	72
<i>Alcaligenes</i>	Sucrose, 20 g/L	50	100	0
<i>Latus</i>				
<i>Ralstonia eutropha</i>	F, 0.5 g/L	47	93	7
Strain R3	GL, 0.5 g/L	35.7	94	6
	A, 0.5 g/L	29.5	96	4
	S, 0.8 g/L	21.5	93	7
	L, 0.5 g/L	43.2	96	4
	F, NR	45	93	7
	F, NR	47	94	6
	GL,NR	33	95	5
	GL,NR	38	96	4
<i>R. eutropha</i>	Digested sludge supernatant	34	NR	NR
<i>R. eutropha</i> H16	A, 22 g/L	53	100	0
	A,22 g/L+P,10 g/L	51	81	19
	P, 22 g/L	35	57	43

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

ที่มา: ดัดแปลงจาก Punrattanasin (2001)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (Continued).

Organisms	Substrate, conc.	PHA	Composition of PHA	
		(%w/w)	HB (%)	HV (%)
<i>R. eutropha</i> H16 (ATCC 17699)	B, 0.03g/L	44	100	0
	B, 0.3 g/L	55	100	0
	B, 3 g/L	75	100	0
	B,10 g/L	63	100	0
	B,1.8g/L+V,1.2g/L	48	NR	NR
	V, 3 g/L	38	NR	NR
<i>R. eutropha</i> H16	A, 20 g/L	51	100	0
	A, 5 g/L	13	100	0
	A, 20 g/L + P, 1 g/L	46	98	2
	A, 20 g/L + P, 2 g/L	52	95	5
	A, 20 g/L + P, 4 g/L	51	91	9
	A, 5 g/L + P, 5 g/L	22	79	21
	A, 5 g/L + P, 10 g/L	38	74	26
	A, 5 g/L +P,20g/L	45	72	28
	P, 2 g/L	12	78	22
	P, 6 g/L	18	76	24
	P, 10 g/L	28	72	28
	P, 14 g/L	42	69	31
	P, 18 g/L	56	73	27
	P, 22 g/L	31	70	30
	P, 26 g/L	40	56	44
P, 30 g/L	35	55	45	
<i>R. eutropha</i> NCIB 11599	G, 10 g/L+P, 1 g/L	59	85	15
	G, 10 g/L+V, 1 g/L	60	78	22
<i>Alcaligenes faecalis</i> NCIB 8156	A, 10 g/L+P, 1 g/L	14	78	22
	A, 10 g/L+V, 1 g/L	5	52	48
<i>Pseudomonas</i> <i>extorquens</i> MP4	M, 10 g/L+P, 1 g/L	26	95	5
	M, 10g/L+V, 1 g/L	5	46	54
<i>Pseudomonas</i> sp. K	M, 1% (v/v)	52-57	100	0
<i>Pseudomonas</i> 135	M, 0.5% (v/v)	34-42	100	0
Activated sludge	A. NR	47	NR	NR
Activated sludge	A. 0.6 g/L	51	NR	NR
Activated sludge	A. 16.95 g/L	33	NR	NR

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

ที่มา : คัดแปลงจาก Punrattanasin (2001)

เกิดขึ้นก็แตกต่างกันด้วยเช่นกัน ดังนั้นการศึกษาการผลิต PHA ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ต้องมีการศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เพื่อการผลิต PHA ให้ได้มากที่สุด

Lemos และคณะ (2006) ศึกษาการสังเคราะห์ PHA จากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากระบบตะกอนเร่ง ในอาหารสังเคราะห์ โดยศึกษาในระบบ SBR (Sequencing Batch Reactor) ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเติมอะซิเตตและโพรพิโอเนตเพื่อเป็นสับสเตรท พบว่า กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการเลี้ยงโดยเติมอะซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ PHA ที่เป็นโฮโมพอลิเมอร์ชนิด HB ส่วนกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงโดยเติมโพรพิโอเนต ให้ PHA ที่เป็นโคพอลิเมอร์ชนิด HB และ HV เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนอะซิเตตร่วมกับโพรพิโอเนต จะได้โคพอลิเมอร์ คือ HB, HV และ hydroxymethylvalerate (HMV) แต่ค่าผลผลิตและอัตราการผลิต PHA จากการใช้อะซิเตตเป็นสารอาหารจะสูงกว่าการใช้โพรพิโอเนต ทั้งนี้เนื่องจากอะซิเตตประกอบด้วยคาร์บอนสายสั้นกว่า ทำให้ง่ายต่อการนำไปใช้โดยจุลินทรีย์

Alias และ Tan (2005) ศึกษาการแยกเชื้อที่สามารถผลิต PHA จากกลุ่มเชื้อผสมในน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์ม พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 45 ไอโซเลท โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้น เมื่อนำมาทดสอบการย้อมสีด้วย Sudan Black B ได้เชื้อ 10 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตไขมันไว้ภายในเซลล์ได้ หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีการจำกัดไนโตรเจน และมี palm olein (ไตรกลีเซอไรด์) หรือ saponified palm olein (เกลือของกรดไขมัน) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม palm olein เชื้อมีการเจริญดีกว่าการเติม saponified palm olein และนำไอโซเลทเดี่ยวๆที่ได้มาทดสอบด้วย Nine Blue A เพื่อหาเชื้อที่ผลิต PHA พบว่าวิธีนี้ไม่ดีพอในการเลือกเชื้อที่ผลิต PHA จึงมีการศึกษาการแยกเชื้อโดยวิธี enrichment technique โดยศึกษาการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายแบบ พบว่าการเติม palm olein (1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และเติมน้ำเสียที่เป็นแหล่งของกลุ่มเชื้อที่ใช้ (2.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบจุลินทรีย์ทั้งหมด 7 ไอโซเลท แต่มีเพียง 2 ไอโซเลทที่เจริญได้ดี (FLP1 และ FLP2) โดยเชื้อ FLP1 สามารถเจริญและผลิต PHA ได้ดีกว่าในอาหารที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เมื่อนำไปบ่งชี้จุลินทรีย์ โดยวิธี BIOLOG พบว่า FLP1 คือ *Burkholderia cepacia* เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมโพรพิโอเนตหรืออวาลิเรต จุลินทรีย์สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ชนิด poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

Dionisi และคณะ (2005) ศึกษาการผลิต PHA จากน้ำเสียโรงงานน้ำมัน โอเลฟินที่ผ่านการหมักแบบไร้อากาศ เปรียบเทียบกับการใช้อาหารสังเคราะห์ โดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์ผสมเริ่มต้น 300 มิลลิกรัม VSS ต่อลิตร เลี้ยงในระบบ SBR ควบคุมพีเอช 7.5 และควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากการใช้น้ำเสียที่ผ่านการหมักแบบไร้อากาศ เป็นอาหารสำหรับการผลิต PHA พบว่าจุลินทรีย์สามารถใช้ VFAs ที่มีอยู่ในน้ำเสียในการเจริญและสร้าง PHA โดยปริมาณ VFAs ที่มีอยู่ใน

ปิวรา บุตรวงศ์ (2546) ศึกษาผลของสารอินทรีย์คาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ กรดอะซิติกและกรดโอเลอิก ต่อการสะสม PHA ของจุลินทรีย์ ในกระบวนการแอนแอโรบิก-แอโรบิกเอสปีอาร์ โดยมีเวลาใน 1 วัฏจักรเท่ากับ 8 ชั่วโมง เป็นเวลาทำปฏิกิริยา 6.5 ชั่วโมง โดยถึงปฏิกรณ์ A และ AA มีการป้อนน้ำเสียสังเคราะห์ที่เติมกรดอะซิติก ควบคุมให้มีค่าซีไอดี 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีสภาวะไร้อากาศระหว่างการหมักเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ อายุสัปดาห์ 10 วัน ส่วนถึงปฏิกรณ์ O และ OO มีการป้อนน้ำเสียสังเคราะห์ที่เติมกรดโอเลอิก ควบคุมให้มีค่าซีไอดี 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีสภาวะไร้อากาศระหว่างการหมักเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง และ 1.5 ชั่วโมง ตามลำดับ อายุสัปดาห์ 20 วัน ผลการทดลองพบว่า ถึงปฏิกรณ์ A และ AA มีผลผลิตเซลล์เท่ากับ 0.304 และ 0.365 มิลลิกรัม MLSS ต่อมิลลิกรัมซีไอดี ตามลำดับ สูงกว่าปฏิกรณ์ O และ OO ซึ่งมีผลผลิตเซลล์เท่ากับ 0.081 และ 0.094 มิลลิกรัม MLSS ต่อมิลลิกรัมซีไอดี ตามลำดับ สำหรับการสะสม PHA พบว่าปฏิกรณ์ที่ใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนจะสะสมสัดส่วน HB เป็นองค์ประกอบหลัก (83-88 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ปฏิกรณ์ที่ใช้กรดโอเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอนจะสะสม PHBV โดยมีสัดส่วน HV เป็นส่วนใหญ่ (78-84 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นการใช้กรดโอเลอิกจะมีการสังเคราะห์ PHAs ชนิดอื่นๆ นอกเหนือจาก PHB คือ PHBV ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีสายยาวกว่า ทำให้มีคุณสมบัติเชิงกลที่ดีกว่า แต่อย่างไรก็ดี ปฏิกรณ์ที่ใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีผลผลิต PHA ที่สูงกว่า คือ ปริมาณ PHA ต่อปริมาณกรดอะซิติก เท่ากับ 2.99 และ 2.8 มิลลิกรัมคาร์บอนต่อมิลลิกรัมซีไอดี สำหรับถึงปฏิกรณ์ A และ AA ตามลำดับ ในขณะที่ถึงปฏิกรณ์ O และ OO มีปริมาณ PHA ต่อปริมาณกรดโอเลอิก เท่ากับ 2.78 และ 2.33 มิลลิกรัมคาร์บอนต่อมิลลิกรัมซีไอดี ตามลำดับ

Yu (2001) ศึกษาการผลิต PHA จากน้ำเสียโรงงานแป้ง โดยศึกษาเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนที่หนึ่งใช้จุลินทรีย์สร้างกรดผลิตกรด และขั้นตอนที่สองใช้จุลินทรีย์ที่ใช้กรดเพื่อสังเคราะห์พอลิเมอร์ น้ำเสียที่ใช้ทดลองขั้นตอนแรกใช้น้ำเสียจากโรงงานแป้งที่ผ่านการบำบัดในถัง UASB ผลิตก๊าซที่ได้ในขั้นตอนแรกได้แก่ กรดอะซิติก (60-80 เปอร์เซ็นต์), กรดโพรพิโอนิก (10-30 เปอร์เซ็นต์) และกรดบิวทีริก (5-40 เปอร์เซ็นต์) โดยมีกรดระเหยง่ายทั้งหมดเท่ากับ 4000 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำเสียที่มีภาระสารอินทรีย์ป้อนเท่ากับ 25-35 กรัมต่อลิตรต่อวัน อย่างไรก็ตาม ชนิดของกรดที่ผลิตในขั้นตอนที่หนึ่งขึ้นอยู่กับภาระสารอินทรีย์ที่ป้อนเข้า โดยสามารถผลิตกรดโพรพิโอนิกได้สูงที่สุดที่ภาระสารอินทรีย์เท่ากับ 9 กรัมต่อลิตรต่อวัน และได้กรดบิวทีริกสูงที่สุดที่ภาระสารอินทรีย์เท่ากับ 26 กรัมต่อลิตรต่อวัน หลังจากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ศึกษาการผลิต PHA โดยใช้เชื้อ *Alcaligenes eutropus* พบว่า 50 กรัมของ PHA ผลิตจาก 100 กรัม total organic carbon (TOC) ที่ถูกใช้ไป และปริมาณ PHA ในเซลล์คิดเป็น 34 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาการผลิต PHA แบบกึ่งกะโดยป้อนกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทีริกเข้าสู่ถังหมักด้วยอัตราการป้อน 3 ระดับ คือ 0.5 0.75 และ 1 กรัมต่อลิตร และมีแหล่งไนโตรเจน 80-100 มิลลิกรัมแอมโมเนียมต่อลิตร สามารถผลิต PHA ได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 45 ได้ PHA 48 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมกรดบิวทีริก และได้ PHA 53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมกรดโพรพิโอนิก PHA ที่มีการเติมกรดบิวทีริก จะได้ PHA ชนิด PHB ส่วนการเติมกรดโพรพิโอนิก จะได้ PHBV โดยมีสัดส่วน HV เท่ากับ 38 เปอร์เซ็นต์

6.2 แหล่งอาหารอื่นๆ

การสะสม PHA จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล แต่มีแหล่งคาร์บอนเพียงพอ แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการผลิต PHA กระบวนการสังเคราะห์และสะสม PHA จะเกิดขึ้นสูงหลังจากแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดและภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือเมื่อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปแต่มีการจำกัดปัจจัยบางชนิด เช่น ออกซิเจน ไนโตรเจน หรือฟอสฟอรัส เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม สารอาหารที่ต้องจำกัดนั้น จัดเป็นแร่ธาตุหลัก (major element) สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้างและการถ่ายเทพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ ซึ่งในการสังเคราะห์พอลิเมอร์จึงจำเป็นต้องมีปริมาณแร่ธาตุหลักเหล่านี้ เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์เท่านั้น เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสะสมแหล่งคาร์บอนและพลังงานอยู่ในเซลล์ในรูปพอลิเมอร์ ดังนั้นในการศึกษาถึงชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จึงจะทำให้การผลิตเกิดขึ้นได้ดี นอกจากนี้จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถผลิต PHA ได้จากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3

แบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้ผลิต PHAs แบ่งเป็น 2 กลุ่ม (Lee, 1996)

กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียที่ใช้สารอาหารในปริมาณจำกัด คือไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โปแทสเซียม ออกซิเจน หรือซัลเฟอร์ ในการสังเคราะห์ PHAs แต่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งอาหาร ได้แก่ *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans*

กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียที่ไม่ต้องจำกัดปริมาณสารอาหารในการสังเคราะห์ PHAs และสามารถเพิ่มปริมาณพอลิเมอร์ในระหว่างการเติบโต ได้แก่ *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandi*, ที่ผ่านการทำให้กลายเป็นพันธุ์ และ ริกอมบิแนนต์เชื้อ *E. coli* ที่ได้รับยีนจาก *Alcaligenes eutrophus*

Punrattanasin และ Randall (1999) ทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะ Microaerophilic-aerobic AS รวมทั้งสภาวะที่จำกัดธาตุอาหาร โดยทำการวัดปริมาณ PHA สะสมในเซลล์ของระบบ SBR แบบต่อเนื่องพบว่าในสภาวะที่มีการจำกัดธาตุอาหารทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส จุลินทรีย์จะมีการสะสม PHA สูงถึง 45 เปอร์เซ็นต์ของ total suspension solids (TSS) และเมื่อจำกัดไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวพบว่าการสะสม PHA เท่ากับ 36 เปอร์เซ็นต์ของ TSS แต่เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ต่อไปในสภาวะดังกล่าว จะพบว่าจุลินทรีย์ในระบบจะค่อยๆ ลดจำนวนลงและไม่ทำการสะสม PHA อีกต่อไป สามารถสรุปได้ว่า จุลินทรีย์จะทำการสะสม PHA ในสภาวะจำกัดธาตุอาหารได้สูงขึ้นแต่ถ้าปล่อยให้ขาดธาตุอาหารต่อไปเรื่อยๆ จุลินทรีย์จะตายเนื่องจากขาดธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต

6.3 อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

Kumar และคณะ (2004) ศึกษาการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ผสมเพื่อเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารสังเคราะห์ โดยใช้กรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 500 ถึง 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรการใช้งาน 250 มิลลิลิตร โดยเติมจุลินทรีย์ผสมเริ่มต้น 430 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ในรูปของ MLSS ผลการทดลองพบว่า ที่การเติมกรดอะซิติกเป็นแหล่งคาร์บอน 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3150 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการศึกษาครั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHB จึงได้ศึกษาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 24, 96, 120, 144 และ 168 ตามลำดับ โดยเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ นำมาวิเคราะห์ปริมาณ PHB และปริมาณเซลล์ และคำนวณในรูปของร้อยละของการสะสม PHB ต่อปริมาณเซลล์ ที่เวลาต่างๆ พบว่าเมื่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเพิ่มขึ้น การสะสม PHB ต่อปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น ชุดการทดลองที่มีการสะสม PHB สูงสุด คือชุดที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 144 มีการสะสม PHB 33 เปอร์เซ็นต์

6.4 ออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิต PHA เนื่องจากสภาวะออกซิเจนมีจำกัด เอนไซม์ ซิเตรทซินเทสและไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนสถูกยับยั้งการทำงานโดย NADH ทำให้ Acetyl CoA ไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโอะซิติลโคเอเพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHA โดยเอนไซม์เบต้าคีโตไซโอเลส (Luengo *et al.*, 2003)

Satoh และคณะ (1998) เลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ 2 แบบ Anaerobic – Aerobic AS (A-A) และ Microanaerobic – Aerobic AS (M-A) แล้วนำสลัดจ์จากทั้ง 2 ระบบมาทดสอบปริมาณ PHA ในปฏิกรณ์แบบกะ 2 แบบ คือ ไม่มีการเติมออกซิเจน และแบบที่มีการเติมออกซิเจนในปริมาณจำกัด พบว่าสลัดจ์จากระบบ A-A มีการสังเคราะห์ PHA ในการทดสอบที่มีออกซิเจนสูงกว่าในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ และ 22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในสลัดจ์จากระบบ M-A สามารถสังเคราะห์ PHA ได้ถึง 62 เปอร์เซ็นต์ สรุปผลการทดลองได้ว่า ออกซิเจนที่ไม่มากจนเกินไป อาจจะทำให้มีการทำงานของ TCA cycle ทำให้สามารถผลิต NADH ได้มากขึ้น NADH สามารถยับยั้ง เอนไซม์ ซิเตรทซินเทส (Citrate synthase) และไอโซซิเตรทดีไฮโดรจีเนส (Isocitrate dehydrogenase) ทำให้อะซิโอะซิติลโคเอ (Acetyl-CoA) ไม่เข้าสู่ TCA cycle แต่จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิโอะซิติลโคเอ (Acetoacetyl-CoA) เพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHA ส่งผลให้สามารถสังเคราะห์ PHA ได้มากขึ้น

6.5 ฟีเอช

ฟีเอชเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิต PHB พบว่า เมื่อต้องการผลิต PHB ควรทำการควบคุมฟีเอชไม่ให้ต่ำกว่า 7 เพื่อป้องกันไม่ให้ค่าฟีเอชลดลงอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดมากเกินไปเมื่อสิ้นสุดการเจริญ

Kasemsap และ Wantawin (2007) ศึกษาผลของ PHA ต่อศักยภาพในการสังเคราะห์ PHA โดยใช้ชุดทดลองในสภาวะไร้อากาศ โดยใช้กรดอะซิติกเป็นสารอาหาร และเปรียบเทียบการสะสม PHA จากสลัดจ์ส่วนเกิน 2 กลุ่ม คือ RP5 และ RP15 ที่มีปริมาณพอลิฟอสเฟตในเซลล์ 2 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ, ไกลโคเจนภายในเซลล์ 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าการสลายสารที่เป็นแหล่งพลังงานได้แก่ไกลโคเจนและพอลิฟอสเฟตที่ค่าฟีเอช 6 จะน้อยที่สุด และมากขึ้นตามลำดับเมื่อฟีเอชสูงขึ้น มีผลทำให้มีการสะสม PHA ที่ฟีเอช 6 มากที่สุด คือ 17 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ในรูปคาร์บอน สำหรับ RP5 และ RP15 ตามลำดับ แต่การใช้พลังงานมากขึ้นและเป็นพลังงานจากการสลายไกลโคเจนในการดึงสารอาหารเข้าเซลล์ที่ฟีเอชสูงขึ้น มีผลให้สัดส่วน HV ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของพลาสติกประเภทนี้มีค่าสูงขึ้น ดังนั้นสลัดจ์ RP5 จะมีสัดส่วน HV/PHA ที่ฟีเอช 8 สูงกว่าที่สะสมที่ฟีเอช 6 แต่สัดส่วนดังกล่าวค่อนข้างคงที่สำหรับ RP15

Chua และคณะ (2003) ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการดำเนินการระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ที่ใช้บำบัดน้ำเสียชุมชนให้สามารถสะสม PHA ได้ โดยปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการสะสม PHA ของจุลินทรีย์ได้แก่ ความเข้มข้นของอะซิเตตในน้ำเสียขาเข้า ค่าพีเอช และ SRT จากการทดลองพบว่าสลัดจ์ที่คุ้นเคยกับน้ำเสียชุมชนที่มีการเติมอะซิเตตเพิ่ม 1000 มิลลิกรัมคาร์บอนต่อลิตร สามารถสะสม PHA ได้สูงสุด 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ส่วนสลัดจ์ที่คุ้นเคยกับน้ำเสียชุมชนซึ่งไม่ได้เติมอะซิเตตจะสะสม PHA ได้เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งเท่านั้น และยังพบอีกว่า อายุสลัดจ์ที่สั้น (3 วัน) จะให้การสะสม PHA ดีกว่าอายุสลัดจ์ที่ยาวนาน (10 วัน) ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าพีเอชจะไม่ค่อยมีผลต่อการสะสม PHA เท่าใดนักในระบบแอกทิเวเต็ดสลัดจ์ โดยพีเอช 7-8 ยังให้การสะสมพอลิเมอร์ที่ไม่ต่างกัน แต่สำหรับการทดลองในระบบกะ พีเอชมีผลกระทบต่ออัตราการสะสมพอลิเมอร์ โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการสะสม PHA คือที่ 8-9

6.6 อุณหภูมิ

โสภา ชินเวทกิจวานิชย์ (2547) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิต PHA ด้วยเชื้อผสมโดยใช้น้ำเสีย อุณหภูมิที่ใช้ทดลองได้แก่ 10, 20, และ 30 องศาเซลเซียส โดยแต่ละอุณหภูมิได้ทำการทดลองกับการจำกัดธาตุอาหาร 3 แบบ คือ จำกัดเฉพาะไนโตรเจน, จำกัดเฉพาะฟอสฟอรัส และจำกัดเฉพาะทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ใช้รูปแบบการเดินระบบแบบสองขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่ผลิต PHA แล้วตามด้วยขั้นตอนการจำกัดธาตุอาหารเพื่อกระตุ้นการผลิต PHA ให้มากขึ้น จากการทดลองพบว่า อุณหภูมิส่งผลต่ออัตราการผลิตและผลผลิตของ PHA อย่างเห็นได้ชัด คืออัตราการผลิตและผลผลิต PHA จะเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ การจำกัดธาตุอาหารทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสให้ผลการผลิต PHA ดีกว่าการจำกัดธาตุอาหารแบบอื่น โดยชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส กับการจำกัดธาตุอาหารเฉพาะไนโตรเจน ค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าความเข้มข้นของ PHA ในระบบ คือ 2,830 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองการจำกัดธาตุอาหารเฉพาะฟอสฟอรัส ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 52 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเข้มข้นของระบบ คือ 1,491 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองจำกัดธาตุอาหารทั้งไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ผลผลิต PHA ในการทดลองที่ 10 และ 20 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกัน โดยค่าสัดส่วน PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของ PHA เท่ากับ 2,133 มิลลิกรัมต่อลิตร

7. การสกัด PHA และทำให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนปกติประกอบด้วย การแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกจากน้ำหมัก จากนั้นนำเซลล์จุลินทรีย์ที่เก็บรวบรวมได้ไปเข้ากระบวนการย่อยเซลล์เพื่อทำให้เซลล์แตกออก และปลดปล่อย PHA ที่สะสมไว้หลุดออกมา หลังจากแยกเอากากชีวมวลออกจึงส่งเข้าสู่กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ในขั้นตอนการแยกเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ออกจากน้ำหมักใช้วิธีการแยกเซลล์ตามปกติธรรมดาซึ่งมักอาศัยกระบวนการแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงหรืออาศัยเพียงการกรองก็สามารถแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักได้ สำหรับในขั้นตอนถัดไปเป็นการย่อยให้เซลล์แตกเพื่อแยกเอา PHA ที่อยู่ภายในออกมาสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

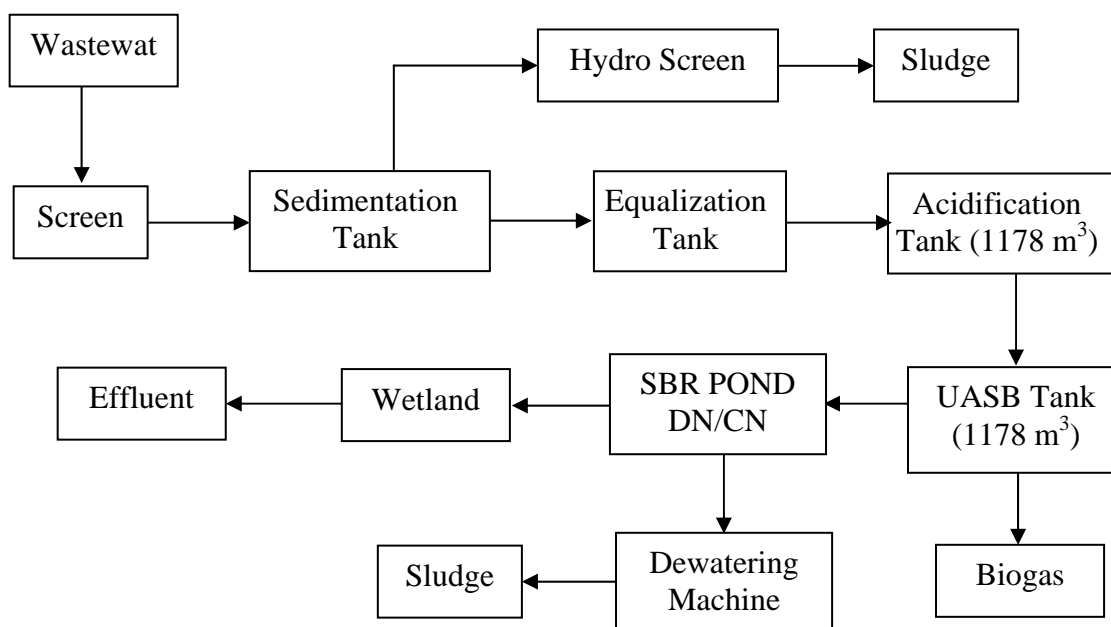
- การย่อยเซลล์ และสกัด PHA ออกด้วยตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม (chloroform) เมทิลีนคลอไรด์ (methylene Chloride) โพรพิลีนคาร์บอเนต (propylene Carbonate) และไดคลอโรอีเทน (dichloroethane) แต่กระบวนการสกัด PHA ออกด้วยตัวทำละลายนี้ จะได้สารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้นประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตรของ PHA ซึ่งมีความหนืดสูงมาก ทำให้กระบวนการแยกเศษชีวมวลออกไปทำได้ยาก จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายในปริมาณมากจนให้ผลไม่คุ้มค่ากับการลงทุนถึงแม้จะมีการหมุนเวียนนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่ (Lee, 1996)

- การย่อยเศษชีวมวลที่ไม่ใช่ PHA ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย วิธีนี้จะช่วยย่อยสลายเศษชีวมวลออกไปทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือโซเดียมไฮโปคลอไรท์จะไปย่อยสลายสารพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตด้วยเช่นกัน และนอกจากนี้ยังมีผลทำให้ PHA ที่แยกสกัดได้มีคุณสมบัติที่ไม่เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้งานหลายๆด้าน

- การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เอนไซม์ กระบวนการนี้ประกอบด้วย การให้ความร้อนกับชีวมวลแล้วนำไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ จากนั้นนำไปล้างด้วยสารละลายซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ เพื่อละลายเอาเศษชีวมวลออกจาก PHA แต่ผลที่ได้จากกระบวนการนี้ มักจะมีความบริสุทธิ์ที่ไม่สูงนัก ในกรณีที่ต้องความบริสุทธิ์สูงๆ ต้องใช้ร่วมกับกระบวนการแยกสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูงขึ้น (Hocking and Marchessault, 1992)

8. กระบวนการบำบัดน้ำเสีย

กระบวนการบำบัดน้ำเสียบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง มีผังกระบวนการดังนี้



ภาพที่ 9 กระบวนการบำบัดน้ำเสียบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)

Figure 9. Wastewater treatment of Tropical Canning Public Company Limited, Thailand.

