



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

กระบวนการต้นน้ำถึงปลายน้ำเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม
จากวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ผกาบดี แก้วกันเนตร

พฤษภาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

กระบวนการต้นน้ำถึงปลายน้ำเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม
จากวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร. ผกาดี แก้วกันเนตร
2. ผศ.ดร. ศรัญญา พรหมโคตร
3. ผศ. สามารถ มุลอมาตย์
4. นายวรารุณ ณะมูล
5. นางสาววรัญญา สุวรรณสิงห์
4. Prof. Dr. Tsuyoshi Imai

สังกัด

มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Yamaguchi University

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษากระบวนการต้นน้ำถึงปลายน้ำเพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHAs) จากวัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก 2 ชนิดได้แก่ น้ำคั้นข้าวฟ่างหวานและน้ำอ้อยคั้น โดยใช้แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Alcaligenes latus* TISTR 1403, *A. eutrophus* TISTR 1095 และ *Hydrogenophaga* sp และจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดิน 3 ชนิดรหัส S4 S6 และ S11 ตามลำดับ พบว่าจุลินทรีย์รหัส S4 สามารถเจริญและผลิต PHAs ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งจากการบ่งชี้โดยเทคนิคทางพันธุกรรม 16s rDNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus aryabhattai* (99.7%) ดังนั้นจึงได้เลือก *B. aryabhattai* เพื่อใช้ผลิต PHAs ในกรณีของการหมักน้ำคั้นข้าวฟ่างหวาน จากการศึกษาองค์ประกอบหลักในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานและน้ำอ้อย พบว่าน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด โดยมีน้ำตาลรวมทั้งหมดเท่ากับ 207.43 และ 105.5 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาการหมักน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานแบบกะและแบบกึ่งกะ โดยใช้ *B. aryabhattai* พบว่าในฟลาสก์เขย่าสามารถผลิตเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 6.22 และ 2.43 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการหมัก 66 ชั่วโมง คิดเป็นผลได้มวลเซลล์ ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.17 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลรวมที่ถูกใช้ คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.066 กรัม PHAs ต่อกรัมน้ำตาลรวมที่ถูกใช้ จุลินทรีย์สามารถสะสม PHAs เท่ากับ 39.07% โดยน้ำหนัก และคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 0.037 กรัมต่อลิตรชั่วโมง สำหรับการหมักแบบกะในถังหมักพบว่าที่เวลาหมัก 72 ชั่วโมงได้ปริมาณเซลล์แห้งจุลินทรีย์และปริมาณ PHAs สูงสุดเท่ากับ 10.38 และ 4.36 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้มวลเซลล์และผลได้ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.19 และ 0.081 จุลินทรีย์สามารถสะสม PHAs เท่ากับ 42% โดยน้ำหนัก และคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 0.061 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ในขณะที่การหมักแบบกึ่งกะภายในถังหมัก พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์แห้งของจุลินทรีย์และปริมาณ PHAs ได้สูงสุดเท่ากับ 14.20 และ 4.84 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 0.073 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ภายหลังการหมักนาน 66 ชั่วโมง ในกรณีการหมักน้ำอ้อยคั้นแบบกะในฟลาสก์โดยใช้แบคทีเรีย *A. eutrophus* พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้เซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณ PHAs สูงสุดเท่ากับ 6.0129 และ 1.8377 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาในการหมักทั้งสิ้น 60 ชั่วโมง คิดเป็นผลได้มวลเซลล์ เท่ากับ 0.1634 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลรวมที่ถูกใช้ คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.0499 กรัม PHAs ต่อกรัมน้ำตาลรวมที่ถูกใช้ คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ ($Y_{p/x}$) เท่ากับ 0.3056 กรัม PHAs ต่อกรัมเซลล์แห้ง และคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 0.0306 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และในกรณีการหมักแบบกะภายในถังหมัก พบว่าที่เวลาหมัก 60 ชั่วโมงได้ปริมาณเซลล์แห้งจุลินทรีย์และปริมาณ PHAs สูงสุดเท่ากับ 5.8806 และ 1.2812 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้มวลเซลล์เท่ากับ 0.1897 คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 0.0413 คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ เท่ากับ 0.2180 และคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 0.0213 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าศักยภาพของการใช้น้ำคั้นข้าวฟ่างหวานและน้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบตั้งต้นเพื่อผลิตเป็นสารผลิตภัณฑ์ PHAs ที่มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น

ABSTRACT

This research project is to study upstream to downstream processes for production of biopolymers of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from two sugar based agricultural raw materials as sweet sorghum juice (SSJ) and sugarcane juice by three bacterial strains of *Alcaligenes latus* TISTR 1403, *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 and *Hydrogenophaga* sp. and including 3 strains coded as S4, S6 and S11 that were isolated from soil environment. It was found that the Isolate S4, identified by 16s rDNA morphology and found as *Bacillus aryabhattai* (99.7 % similarly), can be grown better than other strains. Thus, it was chosen to further study for production of PHAs from sweet sorghum juice. Then, composition of the both juices were characterised and found that the juice contained of total sugar concentrations at 207.43 gL^{-1} for the SSJ and at 105.5 gL^{-1} for the sugarcane juice. Batch fermentation of the SSJ were performed in both flask and fermentor. The results from flask scale revealed that maximum biomass, biomass yields ($Y_{x/s}$), PHAs yield ($Y_{p/s}$) and productivity of 6.22 gL^{-1} , 0.17 gg^{-1} , 2.43 gL^{-1} , 0.066 gg^{-1} and $0.037 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectively, were obtained after 66 h fermentation while in case of fermentor, a maximum dry biomass of 10.38 gL^{-1} biomass yields ($Y_{x/s}$) and PHAs content at 4.36 gL^{-1} were obtained after 72 hr fermentation. The results were equivalent to biomass ($Y_{x/s}$), PHAs yield ($Y_{p/s}$) and productivity at 0.19 gg^{-1} , 0.081 gg^{-1} and $0.061 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectively. When fed-batch fermentation was further considered, it was found that the cell density, PHAs concentration and the productivity could improve and showed maximum values at 14.20 gL^{-1} , 4.84 gL^{-1} and $0.073 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectively after 66 h fed batch cultivation. In case of batch fermentation of sugar cane juice in shake flask by pure bacterial strains of *A. latus* TISTR 1403 and *A. eutrophus* TISTR 1095, it was found that the *A. eutrophus* could grow better than the *A. latus*. Thus, only the *A. eutrophus* was further cultivated via batch fermentation in both shask flask and fermentor. For flask scale, the dry cell mass (DCM) and maximum PHAs were obtained at 6.013 gL^{-1} and 1.84 gL^{-1} after 60 hr fermentation that were converted to biomass yield ($Y_{x/s}$) and product yield ($Y_{p/s}$) of 0.163 and $0.050 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ while, specific product yield ($Y_{p/x}$) and productivity were reached at 0.306 and $0.031 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. In case of fermentor, the DCM and the maximum PHAs were obtained at 5.881 gL^{-1} and 1.281 gL^{-1} that were calculated to values of $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, $Y_{p/x}$ and productivity at about 0.190 , 0.041 , 0.218 and $0.0213 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectively. The results obtained clearly demonstrated the great potential use of the SSJ and the sugarcane juice as raw materials for production of added value product of PHAs.