กระบวนการบำบัดน้ำเสียของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง แบ่งเป็น 2 กระบวนการใหญ่ ๆ ดังนี้

8.1 การบำบัดทางกายภาพ

เป็นกระบวนการกำจัดอนุภาคแขวนลอยซึ่งอยู่ในรูปของของแข็งที่ไม่ละลายน้ำหรือไขมันออกจากน้ำเสีย เพื่อป้องกันการอุดตันของท่อหรือการสิ้นเปลืองของบ่อบำบัด ซึ่งมักเป็นขั้นตอนแรกของระบบบำบัดน้ำเสีย ได้แก่

- การดักด้วยตะแกรง (Screening)
- การตกตะกอน (Sedimentation) และการกวาดตะกอน (Skimming)
- การปรับสภาพ (Equalization)

น้ำเสียจากแหล่งต่าง ๆ ของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่งจะถูกส่งมาตามท่อเพื่อมารวมกันในบ่อสูบล้าง ซึ่งภายในบ่อจะมีตะแกรงอยู่ 2 แบบ คือ ตะแกรงหยาบและตะแกรงละเอียด โดยน้ำเสียจะไหลผ่านตะแกรงหยาบก่อนเพื่อดักหรือแยกของแข็งขนาดใหญ่ออกไป เช่น เศษขยะ เศษ

8.2 การบำบัดทางชีวภาพ

เป็นขั้นตอนการกำจัดหรือลดสารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่ละลายอยู่ในน้ำเสีย โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเสีย ซึ่งมี 2 ระบบ คือแบบไม่เติมอากาศ (UASB System) และแบบเติมอากาศ (SBR System)

ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่เติมอากาศ ประกอบด้วย 2 ถัง ได้แก่ถังกรด และถัง UASB น้ำเสียจากบ่อ EQ ถูกสูบเข้าสู่ถังกรด เพื่อการย่อยสลายสารอินทรีย์และไขมันในน้ำเสียให้เป็นกรดอินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ ดังสมการ

Acid forming bacteria

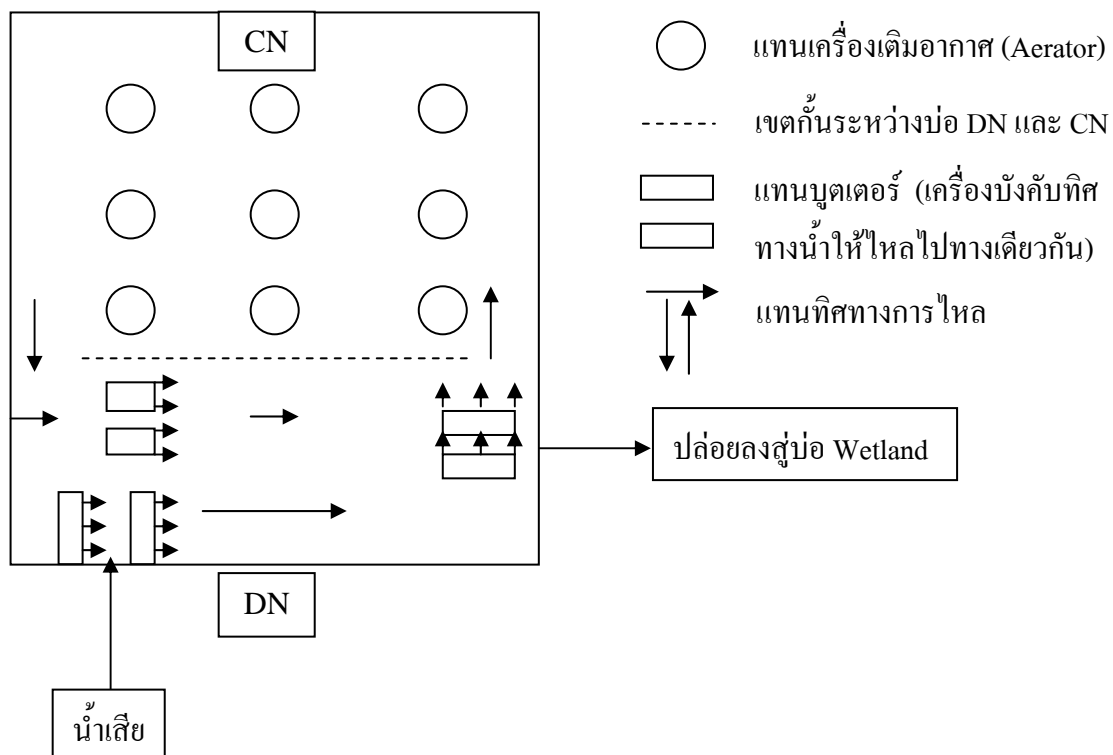
สารอินทรีย์(BOD, COD) \longrightarrow กรดไขมันที่ระเหยได้ (VFA)

หลังจากนั้นน้ำเสียจากถังกรด จะผ่านเข้าถัง UASB ทางด้านล่างโดยน้ำเสียจะไหลจากข้างล่างขึ้นข้างบน (Upflow) ผ่านชั้นของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนซึ่งจะย่อยกรดอินทรีย์จนกลายเป็นก๊าซชีวภาพ (มีเทน) ดังสมการ

Methane forming bacteria

VFA \longrightarrow $\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{ตัวcell}$
(เผาทิ้ง) (ตะกอน MLSS)

จากนั้นน้ำเสียจะเข้าสู่ถังผสมเพื่อเติมปูนขาว ซึ่งเป็นการปรับสภาพของน้ำให้เป็นกลาง (พีเอช 6.8-7.4) และเติมน้ำเสียที่ออกจากถังสร้างกรด ควบคุมให้น้ำเสียมีอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ บีโอดี:ไนโตรเจน:ฟอสฟอรัส เท่ากับ 100:5:1 เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้การเกิด ปฏิกิริยา Nitrification ในระบบบำบัดน้ำเสียแบบ SBR ซึ่งมีทั้งส่วนเติม



ภาพที่ 10 แผนผังของระบบบำบัดน้ำเสีย

Figure 10. Schematic of wastewater treatment system.

ขั้นตอนในบ่อให้อากาศแบบ SBR (Sequencing Batch Reactors) มีดังนี้

- น้ำเสียจะเข้าสู่บ่อ SBR ทางบ่อ DN (Denitrification) จากนั้นน้ำเสียจะไหลเข้าสู่บ่อ CN (Nitrification) (มีเครื่องเติมอากาศอยู่) โดยมีตัวบูดเตอร์(Booster) เป็นตัวบังคับทิศทางน้ำให้ไหลไปทางเดียวกัน และจะไหลวนไปเรื่อยๆจนกว่าจะหยุดเครื่องเติมอากาศ
- ขณะเปิดเครื่องเติมอากาศ(กำลังเติมอากาศ)จะเกิดปฏิกิริยา Nitrification ดังสมการ
$$\text{NH}_3 \xrightarrow{\text{O}_2} \text{NO}_3^-$$
- น้ำเสียที่มี NO_3^- จะไหลมาทาง DN และเกิดปฏิกิริยา Denitrification ดังสมการ
$$\text{NO}_3^- \longrightarrow \text{N}_2 \text{ (ลอยสู่บรรยากาศ)}$$
- หลังจากนั้นจะหยุดเครื่องเติมอากาศและปล่อยให้ตกตะกอน จะได้น้ำใสส่วนบนที่สามารถปล่อยทิ้งออกได้ จากนั้นสามารถนำน้ำเสียชุดใหม่เข้ามาบำบัดต่อไป และ

รอบการทำงานของบ่อ SBR ใน 1 รอบ (ใช้เวลาทั้งหมด 8 ชั่วโมง) จะมีการทำงาน 4 ช่วงดังนี้

1. ช่วงเติมน้ำเสีย (Fill) นำน้ำเสียเข้าระบบ (ครึ่งชั่วโมง)
2. ช่วงทำปฏิกิริยา(React) เป็นการลดสารอินทรีย์ในน้ำเสีย (6 ชั่วโมง)
3. ช่วงตกตะกอน (Settle) ทำให้ตะกอนของจุลินทรีย์ตกลงมาที่ก้นถังปฏิกิริยา (1 ชั่วโมง)
4. ช่วงระบายน้ำออก (Draw) ระบายน้ำที่ผ่านการบำบัดแล้วปล่อยสู่บ่อ Wetland (ครึ่งชั่วโมง)

ในบ่อ SBR จะมีตะกอนจุลินทรีย์มากเกินพอ เมื่อบำบัดไปนานๆ จุลินทรีย์เหล่านี้จะดึงออกซิเจนในน้ำเสีย ทำให้ต้องใช้ออกซิเจนมากขึ้น จึงมีการดึงตะกอนจุลินทรีย์ออกบางส่วนและเอาไปทำแห้ง

สำหรับน้ำเสียที่ผ่านบ่อ SBR แล้วนั้นจะถูกปล่อยลงสู่บ่อ Wetland เป็นเวลา 15 วัน ซึ่งบ่อ Wetland เป็นบ่อน้ำเสียขั้นสุดท้ายก่อนที่จะปล่อยลงสู่ลำคลอง โดยจะอาศัยพืชน้ำเช่น จอก แหน ผักตบชวา บัว ซึ่งพืชเหล่านี้

- สามารถช่วยในการกรองและตกตะกอนของสารแขวนลอยและสารอินทรีย์ที่ตกตะกอนได้ เป็นการลดสารแขวนลอยและค่า BOD ได้

- นอกจากนี้มันยังเป็นตัวดูดซับพวกธาตุอาหาร อันได้แก่ N , P ที่หลงเหลืออยู่ในน้ำซึ่งถ้าหากมีธาตุจำพวกนี้อยู่ในน้ำสูง มันจะส่งผลให้พืชน้ำเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลง

- สามารถถ่ายเทออกซิเจนลงในน้ำ ช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนลงในน้ำได้
- ป้องกันการเจริญเติบโตของสาหร่าย โดยจะทำหน้าที่ในการกำบังแสงแดดที่ส่องลงไปใต้น้ำ นอกจากนี้ยังช่วยลดกลิ่นของน้ำเสียได้อีกด้วย

กรมโรงงานอุตสาหกรรมกำหนดค่ามาตรฐานของน้ำก่อนที่จะปล่อยลงสู่ลำคลอง มีค่าดังนี้

- pH มีค่า 5.5-9.0
- Temp. มีค่า < 40⁰C
- COD มีค่า < 120 mg/L
- BOD มีค่า < 20 mg/L
- TKN มีค่า < 100 mg/L as N

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการแยกเชื้อที่ผลิต PHA จากกลุ่มจุลินทรีย์จากระบบ SBR
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHA จากน้ำเสียโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากระบบตะกอนเร่งในขวดรูปชมพู่
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA จากน้ำเสียโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากระบบตะกอนเร่ง ในถังปฏิกรณ์

ขอบเขตงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHA จากน้ำเสียโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากจากระบบ SBR โดยศึกษาการแยกเชื้อที่ผลิต PHA จากกลุ่มจุลินทรีย์จากระบบ SBR ศึกษาผลของอัตราการเขย่า ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบการฆ่าเชื้อกับไม่ฆ่าเชื้อน้ำเสีย หลังจากนั้นมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์ โดยศึกษาผลของการให้อากาศกับการกวน

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย คือ สามารถทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHA จากน้ำเสีย โดยจุลินทรีย์จากระบวนการบำบัดน้ำเสีย และทราบความเป็นไปได้ในการเพิ่มศักยภาพในการผลิต PHA จากน้ำเสีย ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการลดต้นทุนในการผลิต PHA เพื่อผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

จุลินทรีย์

ในการทดลองใช้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากตะกอนในระบบ sequencing batch activated sludge reactors (SBRs) ช่วงตกตะกอนจุลินทรีย์ของโรงงานทอปปิคอลแคนนิง (ประเทศไทย) จำกัด มหาชน

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (Growth medium; GM1) ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) NH_4Cl_2 0.180, KH_2PO_4 0.052, K_2HPO_4 0.067, MgSO_4 0.50 และ mineral solution 1 มิลลิลิตร ซึ่ง mineral solution ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.008, CaCl_2 0.010, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0003, FeCl_3 0.010, H_3BO_3 0.004, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.002, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 และ $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002 ใช้ $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 30 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน (Kumar *et al.*, 2004)

น้ำเสีย

น้ำเสียจากถังสร้างกรด (acidification tank) จากกระบวนการบำบัดน้ำเสียบริษัททอปปิคอลแคนนิง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) (ภาพที่ 9)

อุปกรณ์

- เครื่องเขย่า (ยี่ห้อ New Brunswick รุ่น Model G25-KLG)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (ยี่ห้อ Hettich รุ่น Model UNIVERSAL.32)
- ตู้ถ่ายเชื้อ (ยี่ห้อ Clean รุ่น V8)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HV-85)
- เครื่องวัดพีเอช (ยี่ห้อ Mettler)
- ถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร (ยี่ห้อ EYELA รุ่น MDL-300)
- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น 320)
- โถดูดความชื้น Model Gas Pak 150
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชัน (ยี่ห้อ JEOL รุ่น JEM-100CX II)

- เครื่อง Gas Chromatography – Flame Ionization Detector; GC-FID (ยี่ห้อ HEWLETTE PACKARD รุ่น HP 6850)

วิธีการวิเคราะห์

1) การหาปริมาณกรดไขมัน

การวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยใช้ GC-FID โดยเก็บตัวอย่างของเหลว นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ปั่นเหวี่ยงแล้ว 1 มิลลิลิตร นำมาเติม 3-M phosphoric 1 มิลลิลิตร และ 4-Methyl-n-valeric acid 1 มิลลิลิตร (internal standard) และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ 15000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 1 นาที และนำส่วนใสมาฉีดเข้า GC ซึ่งใช้ capillary column (Stabilwax-DA, model Restek 06313) โดยกำหนดสภาวะของ GC ดังนี้ มีความดันอากาศภายในเครื่อง 50 psi, ความดันของก๊าซ helium 60 psi และ ความดันของไฮโดรเจน 40 psi ตั้งค่าของ Oven temperature = 50°C, Inlet temperature= 230°C, Det temperature = 250 °C, Ramp = 20 °C/min, H₂ flow = 40 mL/min, Air flow=400 mL/min, He flow=179 mL/min และใช้สารละลายกรดไขมันผสม เพื่อเป็นสารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันในตัวอย่าง สารละลายกรดไขมันผสมประกอบด้วย กรดฟอร์มิก, กรดอะซิติก, กรดโพรพิโอนิก, กรดไอโซบิวริก, กรดไอโซวาเลริก, กรดไอโซคาโปรอิก และกรดเฮปทานอิก (คัดแปลงจาก *Thanakoses et al., 2003*)

2) การหาปริมาณซีโอดี (COD Cell Test, MERCK)

นำตัวอย่างน้ำเสีย 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดวัดค่า COD (COD Cell Test, MERCK) ผสมกับสาร A 2.2 ml และ B 1.8 ml เขย่าให้สารเคมีกับน้ำเสียตัวอย่างผสมกัน ใส่หลอดวัดค่า COD ในเครื่อง Termoreactor ที่อุณหภูมิ 148 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาทีทิ้งไว้ให้เย็น โดยไม่ให้โดนแสง นำหลอดไปวัดค่า COD ด้วยเครื่องวัดค่า COD (MERCK) อ่านค่าที่ได้แล้วนำไปคำนวณหาค่า COD (APHA, AWWA and WPCF, 2001)

3) การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl method

นำตัวอย่างน้ำเสียที่ผ่านกันหมุนเหวี่ยง 15 มิลลิลิตร ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 800 มิลลิลิตร ใส่สารผสม CuSO₄ และ K₂SO₄ ปริมาณ 5 กรัม เติมกรดซัลฟูริก 20 มิลลิลิตร ช้อยในเตาย่อย ที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส 30 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 380 องศาเซลเซียส 60 นาที จนได้สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรและนำกลิ่นในอุปกรณ์กลั่น นำขวดรูปชมพูนขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก (เข้มข้นร้อยละ 4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรที่มีการเติมอินดิเคเตอร์แล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ ดูดตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร

4) การหาปริมาณฟอสเฟต (Ascorbic Acid Method)

นำตัวอย่างน้ำเสียที่ผ่านการหมუნเหวียง 50 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมฟีนอล์ฟทาลีน 1 หยด ถ้าเกิดสีแดงให้หยด 5 N H₂SO₄ ลงไปจนกระทั่งสีแดงหายไปจึงเติมน้ำยารวม (ภาคผนวก ก) 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 – 30 นาที เพื่อให้เกิดสีก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน (APHA, AWWA and WPCF, 2001)

5) การทดสอบกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการผลิต PHA โดยใช้ sudan black B

นำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ มาเกลี่ยในอาหารวุ้นสังเคราะห์ (GM1 agar) นำไปที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มจนเกิดเป็นโคโลนี นำโคโลนีที่ได้มาเกลี่ยในสไลด์ที่สะอาด รอให้แห้ง นำมาผ่านไฟ แล้วย้อมสีด้วย sudan black B (เตรียมจากผง sudan black B 0.3 กรัมในเอทิลแอลกอฮอล์ (70%) 100 มิลลิลิตร) ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 5-10 นาที ล้างให้น้ำไหลผ่าน และทำให้สไลด์แห้ง หยด xylene และหยด safranin ทิ้งไว้ 5-10 นาที ล้างให้น้ำไหลผ่าน และรอให้แห้ง นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ จุลินทรีย์ที่มีการผลิตลึพิดภายในเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็น PHA จะติดสีค้ำของ sudan black B (Burdon, 1946)

6) ปริมาณเซลล์

วัดปริมาณเซลล์ของเชื้อโดยใช้วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง เริ่มจากการเหวียงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่น นำเซลล์ใส่ในงานเพาะเชื้อที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส อบจนแห้งและน้ำหนักคงที่ (Jung *et al.*, 2000)

7) การวิเคราะห์ปริมาณ PHA ในเซลล์จุลินทรีย์

7.1) การวิเคราะห์ด้วยวิธี Gravimetric method

ทำการวิเคราะห์โดยการเติม sodium dodecyl sulfate (SDS) 1% w/v ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชเป็น 10 ลงในเซลล์ที่ผ่านการวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง และบ่มบนเครื่องเขย่า (orbital shaker) เป็นระยะเวลา 60 นาทีด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการปั่นเหวียงแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวียงใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส แล้วเจือจางให้ได้ 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปั่นเหวียงที่ความเร็ว 8,000

7.2) การวิเคราะห์โดยใช้ GC-FID

ทำการวิเคราะห์หา PHA โดยการเติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตรและ สารละลายเมทานอล-ซัลฟูริก (85:15) 1 มิลลิลิตร ลงใน PHA ผ่านการสกัดด้วยวิธี Gravimetric method นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อเปลี่ยนกรดไขมันให้ กลายเป็นเมทิลเอสเทอร์ ทิ้งตัวอย่างให้เย็นในอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เพื่อแยกชั้นของ คลอโรฟอร์มและสารละลายเมทานอล-ซัลฟูริก แล้วนำส่วนของคลอโรฟอร์มไปวิเคราะห์ด้วยการ นิ็ดเข้า GC-FID ซึ่งใช้ capillary column (Stabilwax-DA, model Restek 06313) กำหนดอุณหภูมิของ injector และ detector เป็น 250°C โดยกำหนดโปรแกรมอุณหภูมิของ oven ไว้ที่ 80°C เป็น ระยะเวลา 5 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 200°C ด้วยอัตรา 7°C/min และใช้สาร PHA จาก Aldrich (USA) เป็นสารมาตรฐานที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบชนิดของ PHA (ดัดแปลงจาก Ganzeveld *et al.*, 1999)

8) การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของข้อมูลใช้โปรแกรม SPSS 16.0 โดยนำข้อมูลที่ ต้องการเปรียบเทียบทางสถิติมาป้อนใส่ในโปรแกรม เลือกหน้าต่าง Variable View เพื่อป้อนชื่อและ ลักษณะของข้อมูล (ภาพที่ 25 ภาคผนวก ข) เลือกหน้าต่าง Data View เพื่อป้อนค่าของข้อมูลให้ตรงกับชื่อที่ใส่ไว้ข้างต้น พร้อมทั้งป้อนเลขซ้ำจากข้อมูลที่มีการทดลองหลายซ้ำ และทำการวิเคราะห์ โดยเลือก Analyze ที่แถบเมนู เลือก Compare Means และ One-Way ANOVA ทำให้เกิดหน้าต่าง One-Way ANOVA ขึ้น เลือกชื่อของข้อมูลการทำซ้ำไว้ในช่อง Factor และเลือกข้อมูลที่ต้องการ วิเคราะห์ไว้ในช่อง Dependent List เลือก Post Hoc, Duncan เลือก Significance level เท่ากับ 0.5 กด Continue และเลือกที่ Options, Descriptive กด Continue และ OK ทำให้เกิดหน้าต่าง Output แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ขึ้นมา (ภาคผนวก ข)

วิธีการทดลอง

2.1 การศึกษาลักษณะของน้ำเสีย

ทำการศึกษาลักษณะของน้ำเสียจากถังสร้างกรด จากกระบวนการบำบัดน้ำเสียของบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) (ภาพที่ 9) โดยทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

- ค่าพีเอช โดย พีเอชมิเตอร์
- ค่าซีโอดี (COD Cell Test, MERCK)
- ชนิดและปริมาณของกรดระเหย โดยใช้ GC-FID (ดัดแปลงจาก Thanakoses *et al.*, 2003)
- ปริมาณไนโตรเจน โดยวิธี Kjeldahl method (APHA, AWWA and WPCF, 2001)
- ปริมาณฟอสเฟต โดยวิธี Ascorbic Acid method (APHA, AWWA and WPCF, 2001)

2.2 การศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิต PHA ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบ SBR ในอาหารสังเคราะห์

นำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์จากระบบบำบัดน้ำเสียระบบ SBR มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ GM1 ที่มีคาร์บอนอะตอม 1 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (ผ่านการฆ่าเชื้อ) เพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA โดยใช้สัจจ 430 กรัม/ลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์โดยวิธีการหาคำนวณน้ำหนักแห้ง เพื่อดูการเติบโตของจุลินทรีย์

หลังจากนั้นนำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์มาทดสอบการผลิต PHA โดยทำการทดลองเปรียบเทียบอัตราการเขย่า เพื่อดูสภาวะการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHA โดยเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเสียที่ได้ทำการศึกษาก่อนประกอบเบื้องต้นในข้อ 2.1 ที่ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที โดยเติมกรดโพธิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอนปรับพีเอชให้เป็น 7 และผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการศึกษาผลของอัตราการเขย่าโดยการเลี้ยงแบบวางนิ่ง เปรียบเทียบกับการเขย่าที่ 50, 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ในรูปของน้ำหนักแห้ง และปริมาณ PHA ที่ผลิตได้ด้วยวิธี Gravimetric method (ดัดแปลงจาก Grothe and Chisti, 2000)

2.3 การศึกษาการแยกเชื้อที่สามารถผลิต PHA จากกลุ่มจุลินทรีย์จากระบบ SBR

2.3.1 การแยกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี enrichment technique

นำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากระบบ SBR ของโรงงานทอปปิคอลแคนนิ่ง ที่ผ่านการเพิ่มจำนวนและกระตุ้นให้ผลิต PHA (enrichment technique) ในอาหารสังเคราะห์ GM1 ที่มีการเติมกรดอะซิติก 30 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเจือจาง (10^{-2} - 10^{-8}) และเกลี่ยในอาหารวุ้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบสี, รูปร่าง, ส่วนเส้นขอบของโคโลนีที่ได้ ทำการเกลี่ยซ้ำจนได้โคโลนีเดี่ยวๆ และทดสอบกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการผลิต PHA โดยใช้ sudan black B (Burdon, 1946)

2.3.2 เทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกได้ ด้วยเทคนิค 16s rDNA

วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยนำสายพันธุ์ที่ต้องการศึกษาไปเลี้ยงใน GM medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้มีการเจริญอยู่ในระยะกลางของ log phase จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงและนำเซลล์ที่ตกตะกอนไปสกัด DNA และใช้ไพรเมอร์ (primer) UFUL (5'-GCCTAACACATGCAAGTCGA-3') และ 536R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3') โดยใช้สภาวะในการเพิ่มจำนวนคือ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส 60 วินาที, annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 120 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 1 รอบ ที่ 48 องศาเซลเซียส 60 วินาที และที่ 72 องศาเซลเซียส 300 วินาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนไปหาลำดับโดยใช้ cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer) และ electrophoresis DNA sequencing นำข้อมูลลำดับ 16S rDNA มาเปรียบเทียบกับลำดับของจุลินทรีย์ใน Gene Bank (Nation Center for Biotechnology Information, 2008) [ส่งวิเคราะห์ที่หน่วยเครื่องมือกลาง (Central Instrument Facility; CIF) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิต PHA จากน้ำเสียโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ในขบวนการหมัก

2.4.1 การเตรียมเชื้อสำหรับเป็นเชื้อเริ่มต้น

นำกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากข้อ 2.3.1 มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ GM1 ที่มีการเติมกรดอะซิติก 30 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน (ผ่านการฆ่าเชื้อ) โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ในรูปของน้ำหนักเซลล์แห้ง เพื่อดูการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ เลือกเวลาในการเลี้ยงที่ได้กลุ่มเชื้อที่มีการเจริญในช่วงกลางของ log phase วัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตร-

2.4.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์

นำน้ำเสียที่ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของน้ำเสียเบื้องต้นในข้อ 2.1 ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที โดยเติมกรดโพรฟิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน (เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มสร้างโคพอลิเมอร์) ปรับพีเอชให้เป็น 7 นำน้ำเสียที่เตรียมไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดย มาเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากข้อ 2.1 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวัดพีเอช วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์โดยวิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHA ที่ผลิตได้ ด้วยวิธี Gravimetric method (ดัดแปลงจาก Grothe and Chisti, 2000) เก็บตัวอย่างก่อนและสิ้นสุดการหมัก นำมาปั่นเหวี่ยง แล้วนำส่วนใสมาวิเคราะห์หา Soluble COD และปริมาณกรดระเหยง่าย คำนวณหาร้อยละของการลดลงของสารอินทรีย์ และเลือกชุดการทดลองที่ให้ปริมาณ PHA มากที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.4.3 ผลของอัตราการเขย่า

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการผลิต PHA มากที่สุด จากข้อ 2.4.2 มาศึกษาผลของอัตราการเขย่า โดยเปรียบเทียบการเขย่าที่ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.4.2

2.4.4 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุด จากข้อ 2.4.3 มาใช้ศึกษาผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น โดยศึกษาการเติมเชื้อเริ่มต้นที่ 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.4.2

2.4.5 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอน

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุด จากข้อ 2.4.4 มาใช้ศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอน โดยศึกษาการเติมกรดโพรฟิโอนิก และกรดวาเลอริกอย่างละ 60 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับการใช้กรดทั้งสองชนิดร่วมกัน อย่างละ 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อส่งเสริมการสร้างโคพอลิเมอร์ ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.4.2

2.4.6 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยการเติมกรดอินทรีย์ที่ให้การผลิต PHA สูงสุด จากข้อ 2.4.5 ที่ความเข้มข้น 0, 60, 100, 140, 180 และ 200 มิลลิโมลาร์ และคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.4.2

2.4.7 ผลของพีเอชเริ่มต้น

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุด จากข้อ 2.4.6 มาใช้ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นที่ 6, 6.5, 7 และ 8 ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.4.2

2.4.8 ผลของการฆ่าเชื้อน้ำเสีย

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุด จากข้อ 2.4.7 มาใช้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อน้ำเสียที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.4.2

2.5 การศึกษาผลของการให้อากาศและการกวนต่อการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณ PHA สูงสุดจากข้อ 2.4.8 ทำการหมักในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร ปริมาตรการใช้งาน 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการทดลองเปรียบเทียบการให้อากาศที่ 0, 0.5 และ 1 vvm ที่แต่ละอัตราการกวน 2 ระดับคือการกวนที่ 100 และ 200 รอบต่อนาที (ทั้งหมด 6 ชุดการทดลอง) ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.4.2

2.6 การศึกษาหน่วยย่อยของ PHA ด้วย GC-FID

การวิเคราะห์หาหน่วยย่อยของพอลิเมอร์ทำได้โดยการเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของพอลิเมอร์ด้วยการนำพอลิเมอร์ 4-10 มิลลิกรัมละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 มิลลิตร และเติมกรดซัลฟูริก-เมทานอล (15:85) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต้มในอ่างน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อทำการเปลี่ยนกรดไขมันให้กลายเป็นเมทิลเอสเทอร์แล้ววิเคราะห์ด้วยการใช้ GC-FID ซึ่งใช้ capillary column (Stabilwax-DA, model Restek 06313) กำหนดอุณหภูมิของ injector และ detector เป็น 250°C โดยกำหนดโปรแกรมอุณหภูมิของ oven ไว้ที่ 80°C เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 200°C ด้วยอัตรา 7°C/min และใช้สาร PHA จาก Aldrich (USA) เป็นสารมาตรฐานที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบชนิดของ PHA (ดัดแปลงจาก Ganzeveld *et al.*, 1999)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 องค์ประกอบของน้ำเสีย

จากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำเสียจากถังสร้างกรด (Acidification tank) จากกระบวนการบำบัดน้ำเสียบริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) ดังแสดงใน [ตารางที่ 4](#) พบว่าน้ำเสียมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.97 ค่าซีโอดีเท่ากับ 1875 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 35 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าอัตราส่วนระหว่างซีโอดีต่อไนโตรเจนเท่ากับ 53.57 ปริมาณฟอสเฟตเท่ากับ 330 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมัน พบว่าในน้ำเสียมีกรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทีริก และกรดวาเลอริก เท่ากับ 97.57, 59.61, 34.58 และ 15.70 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งกรดทั้ง 4 ชนิดนี้เป็นกรดไขมันที่สำคัญในการสร้างและสะสม PHA ของเชื้อหลายชนิด ได้แก่ *Ralstonia eutropha*, *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes faecalis*, *Rhodococcus* sp. และ Activated sludge เป็นต้น ([Ganzeveld et al., 1999](#); [Punrattanasin, 2001](#)) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าในน้ำเสียมีสารอาหารในปริมาณน้อย คือมีไนโตรเจนและฟอสเฟตเพียง 35 และ 330 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเหมาะแก่การนำมาใช้เป็นสารอาหารสำหรับผลิต PHA ซึ่งปริมาณสารอาหารในน้ำเสียที่จำกัดนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ [ธงชัย วงศ์สุวรรณ \(2550\)](#) ที่ได้ศึกษาการผลิต PHA จาก *Ralstonia eutropha* และใช้น้ำหมักจากเส้นใยปาล์มเป็นแหล่งอาหาร โดยน้ำหมักมีปริมาณไนโตรเจนและฟอสเฟตเท่ากับ 34 และ 270 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเติมกรดบิวทีริก 5 กรัมต่อลิตรลงในน้ำหมักและเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถให้การผลิต PHA สูงกว่าชุดทดลองที่มีการเพิ่มแหล่งไนโตรเจนและแหล่งฟอสเฟตในน้ำหมัก เพราะสภาวะที่จุลินทรีย์จะสามารถผลิต PHA ได้ดีคือต้องมีสารอาหารน้อยๆ แต่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากพอที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณกรดไขมันในน้ำเสีย (207 มิลลิกรัมต่อลิตร) และค่าซีโอดี (1,875 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะเห็นว่าแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่น้อยมาก ไม่เพียงพอต่อการสังเคราะห์ PHA ให้ได้ปริมาณมากพอ จากงานวิจัยของ [Kumar และคณะ \(2004\)](#) ทำการผลิต PHA จากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเสียโรงงานอาหาร โดยศึกษาการเติมกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1.13, 4.52, 5.65, 6.78 และ 7.91 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าการเติมกรดอะซิติกที่ 6.78 กรัมต่อลิตรให้การผลิต PHA ในเซลล์สูงสุด เท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อนำน้ำเสียนี้ไปใช้เป็นอาหารแก่จุลินทรีย์ ต้องมีการศึกษาการเติมแหล่งคาร์บอนที่เพียงพอต่อการเจริญและผลิต PHA และต้องมีการปรับค่าพีเอชให้เป็น 7 เพราะถ้าใช้น้ำเสียที่พีเอชเป็นกรดอาจทำให้จุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถผลิต PHA ไม่สามารถเจริญได้ เพราะ

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของน้ำเสียจากถังสร้างกรด โรงงานอาหารทะเล บริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)

Table 4. Composition of seafood processing industrial wastewater in Tropical Canning Public Company Limited (Thailand).

Composition	Concentration
pH	5.97
Chemical Oxygen Demand (COD)	1875 mg/l
Nitrogen	35 mg/l
COD/N ratio	53.57
Phosphate	330 mg/l
Acetic acid	97.57 mg/l (1.62 mM)
Propionic acid	59.61 mg/l (0.80 mM)
Butyric acid	34.58 mg/l (0.39 mM)
Valeric acid	15.70 mg/l (0.15 mM)
Total acid	207.46 mg/l

3.2 ลักษณะการเจริญและการผลิต PHA ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบ SBR ในอาหารสังเคราะห์

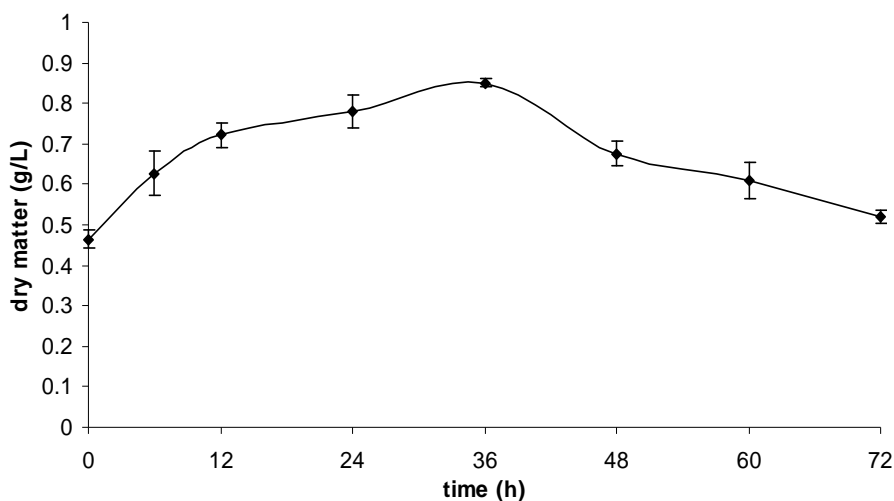
GM1

จากการศึกษาลักษณะการเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากระบบตะกอนเร่งในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ GM1 โดยมีการเติมกรดอะซิติก 30 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน (Kumar *et al.*, 2004) ทำการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 และเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์จากระบบ

ทดสอบการผลิต PHA ของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบอัตราการเขย่าเพื่อดูสภาวะการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHA โดยเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเสียที่ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นในข้อ 3.1 ที่ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยเติมกรดโพธิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อช่วยส่งเสริมการผลิตโคพอลิเมอร์ชนิด PHBV (Yamane et al., 1996) ของกลุ่มจุลินทรีย์ผสม เพราะแหล่งคาร์บอนในน้ำเสียน้อยเกินไป มีการปรับพีเอชให้เป็น 7 และผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการศึกษาผลของอัตราการเขย่าโดยการเลี้ยงแบบวางนิ่ง เปรียบเทียบกับการเขย่าที่ 50, 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง พบว่ากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดีในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็วรอบสูง คือ 250 รอบต่อนาที โดยให้ปริมาณเซลล์สูงสุดคือเท่ากับ 1.43 กรัมต่อลิตร ที่ 36 ชั่วโมง ส่วนที่การเขย่า 150 และ 200 รอบต่อนาที ให้ปริมาณเซลล์รองลงมา เท่ากับ 1.25 กรัมต่อลิตร และที่อัตราการเขย่าน้อยลงไป (100, 50 และ 0 รอบต่อนาที) พบว่ามีการเจริญน้อยมาก โดยให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.88, 0.72 และ 0.74 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 12) ดังนั้นสรุปได้ว่า กลุ่มจุลินทรีย์ผสมเหล่านี้เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ อย่างไรก็ตามวิจัยเกี่ยวกับการผลิต PHA ในขวดรูปชมพู่ และมีการเขย่าด้วยเครื่องเขย่า พบว่ามีการเลือกใช้อัตราการเขย่าที่ 150-200 รอบต่อนาที (Ganzeveld et al., 1999; Du et al., 2001; Bhubalan et al., 2008) ทั้งนี้ขึ้นกับสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

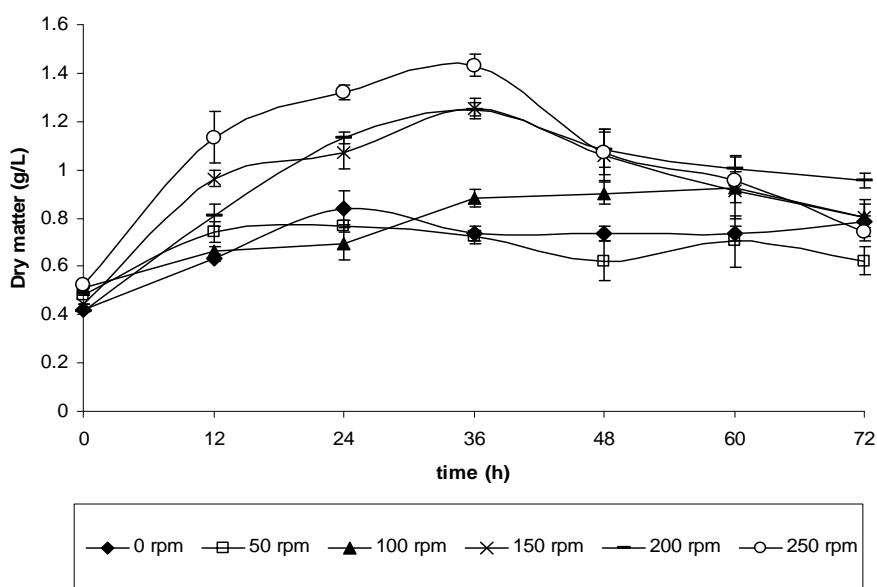
การสกัด PHA ทำโดยวิธี Gravimetric method โดย PHA ไม่สามารถละลายในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ส่วนเซลล์จุลินทรีย์ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ดังนั้นจึงต้องทดสอบประสิทธิภาพการละลายได้ของเซลล์จุลินทรีย์ ด้วยการทำ Negative control โดยนำจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหาร NB ซึ่งเป็นอาหารที่ส่งเสริมการเจริญแต่ไม่ส่งเสริมการผลิต PHA มาทดสอบการสกัด ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ได้ พบว่าเซลล์จุลินทรีย์สามารถละลายได้หมดในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์

แต่ในการทดลองโดยใช้กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมนี้ ยังพบว่ากลุ่มจุลินทรีย์มีการสร้างผลิตภัณฑ์อื่น ซึ่งมีลักษณะเป็นวุ้นอยู่นอกเซลล์ ซึ่งไม่สามารถแยกวุ้นออกจากเซลล์ได้หมด ทำให้เกิดปัญหาในการวัดปริมาณเซลล์และปริมาณ PHA จากเซลล์จุลินทรีย์ และยังทำให้ PHA ที่ได้มีปริมาณน้อยมาก เพราะจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถผลิต PHA มีการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ในอาหาร เพื่อ



ภาพที่ 11 การเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากในอาหารสังเคราะห์ GM1 โดยเติมกรดอะซิติก ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับการใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

Figure 11. Growth curve of consortium cultivated in synthetic medium (GM1) supplemented with 30 mM acetic acid under shaking flask (200 rpm) at room temperature for used as inoculum.



ภาพที่ 12 ผลของอัตราการเขย่าต่อการเจริญจากการเลี้ยงกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง

Figure 12. Effect of shaking rate on growth of consortium cultivated in wastewater supplemented with 60 mM propionic acid at room temperature.

การเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ ทำให้แหล่งคาร์บอนในอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญและผลิต PHA ของจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHA เพื่อเป็นการแก้ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อที่ไม่สามารถผลิต PHA จึงทำการศึกษาการแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHA จากระบบตะกอนเร่งเพื่อนำมาใช้ผลิต PHA

3.3 การแยกเชื้อที่สามารถผลิต PHA จากกลุ่มจุลินทรีย์จากระบบ SBR

3.3.1 การแยกกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี enrichment technique

จากการศึกษาการแยกเชื้อที่สามารถผลิต PHA จากกลุ่มจุลินทรีย์จากระบบ SBR วิธี enrichment technique พบว่าสามารถแยกเชื้อที่เหลืรอดอยู่ได้ 6 ไอโซเลท ที่มีลักษณะโคโลนีต่างกัน โดยตั้งชื่อเป็น PSU-I, PSU-M, PSU-T, PSU-V, PSU-X และ PSU-Y (ตารางที่ 5) โดย PSU-I มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่นทึบแสง มีรอยนูนตรงกลางโคโลนี เมื่อนำไปย้อมแกรม พบว่าจุลินทรีย์มีลักษณะเซลล์เป็นรูปแท่ง ดิคสิแกรมลบ, PSU-M โคโลนีมีสีขาวขุ่น ไม่มันวาว จุลินทรีย์มีลักษณะเซลล์เป็นรูปแท่ง ดิคสิแกรมลบ, PSU-T โคโลนีมีสีขาวขุ่น มันวาว ที่จุดตรงกลาง รอบโคโลนีมีลักษณะใส จุลินทรีย์มีลักษณะเซลล์เป็นรูปไข่ ดิคสิแกรมลบ, PSU-V โคโลนีมีลักษณะสีขาวขุ่น นูนมันวาว จุลินทรีย์มีลักษณะเซลล์กลม ดิคสิแกรมลบ, PSU-X โคโลนีมีสีขาวขุ่นตรงกลาง และมีการเคลื่อนที่เล็กน้อยแผ่ใสรอบๆโคโลนี จุลินทรีย์มีลักษณะเซลล์เป็นรูปไข่ ดิคสิแกรมลบ และ PSU-Y โคโลนีมีสีขาวขุ่นไม่มันวาว จุลินทรีย์มีลักษณะเซลล์เป็นรูปไข่ ดิคสิแกรมลบ หลังจากนั้นนำจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลทมาทดสอบการติดสี sudan black B (Burdon, 1946) เพื่อพิจารณาการผลิตพอลิเมอร์ภายในเซลล์ในกลุ่มของ lipophilic material ซึ่ง sudan black B ($C_{26}H_{24}N_4O$) เป็นสีย้อมสารที่ไม่มีขั้ว ละลายในไขมันได้ ทำให้สามารถติดไขมันได้สูง จึงมีการใช้ sudan black B เพื่อย้อมทดสอบไตรกลีเซอไรด์, ลิพิด และไลโปโปรตีนบางตัว (Wikipedia, 2008) การทดลองพบว่าเชื้อ PSU-I, PSU-M, PSU-V และ PSU-X สามารถย้อมติดสีของ sudan black B แสดงว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 ไอโซเลทนี้ สามารถผลิตพอลิเมอร์กลุ่ม PHA ได้ (Kango and Patel, 2003) นอกจากนี้สามารถสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ที่ไม่มีการติดสีของ sudan black B นั้นเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่มีลิพิดแกรนูล ดังนั้นจึงไม่มี PHA ในเซลล์จุลินทรีย์ เพราะพอลิเอสเทอร์คือลิพิด (Redzwan *et al.* 1997) นอกจากนี้มีการทำ Thin-section electron microscopy (TEM) เพื่อให้เห็นลักษณะเซลล์และการผลิตพอลิเมอร์ภายในเซลล์ พบว่าเชื้อ PSU-I, PSU-M มีการเก็บสะสมสาร PHA ในปริมาณที่มากกว่าเชื้อ PSU-V และ PSU-X โดย PHA ที่จุลินทรีย์สะสมได้ เป็นลักษณะของแกรนูลสีขาว (ภาพที่ 13) ปริมาณของแกรนูลจะมากหรือน้อยขึ้นกับความสามารถในการผลิตของแบคทีเรียแต่ละชนิด และสภาวะในการผลิตด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 5 คุณสมบัติของไอโซเลทในอาหารวุ้นสังเคราะห์ (GM1) ที่มีการเติมกรดอะซิติก 30 มิลลิโมลาร์

Table 5. Characteristics of isolates in synthetic agar medium (GM1) supplemented with 30 mM acetic acid.

Isolates	Characteristics of colonies	Cell shape	Gram staining	Staining with sudan black B
PSU-I	turbid white, dented in the middle colony	rod	negative	positive
PSU-M	turbid white, glitter	rod	negative	positive
PSU-T	turbid white, glitter in the middle colony	circle	negative	negative
PSU-V	turbid white, swell, glitter	coccus	negative	positive
PSU-X	turbid white in the middle colony, motility	circle	negative	positive
PSU-Y	turbid white	circle	negative	negative

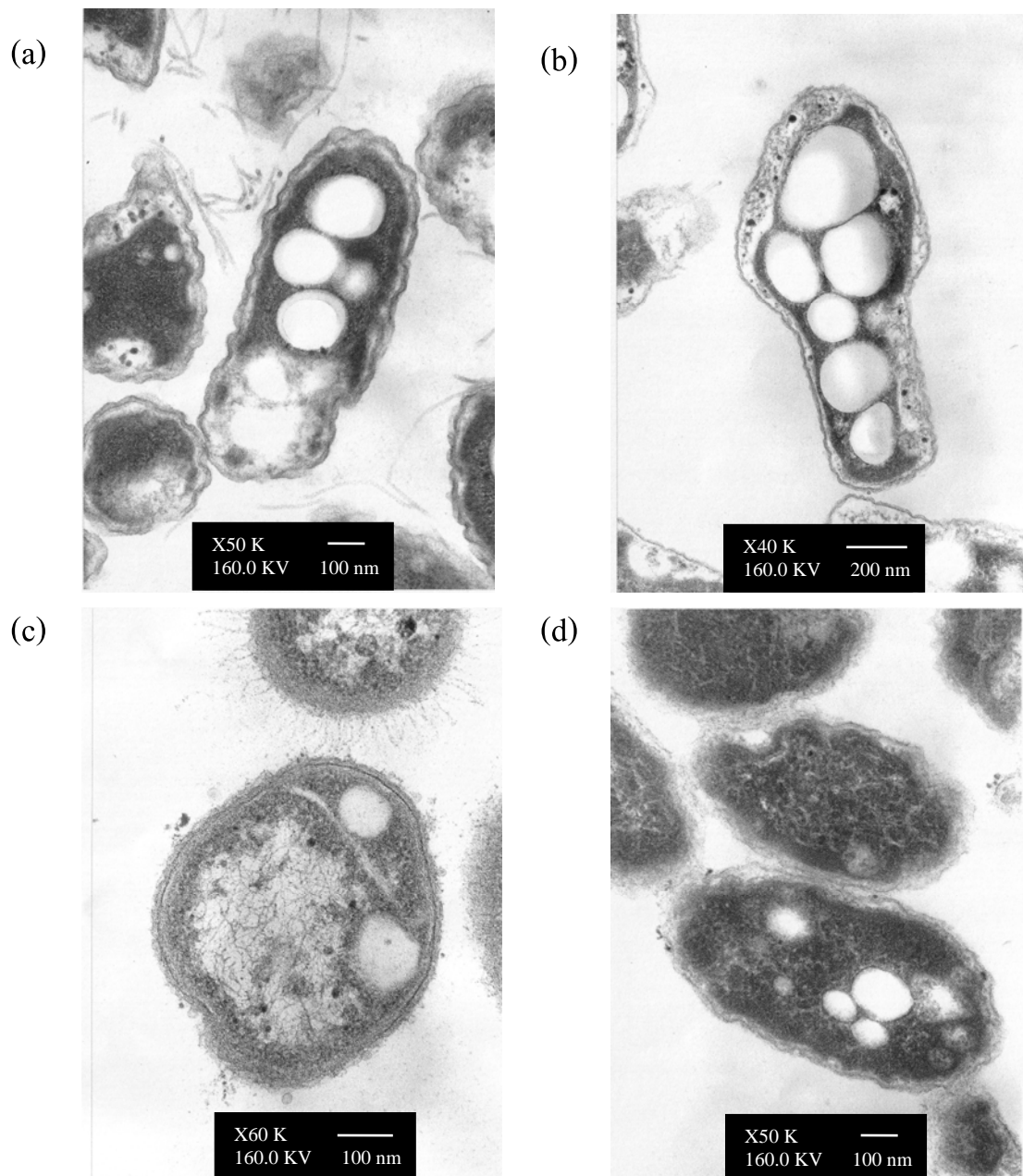
3.3.2 เทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกได้ ด้วยเทคนิค 16s rDNA

จากการนำเชื้อแบคทีเรีย PSU-I, PSU-M, PSU-V และ PSU-X มาเทียบเคียงสายพันธุ์จุลินทรีย์ โดยวิธี 16S rDNA ด้วยการใส่ forward primer คือ UFUL (5'-GCCTAACACATGCA AGT CGA-3') และ reverse primer คือ 536R (5'-GTATTACCG CGGCTGCTGG-3') โครมาโตแกรมของลำดับเบสจากการแปลผลลำดับเบสของยีน 16S rDNA และนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับ gene bank พบว่าเชื้อแบคทีเรีย PSU-I เทียบเคียงได้เป็น *Achromobacter xylosoxidans* (99%) (ก่อนหน้านี้นี้ใช้ชื่อ *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* หรือ *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*) ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย *Achromobacter xylosoxidans* โดยทั่วไปเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแบบแท่งตรง การเจริญของเชื้อนี้เป็นแบบอาศัยออกซิเจน สามารถใช้และเจริญได้ดีในอาหารที่มีกลูโคส ไชโลส และซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ (Yabuuchi and Yano, 1981) *Achromobacter xylosoxidans* พบโดยทั่วไปในระบบตะกอนเร่ง และสามารถผลิต PHA ไว้ภายในเซลล์ได้ประมาณ 18-23 เปอร์เซ็นต์ เมื่อให้กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (Renner et al. 1996) ส่วน PSU-M เทียบเคียงได้เป็น

3.4 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิต PHA จากน้ำเสียโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ในขวดรูปชมพู่

3.4.1 การเตรียมเชื้อสำหรับเป็นเชื้อเริ่มต้น

จากการศึกษาลักษณะการเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I, *Achromobacter* sp. PSU-M, *Acinetobacter baumannii* PSU-V และ *Acinetobacter baumannii* PSU-X ในอาหาร GM1 ที่มีการเติมกรดอะซิติก 30 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (log phase) จนกระทั่งถึง ชั่วโมงที่ 30 การเจริญจะเริ่มคงที่ (stationary phase) โดยช่วง mid-log phase อยู่ในช่วง 10-16 ชั่วโมง และหลังจาก 36 ชั่วโมงไปแล้วเซลล์จะค่อยๆ ลดลง (death phase) ดังแสดงใน [ภาพที่ 14](#) จากการทดลองนี้ จึงเลือก ชั่วโมงที่ 12 เป็นช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น ตลอดการวิจัยนี้



ภาพที่ 13 ลักษณะของ PHA granule ภายในเซลล์ โดยใช้ transmission electron microscope

- (a) *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I, (b) *Achromobacter* sp. PSU-M,
 (c) *Acinetobacter baumannii* PSU-V และ (d) *Acinetobacter baumannii* PSU-X

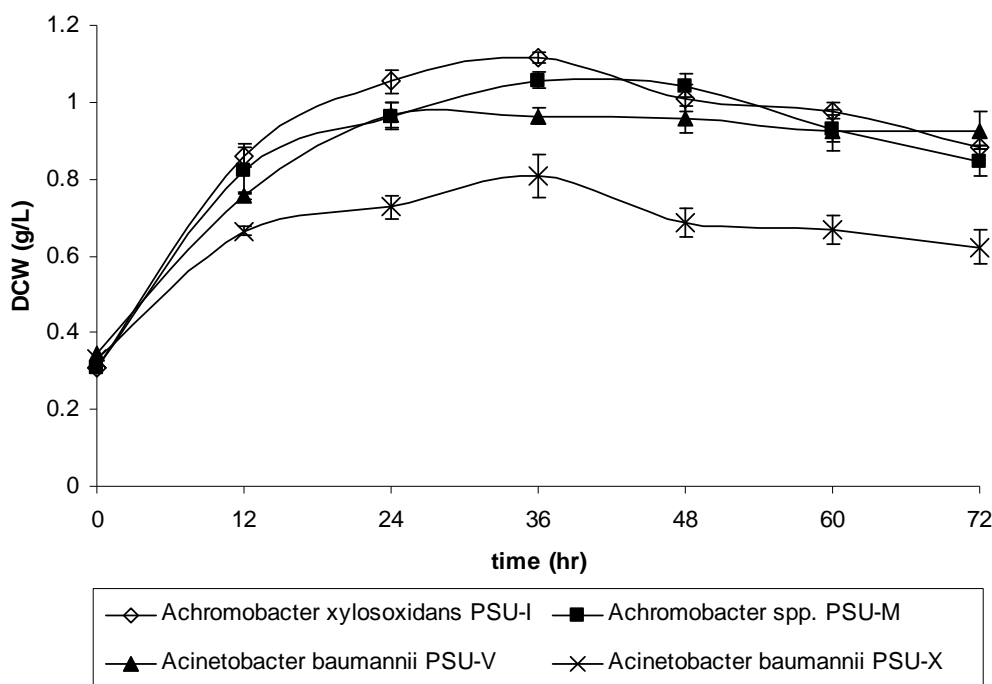
Figure 13. Characteristic of PHA granule in isolated cell by using transmission electron microscope.

- (a) *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I, (b) *Achromobacter* sp. PSU-M,
 (c) *Acinetobacter baumannii* PSU-V and (d) *Acinetobacter baumannii* PSU-X

ตารางที่ 6 ผลการเทียบเคียงแบคทีเรีย *Achromobacter xylooxidans* PSU-I, *Achromobacter* sp. PSU-M, *Acinetobacter baumannii* PSU-V และ *Acinetobacter baumannii* PSU-X กับฐานข้อมูลใน gene bank

Table 6. Identification of *Achromobacter xylooxidans* PSU-I, *Achromobacter* sp. PSU-M, *Acinetobacter baumannii* PSU-V and *Acinetobacter baumannii* PSU-X with database in gene bank.