Executive Summary

Bioplastic of polyhydroxyalkanoates (PHAs), thermoplastic polyester, can be synthesized by various microbes but mostly by bacteria under nutrient limitation as energy storage and accumulated as inclusions in cytoplasm of these bacteria. Bioplastics could lower the contribution of plastic wastes to municipal landfills, about 20% of the total waste by volume and 10% by weight, by substituting for conventional plastic in a wide range of applications. However, the most important problem preventing the commercial application of PHAs is their price. PHAs cost 10 times more when compared to synthetic plastic. Much attention has been devoted to reduce the price for PHAs production by the development of improving bacteria strains as recombinant strain, enhancing production via optimization of fermentation process, more economical recovery process, and most importantly, the use of cheap carbon sources. The carbon source contributes most significantly to the overall cost in PHAs production. A number of carbon sources, including carbohydrates and sugar based materials such as corn, potato, cassava, sugar cane, sweet sorghum, acids and crude carbon substrates (food waste or by products etc.), can be used by various bacteria, have attracted much attention by many researchers around the World. Since, Thailand is an agro-industrial country fruitfull with many agricultural products and by products which can be extensively used as raw materials to produce value added products. Therefore, the aims of this research project is to apply cheap crops such as sugar cane and sweet sorghum juice as carbon sources to produce PHAs via batch and fed-batch fermentation in both small scale of shake flask and in bioreactor by using sucrose utilizing bacterial strains of *Alcaligenes latus*, *A. eutrophus* and bacteria isolated from environment. Effects of operating conditions such as initial pH, ionic strength of the medium, concentration of trace elements, and type of nitrogen source were also investigated. After fermentation, downstream processes such as cell disruption, centrifugation, and extraction were applied to recovery PHAs product and yield of production. The characterizations of PHAs were examined and compared to the standard of synthetic plastic. In addition, potential use of the raw materials of sweet sorghum and sugar cane juice were evaluated.

กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินโครงการวิจัยเรื่อง “กระบวนการต้นน้ำถึงปลายน้ำเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมจากวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก” ประสบผลสำเร็จอย่างสูงและลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยหลักฝ่ายละครึ่งระหว่างสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสถาบันต้นสังกัดของนักวิจัย ได้แก่มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้โครงการวิจัยพื้นฐานเชิงยุทธศาสตร์ “การผลิต การเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยวและการแปรรูปอาหารเพื่อการบริโภคภายในประเทศ และเพื่อเป็นสินค้าส่งออกมูลค่าสูง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 ตามสัญญาเลขที่ DBG 5380013

ในโอกาสนี้คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนการทำงานวิจัยอย่างต่อเนื่อง ในทันทีที่ปิดโครงการนักวิจัยรุ่นใหม่ของ สกว. ซึ่งผลการศึกษาวิจัยที่ได้รับจากโครงการวิจัยดังกล่าวเกิดประโยชน์มากมายหลายประการ อาทิ ทำให้สามารถขยายผลไปยังหน่วยงานทั้งภาครัฐและเอกชนอุตสาหกรรมอีกหลายแห่ง ที่เห็นประโยชน์ในเรื่องของการสร้างทางเลือกของวัตถุดิบทางการเกษตรเพื่อให้สามารถผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อื่นที่มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น และได้ติดต่อขอรับการบริการวิชาการและการถ่ายทอดเทคโนโลยี นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ทำให้สามารถสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ผ่านการผลิตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาและถ่ายทอดองค์ความรู้ทำให้เกิดประโยชน์อย่างกว้างขวาง เกิดความร่วมมือวิจัยและแลกเปลี่ยนนักวิจัยกับต่างประเทศ

ท้ายที่สุด คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ คณะเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ และคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำวิจัย อุปกรณ์ และเครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆในการทำวิจัย รวมทั้งผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ได้เอื้อนนามในที่นี้ ที่มีส่วนช่วยสนับสนุนและช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

พฤษภาคม 2555

สารบัญเรื่อง

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)	ข
บทสรุปผู้บริหาร (Executive summary)	ค
กิตติกรรมประกาศ(Acknowledgements)	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	5
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	5
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 ข้าวฟ่างหวาน	7
2.2 อ้อย	8
2.3 ไบโอฟอลิเมอร์ชนิดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท	10
2.4 จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิตไบโอฟอลิเมอร์ PHAs	11
2.5 แหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอฟอลิเมอร์ PHAs	15
2.6 กระบวนการหมักเพื่อผลิต PHAs	16
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมัก	17
2.8 การผลิต PHAs เชิงพาณิชย์	19
2.9 การย่อยสลายได้ทางชีวภาพ	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	22
3.1 วัตถุดิบ	22
3.2 จุลินทรีย์	22
3.3 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	42
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย	25

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	38
4.1 องค์ประกอบในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์	38
4.2 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยใช้น้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน	40
4.3 ผลการจำแนกบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน	44
4.4 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ต่อการเจริญและผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs	46
4.5 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs	46
4.6 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs จากน้ำคั้น ต้นข้าวฟ่างหวาน โดยใช้วิธีการหมักแบบกะ ในขวดเขย่า	47
4.7 ผลการหมักแบบกะเพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ในถังหมักขนาด 3 ลิตร	52
4.8 ผลการหมักแบบกึ่งกะเพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ในถังหมักขนาด 3 ลิตร	53
4.9 ผลการศึกษาคุณสมบัติของไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวาน	55
4.10 ผลการศึกษาองค์ประกอบในน้ำอ้อยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์	57
4.11 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs จากน้ำอ้อย โดยใช้วิธีการหมักแบบกะในขวดเขย่า	58
4.12 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้วิธีการหมักแบบกะ	64
4.13 ผลการศึกษา ค่า C:N ratios ในน้ำอ้อยในสภาวะถังหมักขนาด 5 ลิตร	66
4.14 ผลการศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs ในแง่ของจุลินทรีย์และแหล่งวัตถุดิบ	68
บทที่ 5 ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	70
5.1 สรุปผลการทดลอง	70
5.2 ข้อเสนอแนะ	72
เอกสารอ้างอิง	73

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	79
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม	80
ภาคผนวก ข วิธีการตรวจวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ	82
ภาคผนวก ค ลำดับนิวคลีโอไทด์	89
ภาคผนวก ง ข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางสถิติ	91
ภาคผนวก จ ข้อมูลดิบจากการทดลอง	99
ภาคผนวก ฉ กราฟมาตรฐาน	107
ภาคผนวก ช การเผยแพร่ผลงานวิจัยและการถ่ายทอดเทคโนโลยี	114

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1	ส่วนประกอบของน้ำอ้อย 9
ตารางที่ 2.2	คุณสมบัติของ PHB เทียบกับ พอลิโพรพิลีน 11
ตารางที่ 2.3	ปริมาณ PHAs ที่สะสมในจุลินทรีย์แต่ละชนิด 13
ตารางที่ 2.4	การผลิต PHAs โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 14
ตารางที่ 2.5	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อองค์ประกอบการผลิต PHAs 18
ตารางที่ 3.1	การออกแบบการทดลองเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHAs 28
ตารางที่ 3.2	การทดลองแบบ Placket-Burman design (N=12) 29
ตารางที่ 3.3	การทดลองแบบ Placket-Burman design (N=12) จากค่าจริง 30
ตารางที่ 4.1	ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆที่พบในน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานจากพื้นที่ต่างๆกัน 39
ตารางที่ 4.2	การผลิต PHB จากจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกจากดิน 3 สายพันธุ์ และจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิง 3 สายพันธุ์ 43
ตารางที่ 4.3	ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ต่อการเจริญและผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs 46
ตารางที่ 4.4	การผลิต PHB จากแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ 47
ตารางที่ 4.5	แผนผังการทดลองแบบ Plackett and Burman Design การผลิต PHB จากแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆสำหรับการกลั่นกรองปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB จากจุลินทรีย์ <i>B. aryabhatai</i> 48
ตารางที่ 4.6	ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากน้ำคั้นข้าวฟ่างหวาน 49
ตารางที่ 4.7	ผลของระดับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณยูเรียต่อปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณไบโอพอลิเมอร์ 49
ตารางที่ 4.8	ปริมาณผลได้ (Yield) ที่ได้จากการหมักน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดยการหมักแบบต่างๆ 54
ตารางที่ 4.9	ผลการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ในน้ำอ้อย 57
ตารางที่ 4.10	ปริมาณผลได้ (Yield) และผลผลิตที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกัน (เวลาสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงที่ 60 ชั่วโมง) 63