Strain	Sequences producing significant alignments	Identity	Score	E
		(%)	(bits)	Value
PSU-I	<i>Alcaligenes</i> sp. IS-J2 16S ribosomal RNA	99	1044	0.0
	<i>Achromobacter xylooxidans</i> B8l 16S ribosomal RNA	99	1044	0.0
	<i>Achromobacter xylooxidans</i> JSI-I 16S ribosomal RNA	99	1044	0.0
	<i>Achromobacter xylooxidans</i> gene for 16S ribosomal RNA	99	1044	0.0
	Unculture <i>Achromobacters</i> sp. Clone SC006B63 16S ribosomal RNA	99	1044	0.0
PSU-M	<i>Pannonibacter</i> sp. W1 16S ribosomal RNA	100	935	0.0
	<i>Pannonibacter phragmitetus</i> LMG5421 16S RNA	100	935	0.0
	<i>Pannonibacter phragmitetus</i> LMG5412 16S RNA	100	935	0.0
	<i>Achromobacter</i> sp. LM5430 16S ribosomal RNA	100	935	0.0
	<i>Achromobacter</i> sp. LM5431 16S ribosomal RNA	100	935	0.0
PSU-V	<i>Acinetobacter baumannii</i> MMC28 16S ribosomal RNA	99	1070	0.0
	<i>Acinetobacter baumannii</i> MMC26 16S ribosomal RNA	99	1070	0.0
	<i>Acinetobacter baumannii</i> MMC19 16S ribosomal RNA	99	1070	0.0
	<i>Acinetobacter baumannii</i> MMC16 16S ribosomal RNA	99	1070	0.0
	Bacterium CR150 16S ribosomal RNA	99	1070	0.0
PSU-X	<i>Acinetobacter baumannii</i> MMC28 16S ribosomal RNA	99	1002	0.0
	<i>Acinetobacter baumannii</i> MMC26 16S ribosomal RNA	99	1002	0.0
	<i>Acinetobacter baumannii</i> MMC19 16S ribosomal RNA	99	1002	0.0
	<i>Acinetobacter baumannii</i> MMC16 16S ribosomal RNA	99	1002	0.0
	Bacterium CR150 16S ribosomal RNA	99	1002	0.0



ภาพที่ 14 การเจริญของจุลินทรีย์ที่ผ่านการแยกเชื้อ เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ GM1 โดยเติมกรดอะซิติกความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับการใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

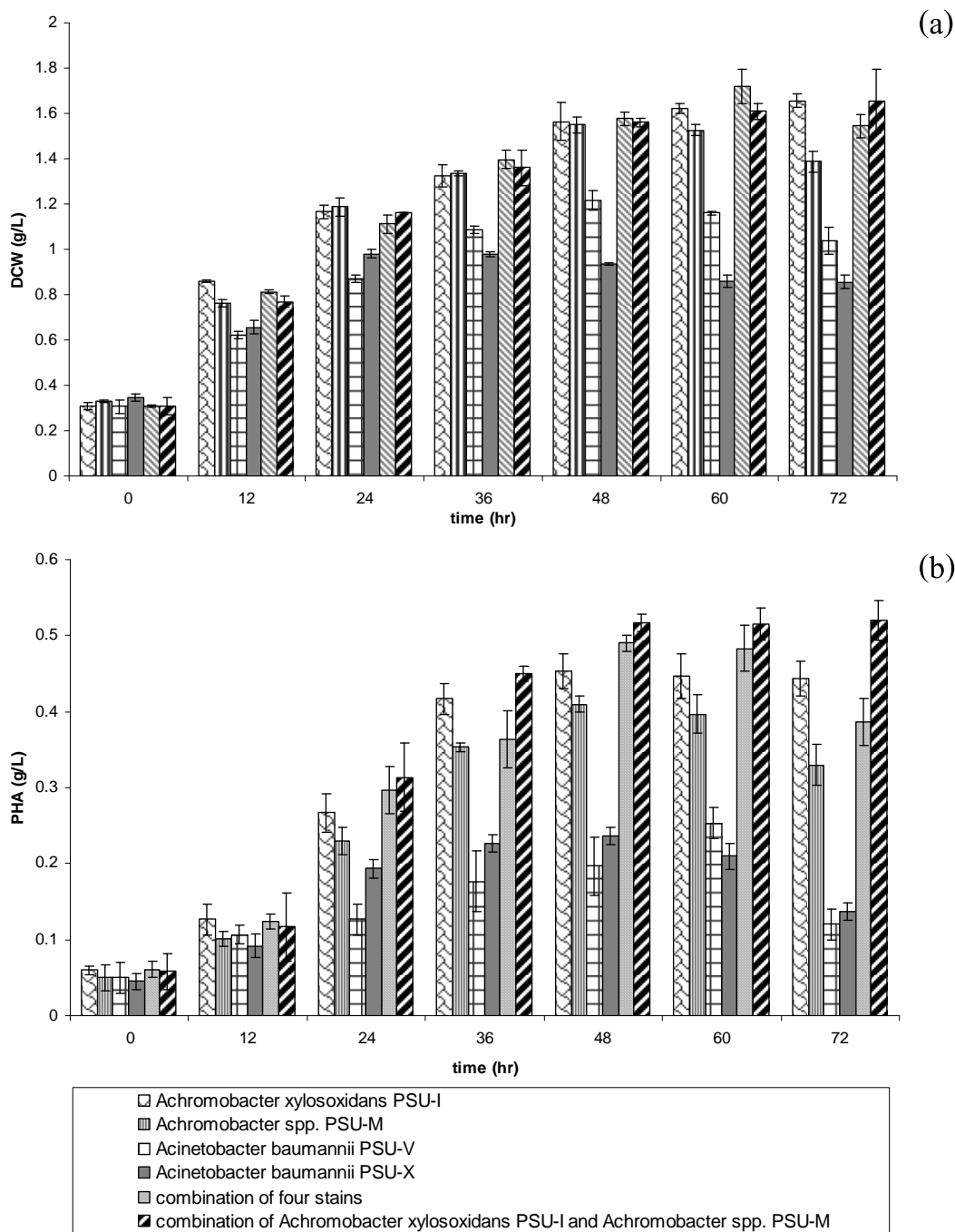
Figure 14. Growth curve of isolated microbial cultures cultivated in synthetic medium (GM1) supplemented with 30 mM acetic acid under shaking flask (200 rpm) at room temperature for used as inoculum.

3.4.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์

จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ ทั้ง 4 ไอโซเลท คือ *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I, *Achromobacter* sp. PSU-M, *Acinetobacter baumannii* PSU-V และ *Acinetobacter baumannii* PSU-X มาศึกษาการเจริญและผลิต PHA ในน้ำเสียจากถังสร้างกรด บริษัททรอปิคอลแคนนิง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) ที่มีการเติมกรดโพธิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอชให้เป็น 7 ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ โดยทำการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ที่แยกได้เปรียบเทียบแต่ละเชื้อกับการนำเชื้อทั้งหมดมารวมกัน และการรวมเชื้อที่สามารถผลิต PHA มากที่สุด และรองลงมา โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเปรียบเทียบเชื้อแต่ละสายพันธุ์ พบว่าจุลินทรีย์มีการผลิต PHA สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 15 (b)) เท่ากับ 0.45, 0.41, 0.20 และ 0.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สัดส่วนการผลิต PHA ต่อการเจริญที่ได้ คิดเป็น 29.0, 26.5, 16.2 และ 25.3 เปอร์เซ็นต์

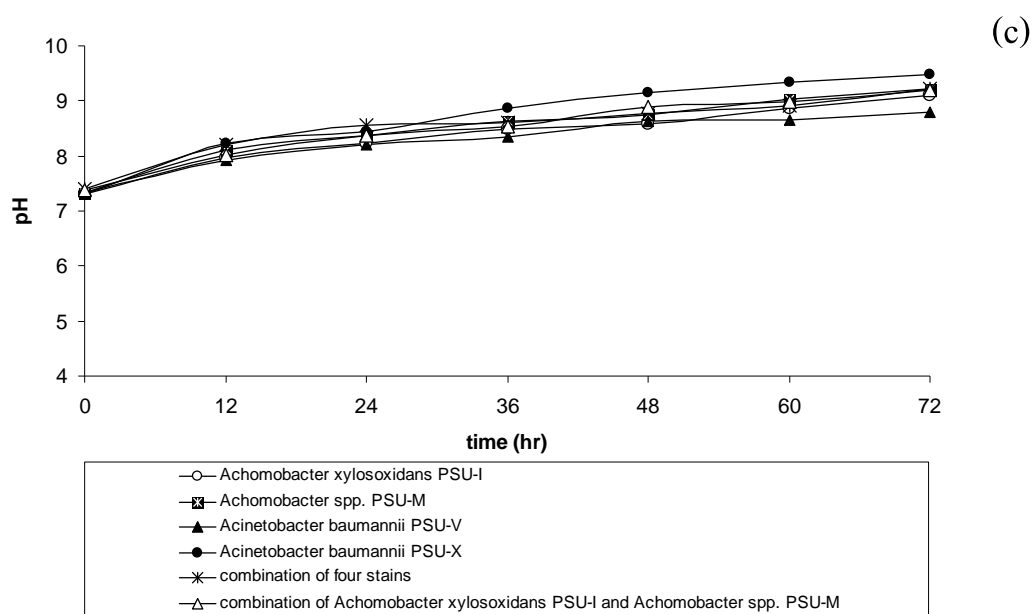
จากการเปรียบเทียบระหว่างการผสมเชื้อ คือ *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M กับการผสมเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าการผสมเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์มีการเจริญที่มากกว่าแต่ผลิต PHA น้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีในน้ำเสีย แต่ความสามารถในการสะสม PHA ได้ไม่เท่ากัน โดยเชื้อ คือ *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M สามารถสะสม PHA ได้ดีกว่า *Acinetobacter baumannii* PSU-V และ *Acinetobacter baumannii* PSU-X ทำให้สัดส่วนการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยลง เมื่อนำมาเลี้ยงรวมกัน ดังนั้นการผสมเชื้อ คือ *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M จึงมีผลผลิตมากกว่าการผสมเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถใช้กรดโพรพิโอนิกที่เติมลงในน้ำเสียได้เป็นอย่างดี กรดโพรพิโอนิกถูกใช้ไปประมาณ 93.9-100 เปอร์เซ็นต์ และยังช่วยลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ประมาณ 81.6-89.0 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 7 และเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชตลอดการทดลอง (ภาพที่ 15 (c)) พบว่าค่าพีเอชมีแนวโน้มพีเอชเพิ่มขึ้น อันเป็นผลมาจากเชื้อแต่ละชนิดสามารถเจริญในน้ำเสีย และสามารถนำโมเลกุลของกรดไขมันระเหยผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ ทำให้มีการลดลงของโมเลกุลของกรด ในขณะที่เดียวกันเป็นการลดไฮโดรเจนไอออนในอาหารเช่นกัน ซึ่งความไม่สมดุลของสารไฮโดรเจนไอออนต่อไฮดรอกไซด์มีผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นเบสสูง (Luli and Strohl, 1990) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชสามารถเป็นตัวชี้วัดถึงการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด

Achromobacter sp. ชื่อเดิมคือ *Alcaligenes* sp. จากการรายงานการวิจัยทั่วไป พบว่าเชื้อ *Alcaligenes* sp. มีความสามารถในการสะสม PHA ในเซลล์ได้ดี จากรายงานของ Boom และคณะ (1994) พบว่า *Alcaligenes eutrophus* NCIM 1 1599 สามารถผลิต PHA จากการเลี้ยงเชื้อเป็น



ภาพที่ 15 การเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHA ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิก ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

Figure 15. Time course of growth (a), PHA production (b) and pH (c) from PHA-accumulating bacteria cultivated in wastewater supplemented 60 mM propionic acid under shaking flask (200 rpm) at room temperature.



ภาพที่ 15 (ต่อ)

Figure 15. (continued)

ตารางที่ 7 ค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สามารถสะสม PHA ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิก ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Table 7. Carbon source and COD removal after 72 h cultivation of PHA-accumulating bacteria in wastewater supplemented 60 mM propionic acid.

Stain	valeric acid			COD		
	0 h (mM)	72 h (mM)	removal (%)	0 h (mM)	72 h (mM)	removal (%)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I	48.61	0	100	12,500	1,685	86.5
<i>Achromobacter</i> sp. PSU-M	48.61	1.25	93.9	12,950	2,380	89.0
<i>Acinetobacter baumannii</i> PSU-V	48.61	2.96	97.4	11,050	1,220	81.6
<i>Acinetobacter baumannii</i> PSU-X	48.61	1.07	97.8	12,900	1,915	85.2
combination of 4 strain	48.61	1.29	97.9	12,550	1,975	84.3
combination of <i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I and <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M	48.61	1.03	97.3	12,400	2,170	82.5

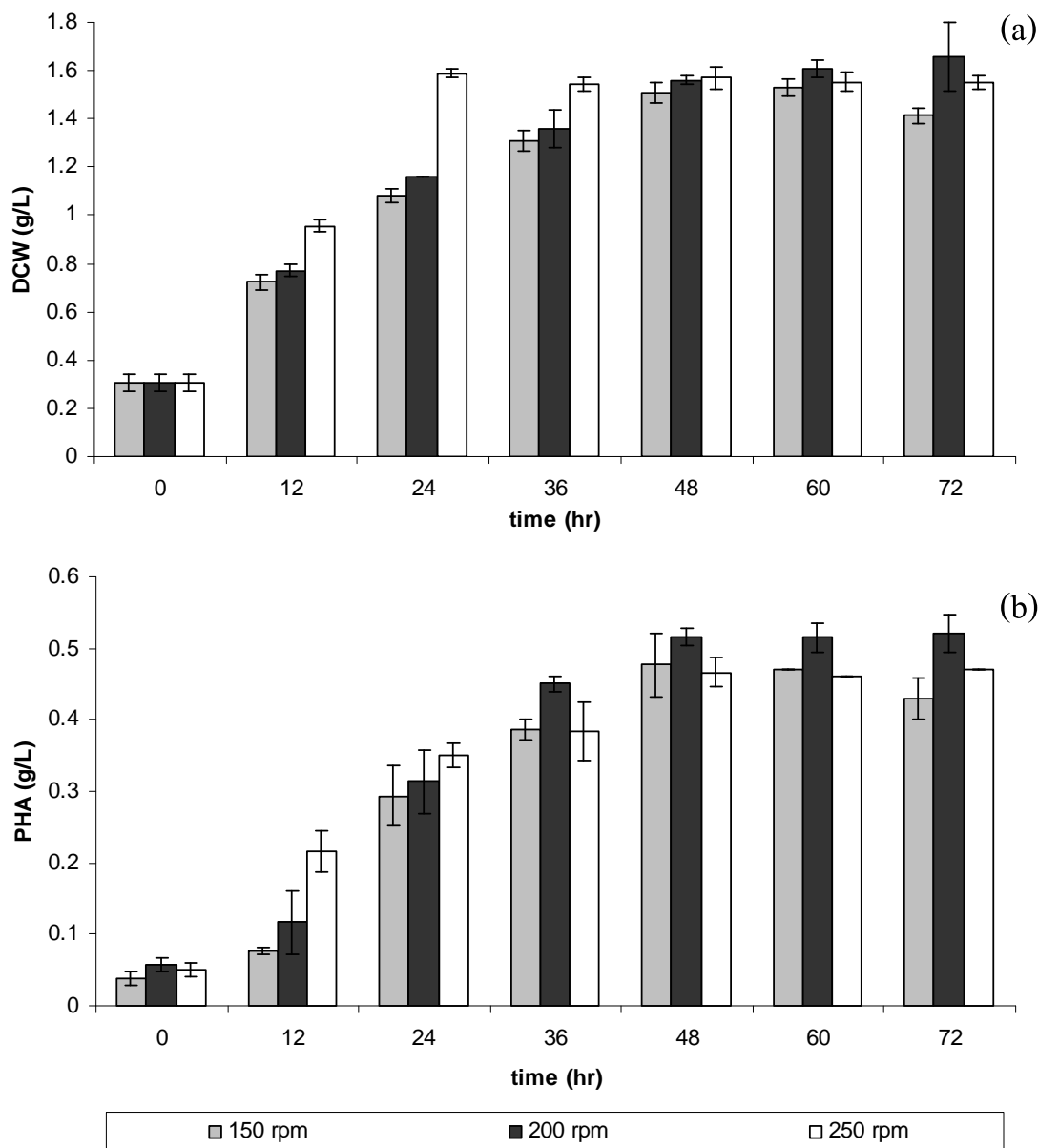
แบบกึ่งกะด้วยการใช้น้ำตาลกลูโคส โดยทำการควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสให้ได้ระดับที่ 10-20 กรัมต่อลิตร ได้ประมาณ 76 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง **Kim และคณะ (2005)** ศึกษาการผลิต PHBV จาก *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 (ชื่อเดิม *Alcaligenes eutrophus*) โดยใช้ฟรุกโตสและแกรวมมา-บิวทิโรแลคโตนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่ใช้ฟรุกโตสความเข้มข้น 14 กรัมต่อลิตร และแกรวมมา-บิวทิโรแลคโตน 6 กรัมต่อลิตร ให้การผลิต PHA ในเซลล์ได้สูงสุด 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง **ธงชัย วงศ์สุวรรณ (2550)** ศึกษาการผลิต PHA จาก *R. eutropha* TISTR 1095 โดยเลี้ยงแบบกึ่งกะ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์มแบบไร้อากาศ ที่มีการเติมกรดโพธิ์ไออนิก 2.5 กรัมต่อลิตร และ กรดบิวทิริก 6.5 กรัมต่อลิตร พบว่า *R. eutropha* TISTR 1095 สามารถผลิต PHA ใ้ภายในเซลล์ได้ประมาณ 77 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.4.3 ผลของอัตราการเขย่า

จากการนำจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M มาทดลองหาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHA ที่อัตราการเขย่าที่ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที โดยเลี้ยงเชื้อในน้ำเสียที่มีเติมกรดโพธิ์ไออนิก 60 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอชให้เป็น 7 พบว่าการเขย่ามีผลต่อการเจริญ (ภาพที่ 16 (a)) โดยการเจริญมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการเขย่า การเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดคือเท่ากับ 1.59 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง แล้วก็เข้าสู่สภาวะคงที่ (stationary phase) แสดงให้เห็นว่าการที่ออกซิเจนมากเกินไป ทำให้อะซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) เข้าสู่ TCA cycle ทำให้การเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และที่การเขย่า 150 และ 200 รอบต่อนาที ให้ปริมาณเซลล์ เท่ากับ 1.51 และ 1.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อนำค่าการเจริญที่ได้มาเปรียบเทียบกับสถิติ พบว่าการเจริญที่อัตราการเขย่า 150 และ 200 รอบต่อนาที ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชตลอดการทดลอง (ภาพที่ 16 (c)) พบว่าค่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกชุดการทดลอง ซึ่งสามารถเป็นตัวชี้วัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง พบว่าจุลินทรีย์สามารถใช้กรดโพธิ์ไออนิกที่เติมลงในน้ำเสียได้เป็นอย่างดีที่อัตราการเขย่าทั้ง 3 ชุดการทดลอง โดยกรดโพธิ์ไออนิกถูกใช้ไปประมาณ 96.4-97.3 เปอร์เซ็นต์ และยังช่วยลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ประมาณ 81.9-82.7 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 8 และเมื่อพิจารณาการผลิต PHA (ภาพที่ 16 (b)) ของจุลินทรีย์ พบว่าชุดการทดลองที่มีการสะสม PHA มากที่สุดคือการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตร โดยสัดส่วนระหว่าง PHA ต่อการเจริญ เท่ากับ 33.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่การเขย่า 150 และ 250 รอบต่อนาที มีการผลิต PHA เท่ากับ 0.48 และ 0.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สัดส่วนระหว่าง PHA ต่อการเจริญ เท่ากับ 31.5 และ 29.7

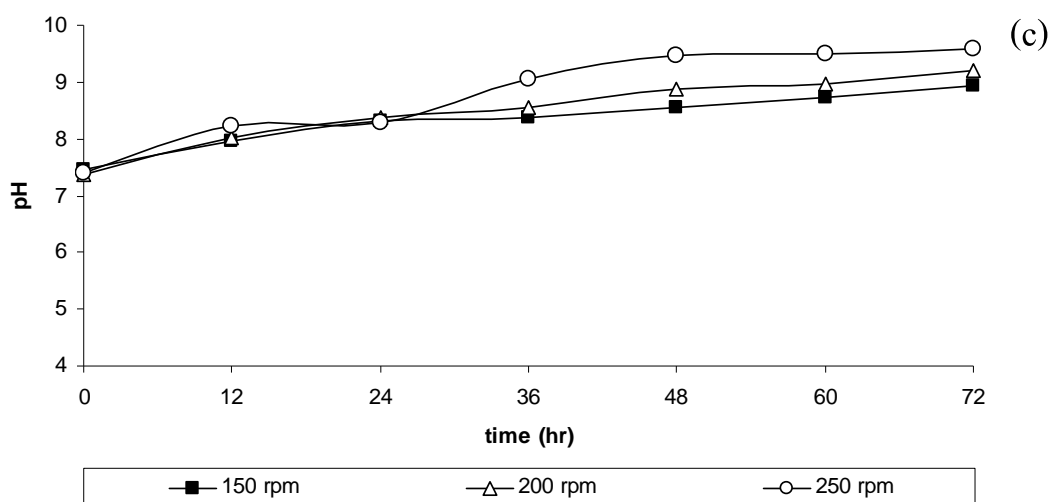
3.4.4 ผลของการเติมเชื้อเริ่มต้น

จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M มาทดลองหาการเติมเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิต PHA ที่การเติมเชื้อเริ่มต้น 5, 10 (ชุดควบคุม) และ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงเชื้อในน้ำเสียที่มีเติมกรดโพธิ์ฟอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอชให้เป็น 7 พบว่าการเติมเชื้อที่ 20 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12–36 และเมื่อเวลาผ่านไป 48–72 ชั่วโมง พบว่าการเติมเชื้อที่ 20 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญใกล้เคียงกับการเติมเชื้อที่ 10 เปอร์เซ็นต์ และมีการเจริญสูงสุดโดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในชั่วโมงที่ 48 (1.59 และ 1.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) และมีการเจริญมากกว่าการเติมเชื้อเริ่มต้นที่ 5 เปอร์เซ็นต์ (1.40 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60) การเติมเชื้อเริ่มต้นที่ 5 เปอร์เซ็นต์ จุลินทรีย์มีการเพิ่มจำนวนน้อยกว่า ทำให้เหลือแหล่งคาร์บอนในอาหารมากกว่า ทำให้หลังจากชั่วโมงที่ 48 จุลินทรีย์สามารถเจริญได้อีก แต่ก็ยังน้อยกว่าการเติมเชื้อที่ปริมาณมากกว่า (ภาพที่ 17 (a)) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชตลอดการทดลอง (ภาพที่ 17 (c)) พบว่าค่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกชุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง พบว่าจุลินทรีย์สามารถใช้กรดโพธิ์ฟอนิกที่เติมลงในน้ำเสียได้เป็นอย่างดีที่การเติมเชื้อเริ่มต้นทั้ง 3 ชุดการทดลอง โดยกรดโพธิ์ฟอนิกถูกใช้ไปประมาณ 96.5–98.2 เปอร์เซ็นต์ และยังช่วยลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ประมาณ 79.8–90.6 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 9 และเมื่อพิจารณาการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ พบว่าที่การเติมเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ 20 เปอร์เซ็นต์ มีการผลิต PHA เท่ากับ 0.50 และ 0.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่เมื่อ พิจารณาสัดส่วนการผลิต



ภาพที่ 16 ผลของการเขย่าต่อการเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยง จุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียโดยเติมกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง

Figure 16. Effect of shaking rate on growth (a), PHA production (b) and pH (c) from the mixed culture of *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M cultivated in wastewater supplemented 60 mM propionic acid at room temperature.



ภาพที่ 16 ต่อ

Figure 16. (continued).

ตารางที่ 8 ผลของอัตราการเขย่าต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราการเขย่าต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

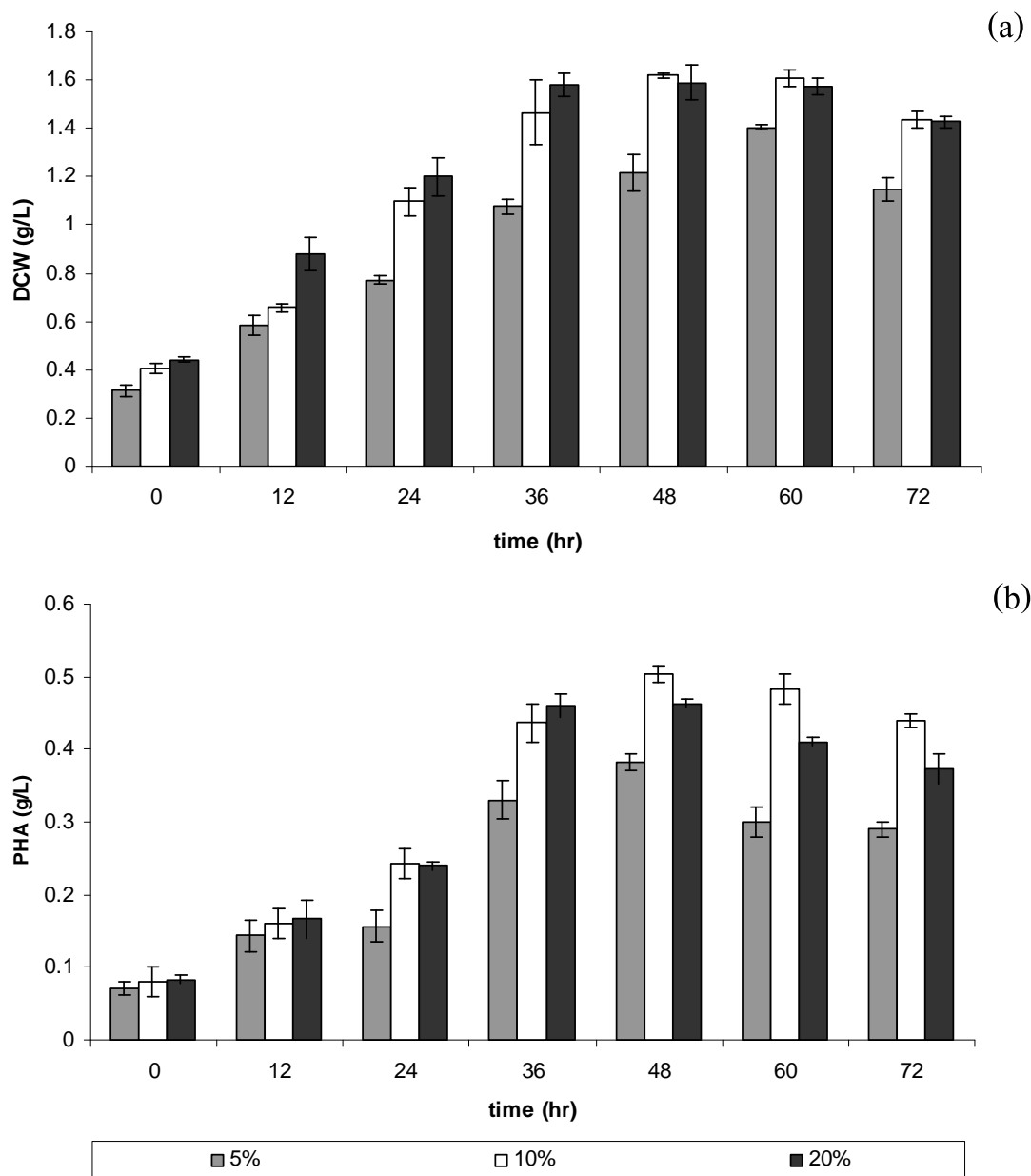
Table 8. Effect of shaking rate on carbon source and COD removal after 72 h cultivation of the mixed culture of *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M in wastewater supplemented 60 mM propionic acid

Shaking rate (rpm)	propionic acid			COD		
	0 h	72 h	removal	0 h	72 h	removal
	(mM)	(mM)	(%)	(mM)	(mM)	(%)
150	48.61	1.75	96.4	12,400	2,240	81.9
200	48.61	1.30	97.3	12,400	2,170	82.5
250	48.68	1.45	97.0	12,400	2,145	82.7

เปอร์เซ็นต์ การผลิต PHA จะไม่เพิ่มขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 36 และลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาผ่านไป (ภาพที่ 17 (b)) ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มาก ทำให้มีการใช้แหล่งคาร์บอนในอาหารหมดอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ชุดการทดลองนี้มีสัดส่วนของอาหารน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น โดยมีสัดส่วนของอาหารเพียง 80 เปอร์เซ็นต์ และปริมาตรเชื้อเริ่มต้น 20 เปอร์เซ็นต์ ทำให้จุลินทรีย์ต้องใช้แหล่งพลังงานในเซลล์เพื่อความอยู่รอด ซึ่งก็คือ PHA ส่วนการเติมเชื้อเริ่มต้นที่ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการสะสม PHA เท่ากับ 0.38 กรัมต่อลิตร สัดส่วนระหว่าง PHA ต่อการเจริญเท่ากับ 31.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจุลินทรีย์มีการสะสม PHA ในเซลล์สูง แต่ก็ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับการทดลองการเติมเชื้อเริ่มต้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนี้เป้าหมายของการทดลองนี้ เพื่อต้องการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ให้มีปริมาณมากอย่างรวดเร็ว เพื่อลดเวลาในการผลิต PHA แต่ชุดการทดลองที่มีการเติมเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ให้การเจริญและผลิต PHA น้อยที่สุด จึงทำให้ชุดการทดลองนี้ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ทดลองต่อ ดังนั้นจึงเลือกการเติมเชื้อเริ่มต้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์ ไปใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งในงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิต PHA โดยทั่วไป เลือกใช้การเติมเริ่มต้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน (Marangoni *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2003; Kemavongse *et al.*, 2007)

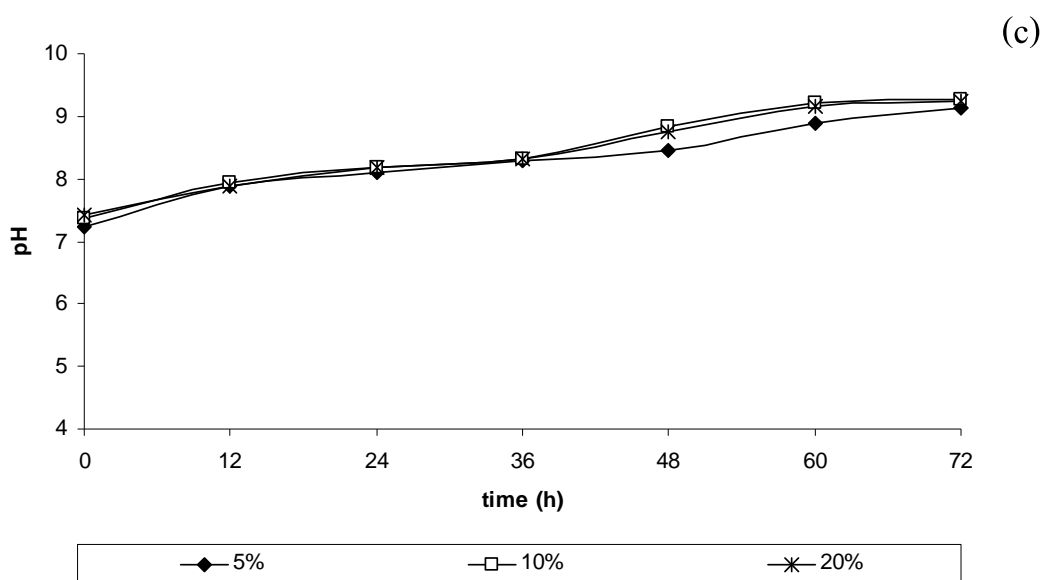
3.4.5 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอน

จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M มาทดลองการเติมชนิดของแหล่งคาร์บอนในน้ำเลี้ยงต่อการผลิต PHA โดยศึกษาการเติมกรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์, กรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับการผสมกรดทั้งสองชนิด อย่างละ 30 มิลลิโมลาร์ ในน้ำเลี้ยงที่ทำการปรับพีเอชให้เป็น 7 ซึ่งช่วยแก้ปัญหาความเป็นพิษของปริมาณกรดในระบบ เพราะกรดที่ใส่ไปทำให้พีเอชลดลงเหลือประมาณ 4 การเลือกใช้กรดวาเลอริกและกรดโพรพิโอนิกเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากกรดวาเลอริกมีผลให้เกิดการสังเคราะห์โมโนเมอร์ชนิด hydroxyvalerate (HV) โดยสัดส่วนของ HV ยิ่งสูงจะช่วยให้โพลิเมอร์มีความแข็งแรงมากขึ้น มีความยืดหยุ่นมากขึ้น และค่า elongation ก็เพิ่มขึ้นด้วย (Madden *et al.*, 2000; Khanna และ Srivastava, 2005) การผลิต hydroxyvalerate จากกรดวาเลอริกนั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงดังนี้ จากกรดวาเลอริกถูกเปลี่ยนเป็น Valeryl-CoA จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น L(+)-3-hydroxyvaleryl-CoA และ 3-ketovaleryl-CoA ตามลำดับ จากนั้น 3-ketovaleryl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น D(+)-3-hydroxyvaleryl-CoA ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารตัวกลางสำคัญในการที่จะเปลี่ยนแปลงเป็น 3-hydroxyvalerate หรือ 3HV unit (Eschenlauer *et al.*, 1996) ส่วนกรดโพรพิโอนิกก็สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหรือสารตั้งต้นสำหรับการผลิต hydroxyvalerate ได้เช่นกัน ซึ่งกลไกการเปลี่ยนแปลงกรดโพรพิโอนิกนั้นมีความคล้ายคลึงกับการเปลี่ยนแปลงของกรดวาเลอริก โดยเริ่มต้นจากกรดโพรพิโอนิกจากนั้นถูกเปลี่ยนไปเป็น propionyl-



ภาพที่ 17 ผลของการเติมเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียโดยเติมกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

Figure 17. Effect of inoculation on growth (a), PHA production (b) and pH (c) from the mixed culture of *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M cultivated in wastewater supplemented 60 mM propionic acid under shaking flask (200 rpm) at room temperature.



ภาพที่ 17 (ต่อ)

Figure 17. (Continued).

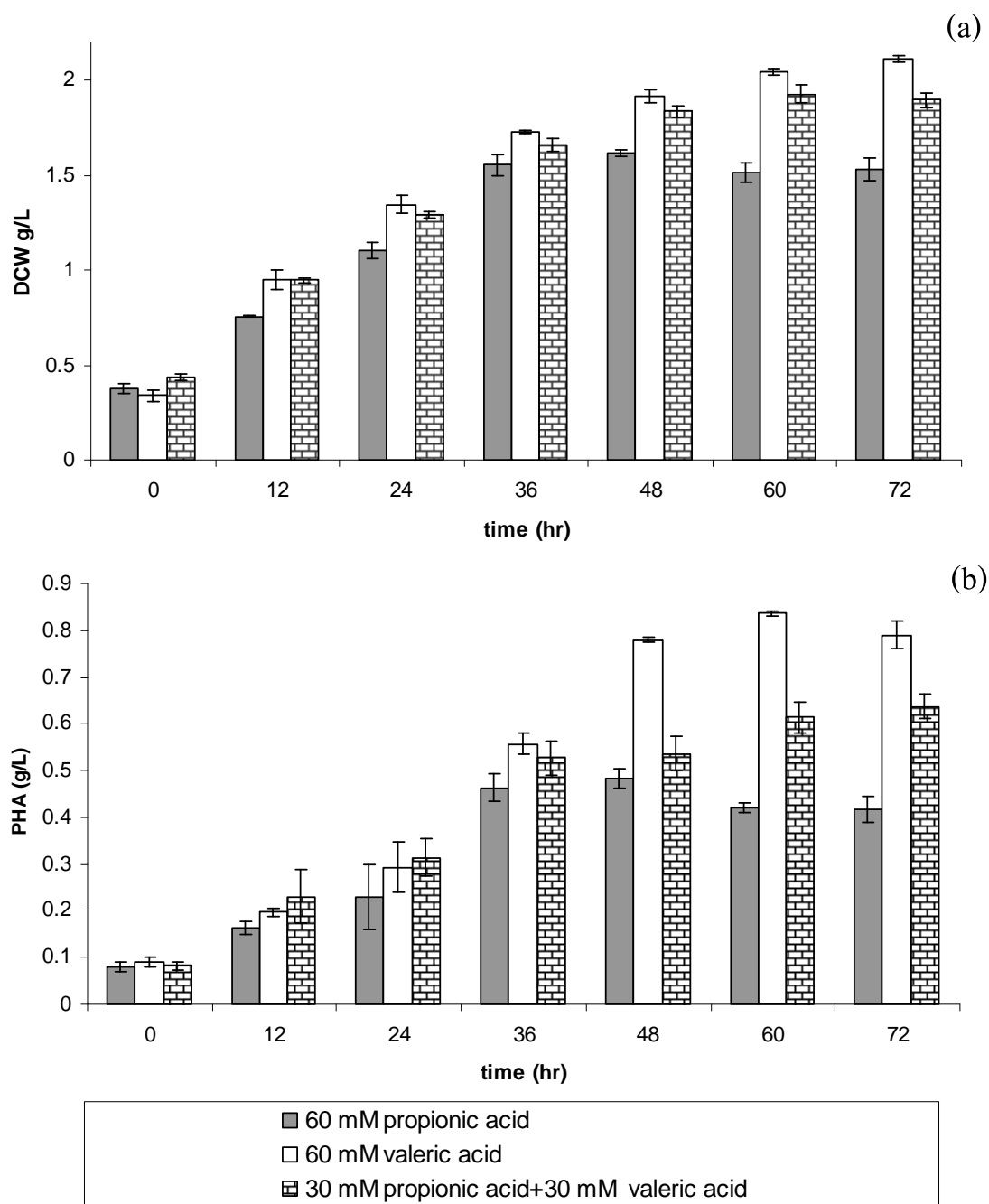
ตารางที่ 9 ผลของการเติมเชื้อเริ่มต้นต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Table 9. Effect of inoculation on carbon source and COD removal after 72 h cultivation of the mixed culture of *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M in wastewater supplemented 60 mM propionic acid.

Inoculation (%)	propionic acid			COD		
	0 h (mM)	72 h (mM)	removal (%)	0 h (mM)	72 h (mM)	removal (%)
5	51.30	0.90	98.2	13,080	2,635	79.8
10	48.60	1.31	97.3	12,400	2,170	82.5
20	43.20	1.50	96.5	12,030	1,135	90.6

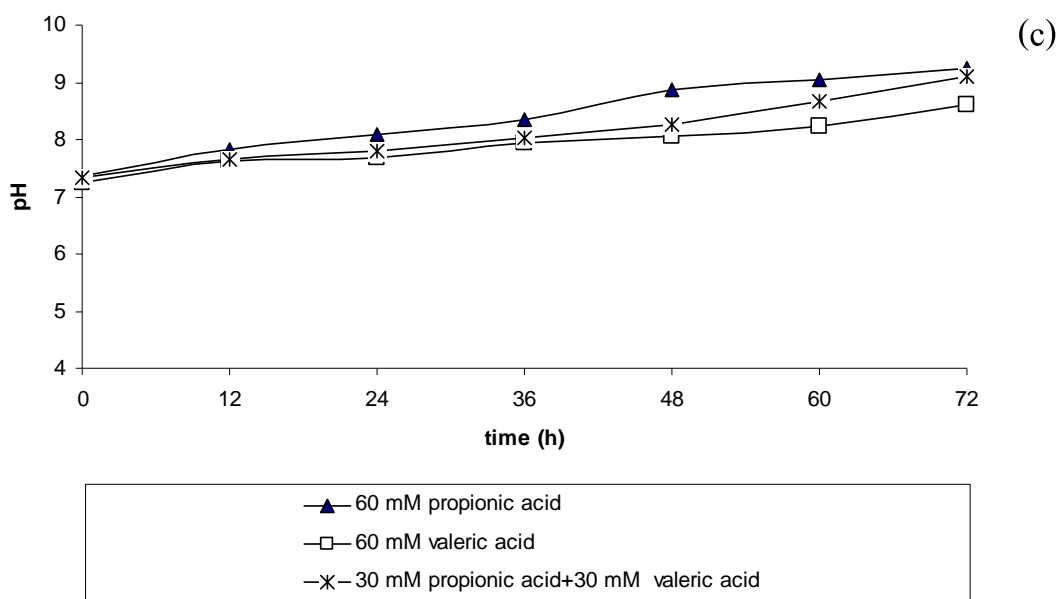
CoA จากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น 3-ketovaleryl-CoA ที่ท้ายที่สุดจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ D(+)-3-hydroxyvaleryl-CoA ซึ่งเป็นสารตัวกลางสำคัญในการที่จะเปลี่ยนเป็น 3-hydroxyvalerate หรือ 3HV unit (Yamane et al., 1996)

การทดลองพบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิก จุลินทรีย์มีการเจริญ น้อยที่สุดตลอดการทดลอง (ภาพที่ 18 (a)) จุลินทรีย์เจริญได้สูงสุดเท่ากับ 1.62 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นการเจริญก็ลดลงเพราะแหล่งคาร์บอนในอาหารเริ่มหมดไป ส่วนชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาเลอริก พบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญสูงสุดตลอดการทดลอง จุลินทรีย์เจริญได้ สูงสุดเท่ากับ 2.12 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 และชุดการทดลองที่มีการเติมกรดทั้งสองชนิด พบว่า จุลินทรีย์มีการเจริญรองลงมา ทั้งนี้เนื่องจากชุดการทดลองนี้มีสัดส่วนของกรดโพรพิโอนิกอยู่ด้วย โดย จุลินทรีย์เจริญได้สูงสุดเท่ากับ 1.93 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 60 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่า พีเอชตลอดการทดลองพบว่าค่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกชุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญ ของจุลินทรีย์ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง พบว่าจุลินทรีย์สามารถใช้กรดโพรพิโอนิกและกรดวาเลอริกที่เติมลงในน้ำเสียได้เป็นอย่างดี โดยชุด การทดลองที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ พบว่ากรดโพรพิโอนิกถูกใช้ไปประมาณ 97.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาเลอริก 60 มิลลิโมลาร์ พบว่ากรดวาเลอริกถูกใช้ ไป 95.0 เปอร์เซ็นต์ และชุดการทดลองที่มีการเติมกรดไขมันทั้งสองชนิด พบว่ากรดไขมันทั้งสอง ชนิดถูกใช้ไปจนหมด (100 เปอร์เซ็นต์) และยังช่วยลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ประมาณ 83.2, 84.6 และ 85.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10 และเมื่อพิจารณาการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ พบว่าการผลิต PHA ของจุลินทรีย์สอดคล้องกับการเจริญ โดยชุดการทดลองที่มีการ เติมกรดวาเลอริก และชุดทดลองที่มีการเติมกรดทั้งสองชนิด มีการผลิต PHA สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 เท่ากับ 0.84 และ 0.61 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สัดส่วนระหว่าง PHA ต่อการเจริญเท่ากับ 40.9 และ 31.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่มีการเติมกรดโพรพิโอนิกมีการผลิต PHA น้อยที่สุด เท่ากับ 0.48 กรัมต่อลิตร และ 29.9 เปอร์เซ็นต์ ณ ชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 18 (b)) ซึ่งสอดคล้องกับการ ทดลองของ Bhubalan และคณะ (2008) จากการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์จากริคอบิแนนต์ *Cupriavidus necator* PHB-4/ pBBREE32d13 ในอาหารสังเคราะห์ โดยใช้น้ำมันจากเมล็ดในปาล์ม 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบการเติมโซเดียมวาเลอเรตและโซเดียมโพรพิโอเนต ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมการผลิตสัดส่วน HV พบว่าการเติมโซเดียมวาเลอเรต จุลินทรีย์มีการ เจริญและผลิต PHA ในเซลล์อยู่ในช่วง 5.5-7.9 กรัมต่อลิตร และ 59-79 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเติม โซเดียมโพรพิโอเนต จุลินทรีย์มีการเจริญและผลิต PHA ในเซลล์อยู่ในช่วง 4.5-5.8 กรัมต่อลิตร และ



ภาพที่ 18 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยง จุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสีย เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

Figure 18. Effect of carbon source on growth (a), PHA production (b) and pH (c) from the mixed culture of *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M cultivated in wastewater under shaking flask (200 rpm) at room temperature.



ภาพที่ 18 (ต่อ)

Figure 18. (Continued).

60-79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยการเจริญและการผลิต PHA ในเซลล์สูงสุดเกิดขึ้นจากการเติมกรดแต่ละชนิดที่ 10 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36

Kemavongse และคณะ (2007) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการใช้กรดโพรพิโอนิกและกรดวาเลอริกต่อการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* U7 เพื่อผลิต PHA โดยเลี้ยงในอาหาร GA (glutamate-acetate medium) ซึ่งมีอะซิเตต 40 มิลลิโมลาร์ พบว่าการใช้กรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ จุลินทรีย์สามารถผลิต PHA ภายในเซลล์ได้เท่ากับ 1.88 กรัมต่อลิตร (77.7 เปอร์เซ็นต์) PHA ที่ได้มีสัดส่วน HB และ HV เท่ากับ 80.9 และ 19.1 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการใช้กรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิต PHA ภายในเซลล์ได้ 1.93 กรัมต่อลิตร (77.4 เปอร์เซ็นต์) มีสัดส่วน HB และ HV เท่ากับ 15.2 และ 84.8 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า การใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้เกิดการส่งเสริมการผลิต HV มากกว่าการใช้กรดโพรพิโอนิก ดังนั้นจึงเลือกการเติมกรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 10 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสีย เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

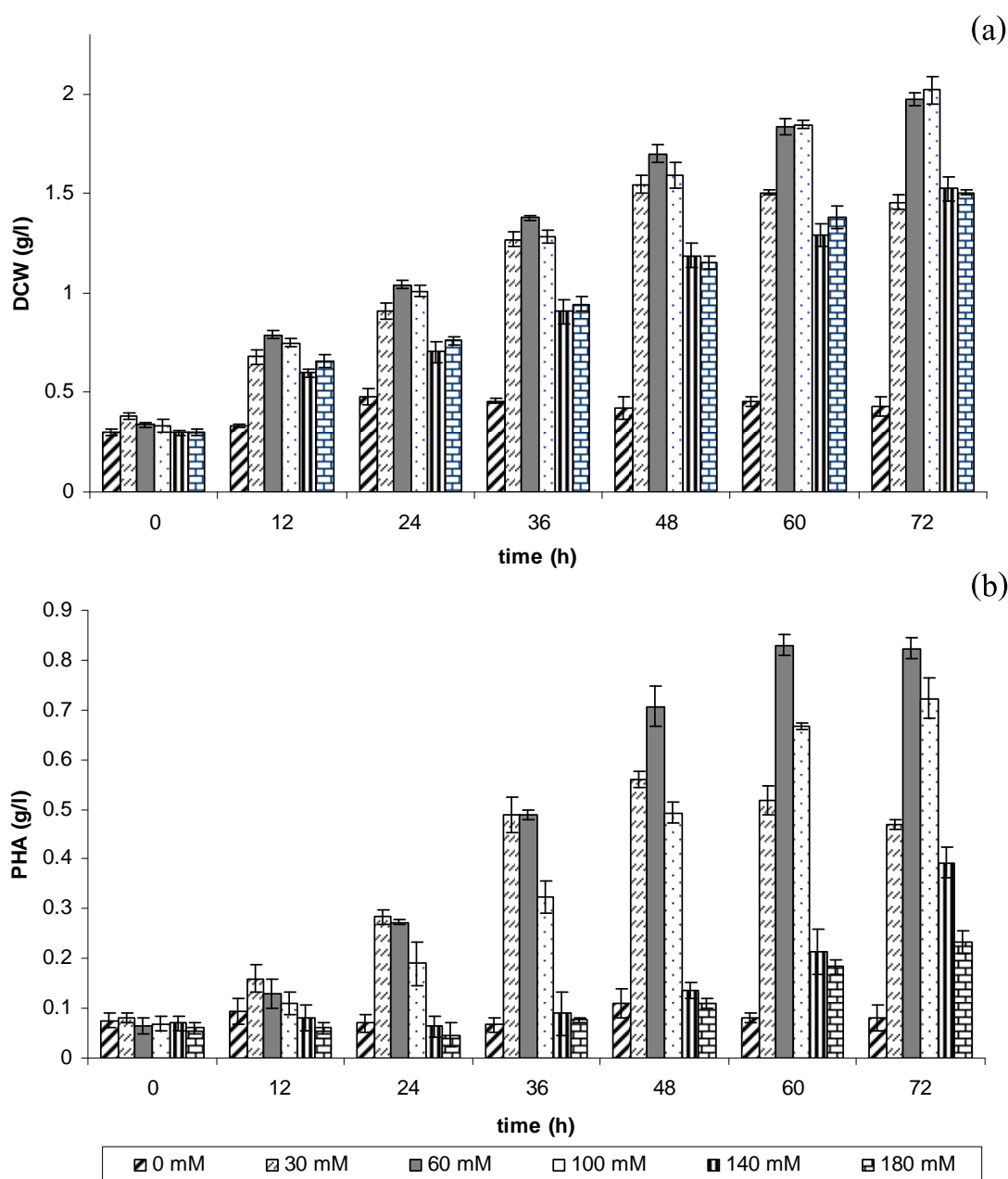
Table 10. Effect of carbon source on carbon source and COD removal after 72 h cultivation of the mixed culture of *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M in wastewater.

carbon source	60 mM	60 mM valeric	30 mM propionic acid
	propionic acid	acid	+ 30 mM valeric acid
propionic acid			
0 h (mM)	48.2		25.65
72 h (mM)	1.29	-	0
removal (%)	97.3		100.0
valeric acid			
0 h (mM)		50.56	24.79
72 h (mM)	-	2.51	0
removal (%)		95.0	100.0
COD			
0 h (mM)	12,900	15560	15,500
72 h (mM)	2,170	2,390	2,325
removal (%)	83.2	84.6	85.0

หมายเหตุ : ที่ชั่วโมงที่ 0 มีการเติมหัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในน้ำเสียที่มีการเติมกรดชนิดต่างๆ จึงส่งผลให้ปริมาณกรดที่วัดได้มีค่าลดลง

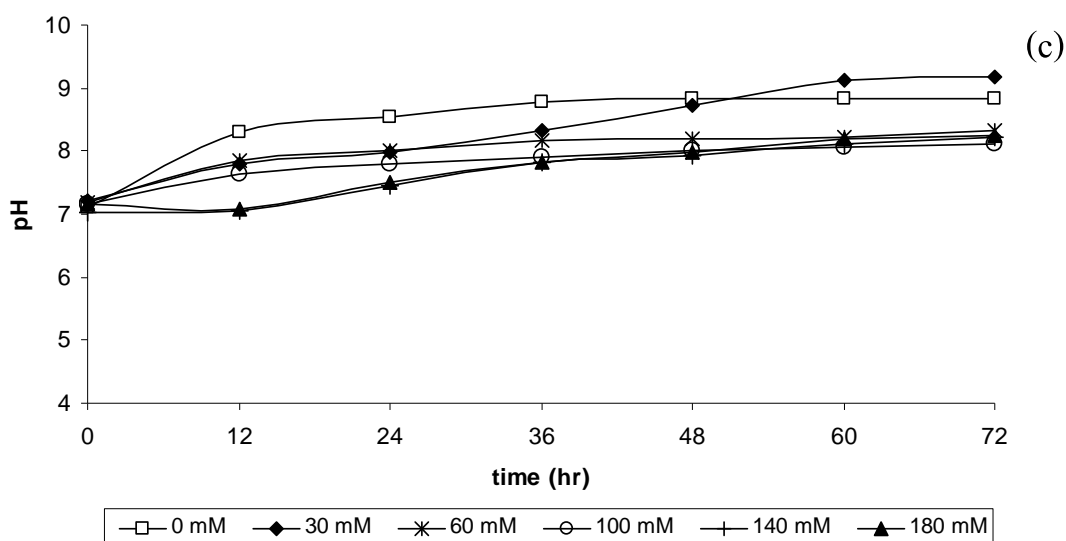
จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ผสมระหว่าง *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M มาทดลองการเติมกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 30, 60, 100, 140 และ 180 มิลลิโมลาร์ ในน้ำเสียต่อการผลิต PHA (คิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 0.1, 51, 102, 171, 240, 308 ตามลำดับ) ทำการปรับพีเอชให้เป็น 7 ซึ่งช่วยแก้ปัญหาความเป็นพิษของปริมาณกรด การทดลองพบว่าทุกชุดการทดลองการเจริญของจุลินทรีย์มีแนวโน้มเดียวกัน (ภาพที่ 19 (a)) การเจริญเข้าสู่ช่วงการเจริญคงที่ในช่วง 48-60 ชั่วโมง และมีการเจริญขึ้นเล็กน้อย ไปเรื่อยๆ เนื่องจากแหล่งคาร์บอนในอาหารยังไม่หมด ยกเว้นชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมกรดวาเลอริก (0 มิลลิโมลาร์) และชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ โดยชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมกรดวาเลอริก จุลินทรีย์มีการเจริญเพิ่มเล็กน้อยในช่วง 24 เท่ากับ 0.48 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นการเจริญก็ลดลงและคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำเสียมีปริมาณที่น้อยมาก ทำให้การเจริญเกิดขึ้นได้น้อย ชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ จุลินทรีย์มีการเจริญได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 1.55 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นการเจริญก็ลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากแหล่งคาร์บอนในอาหารหมดไป ทำให้จุลินทรีย์ไม่มีอาหารเพื่อความอยู่รอด ส่วนชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 60 และ 100 มิลลิโมลาร์ จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 1.97 และ 2.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 140 และ 180 มิลลิโมลาร์ จุลินทรีย์มีการเจริญน้อยกว่าการเติมกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 60 และ 100 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากความเข้มข้นของกรดวาเลอริกมีมากเกินไปทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีการยับยั้งของสับสเตรท โดยจุลินทรีย์มีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 1.52 และ 1.51 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชตลอดการทดลอง (ภาพที่ 19 (c)) พบว่าค่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกชุดการทดลอง และชุดการทดลองที่มีการเจริญมากกว่า พบว่ามีความเป็นด่างมากกว่าด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และเมื่อพิจารณาการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ (ภาพที่ 19 (b)) พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ มีการผลิต PHA มากที่สุดในชั่วโมงที่ 60 เท่ากับ 0.83 กรัมต่อลิตร และ 45.2 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเซลล์ ซึ่งให้การผลิต PHA มากกว่าชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (0.67 กรัมต่อลิตร และ 36.1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเซลล์) ทั้งที่ทั้งสองชุดการทดลองนี้มีการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของกรดวาเลอริก 100 มิลลิโมลาร์ มีมากเกินไปที่จุลินทรีย์จะใช้ได้ ทำให้ปริมาณกรดที่เกินความต้องการก่อให้เกิดความเป็นพิษ ทำให้ความสามารถในการสะสม PHA ของจุลินทรีย์น้อยลง และนอกจากนี้อาจเป็นผลเนื่องจากอัตราส่วน

และส่วนชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมกรดวาเลอริก และชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการผลิต PHA น้อยกว่าการเติมกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เพราะมีปริมาณแหล่งคาร์บอนน้อยเกินไป ไม่เพียงพอต่อการเจริญ ทำให้การสะสม PHA ก็ต้องหยุด เมื่อไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อเวลาผ่านไปจุลินทรีย์จึงใช้ PHA ซึ่งเป็นพลังงานสำรองในเซลล์ เพื่อความอยู่รอด และเมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง พบว่าความสามารถในการใช้กรดวาเลอริกของจุลินทรีย์สอดคล้องกับการเจริญและการผลิต PHA โดยชุดการทดลองที่เติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 0 และ 30 มิลลิโมลาร์ พบว่ากรดวาเลอริกถูกใช้ไปทั้งหมด (100 เปอร์เซ็นต์) ลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ประมาณ 95.0 และ 95.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้นของกรดวาเลอริก 60, 100, 140 และ 180 มิลลิโมลาร์ กรดวาเลอริกถูกใช้ไปประมาณ 95.0, 66.2, 33.7 และ 30.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ประมาณ 84.6, 70.4, 36.0 และ 33.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **ดังแสดงในตารางที่ 11** ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกชุดการทดลองที่มีการเติมกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนไปใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 19 การเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดวาเลอริกที่ความเข้มข้นต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

Figure 19. Time course of growth (a), PHA production (b) and pH (c) from the mixed culture of *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M cultivated in wastewater supplemented with different concentrations of valeric acid under shaking flask (200 rpm) at room temperature.



ภาพที่ 19 (ต่อ)

Figure 19. (Continued).

ตารางที่ 11 ค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylooxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีกรด เต็มกรดวาเลอริก ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Table 11. Carbon source and COD removal after 72 h cultivation of the mixed culture of *Achromobacter xylooxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M in wastewater supplemented with different concentrations of valeric acid.