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.11	ปริมาณผลได้ (Yield) ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยของความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ที่เวลาต่างๆ	64
ตารางที่ 4.12	ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ (Biomass) และปริมาณไบโอพอลิเมอร์ (PHAs) ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ C: N ratios = 6.8:1.0	68
ตารางที่ 4.13	การเปรียบเทียบการผลิต PHAs จากวัตถุดิบต่างชนิดกัน	69
ตารางภาคผนวกที่ ง-1	Analysis of Varian of selected Factorial model (Response: Biomass)	91
ตารางภาคผนวกที่ ง-2	Analysis of Varian of selected Factorial model (Response: PHB)	92
ตารางภาคผนวกที่ ง-3	Sequential Model Sum of Squares [Type I] (Biomass)	94
ตารางภาคผนวกที่ ง-4	Lack of Fit Tests (Biomass)	94
ตารางภาคผนวกที่ ง-5	Model Summary Statistics (Biomass)	95
ตารางภาคผนวกที่ ง-6	Analysis of variance table [Type III] (Biomass)	95
ตารางภาคผนวกที่ ง-7	Sequential Model Sum of Squares [Type I] (PHB)	96
ตารางภาคผนวกที่ ง-8	Lack of Fit Tests (PHB)	96
ตารางภาคผนวกที่ ง-9	Model Summary Statistics (PHB)	97
ตารางภาคผนวกที่ ง-10	Analysis of variance table [Type III] (PHB)	97
ตารางภาคผนวกที่ ง-11	Model predictions of biomass and PHB	98
ตารางภาคผนวกที่ จ-1	การเจริญโดยวัดความขุ่นของเซลล์ (OD 600 nm) ของ <i>A. eutrophus</i> และ <i>A. latus</i> ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร	100
ตารางภาคผนวกที่ จ-2	ข้อมูลการเจริญของ <i>A. eutrophus</i> TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรวมแตกต่างกัน ที่ C:N ratios = 6.8:1.0	101

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางภาคผนวกที่ จ-3 ข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ <i>A. eutrophus</i> ที่ความเข้มข้น ของน้ำตาลรวมแตกต่างกัน ที่ C: N ratios = 6.8:1.0	101
ตารางภาคผนวกที่ จ-4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรวมที่เวลาแตกต่างกันของการหมัก โดย <i>A. eutrophus</i> TISTR ที่ C: N ratios = 6.8:1.0	102
ตารางภาคผนวกที่ จ-5 ปริมาณการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs ของ <i>A. eutrophus</i> ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกันที่ C:N ratios = 6.8:1.0	102
ตารางภาคผนวกที่ จ-6 ข้อมูลค่าความขุ่นของเซลล์ (OD 600 nm) ปริมาณน้ำตาล และน้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>A. eutrophus</i> และการผลิต ไบโอพอลิเมอร์ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตรเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ที่ C:N = 6.8:1.0	103
ตารางภาคผนวกที่ จ-7 ปริมาณการวัดไบโอพอลิเมอร์ PHAs ในถังหมัก 5 ลิตร ที่ C:N = 6.8:1.0	104
ตารางภาคผนวกที่ จ-8 ค่าความขุ่นของเซลล์ ในถังหมัก 5 ลิตร ที่ C:N = 8.9:1.0	105
ตารางภาคผนวกที่ จ-9 ข้อมูลการวัดปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด (OD _{490 nm}) โดยวิธี Phenol – sulfuric ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ C: N = 8.9:1.0	105
ตารางภาคผนวกที่ จ-10 ข้อมูลปริมาณการวัดไบโอพอลิเมอร์ PHAs ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ C: N = 8.9:1.0	106
ตารางภาคผนวกที่ ฉ.1 ค่าความขุ่นของเซลล์ (OD ₂₃₅) และน้ำหนักเซลล์แห้ง <i>A. eutrophus</i> ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานน้ำหนัก เมื่อใช้น้ำตาลรวมทั้งหมด 40 กรัมต่อลิตร กล้าเชื้อ 10%	111
ตารางภาคผนวกที่ ฉ.2 ค่าการดูดกลืนแสง (OD ₂₃₅) และค่าความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐาน PHB ในการสร้างกราฟมาตรฐานวิเคราะห์ PHAs	112
ตารางภาคผนวกที่ ฉ.3 ค่าการดูดกลืนแสง (OD ₄₉₀) และค่าความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐานกลูโคส ในการสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลรวม	113

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1	7
ภาพที่ 2.2	8
ภาพที่ 2.3	10
ภาพที่ 2.4	12
ภาพที่ 3.1	26
ภาพที่ 3.2	34
ภาพที่ 3.3	34
ภาพที่ 3.4	36
ภาพที่ 4.1	38
ภาพที่ 4.2	41
ภาพที่ 4.3	41
ภาพที่ 4.4	42
ภาพที่ 4.5	44
ภาพที่ 4.6	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 4.7	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสายพันธุ์อ้างอิง	45
ภาพที่ 4.8	แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจุลินทรีย์	45
ภาพที่ 4.9	Contour และ Response surface แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs กับปริมาณ Urea และปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด	50
ภาพที่ 4.10	การเปลี่ยนแปลงการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs ระหว่างการเพาะเลี้ยง <i>B. arybhattai</i> ในพลาสติกเขย่า 200 รอบต่อนาทีและอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	52
ภาพที่ 4.11	การเปลี่ยนแปลงการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs ระหว่างการเพาะเลี้ยง <i>B. arybhattai</i> แบบกะในถังหมัก ขนาด 3 ลิตร	53
ภาพที่ 4.12	การเปลี่ยนแปลงการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs ระหว่างการเพาะเลี้ยง <i>B. arybhattai</i> แบบกึ่งกะในถังหมัก ขนาด 3 ลิตร	54
ภาพที่ 4.13	ไบโอพอลิเมอร์ PHB ที่สกัดได้จากเซลล์ของจุลินทรีย์ <i>Bacillus arybhattai</i> โดยใช้น้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งอาหาร	55
ภาพที่ 4.14	อุณหภูมิที่พอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงเป็นสถานะคล้ายแก้ว (T _g) และอุณหภูมิจุดหลอมเหลว (T _m) ของ PHB มาตรฐานและ PHB ที่สกัดได้จากเซลล์ของจุลินทรีย์ <i>B. arybhattai</i>	56
ภาพที่ 4.15	การสลายตัวโดยความร้อนของ PHB มาตรฐานและ PHB ที่สกัดได้จากเซลล์ของจุลินทรีย์ <i>B. arybhattai</i>	56
ภาพที่ 4.16	เปรียบเทียบการเจริญ ของเซลล์จุลินทรีย์ <i>A. latus</i> และจุลินทรีย์ <i>A. eutrophus</i> ในน้ำอ้อย 20กรัมต่อลิตร	59
ภาพที่ 4.17	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์ระหว่างการเพาะเลี้ยง <i>A. eutrophus</i> TISTR 1095 ที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	60
ภาพที่ 4.18	การเปลี่ยนแปลงการผลิตไบโอพอลิเมอร์ ระหว่างการเพาะเลี้ยง <i>A. eutrophus</i> TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดที่แตกต่างกัน ที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 4.19	การเปลี่ยนแปลงการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs ระหว่างการเพาะเลี้ยง <i>A. eutrophus</i> ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที	62
ภาพที่ 4.20	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล และน้ำหนักรเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ ในระหว่างการเพาะเลี้ยง <i>A. eutrophus</i> ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร และในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ C:N ratios = 6.8:1.0	65
ภาพที่ 4.21	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล และน้ำหนักรเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ ในระหว่างการเพาะเลี้ยง <i>A. eutrophus</i> ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่แปรผันค่า C:N ratios	66
ภาพที่ 4.22	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล และน้ำหนักรเซลล์แห้งและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ ของจุลินทรีย์ <i>A. eutrophus</i> ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ C:N ratios = 6.8:1.0	67
ภาพภาคผนวกที่ ก-1	ปฏิกิริยาของการวิเคราะห์น้ำตาลโดยรวม	83
ภาพภาคผนวกที่ ฉ-1	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณไบโอพอลิเมอร์ PHAs	108
ภาพภาคผนวกที่ ฉ-2	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก	108
ภาพภาคผนวกที่ ฉ-3	โครมาโตแกรมแสดงพีคของน้ำตาลแต่ละชนิด	109
ภาพภาคผนวกที่ ฉ-4	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส	109
ภาพภาคผนวกที่ ฉ-5	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรุคโตส	110
ภาพภาคผนวกที่ ฉ-6	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส	110
ภาพภาคผนวกที่ ฉ-7	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้ง	111
ภาพภาคผนวกที่ ฉ-8	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณไบโอพอลิเมอร์ PHAs	112
ภาพภาคผนวกที่ ฉ-9	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก	113