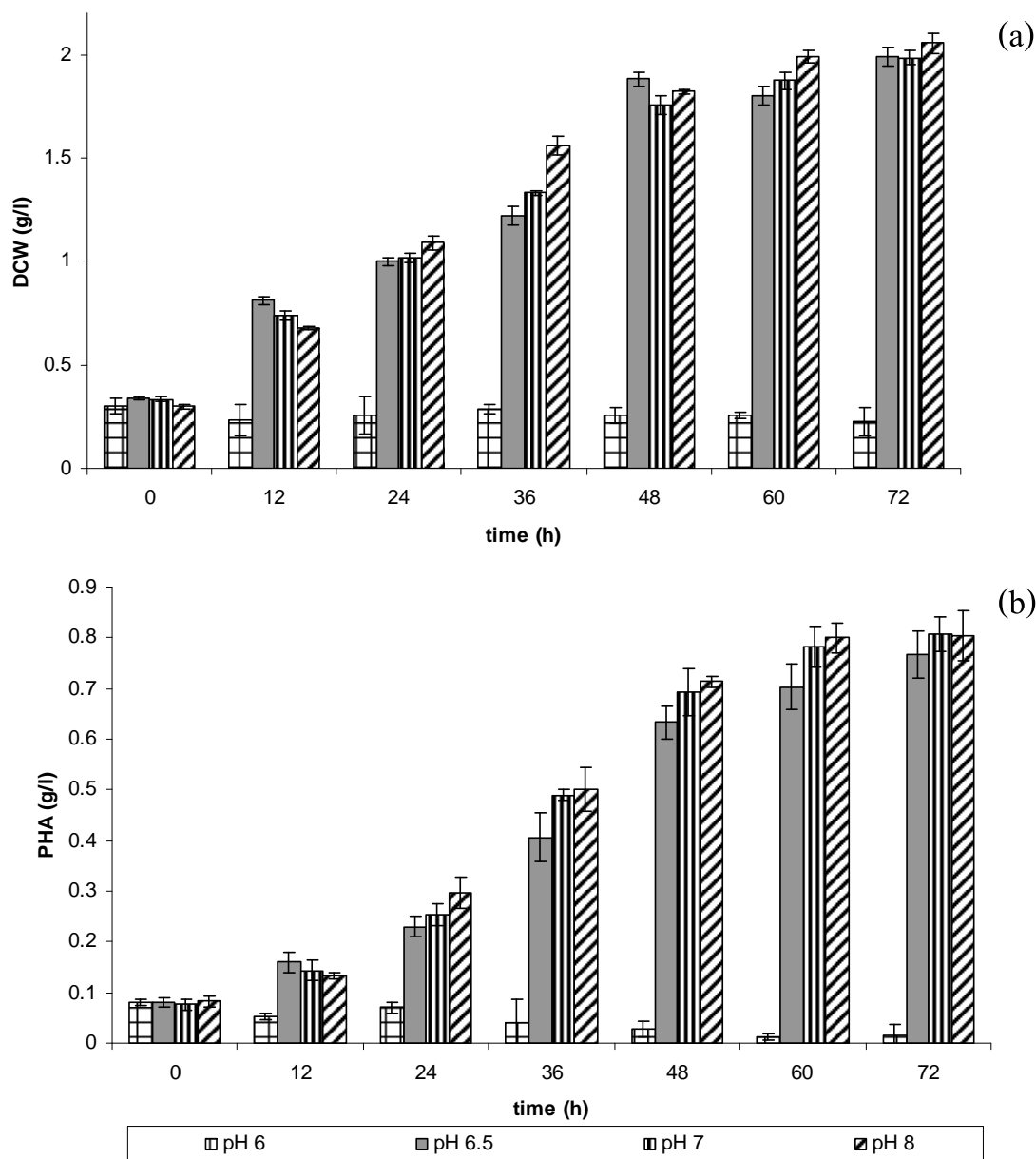
wastewater supplemented with different concentrations of valeric (mM)	valeric acid			COD		
	0 h	72 h	removal	0 h	72 h	removal
	(mM)	(mM)	(%)	(mM)	(mM)	(%)
0 mM	0.15	0	100.0	1,875	95	94.7
30 mM	24.56	0	100.0	10,600	505	95.2
60 mM	50.55	2.50	95.0	15,500	2,480	84.6
100 mM	88.67	29.9	66.2	21,450	6,340	70.4
140 mM	120.45	79.82	33.7	32,650	20,900	36.0
180 mM	160.20	111.74	30.2	38,100	25,435	33.2

3.4.7 ผลของพีเอชเริ่มต้น

ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิต PHA โดยทำการปรับน้ำเลี้ยงที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีการเติมกรดวาลेरริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ให้พีเอชมีค่าเป็น 6, 6.5, 7 และ 8 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าการเจริญของเชื้อผสมระหว่าง *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.5, 7 และ 8 มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน โดยมีการเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ในชั่วโมงที่ 60 เท่ากับ 1.80, 1.87 และ 1.99 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 20 (a)) ส่วนอาหารที่มีการปรับพีเอชเป็น 6 พบว่าจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ อันเป็นผลสืบเนื่องจากการขาดความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฮโดรเจนไอออนกับปริมาณไฮดรอกไซด์ ซึ่งจะส่งผลต่อการผ่านเข้าออกของสารอาหาร เซลล์จึงไม่สามารถนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ หรืออีกนัยหนึ่งเป็นผลมาจากความเป็นพิษของปริมาณกรดในระบบ เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเติมกรดวาลेरริก โดยกรดวาลेरริกทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญ ซึ่งปกติจะมีการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7 เพื่อเป็นการปรับปริมาณไฮโดรเจนไอออนอิสระที่แสดงประจุบวกให้ลดลงด้วยไฮดรอกไซด์ ซึ่งมีประจุลบ จึงทำให้ไฮโดรเจนไอออนไม่สามารถส่งผลกระทบต่อเซลล์ (Du *et al.*, 2001) ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่มีการปรับพีเอชเป็น 6 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และพีเอชไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดการทดลอง (ภาพที่ 20 (c)) ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ก็ไม่มีการผลิต PHA ด้วยเช่นกัน โดยพบว่าชุดการทดลองที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 ปริมาณ PHA แทบจะไม่เปลี่ยนแปลงจากเริ่มต้น (ภาพที่ 20 (b)) ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญข้างต้น โดยต่างจากชุดการทดลองที่มีการปรับพีเอชเป็น 6.5, 7 และ 8 การผลิต PHA จะเกิดขึ้นควบคู่กับการเจริญ อันเป็นผลจาก PHA เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำรอง จึงมีการสะสมควบคู่กับการเจริญและจัดเป็นสารกลุ่ม primary metabolite หรือ growth-associated substance การสะสม PHA เกิดขึ้นสูงสุดเมื่อเชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase และจะเพิ่มเล็กน้อยหรือค่อนข้างคงที่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น จุลินทรีย์สามารถสะสม PHA ในเซลล์ได้สูงสุดเท่ากับ 0.70, 0.78 และ 0.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่พีเอชเริ่มต้น 6.5, 7 และ 8 และเห็นได้ว่าที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 ให้การผลิต PHA สูงสุด แต่เมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นพบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันกับการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อคิดเป็นการผลิต PHA ภายในเซลล์ พบว่าการปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ให้การผลิต PHA ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่า การปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.5 และ 8 เท่ากับ 41.8, 39.1 และ 40.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเนื่องด้วยการปรับพีเอชเริ่มต้นต้องอาศัยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จึงไม่จำเป็นต้องสิ้นเปลืองสารเคมีเพื่อใช้ในการปรับพีเอชเริ่มต้นให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นเบส ดังนั้นจึงเลือกใช้การปรับพีเอชเท่ากับ 7 ไปใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่ง

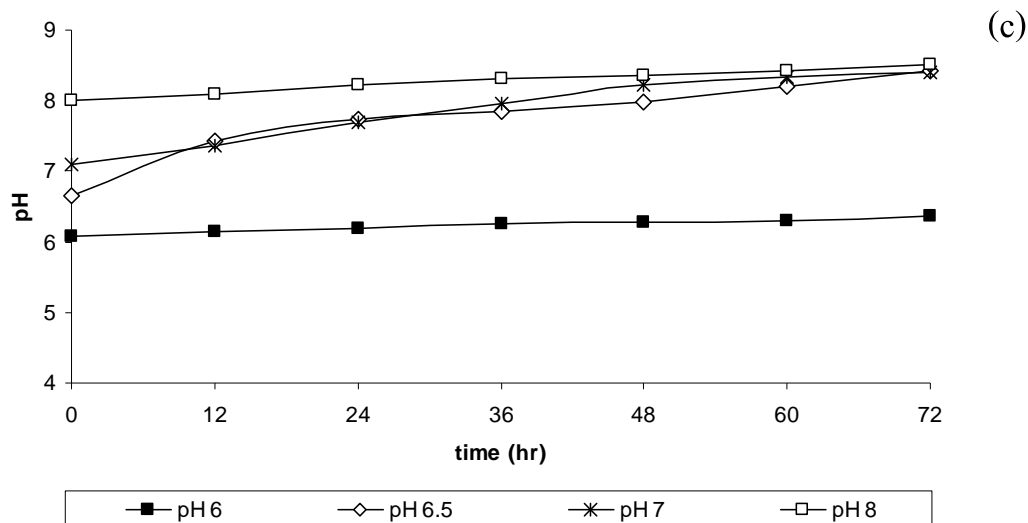
3.4.7 ผลของการหมักเชื้อน้ำเสีย

การเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M เปรียบเทียบระหว่างการหมักเชื้อและไม่หมักเชื้อน้ำเสียที่มีเดิมกรดโพรฟิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอชเริ่มต้นให้เป็น 7 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าการหมักเชื้อน้ำเสีย จุลินทรีย์มีการเจริญมากกว่าการไม่หมักเชื้อน้ำเสีย (ภาพที่ 21 (a)) โดยการหมักเชื้อน้ำเสียมีการเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ในชั่วโมง 60 เท่ากับ 1.87 กรัมต่อลิตร และเจริญได้ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 1.98 ส่วนการไม่หมักเชื้อน้ำเสียให้การเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 1.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งการเจริญของทั้งสองชุดการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชตลอดการทดลอง (ภาพที่ 21 (c)) พบว่าค่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทั้งสองชุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และเมื่อพิจารณาการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ (ภาพที่ 21 (b)) พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิต PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 0.78 และ 0.70 กรัมต่อลิตร ในชุดการทดลองที่หมักเชื้อและไม่หมักเชื้อน้ำเสีย ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) คิดเป็น 41.8 และ 39.1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเซลล์ ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อโดยการหมักเชื้อน้ำเสียให้การผลิต PHA มากกว่าการไม่หมักเชื้อน้ำเสีย เนื่องจากน้ำเสียที่ไม่ผ่านการหมักมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีอยู่ในน้ำเสียและเกิดการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมระหว่างการเตรียมน้ำเสีย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sangkharak (2007) จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* สายพันธุ์ N20 ในน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์มจากระบบบำบัดแบบไร้อากาศ โดยเปรียบเทียบการหมักเชื้อและไม่หมักเชื้อน้ำเสีย พบว่าการหมักเชื้อน้ำเสีย จุลินทรีย์สามารถเจริญและผลิต PHA ในเซลล์ได้ดีกว่าการไม่หมักเชื้อน้ำเสีย เท่ากับ 8 กรัมต่อลิตร (87.9 เปอร์เซ็นต์) และ 7.88 กรัมต่อลิตร (86.4 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ



ภาพที่ 20 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยง จุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

Figure 20. Effect of initial pH on growth (a), PHA production (b) and pH (c) from the mixed culture of *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M cultivated in wastewater supplemented with 60 mM valeric acid under shaking flask (200 rpm) at room temperature.



ภาพที่ 20 (ต่อ)

Figure 20. (Continued).

ตารางที่ 12 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Table 12. Effect of initial pH on carbon source and COD removal after 72 h cultivation of the mixed culture of *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M in wastewater supplemented with 60 mM valeric acid.

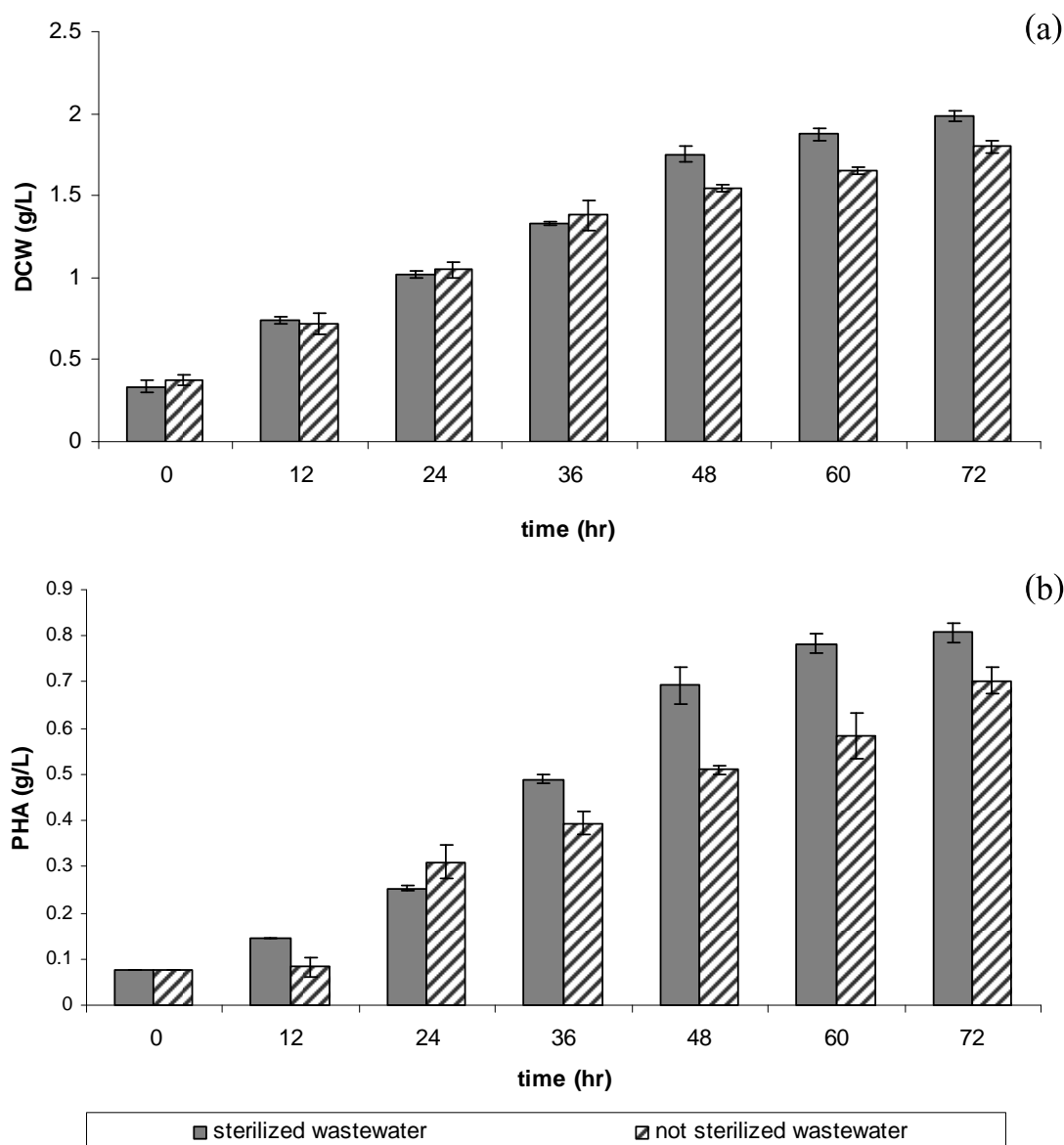
Initial pH	valeric acid			COD		
	0 h (mM)	72 h (mM)	removal (%)	0 h (mM)	72 h (mM)	removal (%)
6	50.06	31.92	36.2	15,530	10,710	31.0
6.5	51.84	6.10	88.2	15,500	2,825	81.8
7	50.55	2.50	95.0	15,550	2,390	84.6
8	51.05	0.49	99.0	15,570	1,375	91.2

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงพบว่าชุดการทดลองที่ไม่ฆ่าเชื้อน้ำเสีย จุลินทรีย์ใช้กรควาเลอร์ทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ ลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ประมาณ 97.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อน้ำเสีย ทั้งนี้เนื่องจากชุดการทดลองที่ไม่ฆ่าเชื้อน้ำเสีย จุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในน้ำเสียมีการแย่งใช้แหล่งคาร์บอนทำให้แหล่งคาร์บอนหมดเร็วกว่า โดยชุดการทดลองที่มีการฆ่าเชื้อน้ำเสีย กรควาเลอร์ถูกใช้และลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ประมาณ 95.0 และ 84.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **ดังแสดงในตารางที่ 13** ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้การฆ่าเชื้อน้ำเสียนำไปศึกษาต่อ เพื่อเป็นการลดความแปรปรวนจากสิ่งแวดล้อม แต่ถ้าต้องการผลิต PHA ในระดับอุตสาหกรรม และต้องการลดต้นทุนในการทำระบบฆ่าเชื้อน้ำเสีย การผลิต PHA โดยใช้ น้ำเสียที่ไม่ฆ่าเชื้อ ยังมีศักยภาพที่สามารถกระทำได้

3.5 ผลของการให้อากาศและการกวนต่อการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์

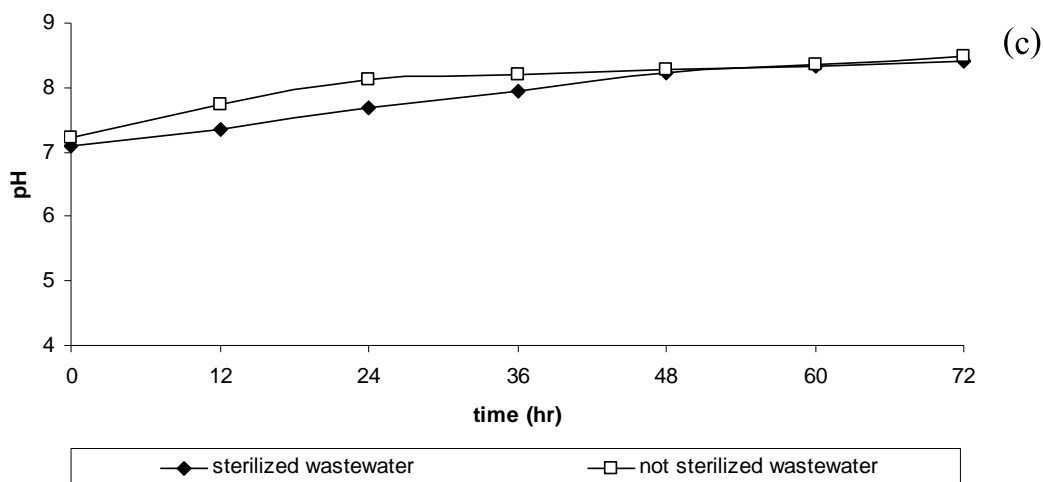
ทำการทดลองหาผลของการให้อากาศและการกวนต่อการผลิต PHA ในถังปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.2 คือ เดิมกรควาเลอร์ 60 มิลลิโมลาร์ ในน้ำเสีย ปรับพีเอช เริ่มต้นให้เป็น 7 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การทดลองพบว่า การเจริญของเชื้อผสมระหว่าง *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในถังหมักจากการศึกษาผลของการให้อากาศและการกวน ซึ่งเปรียบเทียบการให้อากาศที่ 0, 0.5 และ 1 vvm กับการกวนที่ 100 และ 200 รอบต่อนาที พบว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการให้อากาศ ทั้งที่มีการกวนที่ 100 และ 200 รอบต่อนาที จุลินทรีย์ไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 22 (a)) แสดงให้เห็นว่าการกวนที่ 100 และ 200 รอบต่อนาที ไม่สามารถช่วยเพิ่มปริมาณอากาศในถังหมักได้ ซึ่งการไม่มีออกซิเจนเพื่อใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ทำให้กระบวนการเจริญเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ แต่เมื่อมีการให้อากาศพบว่าการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเมื่อเพิ่มการให้อากาศเป็น 0.5 vvm และการกวน 100 รอบต่อนาที พบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญมากขึ้นกว่าการไม่ให้อากาศ จุลินทรีย์เจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 มีค่าประมาณ 1.00 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อให้การกวนเพิ่มขึ้นเป็น 200 รอบต่อนาที พบว่าการเจริญเพิ่มมากขึ้นเป็นสองเท่า เท่ากับ 2.10 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากการกวนที่ 200 รอบต่อนาที สามารถกวนผสมอาหารให้จุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนในอาหาร และดูดซับออกซิเจนได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบการให้อากาศ 0.5 vvm/การกวน 200 รอบต่อนาที กับ การให้อากาศ 1 vvm/การกวน 100 รอบต่อนาที พบว่าการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการให้อากาศ 1 vvm/การกวน 100 รอบต่อนาที จุลินทรีย์มีการเจริญเท่ากับ 1.97 กรัมต่อลิตร และเมื่อให้อากาศ 1 vvm/การกวน 200 รอบต่อนาที พบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 3.20 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชตลอดการ



ภาพที่ 21 ผลของการฆ่าเชื้อน้ำเสียต่อการเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

Figure 21. Effect of sterilization of wastewater on growth (a), PHA production (b) and pH (c) from the mixed culture of *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M cultivated in wastewater supplemented with 60 mM valeric acid under shaking flask (200 rpm) at room temperature.



ภาพที่ 21 (ต่อ)

Figure 21. (Continued).

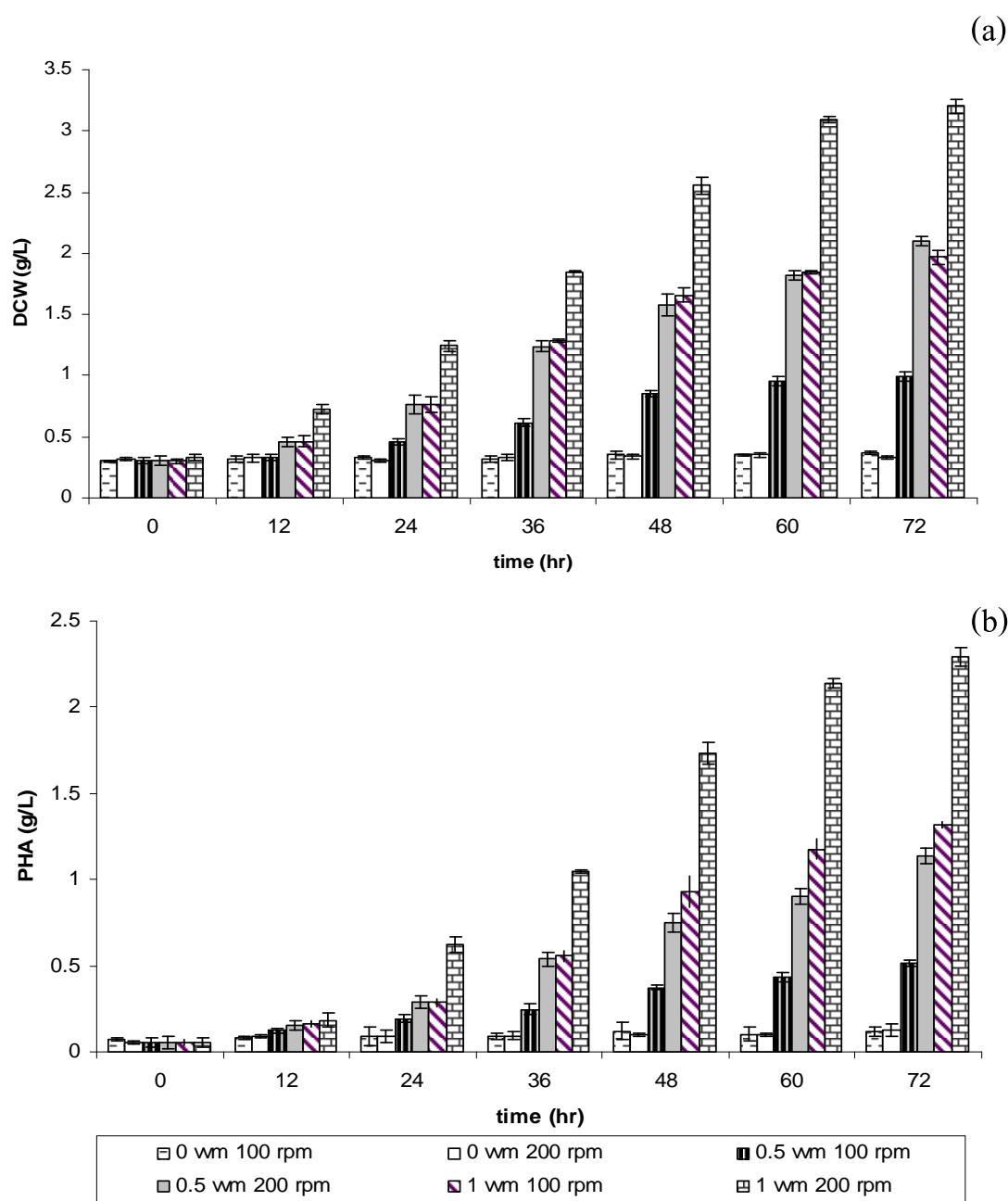
ตารางที่ 13 ผลของการฆ่าเชื้อน้ำเสียต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีโอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริกความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Table 13. Effect of sterilization of wastewater on carbon source and COD removal after 72 h cultivation of the mixed culture of *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M in wastewater supplemented with 60 mM valeric acid.