บทที่ 1 บทนำ (Introduction)

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา (Research rationale)

ด้วยปัจจุบันพลาสติกสังเคราะห์ (Synthetic plastic) จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เป็นวัสดุที่เป็นที่นิยมและมีการนำมาใช้งานกันอย่างแพร่หลายทั้งในรูปของภาชนะบรรจุ ถุง ขวดและแผ่นพลาสติกใส ฟิล์มห่อ ตลอดจนสิ่งของเครื่องใช้ต่างๆ ในชีวิตประจำวัน ฯลฯ ทั้งนี้เนื่องจากพลาสติกมีคุณสมบัติที่ดีหลายอย่าง เช่น มีความเหนียวและมีความยืดหยุ่น เป็นฉนวนและไม่เป็นสนิม มีน้ำหนักเบา ตลอดจนมีราคาถูกกว่าวัสดุอื่นๆ หลายชนิด ดังนั้นจึงทำให้อัตราการใช้พลาสติกเฉลี่ยต่อคนสูงถึง 100 กิโลกรัม/คน/ปี และนับวันปริมาณการใช้ยิ่งเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ เป็นเหตุให้มีขยะจำพวกเศษพลาสติกถูกทิ้งสู่สิ่งแวดล้อมจำนวนมากและยากแก่การจัดการ เพราะหากกำจัดโดยการฝังกลบที่ถูกต้องตามหลักสุขาภิบาล (Sanitary landfill) จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติย่อยสลายได้ยากและใช้เวลานานหลายสิบปี (Young, 1981; Huang และคณะ, 1995) และหากนำไปกำจัดโดยวิธีเผากลางแจ้ง ก็จะทำให้เกิดควันดำส่งกลิ่นเหม็นก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางอากาศ (Air pollution)

ประกอบกับวิกฤตการณ์การขาดแคลนพลังงานเชื้อเพลิงจากน้ำมันปิโตรเลียม ทำให้ประเทศต่างๆ ทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยได้แสวงหาทรัพยากรธรรมชาติต่างๆ (Natural resources) ที่จะสามารถนำมาใช้ในการเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ และเนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม จึงทำให้มีวัตถุดิบที่ได้จากการเกษตรประเภทแป้ง (starch based materials) เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง ฯลฯ และน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ (sugar based materials) เช่น อ้อยและข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น ได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานทดแทนในรูปของเอทานอล ขณะเดียวกันการศึกษาวิจัยและพัฒนาในเรื่องการแปรรูปวัตถุดิบทางการเกษตรดังกล่าว ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้นกว่าผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณมากและมีมูลค่าต่ำกว่า เช่น อาหาร ได้รับความสนใจกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสร้างองค์ความรู้และพัฒนาวิธีการแปรรูปผลผลิตจากวัตถุดิบทางการเกษตร เพื่อผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม หรือ “พลาสติกที่สลายตัวได้” (Degradable plastic) หรือที่นิยมเรียกว่า “พลาสติกชีวภาพ” (Bioplastic)

โดยในระยะเวลามากกว่า 10 ปีที่ผ่านมา นักวิจัยในต่างประเทศเป็นส่วนใหญ่ให้ความสนใจในการวิจัยและพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกที่สลายตัวได้ทางชีวภาพ เพื่อนำมาใช้ทดแทนการใช้พลาสติกสังเคราะห์และพลาสติกชีวภาพส่วนใหญ่มักจะสังเคราะห์ขึ้นจากสารไบโอพอลิเมอร์ (Biopolymers) ที่ได้จากธรรมชาติ เช่น เซลลูโลส (cellulose) ไชแลน (xylan) พูลูลาน (pullulan) ไคติน (chitin) ไคโตซาน (chitosan) และกรดแลคติก (lactic acid) เป็นต้น ในบรรดาสารไบโอพอลิเมอร์เหล่านี้ พบว่าสารในกลุ่มพอลิเบตาไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates: PHAs) ที่มีมากกว่า 40 ชนิด รวมทั้งสารอนุพันธ์ (monomer) ของพอลิเมอร์กลุ่มนี้เป็นสารชีวภาพที่ได้รับความสนใจศึกษามากที่สุด ทั้งนี้เพราะสามารถนำมาผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพได้แล้ว ยังมีคุณสมบัติหลายประการคล้ายคลึงกับพลาสติกสังเคราะห์ชนิดพอลิโพรพิลีน และสามารถสลายตัวได้ในระยะเวลาสั้น (ประมาณ 6 เดือน ถึง 1 ปี) (Evan และ Sikder, 1990) สามารถสลายตัวทางชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ (Bassas et al, 2006) นอกจากนี้สามารถผลิตได้จากกลุ่มจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียในกลุ่มของสายพันธุ์ต่างๆ เช่น *Alcaligenes* spp., *Pseudomonas* spp., *Ralstonia* spp., *Bacillus* spp. เป็นต้น โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้างและสะสมสารพอลิเมอร์และโคพอลิเมอร์ (copolymer) ไว้ภายในเซลล์ (storage polymer) เสมือนเป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งพลังงาน เมื่อเซลล์จุลินทรีย์เผชิญกับสภาวะไม่สมดุลของแหล่งอาหาร (Nutrient imbalance) เช่น เมื่อเซลล์จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนมากเกินไป (Excess carbon) แต่ขณะเดียวกันก็ขาด

ปริมาณสารอาหารชนิดอื่น เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ฯลฯ จึงทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนเพื่อการเจริญเติบโตได้ แต่จะเปลี่ยนไปสร้างและสะสมสารโพลีเมอร์อยู่ในเซลล์แทน (Chua, 1997; Rhee, et al, 1999; Steinbuchel และ Lutke-Eversloh, 2003; Bassas, et al, 2006)

อย่างไรก็ตาม การใช้ประโยชน์จากสารโพลีเมอร์ PHAs เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพ ยังคงมีอุปสรรคและข้อจำกัดที่สำคัญในเรื่องของต้นทุนในการผลิต ซึ่งพบว่าสูงกว่าการผลิตพลาสติกสังเคราะห์ถึง 10 เท่า (Chang, 1994) โดยแนวทางหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้และมีศักยภาพมากที่สุดในการแก้ปัญหาเพื่อลดต้นทุนในการผลิตโพลีเมอร์กลุ่มนี้ อาจทำได้โดยการใช้แหล่งของคาร์บอนที่จุลินทรีย์จะใช้เป็นสารตั้งต้น (Substrate) ที่มีราคาถูก เช่น กากมันสำปะหลัง (cassava waste) กากน้ำตาล (molasses) และน้ำเสียจากระบบบำบัดในอุตสาหกรรมอาหารและเกษตร เป็นต้น ภายหลังจากที่ ผกาวดีและคณะ (2543) ประสบความสำเร็จในการศึกษาเพื่อประเมินศักยภาพความเป็นไปได้ในการผลิตสารโพลีเมอร์ควบคู่ไปกับการเดินระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่งจากน้ำเสียโรงงานแป้งมันสำปะหลัง โดยการสร้างสภาวะที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้กลุ่มจุลินทรีย์ผสม (mixed cultures) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียชนิดต้องการออกซิเจนที่เลี้ยงไว้ในถังเดิมอากาศของระบบ สามารถย่อยสลายสิ่งสกปรกประเภทสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำเสีย และขณะเดียวกันก็จะมีการสร้างและสะสมโพลีเมอร์ไว้ในเซลล์ ตลอดจนการสกัดสารโพลีเมอร์ดังกล่าวออกมาเพื่อประเมินผลได้ (yield) และพบว่าโพลีเมอร์ที่สกัดได้เป็นโพลีเมอร์ในกลุ่ม PHAs ต่อมาผกาวดีและคณะ (2544) ได้ศึกษาการผลิตโพลีเมอร์ในกลุ่ม PHAs จากน้ำเสียสังเคราะห์ โดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์ผสมจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบตะกอนเร่ง เพื่อเปรียบเทียบกับกับการใช้แบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 พบว่าทั้งกลุ่มจุลินทรีย์ผสมและเชื้อบริสุทธิ์สามารถผลิต PHAs ได้ แต่อย่างไรก็ตามต้นทุนการผลิตยังสูงอยู่ในขณะที่ผลได้ของ PHAs ยังต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยบางประการไม่ว่าจะเป็นสารบางอย่างที่มีผลเป็นพิษกับจุลินทรีย์หรือแม้กระทั่งความไม่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตภายใต้แหล่งอาหารนั้นๆ ได้อย่างเต็มที่ การควบคุมระบบค่อนข้างยากไม่เหมือนกับการใช้แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งพลังงานเดี่ยวๆ เช่น การใช้กากน้ำตาลบริสุทธิ์ทั่วไป

และจากการที่ประเทศไทยมีความได้เปรียบทางด้านทรัพยากรการเกษตรที่มีความหลากหลาย ทั้งในเชิงของปริมาณและคุณภาพ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ความสนใจของวิจัยยังคงมุ่งเน้นไปที่การใช้วัตถุดิบตั้งต้นทางการเกษตรที่มีราคาถูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งอ้อยและข้าวฟ่างหวาน หรือ Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench.) ทั้งนี้เพราะพืชทั้งสองชนิดนั้นและเป็นพืชไร่เศรษฐกิจหลักของประเทศและมีการเพาะปลูกอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยที่อ้อยนั้นเป็นตัวแทนของพืชไร่อายุหนึ่งปี ขณะที่ในส่วนของข้าวฟ่างหวานนั้นเป็นตัวแทนของพืชไร่ที่มีอายุสั้น ประมาณ 100 วันหรือประมาณสามเดือนเท่านั้น และน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานซึ่งเป็นพืชไร่ที่เพาะปลูกได้ง่าย มีน้ำหวานในลำต้น (juicy stem: D gene) และมีรสหวาน (sweet stalk; x gene) คล้ายอ้อย จึงนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายรูปแบบทั้งในรูปของพืชอาหารสัตว์ เช่น ทำหญ้าหมักไว้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ได้โดยตรง และอาหารมนุษย์โดยการหีบเอาน้ำหวานที่คั้นออกมาได้จะมีความหวานอยู่ระหว่าง 15-24 บริกซ์ น้ำหวานที่ได้นี้อาจจะเป็นชนิดซูโครส เพื่อใช้ประโยชน์สำหรับทำน้ำตาล หรือเป็นชนิดไซรัป (syrup) สำหรับทำน้ำผึ้ง หรือน้ำข้าวฟ่างหวานพร้อมดื่ม เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) สูง ปริมาณน้ำคั้นที่ได้จะอยู่ระหว่าง 40-45% ค่า pH ของน้ำหวานจะอยู่ระหว่าง 4.5-5.2 ขึ้นอยู่กับปริมาณ aconitic acid และมีค่าความถ่วงจำเพาะอยู่ระหว่าง 1.05-1.08 นอกจากนี้ข้าวฟ่างหวานยังเป็นพืชที่ปรับตัวได้ดีกับสภาพแห้งแล้ง ต้องการน้ำ 250-350 ลิตร เพื่อการผลิตน้ำหนักแห้ง 1 กิโลกรัม ทนสภาพดินเค็มและดินด่างได้ปานกลาง pH (5.0-8.5) รวมทั้งทนต่อสภาพน้ำท่วมขังได้พอสมควร ข้าวฟ่างหวานพันธุ์ปลูกในปัจจุบัน ให้ผลผลิตต้นสดตั้งแต่ 5-12 ตันต่อไร่ จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร พบว่าประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวฟ่างประมาณ 6 แสนไร่เศษและมีปริมาณผลผลิตรวมทั้งสิ้น 146,455 ตัน แต่ข้าวฟ่างส่วนใหญ่ถูกนำไปเลี้ยงสัตว์ อย่างไรก็ตามในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา เกษตรกรเริ่มมีการปลูกข้าวฟ่างหวานเพื่อนำไปผลิตพลังงานทดแทนในรูปเอทานอล

และจากการเปรียบเทียบราคาต้นทุนวัตถุดิบทางการเกษตร ที่สามารถนำมาผลิต PHAs ได้ หน่วยเป็น (บาท/กก) เช่น ข้าวฟ่างหวาน (0.49 บาท/กก.) อ้อย (0.8 บาท/กก.) กากน้ำตาล (3.8 บาท/กก.) มันสำปะหลัง (1.7 บาท/กก.) และข้าวโพด (5.34 บาท/กก.) ซึ่งพบว่าราคาวัตถุดิบของข้าวฟ่างหวานมีราคาถูกที่สุด และอ้อยเป็นลำดับรอง (ประสิทธิ์ และคณะ, 2549) เมื่อพิจารณาในเรื่องของต้นทุนของราคาวัตถุดิบ ประกอบกับ รายงานวิจัยที่ผกาดีและคณะ, 2550 ได้ศึกษาการผลิตสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs จากการนำน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานไปหมักแบบกะในระดับฟลาสก์ ซึ่งผลการทดลองพบว่าน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานมีศักยภาพสูงที่จะนำไปผลิตสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs ได้โดยตรง เพราะอุดมไปด้วยแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อจุลินทรีย์และนำสภาวะที่เหมาะสมมาขยายการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งพบว่า ผลได้ของสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs มีสูง