Condition	valeric acid			COD		
	0 h (mM)	72 h (mM)	removal (%)	0 h (mM)	72 h (mM)	removal (%)
Sterilized wastewater	50.55	2.50	95.0	15,550	2350	84.6
Not sterilized wastewater	49.89	0	100.0	17,600	430	97.6

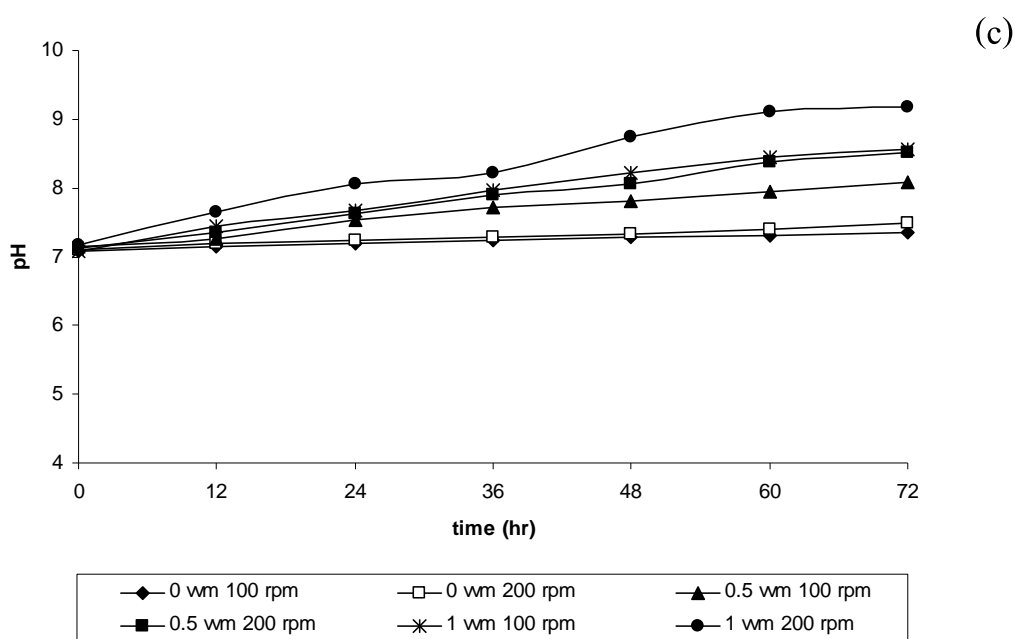
ทดลอง (ภาพที่ 22 (c)) พบว่าค่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในชุดการทดลองที่จุลินทรีย์มีการเจริญ และชุดการทดลองที่มีการเจริญมากกว่า พบว่ามีความเป็นด่างมากกว่าด้วยเช่นกัน ส่วนชุดการทดลองที่ไม่มีมีการให้อากาศ ค่าพีเอชไม่มีการเปลี่ยน ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และเมื่อพิจารณาการผลิต PHA ของจุลินทรีย์ (ภาพที่ 22 (b)) พบว่าชุดการทดลองที่ไม่ให้อากาศ ไม่มีการผลิต PHA เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญ ส่วนชุดการทดลองที่มีการให้อากาศ 0.5 vvm/การกวน 200 รอบต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีการให้อากาศ 1 vvm/การกวน 100 รอบต่อนาที ซึ่งให้ปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างกัน พบว่าชุดการทดลองที่มีการให้อากาศ 1 vvm/การกวน 100 รอบต่อนาที ส่งเสริมการผลิต PHA มากกว่า ชุดการทดลองที่มีการให้อากาศ 0.5 vvm/การกวน 200 รอบต่อนาที เท่ากับ 1.32 และ 1.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (67.0 และ 51.9 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเซลล์ ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าการให้อากาศที่เหมาะสม จะส่งเสริมการผลิต PHA มากกว่า ถึงแม้จะมีการกวนน้อยกว่า และเมื่อมีการให้อากาศ และการกวนที่เหมาะสมที่ 1 vvm และ 200 รอบต่อนาที ตามลำดับ พบว่าจุลินทรีย์มีการผลิต PHA สูงสุดเท่ากับ 2.29 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 71.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ **ธงชัย วงศ์สุวรรณ (2550)** เกี่ยวกับการให้อากาศในการผลิต PHA โดยใช้เชื้อ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 โดยควบคุมการให้อากาศที่ 0.5, 1 และ 2 vvm มีการกวนที่ 200 รอบต่อนาที และมีการเติมโพรพิโอเนต 2.5 กรัมต่อลิตร, กรดบิวทิริก 6.5 กรัมต่อลิตรในน้ำหมัก พบว่าการให้อากาศ 0.5 vvm ให้การเจริญและผลิต PHA น้อยที่สุด ส่วนที่การให้อากาศ 1 และ 2 vvm พบว่าการให้อากาศ 2 vvm มีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าและมากกว่าที่ 1 vvm แต่เมื่อพิจารณาการผลิต PHA พบว่าการให้อากาศ 1 vvm มีการผลิต PHA มากกว่าที่ 2 vvm เท่ากับ 51.30 และ 40.23 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์ ตามลำดับ

ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม และมีปริมาณคาร์บอนมากเกินไป พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ NADPH oxidase จะลดลงทำให้เกิดการสะสมของ NADPH มากขึ้น ส่งผลให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ citrate synthase และเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase ทำให้เกิดการสะสมของ Acetyl-CoA เพิ่มมากขึ้นจนถึงระดับความเข้มข้นหนึ่ง ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการยับยั้งเอนไซม์ Acetyl-CoA transferase ขึ้นด้วยกระบวนการ feedback inhibition ในทำนองเดียวกัน การสะสมของ NADPH ในปริมาณมากขึ้นหรืออีกนัยหนึ่งสัดส่วนของ NADPH/NAD มีค่าสูง ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม จะส่งเสริมให้เกิดวิถีการผลิต PHA โดยพบว่า PHA จะมีบทบาทในการเป็นตัวรับอิเล็กตรอนทางเลือก (Arunpan, 1998)



ภาพที่ 22 ผลของอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนต่อการเจริญ (a) การผลิต PHA (b) และค่าพีเอช (c) จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Figure 22 Effect of aeration rate and agitation rate on growth (a), PHA production (b) and pH (c) from the mixed culture of *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M cultivated in wastewater supplemented with 60 mM valeric acid in fermenter at 30 °C.



ภาพที่ 22 (ต่อ)

Figure 22. (Continued).

ตารางที่ 14 ผลของอัตราการให้อากาศและอัตราการกวน ต่อค่าการลดลงของแหล่งคาร์บอนและซีไอดี หลังจากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในน้ำเสียที่เติมกรดโพรพิโอนิก 60 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Table 14. Effect of aeration rate and agitation rate on carbon source and COD removal after 72 h cultivation of the mixed culture of *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I and *Achromobacter* sp. PSU-M in wastewater supplemented with 60 mM valeric acid.

Aeration rate and Agitation rate	valeric acid			COD		
	0 h (mM)	72 h (mM)	removal (%)	0 h (mM)	72 h (mM)	removal (%)
0 vvm, 100 rpm	49.57	33.11	33.2	15,590	10,970	29.6
0 vvm, 200 rpm	49.88	32.36	35.1	15,490	10,550	31.9
0.5 vvm, 100 rpm	40.06	27.52	45.0	15,600	8,550	45.2
0.5 vvm, 200 rpm	50.07	21.79	56.5	15,630	7,277	53.4
1 vvm, 100 rpm	49.83	22.42	55.0	15,550	7,215	53.6
1 vvm, 200 rpm	49.96	0.76	98.5	15,600	2,025	87.0

และจากการศึกษาเกี่ยวกับอัตราการกวนข้างต้น พบว่าให้ผลแตกต่างจากผลการศึกษาของ **ธงชัย วงศ์สุวรรณ (2550)** ที่ 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที โดยควบคุมการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm พบว่าการเพิ่มอัตราการกวนจะมีผลทำให้เพิ่มอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วจนในช่วงแรก และลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากชั่วโมงที่ 60 ทำให้การผลิต PHA สูงในช่วงแรก และลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากชั่วโมงที่ 54 ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญ ทำให้ที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที ให้ผลการเจริญและการผลิต PHA มากกว่าที่ 200 และ 300 รอบต่อนาที ซึ่งมีการผลิต PHA ใ้ภายในเซลล์ที่ชั่วโมงที่ 66 เท่ากับ 74.11, 74.22 และ 60.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 77.11, 66.29 และ 59.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งให้ผลแตกต่างจากผลการศึกษาของ **Arunpan (1998)** โดยทำการศึกษาการผลิต PHA จากเชื้อ *R. meliloti* TISTR 078 ใช้ฟรุ๊คโตสร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน ศึกษาอัตราการกวนตั้งแต่ 200, 300 และ 400 rpm และควบคุมอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.4 vvm พบว่าการใช้ความเร็วในการกวนที่ความเร็ว 300 rpm จะให้การเจริญสูงสุดหลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 45 ชั่วโมง และมีการเก็บสะสม PHA สูงสุดในช่วงระยะการเจริญคงที่หลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 48 ชั่วโมง ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า การให้อากาศและการกวนที่เหมาะสมนั้นขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และสถานะในการเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยการให้อากาศจะช่วยส่งเสริมการเจริญและผลิต PHA ส่วนการกวนจะช่วยผสมอาหารกับเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์สามารถดูดซึมอาหารและอากาศได้ดี

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง พบว่าความสามารถในการใช้กรดวเลอริกของจุลินทรีย์สอดคล้องกับการเจริญและการผลิต PHA โดยชุดการทดลองที่มีการให้อากาศที่ 0 vvm พบว่ากรดวเลอริกถูกใช้ไปน้อยที่สุด เท่ากับ 33.2 และ 35.1 เปอร์เซ็นต์ ที่การกวน 100 และ 200 รอบต่อนาที ตามลำดับ ลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ประมาณ 29.6 และ 31.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่มีการให้อากาศที่ 0.5 vmm ที่การกวน 100 และ 200 รอบต่อนาที กรดวเลอริกถูกใช้ไปประมาณ 45.0 และ 56.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ประมาณ 45.2 และ 53.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และชุดการทดลองที่มีการให้อากาศที่ 1 vvm ที่การกวน 100 และ 200 รอบ กรดวเลอริกถูกใช้ไปประมาณ 55.0 และ 98.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ประมาณ 53.6 และ 87.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **ดังแสดงในตารางที่ 14**

จากการเจริญและการผลิต PHA ของการเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M เปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ (**ตารางที่ 15**) จะเห็นว่าจุลินทรีย์สามารถผลิต PHA ใ้ภายในเซลล์ได้สูง แต่การเจริญยังเกิดขึ้นได้น้อย ทำให้ปริมาณ PHA เกิดขึ้นได้น้อยด้วยเช่นกัน ดังนั้นควรมีการปรับปรุงน้ำเสียที่ใช้ อาจจะมีการหมักน้ำ

ตารางที่ 15 การผลิต PHA โดยจุลินทรีย์

Table 15. PHA production by microorganisms.

Organisms	Substrate, conc.	Condition	Dry cell	PHA	PHA	Composition		Reference
			weight	concentration	content	of PHA (%)		
			(g/l)	(g/l)	(%)	HB	HV	
<i>Ralstonia eutropha</i> TISTR 1095	fermented palm pressed fiber water + B (6.5 g/L) + P(2.5 g/L)	1.0 vvm, 100 rpm, 30 °C	5.25	4.05	77.11	81.7	18.3	ธงชัย วงศ์สุวรรณ, 2550
<i>R. eutropha</i> TISTR 1095	seafood industrial wastewater (acidification tank)+ B(5 g/L) + P(5 g/L)	1.0 vvm, 100 rpm, 30 °C	4.48	1.34	29.9	78.0	22.0	ดวงนภา แซ่ถิ่ม, 2550
<i>R. eutropha</i> ATCC 17699	SM + G(20 g/L) + B(3 g/L) + P(3 g/L) + A(1 g/L) + L(1 g/L)	0.5 vvm, 400 rpm 30 °C	3.89	1.45	37.3	NR	NR	Yan <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> U7	GM + A(40 mM) + V(40 mM) + Y(2 g/L)	1.0 vvm, 200 rpm, 30 °C	5.10	2.70	52.9	15.2	84.8	Kemavongse <i>et al.</i> , 2008
<i>R. sphaeroides</i> N20	GM + A(3.9 g/L)	1.0 vvm, 150 rpm, 37 °C	9.18	8.76	95.4	100	-	Sangkharak and Prasertsan, 2007
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> PSU-I and <i>Achromobacter</i> sp. PSU-M	seafood industrial wastewater (acidification tank)+ V (60 mM)	1.0 vvm, 200 rpm, 30 °C	3.20	2.29	71.5	30.6	69.4	This study

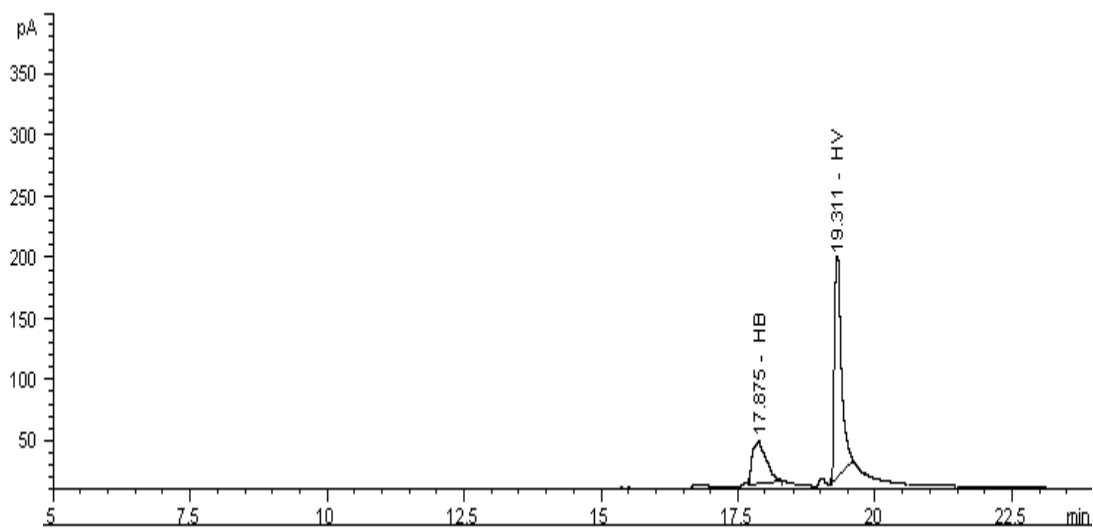
A = acetic acid, B = butyric acid, G= glucose, GM= glutamate medium, L= lactic acid, P= propionic acid, SM= synthetic medium (Yan *et al.*, 2003), Y= yeast extract

NR = not reported

เสียแบบไร้อากาศก่อนการนำมาใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อให้มีปริมาณกรดไขมันที่เพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนแหล่งของน้ำเสียที่ใช้ โดยเลือกน้ำเสียที่มีค่าซีโอดีสูง และกระบวนการบำบัดในขั้นตอนผลิตกรดมีการผลิตกรดไขมันในปริมาณที่สูง ซึ่งยังเป็นการลดต้นทุน ถ้าหากไม่มีการเพิ่มแหล่งคาร์บอนในน้ำเสีย

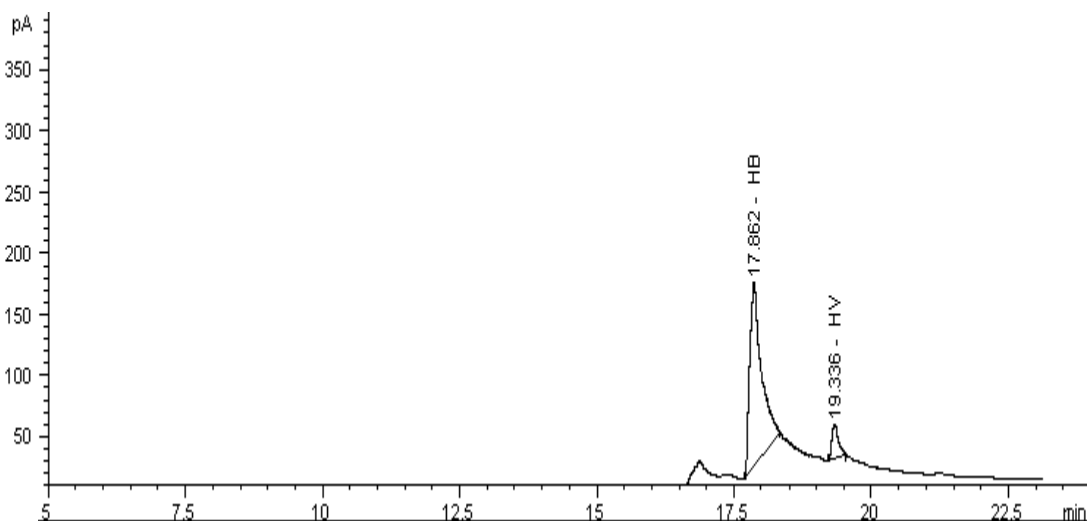
3.6 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของ PHA ด้วย Gas chromatography; GC

หลังจากการเตรียม methyl ester ของพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดเซลล์แบคทีเรีย *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ที่เลี้ยงในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริก 60 มิลลิโมลาร์ และเมื่อทดสอบด้วย GC พบว่าปรากฏโครมาโตแกรมซึ่งแสดงถึง methyl ester ของโมโนเมอร์ พีคเด่นเพียง 2 พีค ได้แก่ methyl hydroxybutyrate ที่ retention time เท่ากับ 17.87 นาที และ methyl hydroxyvalerate ซึ่งมี retention time เท่ากับ 19.31 นาที ดังแสดงในภาพที่ 23 จากผลของโครมาโตแกรมสามารถคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเป็นเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ ซึ่ง PHA ที่ได้ประกอบด้วยหน่วยย่อยของ hydroxybutyrate (HB) 30.56 โมลเปอร์เซ็นต์ และหน่วยย่อยของ hydroxyvalerate (HV) 69.44 โมลเปอร์เซ็นต์ ดังนั้น PHA ที่ผลิตได้จาก *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M ในการทดลองนี้จัดอยู่ในกลุ่มโคพอลิเมอร์ชนิด polyhydroxybutyrate-co-polyhydroxyvalerate (PHBV) โดยแหล่งคาร์บอนภายนอกเซลล์มีผลโดยตรงต่อโมโนเมอร์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ทำให้เอนไซม์ PHA synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการเชื่อมต่อหน่วยย่อยหรือโมโนเมอร์ ให้เกิดเป็นพอลิเมอร์ด้วยการเร่งการเกิดพันธะเอสเทอร์ระหว่างหน่วยย่อยที่เกิดขึ้น ถ้าแหล่งคาร์บอนดังกล่าวเป็นกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนในสาย หรือโครงสร้างเป็นเลขคี่จะมีผลให้เกิดพอลิเมอร์ชนิดโคพอลิเมอร์มากกว่าโฮโมพอลิเมอร์ (Ganzeveld *et al.*, 1999) ดังนั้นการใช้กรดวาเลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับกรดต่างๆที่มีอยู่ในน้ำเสีย เมื่อเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยเอนไซม์ PHA synthase ทำให้เกิดโคพอลิเมอร์ชนิด PHBV เกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sangkharak (2007) ที่ศึกษาการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* N20 ในน้ำเสียที่มีการเติมกรดวาเลอริก 40 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า PHA ที่จุลินทรีย์ผลิตได้มีส่วน HB และ HV เท่ากับ 30.05 และ 69.95 โมลเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้สัดส่วน HV ที่สูงจะทำให้โคพอลิเมอร์ที่ได้มีความแข็งแรงและมีความยืดหยุ่นมากขึ้นด้วย (Madden *et al.*, 2000; Khanna and Srivastava, 2005)



ภาพที่ 23 โครมาโตแกรมของ PHA ที่ผลิตจากการเลี้ยงจุลินทรีย์ผสม *Achromobacter xylooxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M

Figure 23. Chromatogram of PHA produced from the mixed culture of *Achromobacter xylooxidans* PSU-I และ *Achromobacter* sp. PSU-M cultivation.



ภาพที่ 24 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHA

Figure 24. Chromatogram of standard PHA.

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อและเทียบเคียงจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA จากกลุ่มจุลินทรีย์จากระบบ SBR

เมื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วย วิธี enrichment technique และทดสอบการติดสี sudan black B ของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHA ได้ สามารถแยกเชื้อได้ 4 ไอโซเลท คือ PSU-I, PSU-M, PSU-V และ PSU-X เมื่อนำมาเทียบเคียงด้วยเทคนิค 16S rDNA พบว่าสายพันธุ์ PSU-I เทียบเคียงได้เป็น *Achromobacter xylosoxidans* (99%), PSU-M เทียบเคียงได้เป็น *Achromobacters* sp. (100%) ส่วน PSU-V และ PSU-X เทียบเคียงได้เป็น *Acinetobacter baumannii* (99%)

4.2 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์

จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ ทั้ง 4 ไอโซเลท คือ *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I, *Achromobacter* spp. PSU-M, *Acinetobacter baumannii* PSU-V และ *Acinetobacter baumannii* PSU-X พบว่า *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* spp. PSU-M มีการเจริญและผลิต PHA มากที่สุด ทั้งนี้ได้ศึกษาการผสมเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ และเชื้อ 2 สายพันธุ์ ที่ให้การผลิต PHA มากที่สุด มาเลี้ยงเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ข้างต้น พบว่าการผสมเชื้อระหว่าง *Achromobacter xylosoxidans* (PSU-I) และ *Achromobacters* sp. (PSU-M) มีการผลิต PHA มากที่สุด

4.3 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิต PHA จากน้ำเสียโดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์

การเติมเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ การเติมเชื้อที่ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงในน้ำเสียที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือการเติมกรดวาลริก 60 มิลลิโมลาร์ ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ ในขณะที่สภาวะสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม คือ ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้อากาศในอัตรา 1.0 vvm ร่วมกับการกวนที่ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อผสมระหว่าง *Achromobacter xylosoxidans* PSU-I และ *Achromobacter* spp. PSU-M สามารถเจริญและผลิต PHA ได้สูงสุดเท่ากับ 3.20 และ 2.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็น 71.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเซลล์ และจากการให้อากาศในอัตรา 1.0 vvm ร่วมกับการกวนที่ 200 รอบต่อนาทีนี้ พบว่าสามารถเพิ่มการผลิต PHA จากการใช้น้ำเสียอย่างเดียวได้ประมาณ 32.71 เท่า

4.4 องค์ประกอบของพอลิเมอร์

PHA ที่ผลิตได้เป็นโคพอลิเมอร์ของพอลิไฮดรอกซีบีวาทิเรตกับพอลิไฮดรอกซีวาริเรต มีสัดส่วนหน่วยย่อยของ HB และ HV เท่ากับ 30.56 และ 69.44 โมลเปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพในการผลิตโคพอลิเมอร์ของเชื้อ ควรมีการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม
2. การพัฒนาการหมักเพื่อผลิตโคพอลิเมอร์ นอกจากจะเลี้ยงเชื้อแบบกะหรือกึ่งกะ สามารถทำแบบกะสองขั้นตอน, แบบกึ่งต่อเนื่อง, แบบต่อเนื่องขั้นตอนเดียว และแบบต่อเนื่องสองขั้นตอน
3. ควรปรับปรุงน้ำเสียที่ใช้ในการหมัก อาจจะมีการหมักน้ำเสียแบบไร้อากาศก่อนการนำมาใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อให้มีปริมาณกรดไขมันที่เพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์ หรือเปลี่ยนแหล่งของน้ำเสียที่ใช้ โดยเลือกน้ำเสียที่มีค่าซีโอดีสูง และกระบวนการบำบัดในขั้นตอนผลิตกรดมีการผลิตกรดไขมันในปริมาณที่สูง ซึ่งยังเป็นการลดต้นทุน ถ้าหากไม่มีการเพิ่มแหล่งคาร์บอนในน้ำเสีย

เอกสารอ้างอิง

- คมกฤษ ดลอารมย์. 2542. การสกัดพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์และคลอโรฟอร์ม. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ดวงนภา แซ่ลิ่ม. 2550. การผลิตและการย่อยสลายพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตจากน้ำเสียโดยใช้ *Ralstonia eutropha* TISTR 1095 วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ธงชัย วงศ์สุวรรณ. 2550. การผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตโดยใช้กรดคาร์บอกซิลิกที่ได้จากการหมักเส้นใยปาล์ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ปีวรา บุตรวงศ์. 2546. การสังเคราะห์ PHA จากกระบวนการแอนแอโรบิกแเอโรบิกแอคทีเวเต็ด สลัดจ์ที่ใช้บำบัดน้ำเสียต่างชนิด. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- โสภา ชินเวชกิจวานิชย์. 2547. อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตพีเอชเอเชื่อมโดยน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Alias, Z. and Tan I.K.P. 2005. Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA) producing bacteria by an enrichment technique. *Bioresource Technol.* 96 : 1229-1234.
- APHA, AWWA and WPCF. 2001. Standard Method of the Examination of the Water and Wastewater 20th ed. American Public Health Association, Wastington, DC.
- Argelier S, Delgenes J.H. and Moletta R. 1998. Design of acidogenic reactors for the anaerobic treatment of the organic fraction of solid food waste. *Bioprocess Eng.* 18 : 309-315.
- Arunpan, N. 1998. Production of Poly-β-hydroxyalkanoate from Microorganism. Master of Science Thesis in Biotechnology. Prince of Songkla University.
- Bhubalan, K., Lee, W., Loo, C., Yamamoto, T., Tsuge, T., Doi, Y. and Sudesh, K. 2008. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. *Pol. Degrad. Stab.* 93 : 17-23.
- Boom, S. K., Seung, C. L., Sang, Y. L., Ho, N. C., Yong, K. C. and Seong, I. W. 1994. Production of poly (3-hydroxybutyric acid) by fed batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnol. Bioeng.* 43(9): 892-898

- Borsodi, A.K., Micsinai, A., Kovács, G., Tóth, E., Schumann, P., Kovács, A.L., Böddi, B. and Márialigeti, K. 2003. *Pannonibacter phragmitetus* gen. nov., sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium isolated from decomposing reed rhizomes in a Hungarian soda lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 : 555-561.
- Bouvet, P.J.M. and Grimont, P.A.D. 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Inter J. Syst Bacterio.* 36(2) : 228-240.
- Burdon, K.L. 1946. Fatty materials in bacteria and fungi revealed by staining dried fixed slide preparations. *J. Bacterio.* 52 : 665–668.
- Chua, A.S.M., Takabatake, H., Satoh, H. and Mino, T. 2003. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Res.* 37 : 3602-3611.
- Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A. Keller, J., Jenkins, D. and Blackall, L.L. 2000. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed Probes for their detection and quantitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 1175-1182.
- Crocetti, G.R., Banfield, J.F., Keller, J., Bond, P.L., and Blackall, L.L. 2002. Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiol.* 148 : 3353-3364.
- Dai, Y., Yuan, Z., Wang, X., Oehmen, A. and Keller, J. 2007. Anaerobic metabolism of *Defluviicoccus vanus* related glycogen accumulating organisms (GAOs) with acetate and propionate as carbon sources. *Water res.* 41(9) : 1885-1896.
- Dionisi, D., Carucci, G., Petrangeli Papini, M., Riccardi, C., Majone, M. and Carrasc, F. 2005. Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water Res.* 39 : 2076–2084.
- Doi, Y. 1990. *Microbial polyester*. VCH, New York. 156 pp.

- Du, G., Si, Y. and Yu, J. 2001. Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acids on synthesis of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Ralstonia eutropha*. *Biotechnol. Lett.* 23: 1613–1617.
- Eschenlauer, A. C., Stoup, S. K. Srieence, F. and Somers, D. A. 1996. Production of heteropolymeric polyhydroxyalkanoate in *Escherichia coli* from a single carbon source. *Int. J. Biol Macromol.* 19 (2) : 121-130.
- Ganzeveld, K. J., Hagen, A. V., Agteren, M. H. V., Koning, W. D. and Uiterkamp, A. J. M. S. 1999. Upgrading of organic waste: production of copolymer poly-3-hydroxybutyrate-co-valerate by *Ralstonia eutrophus* with organic waste as sole carbon source. *J. Clean. Prod.* 7 (6): 413-419.
- Grothe, E. and Chisti, Y. 2000. Poly (β -hydroxybutyric acid) thermoplastic production by *Alcaligenes latus* : Behavior of fed-batch cultures. *Bioprocess. Eng.* 22: 441-449.
- Hocking, P.J. and Marchessault R.H. 1994. Biopolyesters. *In Chemistry and Technology of biodegradable polymers.* (Griffin, G. J. L. ed.). p. 48–95. Chapman and Hall, London.
- Jogdand, S.N. 2004. Welcome to the Eco-Friendly Plastic (online). Available : <http://www.biotechsupportindae.com/jogsn/.html> (2004, March).
- Jorgensen, K.S. and Pauli, A.S.L. 1995. Polyphosphate accumulation among denitrifying bacteria in activated sludge. *Anaerobe Environ. Microb.* 1 : 161-168.
- Jung, Y.M., Park, J. S. and Lee, Y. H. 2000. Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned phbCAB genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Enzyme. Microb. Technol.* 26 (2): 201-208.
- Kango, S. and Patel, B. K. C. 2003. *Microvirgo subterranean* gen. nov., sp. Nov., a moderate thermophile from a deep subsurface australian thermal aquifer. *Int. J. Syst Bacteriol.* 53 : 401-406.
- Kasemsap, C. and Wantawin, C. 2007. Batch production of polyhydroxyalkanoate by low polyphosphate content activated sludge at varying pH. *Bioresource. Technol.* 98 : 1020-1027.
- Kemavongse, K., Prasertsan, P. Upaichit, A. and Methacanon, P. 2007. Effect of co-substrate on production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and copolymer PHBV from newly

- identified mutant *Rhodobacter sphaeroides* U7 cultivated under aerobic-dark condition. Songklanakarin J. Sci. Technol. 29(4) : 1101-1113.
- Kemavongse, K., Prasertsan, P. Upaichit, A. and Methacanon, P. 2008. Poly- β -hydroxyalkanoate production by halotolerant *Rhodobacter sphaeroides* U7. World J Microbiol Biotechnol. 24 : 2073–2085.
- Khanna, S. and Srivastava, A.K. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Process Biochem. 40(2) : 607-619.
- Kim, J.S, Lee, B.H. and Kim, B.S. 2005. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*. Biochem. Eng. J. 23 : 169–174.
- Kumar, M.S., Mudliar, S.N., Reddy, K.M.K. and Chakrabarti, T. 2004. Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant. Bioresource Technol. 95 : 327-330.
- Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G. And Witholt, B. 1988. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of substrates on formation and composition of poly-(R)- 3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. Appl. Environ. Microbiol. 54 : 2924–32.
- Lee, S.Y. 1996. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Biotechnol. Bioeng. 49 : 1–14.
- Lemos, P.C., Serafim, L.S. and Reis, M.A.M. 2006, Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. J. Biotechnol. 122 : 226-238.
- Luengo, J.M., Garcia, B., Sandoval, A., Noharro, G. and Olivera, E.R. 2003. Bioplastics from microorganisms. Curr. Opin Microbiol. 6 : 256-260.
- Luli, G. W. and Strohl, W. R. 1990. Comparison of Growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. Appl Environ Microbiol. 56 (4):1004-1011.
- Madden, L.A., Andersona, A.J., Asrar, J., Berger, P. and Garrett, P. 2000. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures. Polymer. 41: 3499–3505.