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเกิดแนวคิดและต้องการที่จะวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตพลาสติกชีวภาพ หรือ พลาสติกที่สลายตัวได้ตามธรรมชาติ ตั้งแต่กระบวนการต้นน้ำ จนกระทั่งถึงกระบวนการปลายน้ำ เพื่อนำสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs ที่ผลิตได้ผ่านกระบวนการหมักวัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก ด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตสูง และเข้าสู่กระบวนการหลังการหมักที่มีการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ (product recovery) โดยการสกัดสารไบโอพอลิเมอร์เหล่านี้ออกจากเซลล์จุลินทรีย์ เพื่อนำไปผสม (blending) และการขึ้นรูปตามแบบ (compounding) โดยการใช้ตัวประสานที่ทำหน้าที่เป็น pasticiser ที่ได้จากสารโพลีเมอร์จากธรรมชาติ เช่น แป้งมันสำปะหลัง ยาง และกลีเซอรอล เป็นต้น เพื่อนำมาผลิตเป็นนวัตกรรมผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพ (Innovative bioplastic product) และสามารถขยายผลการผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรมหรือเชิงพาณิชย์ โดยจะเริ่มจากการศึกษาเพื่อนำน้ำอ้อยคั้นและน้ำคั้นข้าวฟ่างหวาน มาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์สายพันธุ์ทางการค้า ได้แก่ *Alcaligenes latus*, *A. eutrophus* และ *Bacillus* spp. รวมทั้งสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ (จากข้อมูลผลการทดลองในระดับฟลาสก์ที่คณะผู้วิจัยได้ศึกษาพบว่าในน้ำอ้อยคั้นและน้ำคั้นข้าวฟ่างหวาน มีองค์ประกอบของน้ำตาลผสมหลายชนิดและมีความหวานหรือความเข้มข้นของน้ำตาลสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก) ซึ่งจุลินทรีย์จะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในผลิตสารไบโอพอลิเมอร์ในกลุ่ม PHAs โดยใช้กระบวนการหมักแบบกะและแบบกึ่งกะ ทั้งในระดับฟลาสก์และในระดับขยายขนาดภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) หรือถังหมัก (Fermentor) ขนาด 5 ลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิต รวมทั้งการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในการผลิตสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs ประสิทธิภาพสูงสุด ตลอดจนการศึกษาระบบการเก็บเกี่ยวเพื่อแยกสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs ออกจากน้ำหมัก หลังจากนั้นจะนำสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs ที่ผลิตได้นำไปเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตเป็นนวัตกรรมผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพ เพื่อให้เกิดการขยายผลการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพเชิงพาณิชย์ต่อไป ในขณะเดียวกันความสมบูรณ์ของโครงการวิจัยนี้ จะครอบคลุมไปถึงการศึกษาอัตราการสลายตัวทางชีวภาพ (Biodegradation) ตลอดจนการศึกษาเพื่อเป็นการประเมินอายุการใช้งานของผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพที่ผลิตขึ้นที่สภาวะต่างๆ ในการนำพลาสติกชีวภาพไปใช้ประโยชน์ในลักษณะต่างๆ เช่น การใช้ภายในไมโครเวฟ หรือการใช้ที่อุณหภูมิสูง เป็นต้น ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้คาดหวังไว้ว่าข้อมูลจากผลการวิจัยจะสร้างคุณประโยชน์ โดยสามารถนำไปขยายผลเพื่อพัฒนาสู่การผลิตสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพในระดับเชิงพาณิชย์ต่อไปนอกจากนี้ยังเป็นสร้างมูลค่าเพิ่ม (Value added product) ให้กับพืชไร่ทางการเกษตรได้แก่ อ้อยและข้าวฟ่างหวาน ทำให้ราคาของอ้อยและข้าวฟ่างหวานสูงขึ้น และเพื่อเป็นการส่งเสริมและเกิดเป็นแรงจูงใจให้เกษตรกร ได้หันมาปลูกอ้อยและข้าวฟ่างหวานเพิ่มขึ้นในทางอ้อมเป็นการสร้างรายได้ให้กับเกษตรกร ตลอดจนเป็นการรักษาสังแวดล้อมซึ่งจะเป็นการช่วยแก้ปัญหาการจัดการขยะพลาสติกสังเคราะห์ ที่กำลังมีเพิ่มมากขึ้นในทุกๆ พื้นที่ทั่วโลกต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (Objectives of the research)

1.2.1 วัตถุประสงค์หลักของโครงการ

เพื่อวิจัยและพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์นวัตกรรมพลาสติกชีวภาพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมจากวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักโดยใช้กระบวนการต้นน้ำถึงปลายน้ำ

1.2.2 วัตถุประสงค์ย่อยของโครงการ

1. เพื่อศึกษาถึงองค์ประกอบและคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีเบื้องต้นของน้ำอ้อยคั้นและน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวาน เพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากของน้ำอ้อยคั้นและน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวาน โดยใช้วิธีการหมักแบบกะและแบบกึ่งกะในระดับห้องปฏิบัติการ (ในพลาสติกเยื่อ)
3. เพื่อนำผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ไปใช้ในการผลิต PHAs โดยใช้วิธีการหมักแบบกะและแบบกึ่งกะในระดับขยายส่วนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพหรือถังหมักที่มีขนาดความจุ 5 ลิตร
4. เพื่อศึกษากระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูงและมีความเหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยว PHAs ที่สร้างและสะสมอยู่ในกลุ่มเซลล์จุลินทรีย์
5. เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของ PHAs ที่ผลิตได้จากของน้ำอ้อยคั้นและน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานเปรียบเทียบกับ PHAs ทางการค้า
6. เพื่อประเมินศักยภาพในการผลิต PHAs จากการหมักของน้ำอ้อยคั้นและน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานด้วยจุลินทรีย์ในแง่ต้นทุนในการผลิต
7. เพื่อศึกษาการผสมและการขึ้นรูปของ PHAs ในกระบวนการผลิตพลาสติกสังเคราะห์ กับสารไบโอพอลิเมอร์จากธรรมชาติ เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ไบโอพลาสติกหรือพลาสติกที่ย่อยสลายได้ต้นแบบ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย (Scope of research work)

โครงการวิจัยนี้ครอบคลุมถึงการศึกษาองค์ประกอบและคุณสมบัติเบื้องต้นของวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาล ในที่นี้จะเลือกทำการศึกษาในน้ำอ้อยคั้นและน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวาน เช่น ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้นเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิต PHAs การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากในน้ำอ้อยคั้นและน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวาน โดยใช้วิธีการหมักในระดับห้องปฏิบัติการ และการศึกษาการผลิต PHAs จากในน้ำอ้อยคั้นและน้ำคั้นข้าวฟ่างหวาน โดยใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการผลิต PHAs ในระดับห้องปฏิบัติการ (flask scale) และขยายขนาด (up scale) ในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพ (fermentor) ขนาด 5 ลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณผล ผลิตรวมทั้งการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสาร PHAs และครอบคลุมถึงการศึกษากระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ PHAs ที่สะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งลอยปนอยู่ในน้ำหมัก เพื่อแยก PHAs ออกจากน้ำหมักน้ำอ้อยคั้นและในน้ำหมักข้าวฟ่างหวาน ให้ได้ปริมาณมาก (yield) และมีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักแล้ว หลังจากนั้นจะนำ PHAs ที่ผลิตได้นำไปเป็นวัตถุดิบเพื่อผสมและขึ้นรูปกับโพลีเมอร์ธรรมชาติที่มีราคาถูก เช่น แป้งมันสำปะหลัง ยาง และกลีเซอรอล ใน

การผลิตนวัตกรรมผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อให้เกิดการขยายผลการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพในระดับเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

- 1.4.1 ทราบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีบางประการของวัตถุดิบหลักได้แก่อ้อยและข้าวฟ่างหวาน ที่ใช้ในกระบวนการหมัก เพื่อผลิตสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs
- 1.4.2 ทราบวิธีการรวบรวม คัดแยก และการบ่งชี้ลักษณะของสายพันธุ์ ตลอดจนอัตราการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์และสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ที่จะใช้ในการผลิต PHAs
- 1.4.3 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการหมักวัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักเพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิด PHAs โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถ ในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับขยายส่วนในถังหมัก เพื่อให้ได้ผลผลิต (Productivity) หรือผลได้ (Yield) ที่มีประสิทธิภาพซึ่งจะสามารถนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกชีวภาพหรือไบโอพลาสติกต่อไป
- 1.4.4 ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักและเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์จากเซลล์จุลินทรีย์
- 1.4.5 ทราบผล/วิธีการผลิต PHAs ทั้งในระดับฟลasks และในถังหมักขยายขนาด
- 1.4.6 คุณสมบัติของไบโอพอลิเมอร์ (PHAs) ทั้งทางด้านกายภาพ ทางกลและทางความร้อนบางประการ เปรียบเทียบกับคุณสมบัติของพลาสติกสังเคราะห์
- 1.4.7 ได้ผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพต้นแบบ
- 1.4.8 ทราบผล/วิธีการผลิต ผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพต้นแบบ
- 1.4.9 ได้ข้อมูลวิจัยและแนวทางในการนำเสนอผลงานวิจัยทั้งในรูปแบบในที่ประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ ตลอดจนการยื่นขอความวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ
- 1.4.10 เป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัตถุดิบทางการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชไร่ที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ เช่น อ้อย และข้าวฟ่างหวาน อันจะส่งผลดีในทางอ้อมให้กับเกษตรกรที่ปลูกพืชไร่เหล่านี้ ในการป้องกันกับอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพ
- 1.4.11 เป็นข้อมูลเชิงลึกให้กับอุตสาหกรรมผู้ผลิตพลาสติกสังเคราะห์ ตลอดจนอุตสาหกรรมผู้ผลิตน้ำตาลในการขยายสายการผลิต หรือมีอุตสาหกรรมการผลิตไบโอพอลิเมอร์จากอ้อยเพื่อป้อนสู่โรงงานผลิตพลาสติก และ/หรือ มีอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพครบวงจร เพื่อลงทุนในการผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ย่อยสลายหรือพลาสติกชีวภาพ ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมในระดับอุตสาหกรรมต่อไป
- 1.4.12 ทำให้มีแลกเปลี่ยนและถ่ายทอดเทคโนโลยีระหว่างนักวิจัยในภาครัฐสู่ภาคเอกชน หรือภาคอุตสาหกรรมภายในประเทศ และ/หรือต่างประเทศ อันจะนำไปสู่การขยายผลการผลิตในระดับเชิงพาณิชย์ในอนาคต
- 1.4.13 ได้ข้อมูลการวิจัยที่สามารถนำไปตีพิมพ์ผลงานวิจัยในรูปแบบ manuscript เผยแพร่ในวารสารวิจัยทางวิทยาศาสตร์ซึ่งเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติและมีปัจจัยกระทบ (Impact factor) การนำเสนอผลงานทางวิชาการแบบโปสเตอร์และ /หรือแบบปากเปล่า (Poster / oral presentations)

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

(Theory and Literature reviews)

2.1 ข้าวฟ่างหวาน (Sweet sorghum)

ข้าวฟ่างหวาน (Sweet sorghum: *Sorghum bicolor* (L.) Moench) โดยปกติแล้วเป็นพืชที่ใช้ประโยชน์จากน้ำคั้นของลำต้นเป็นหลัก มีความหวานเช่นเดียวกับอ้อย มีน้ำตาลหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส ซึ่งในส่วนของน้ำตาลซูโครสจะมีปริมาณมากกว่าน้ำตาลชนิดอื่นเช่นเดียวกันกับอ้อย แต่ในขณะเดียวกันก็สามารถใช้ประโยชน์จากเมล็ดได้เช่นเดียวกับข้าวฟ่างเมล็ด (grain sorghum) จึงเป็นพืชที่ใช้ประโยชน์ได้แบบอเนกประสงค์ทั้งในรูปอาหาร พลังงาน และวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี ถ้าปลูกในสภาพอากาศน้ำฝนทั่วไปจะให้ผลผลิตต้นสดเฉลี่ยประมาณ 4-7 ตันต่อไร่ แต่หากปลูกในสภาพที่มีน้ำชลประทานจะได้ผลผลิตต้นสดประมาณ 15-20 ตันต่อไร่ มีอายุเก็บเกี่ยว 100-120 วัน จึงเป็นพืชหนึ่งที่มีความสนใจเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารต่างๆ เช่น เอทานอล (Loapaiboon และคณะ 2009) กรด แลคติก (Hetényi และคณะ 2010) ไฮโดรเจน (Antonopoulou และคณะ 2008) ฯลฯ จากคุณสมบัติดังกล่าว น้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานจึงเหมาะที่จะนำมาใช้เพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ มข. 40 ดังรูป 2.1 ซึ่งได้รับการพัฒนาสายพันธุ์จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น จะให้ผลผลิตเฉลี่ย 5-7 ตันต่อไร่ มีอายุเก็บเกี่ยว 90-100 วัน (25-35 วันหลังดอกบาน) ให้น้ำหวานเฉลี่ย 2500-3500 ลิตรต่อไร่ (ประสิทธิ์, 2551)



ภาพที่ 2.1 ข้าวฟ่างหวาน“มข 40” ที่ผ่านปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น

2.2 อ้อย (Sugar cane)

อ้อยมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharum officinarum* L. อยู่ในวงศ์ Poaceae (Gramineae) รู้จักกันในชื่อสามัญคือ Sugar Cane ซึ่งอ้อยเป็นพืชพวงหญ้าชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อมนุษย์มากในแง่ของ

การใช้เป็นอาหาร อ้อยนับเป็นพืชสำคัญอันดับ 4 ของโลก รองจากผลผลิตทางการเกษตรได้แก่ ข้าว สาลี ข้าวโพด และข้าว ตามลำดับ อ้อย คือพืชสำคัญที่เป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมน้ำตาลของประเทศ และไทยส่งออกน้ำตาลรองจาก บราซิล สหภาพยุโรป และออสเตรเลีย สร้างรายได้เข้าประเทศปีละมากกว่าสองหมื่นล้านบาท ในแต่ละปีประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยโรงงานไม่น้อยกว่า 5.4 ล้านไร่ ให้ผลผลิตอ้อยประมาณ 49 ล้านตัน ผลผลิตเฉลี่ย 9.5 ตันต่อไร่



ภาพที่ 2.2 อ้อยพันธุ์“อุ้มทอง 9” ที่ผ่านปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์และให้การรับรองโดย กรมวิชาการเกษตร (www. locals.in.th)

สำหรับประเทศไทยได้มีการปลูกอ้อยมาแต่โบราณกาล แต่การทำน้ำตาลจากอ้อยได้เริ่มในสมัยกรุงสุโขทัยประมาณปี พ.ศ. 1920 แหล่งผลิตสำคัญอยู่ที่เมืองสุโขทัย พิษณุโลก และกำแพงเพชรน้ำตาลที่ผลิตได้ในสมัยนั้นเป็นน้ำตาลทรายแดง (muscovado) หรือน้ำอ้อยยบ เชื่อกันว่าชาวจีนเป็นผู้ที่นำเอากรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายแดงเข้ามามีส่วนการผลิตน้ำตาลทรายขาว (centrifugal sugar) นั้นได้เริ่มที่จังหวัดลำปางเมื่อปี พ.ศ. 2480 หลังจากนั้นการผลิตน้ำตาลทรายขาวได้ขยายตัวเพิ่มขึ้นโดยลำดับ (กำเนิด และ สุกฤษฎี, 2536)

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของน้ำอ้อย (ดัดแปลงจาก James, 1985)

น้ำอ้อยคั้น	เปอร์เซ็นต์ (%)
น้ำ (water)	73 - 76
ของแข็ง (solid)	24 - 27
ของแข็งที่ละลายได้ (soluble solid)	10 - 16
เยื่อ (fiber)	11 - 16
ส่วนประกอบในน้ำอ้อย	เปอร์เซ็นต์จากของแข็งที่ละลายได้ (%)
น้ำตาล (sugar)	75 - 92
ซูโครส (Sucrose)	70 - 88
กลูโคส (glucose)	2 - 4
ฟรุคโตส (fructose)	2 - 4
เกลือ (salts)	3.0 - 4.5
เกลือของกรดอินทรีย์	1.5 - 4.5
เกลือของกรดอินทรีย์	1.0 - 3.0
กรดอินทรีย์อิสระ (organic acid)	1.5 - 5.5
กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acids)	1.1 - 3.0
กรดอะมิโน (amino acid)	0.5 - 2.5
สารอื่นที่ไม่ใช่น้ำตาล (Other organic nonsugars)	
โปรตีน (protein)	0.5 - 0.6
แป้ง (starch)	0.001 - 0.050
ยาง (gums)	0.30 - 0.60
ไขและไขมัน (wax and fats)	0.05 - 0.15
สารอื่นๆ	3.0 - 5.0

2.3 ไบโอพอลิเมอร์ชนิดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates; PHAs)