- Marangoni, C. Furigo, A. Jr., and Aragão, G.M.F. 2002. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. *Process Biochem.* 38 : 137-141.
- Nation Center for Biotechnology Information. 2008. Gene Bank (online). Available : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (2008, July).
- Pozo, C., Martinez-Toledo, M. V., Rodelas, B. and Gonzalez-Lopez, J. 2002. Effect of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechin (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. *J. Biotechnol.* 97: 125-131.
- Punrattanasin, W. 2001. The utilization of activated sludge polyhydroxyalkanoates for the production of biodegradable plastics. Ph.D. Dissertation. Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Punrattanasin, W. and Randall, C.W. 1999. Factors affecting the production and storage of polyhydroxyalkanoates in activated sludge biomass. Msc. Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Redzwan, G., Gan, S.N. and Tan, I.K.P. 1997. Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from an integrated-farming pond and palm-oil mill effluent ponds. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13 : 707-709.
- Renner, G., Haage, G. and Braunegg, G. 1996. Production of short-side-chain polyhydroxyalkanoates by various bacteria from the rRNA superfamily III. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46 : 268-272.
- Salehizadeh, H. and Van Loosdrecht, M.C.M. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* 24 : 261-279.
- Sangkharak, K. 2007. Production and application of Polyhydroxybutyrate (PHB) from Mutant Strain of *Rhodobacter sphaeroides* ES 16. Ph.D. Dissertation. Prince of Songkla University.
- Sangkharak, K. and Prasertsan, P. 2007. Optimization of polyhydroxybutyrate production from a wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. *J. Biotechnol.* 132 : 331-340.

- Satoh, H., Iwamoto, Y., Mino, T. and Matsuo, T. 1998. Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. *Water Sci. Technol.* 38(2) : 103-109.
- Shimisu, H., Shioya, S. and Suga, K. I. 1990. Cultivation condition for production of biodegradable poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) production in *Alcaligenes eutrophus* H16 and *Myoplasma rubra* R14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium limited batch cultures. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 7: 1-10.
- Sudesh, H., Abe, H. and Doi, Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates : biological polyesters. *Prog. in Polym. Sci.* 25 : 1503–1555.
- Thanakoses, P., Black, A.S. and Holtzapfle, M.T. 2003. Fermentation of corn stover to carboxylic acids. *Biotechnol. Bioeng.* 83(2) : 191-200.
- Tian, Q.W., Suqin S., Isao, N. and Guo, Q. C. 2002. Two-dimensional fourier transform infrared spectroscopy study of biosynthesized poly(hydroxybutyrate-cohydroxyhexanoate) and poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate). *J. Pol. Sci. Polym. Phys.* 40 : 649–656.
- Wikipedia. 2008. Polyphosphate-accumulating organisms. Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Polyphosphate-accumulating_organisms (2008, December).
- Wikipedia. 2008. Sudan Black B. Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Sudan_Black_B (2008, October).
- Yabuuchi, E. and Yano, I. 1981. *Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) norn. rev. *Inter J. Syst Bacterio.* 31(4) : 477-478.
- Yamane, T., Chen, X. and Ueda, S. 1996. Growth associated production of poly(3-hydroxyvalerate) from *n*-pentanol by a methylotrophic bacterium, *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 380-384.
- Yan, Q., Du, G. and Chen, J. 2003. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with continuous feeding of mixed organic acids as carbon sources by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochem.* 39 : 387- 391.
- Yu, J. 2001. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *J. Biotechnol.* 86 : 105-112.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสีย

1. การวิเคราะห์หาอินทรีย์สารในโตรเจน

วิธีวิเคราะห์ (ดัดแปลงจาก APHA, AWWA and WPCF, 2001)

ขั้นตอนการย่อย

1. ตัวอย่างปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 800 มิลลิลิตร
2. ใส่สารผสม CuSO_4 และ K_2SO_4 ปริมาณ 5 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริก 20 มิลลิลิตร
4. วางหลอดย่อยแล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบ ขวดใส่ต่างและเครื่องดักจับไอกรดให้เรียบร้อย
5. เปิดสวิทช์เครื่องดักจับไอกรดและเตาย่อย แล้วตั้งอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ที่ 30 นาที จากนั้นปรับอุณหภูมิเป็น 380 องศาเซลเซียส ย่อยต่ออีก 60 นาที จนได้สารละลายใส
6. ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น
7. นำมาถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และใช้น้ำกลั่นล้างหลอดย่อยให้หมดสารละลายตัวอย่าง และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรเก็บไว้กลั่นต่อไป

ขั้นตอนการกลั่นและไตเตรต

1. จัดอุปกรณ์กลั่น แล้วเปิดสวิทช์ให้ความร้อนและเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่นด้วย
2. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก (เข้มข้นร้อยละ 4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ซึ่งเติมอินดิเคเตอร์เรียบร้อยแล้วไปรับรองของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจมในสารละลายกรดนี้
3. ดูดตัวอย่างด้วยปิเปตแบบกระเปาะความจุ 10 มิลลิลิตร ใส่ในช่องตัวอย่าง และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป 20 มิลลิลิตร
4. กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างปลายอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นในขวดรองรับ
5. ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดกำมะถันที่มีความเข้มข้น 0.2 N จนสีของสารละลายเป็นสีม่วง
6. กำหนดหาปริมาณอินทรีย์สารในโตรเจนจากสูตร

$$\text{organicN}(\text{mg/l}) = \frac{(D - E) \times 280}{\text{sample}(\text{ml})}$$

เมื่อ D คือ มิลลิลิตรของกรดกำมะถันที่ใช้ในการไตเตรต

E คือ มิลลิลิตรของกรดกำมะถันที่ใช้ในการไตเตรตแบบลิ้งค์

2. การวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในน้ำ : Ascorbic Acid Method (APHA, AWWA and WPCF, 2001)

สารเคมี

1. สารละลายกรดกำมะถัน 5 นอร์มัล

เตรียมโดยเติมกรดกำมะถันเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 70 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

2. สารละลายแอนติโมนีโพแทสเซียมทาทเรท

เตรียมโดยละลายแอนติโมนีโพแทสเซียมทาทเรท ($\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) 1.3715 กรัม ในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้ว

3. สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท

เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 20 กรัม ในน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดพลาสติกที่ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลายกรดแอสคอร์บิก 0.1 โมลาร์

เตรียมโดยละลายกรดแอสคอร์บิก 1.76 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ซึ่งสารจะอยู่ตัว 1 อาทิตย์ ถ้าเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

5. น้ำยารวม (Combined reagent) 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

- 50 มิลลิลิตร 5 นอร์มอล กรดกำมะถัน
- 5 มิลลิลิตร สารละลายแอนติโมนีโพแทสเซียมทาทเรท
- 15 มิลลิลิตร สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท
- 30 มิลลิลิตร สารละลายกรดแอสคอร์บิก

น้ำยาเคมีเหล่านี้ผสมกันที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีความขุ่นเกิดขึ้นหลังจากการเติมแอนติโมนีโพแทสเซียมทาทเรท หรือแอมโมเนียมโมลิบเดท ให้เขย่าแล้วทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที น้ำยารวมจะอยู่ตัว 4 ชั่วโมง

6. สารละลายสต็อกฟอสเฟต

เตรียมโดยนำโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต KH_2PO_4 anhydrous 219.5 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตรของสารละลายเท่ากับ 50 ไมโครกรัม $\text{PO}_4\text{-P}$

7. สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต

เตรียมโดยนำสารละลายสต็อกฟอสเฟต 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ 1000 มิลลิลิตร ซึ่ง 1 มิลลิลิตรของสารละลายเท่ากับ 2.5 ไมโครกรัม $PO_4\text{-P}$

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของฟอสเฟตเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 และ 1.2 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัสต่อลิตร โดยเปิดสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต 2, 6, 10, 16 และ 24 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดที่กำหนด เขย่าให้เข้ากันแล้วเทสารละลายใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมนิฮอล์ฟทาไลน์อินดิเคเตอร์ 1 หยด ถ้าเกิดสีแดงให้หยด 5 นอร์มอล H_2SO_4 ลงไปจนกระทั่งสีแดงหายไป เติมน้ำยารวม (Combine reagent) 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10-30 นาที เพื่อให้เกิดสี นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟอสเฟตและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 50 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของฟอสเฟต

การคำนวณ

$$P(\text{mg/l}) = \frac{\text{mgP} \times 1000}{\text{sample}(\text{ml})}$$

ถ้าต้องการผลในรูปฟอสเฟตให้ใช้สูตร

$$PO_4(\text{mg/l}) = P(\text{mg/l}) \times 3.06$$

3. การวิเคราะห์ค่า COD (COD Cell Test, MERCK)

วิธีเตรียมตัวอย่าง

1. เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศ
2. ตกตะกอนโดยการปรับ pH เป็น 12.0 ด้วย NaOH แล้วกรองตะกอนออก
3. ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย สารละลาย HCl
4. เก็บในถังพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. ทำการเจือจางตัวอย่างเพื่อให้ค่า COD อยู่ในช่วง 500-10000 มิลลิกรัมต่อลิตร

6. ปิเปตน้ำเสียตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดวัดค่า COD (COD Cell Test, MERCK)
เขย่าให้สารเคมีกับน้ำเสียตัวอย่างผสมกัน

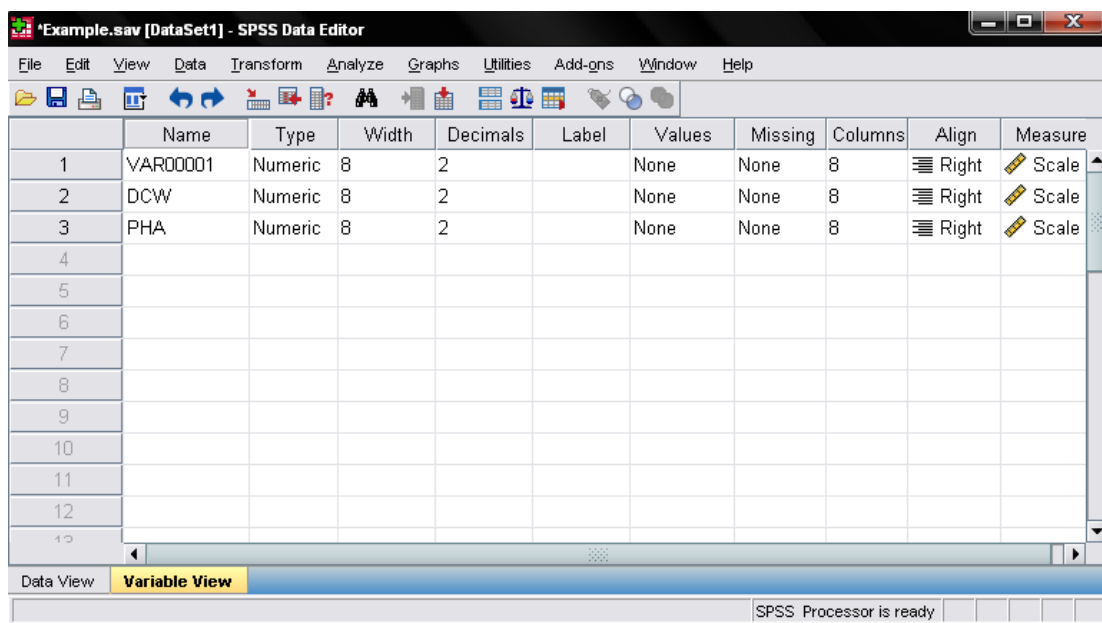
วิธีวัดค่า COD

1. ใส่หลอดวัดค่า COD ในเครื่อง Termoreator ที่อุณหภูมิ 148 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที
2. ทิ้งไว้ให้เย็นโดยไม่ให้โดนแสง
3. นำหลอดไปวัดค่า COD ด้วยเครื่องวัดค่า COD (MERCK) อ่านค่าที่ได้แล้วนำไปคำนวณหาค่า COD

4. การสกัดและตกตะกอน PHA (คมกฤษ ดลอารมย์, 2542)

1. นำเซลล์ 5 กรัมละลายน้ำ 100 มิลลิลิตร ดึงตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วที่มีฝาเกลียวปิดขนาด 10 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
2. เก็บส่วนของเซลล์ไว้แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือ คลอโรกซ์ 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส เติมน้ำกลั่นลงไป 4 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที
3. เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างด้วยอะซิโตน 5 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิมนำส่วนของตะกอนมาล้างด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ 99.8% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม
4. เก็บส่วนของตะกอนไว้ เติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 30 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นเก็บส่วนใสไว้
5. นำส่วนที่เป็นตะกอนข้างต้นไปสกัด PHA อีกครั้ง
6. รวมส่วนใสที่ได้แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยมีหลอดที่มีขีดบอกปริมาตร 10 มิลลิลิตรรองรับ เติมคลอโรฟอร์มลงในหลอดแก้วจนปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร ซึ่ง PHA จะละลายอยู่ในคลอโรฟอร์ม
7. นำสารละลายดังกล่าวมาตกตะกอนด้วยเฮกเซน แล้วกรองจะได้ตะกอน PHA จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่ 80 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข
ภาพตัวอย่างการวิเคราะห์ทางสถิติ

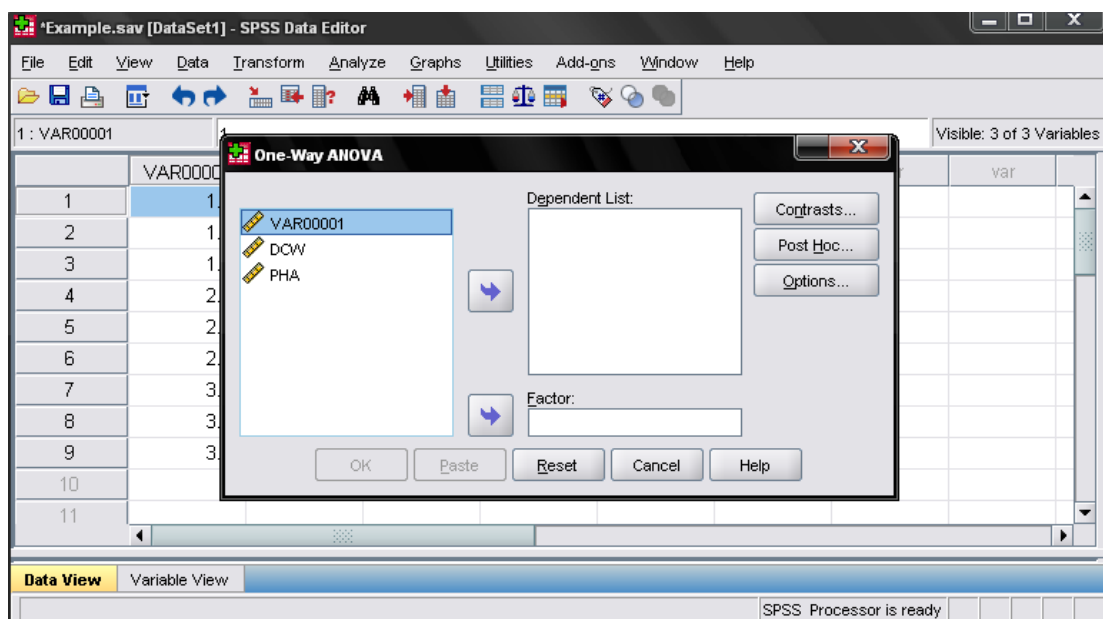
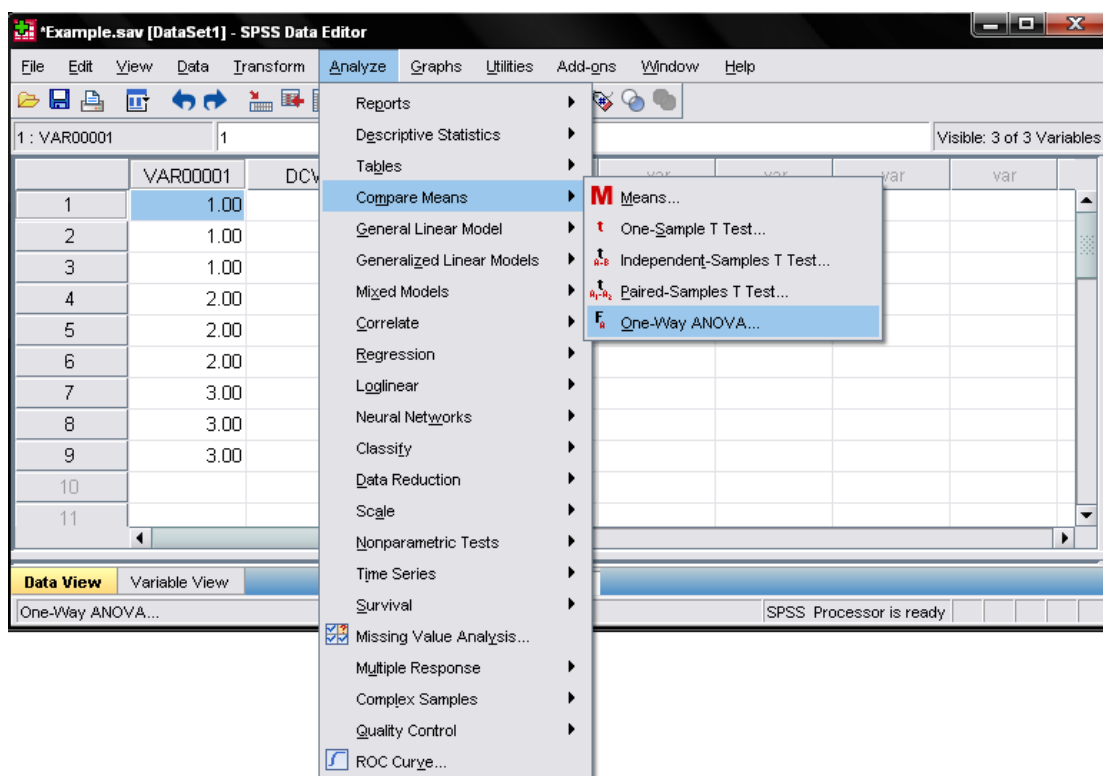


The screenshot shows the SPSS Data Editor window in Data View. The table below represents the data for the first three variables:

	VAR00001	DCW	PHA	var	var	var	var	var
1	1.00	1.46	0.43					
2	1.00	1.54	0.48					
3	1.00	1.53	0.52					
4	2.00	1.57	0.51					
5	2.00	1.54	0.51					
6	2.00	1.57	0.53					
7	3.00	1.53	0.46					
8	3.00	1.53	0.45					
9	3.00	1.60	0.49					
10								
11								

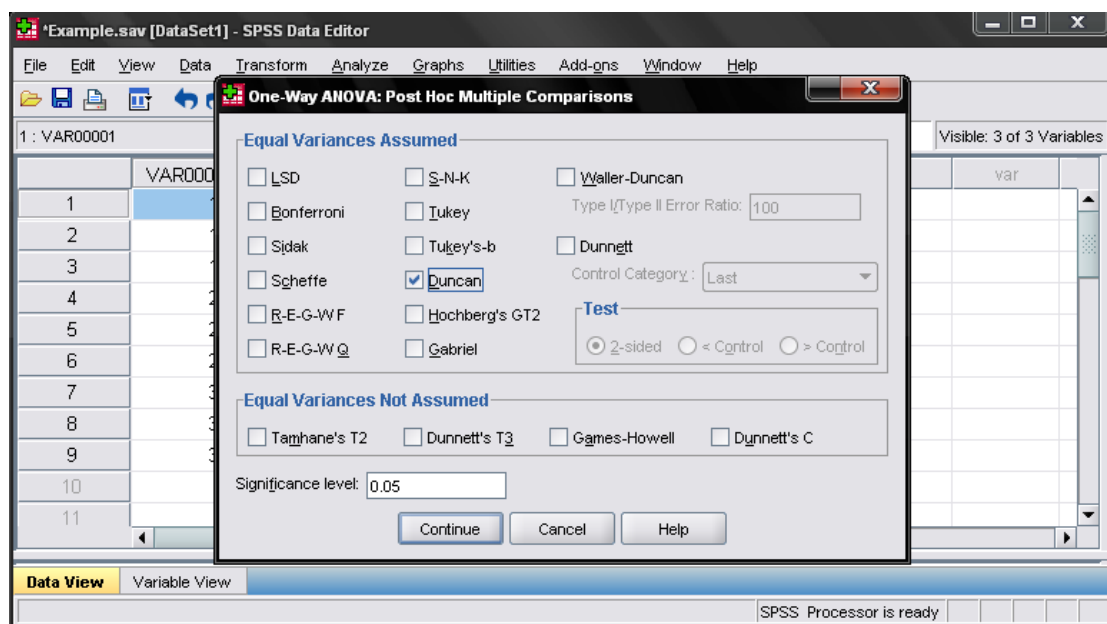
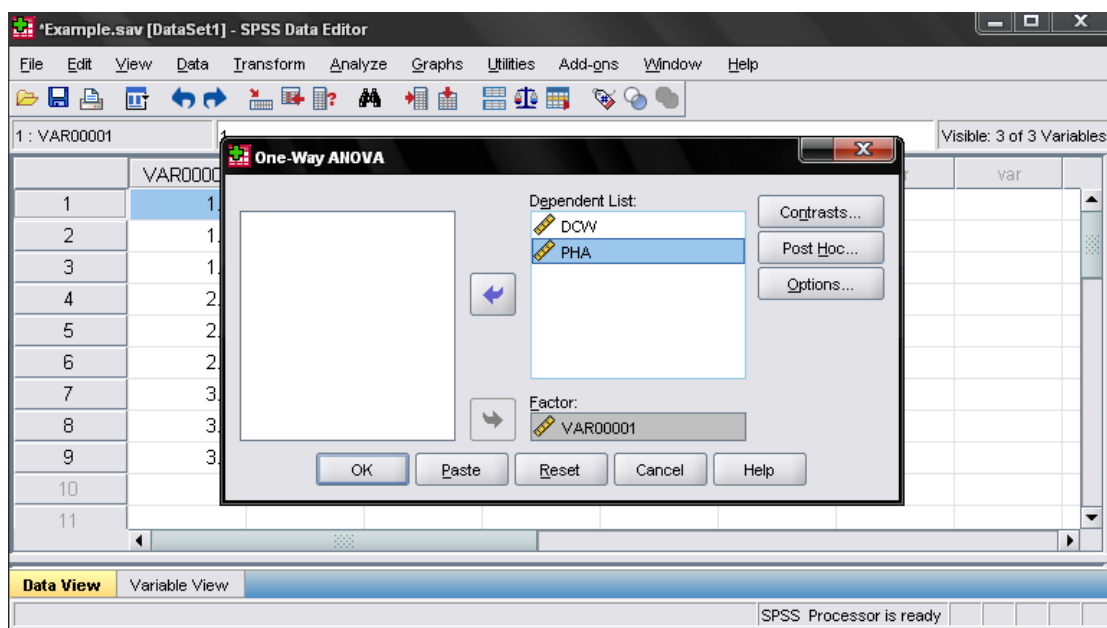
ภาพที่ 25 ตัวอย่างการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS 16.0

Figure 25. Sample of statistic analysis by SPSS 16.0.



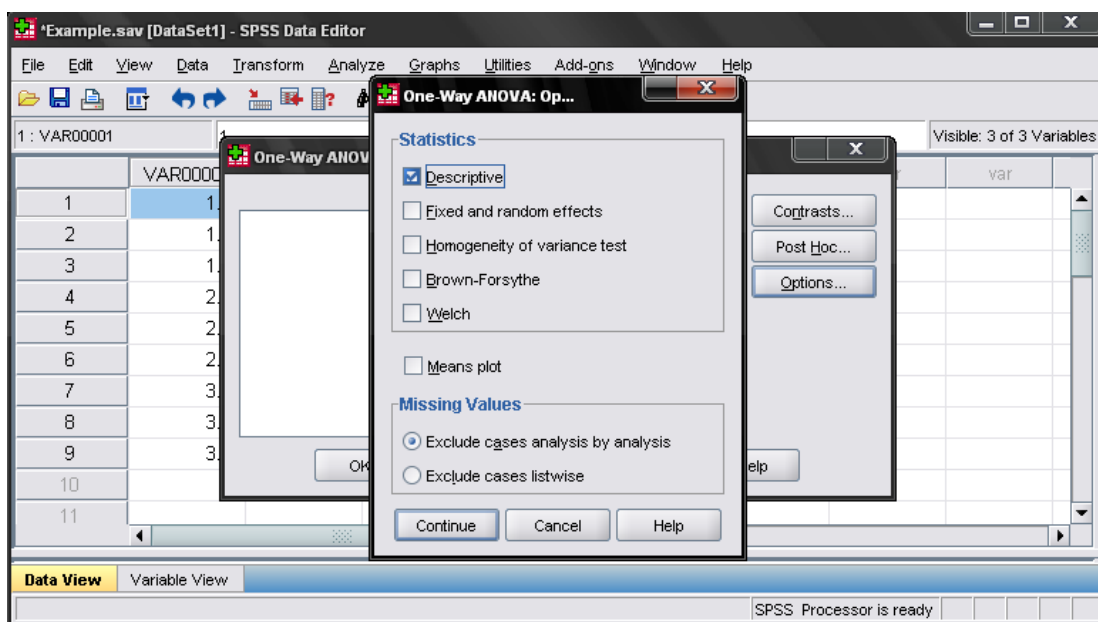
ภาพที่ 25 (ต่อ)

Figure 25. (Continued).



ภาพที่ 25 (ต่อ)

Figure 25. (Continued).



➔ **Oneway**

[DataSet1] C:\Documents and Settings\Yaneedar Raden-Ahmad\Desktop\Example.sav

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
DCW 1	3	1.5100	.04359	.02517	1.4017	1.6183	1.46	1.54
2	3	1.5600	.01732	.01000	1.5170	1.6030	1.54	1.57
3	3	1.5533	.04041	.02333	1.4529	1.6537	1.53	1.60
Total	9	1.5411	.03887	.01296	1.5112	1.5710	1.46	1.60
PHA 1	3	.4767	.04509	.02603	.3647	.5887	.43	.52
2	3	.5167	.01155	.00667	.4880	.5454	.51	.53
3	3	.4667	.02082	.01202	.4150	.5184	.45	.49
Total	9	.4867	.03428	.01143	.4603	.5130	.43	.53

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DCW	Between Groups	.004	2	.002	1.730	.255
	Within Groups	.008	6	.001		
	Total	.012	8			
PHA	Between Groups	.004	2	.002	2.423	.169
	Within Groups	.005	6	.001		
	Total	.009	8			

ภาพที่ 25 (ต่อ)

Figure 25. (Continued).

Post Hoc

Homogeneous

DCW

Duncan

VAR0001	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	3	1.5100
3	3	1.5533
2	3	1.5600
Sig.		.149

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

PHA

Duncan

VAR0001	N	Subset for alpha = 0.05
		1
3	3	.4667
1	3	.4767
2	3	.5167
Sig.		.091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

ภาพที่ 25 (ต่อ)

Figure 25. (Continued).