ในระยะเวลาที่ผ่านมาประกาศต่างๆทั่วโลกมีการตื่นตัวเรื่องปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมไม่ว่าจะเป็นปัญหาโลกร้อน ปัญหาน้ำเสีย ตลอดจนปัญหาการกำจัดของเสีย หรือขยะต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งขยะที่เกิดจากพลาสติกที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นต้องใช้เวลายาวนานหลายปีในการสลายตัว ดังนั้นในปัจจุบันการวิจัยพัฒนาและผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ (Biodegradable plastic) จึงเป็นแนวทางที่ได้รับการสนใจทั้งภาครัฐและเอกชน ซึ่งพลาสติกที่ย่อยสลายได้นี้มีหลายชนิด เช่น พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid ; PLA) พอลิบิวทีลีนซัคซิเนต (Polybutylene succinate ; PBS) และ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates ; PHAs) ซึ่งพลาสติกที่ย่อยสลายได้เหล่านี้จะถูกผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์โดยจะอยู่ในรูปของพอลิเมอร์ หรือเรียกว่า ไบโอพอลิเมอร์ (Biopolymer) ซึ่งปัจจุบันไบโอพอลิเมอร์ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากคือ สารในกลุ่มของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHAs) สารไบโอพอลิเมอร์ชนิดนี้ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1926 โดย Lemoigne นักวิทยาศาสตร์แห่ง Pasteur Institute ณ กรุงปารีส (Anderson และ Dawes, 1990)



ภาพที่ 2.3 ไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตและสกัดได้จากจุลินทรีย์ (ที่มา: <http://www.ucd.ie/biocata>)

PHAs ประกอบด้วยโมโนเมอร์หลัก คือ กรดไฮดรอกซีอัลคาโนอิก (hydroxyalkanoic acids) และสามารถจำแนกอย่างกว้างๆได้ 2 กลุ่มตามความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่ (R) ในหน่วยโมโนเมอร์ คือ ความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่สั้น ซึ่งโมโนเมอร์จะประกอบด้วยอะตอมคาร์บอน 3 - 5 อะตอม และความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่ปานกลาง ซึ่งโมโนเมอร์จะประกอบด้วยอะตอมคาร์บอน 6 - 14 อะตอม PHAs ที่ผลิตได้โดยทั่วไปประกอบด้วยโมโนเมอร์ 100 - 30,000 หน่วย และมีความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่สั้น ทั้งนี้ PHAs มีปริมาณผลึกในโครงสร้างสูง (ร้อยละ 60 - 70) จึงทำให้พอลิเมอร์ มีความต้านทานต่อตัวทำละลายต่างๆดีมากและความต้านทานต่อไขมันและน้ำมันปานกลางถึงดี นอกจากนี้ยังมีความต้านทานต่อรังสี UV ดี แต่ไม่ทนต่อการกัดและต่าง เนื่องจาก PHAs มีการแพร่ผ่านของก๊าซออกซิเจนต่ำ ทำให้สามารถใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ที่ไม่ต้องการให้สัมผัสกับอากาศ และยังสามารถใช้ความร้อนในการขึ้นรูปได้ง่าย ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว PHAs จะมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ พอลิโพรพิลีน (Polypropylene ; PP) (Evan และ Sikdar, 1990) ดังตารางที่ 2.2 แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆของสาร PHAs กับพลาสติกสังเคราะห์ชนิดพอลิโพรพิลีน ค่าอุณหภูมิจุดหลอมเหลว (Melting point) มีค่าใกล้เคียงกันมาก รวมทั้งค่าร้อยละของการเกิดผลึก (Crystallinity) ดังนั้นเมื่อพิจารณาตามคุณสมบัติทั่วไปแล้วสามารถเรียกได้ว่า PHAs นี้เป็น Thermoplastic อีกชนิดหนึ่ง

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของ PHB เทียบกับ พอลิโพรพิลีน (Evan และ Sikder, 1990)

Property	PHB	Polypropylene
Melting point, °C	175	176
Crystallinity, %	80	70
Molecular weight, daltons	5×10^5	20×10^5
Glass transition, °C	15	-10
Density, g/cm ³	1.25	0.905
Tensile strength, Mpa	40	38

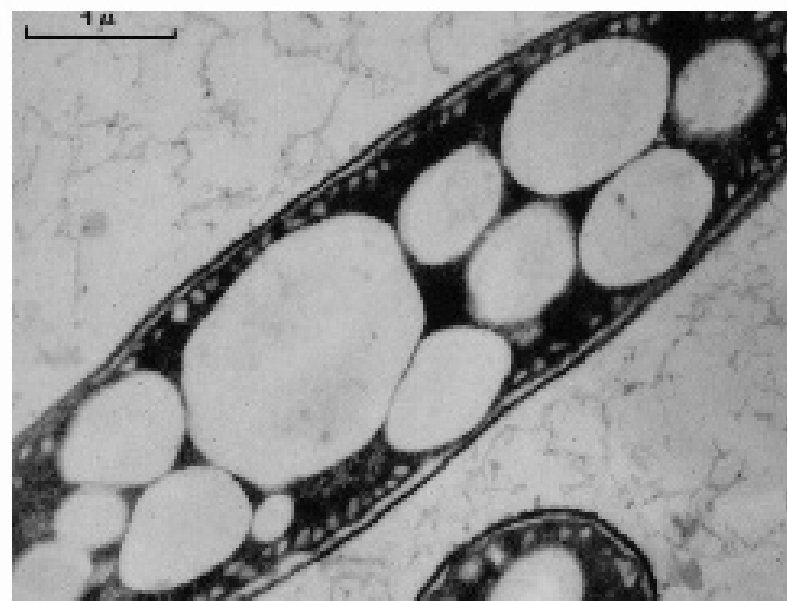
ในปัจจุบันการใช้ประโยชน์จาก PHAs สามารถใช้ได้หลายลักษณะโดยทั่วไปแล้วในโรงงานอุตสาหกรรมมีการผลิต PHAs เพื่อเป็นบรรจุภัณฑ์ หลากๆชนิด ไม่ว่าจะเป็น ขวด ถัง หรือใช้เป็นฟิล์มเคลือบกระดาษ (Steinbuchel และ Fuchtenbusch, 1998) ในด้านการเกษตรจะใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช หรือปุ๋ยตามช่วงเวลาที่กำหนด หรือแม้กระทั่งในทางการแพทย์ เช่น เป็นวัสดุห่อหุ้มตัวยานหรือฮอร์โมนต่างๆ หรือใช้เป็นไหมละลายเย็บแผล เนื่องจาก PHAs มีความสามารถในการเข้ากันได้กับระบบชีวภาพ (biocompatible) ความสามารถถูกดูดซึม (bioresorbable) ในกระบวนการในร่างกายทำให้ไม่มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ของมนุษย์ และยังสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) แต่ทั้งนี้การใช้ PHAs ในทางการแพทย์นี้ยังมีข้อจำกัดคือ PHAs ที่ได้ยังไม่มีความบริสุทธิ์เพียงพอ และต้นทุนราคายังถือว่าสูงกว่าวัสดุชนิดอื่น

2.4 จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs (PHAs producing microorganisms)

ในปัจจุบันการผลิต PHAs จะสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เชื่อกันว่า PHAs ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นนี้จะทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมคาร์บอนและพลังงาน นอกจากนี้ยังอาจทำหน้าที่ควบคุมปริมาณและสัญญาณแคลเซียมในเซลล์ โดยที่การผลิต PHAs นั้นจะเกิดขึ้นหลังจากการเจริญของจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะสูงสุดแล้ว และการสะสม PHAs ภายในเซลล์จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ของจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล (Nutrient imbalance) โดยมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป ในขณะที่ปริมาณ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจนมีอย่างจำกัด โดยที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีการสะสม PHAs แตกต่างกัน ขึ้นกับสภาวะการเพาะเลี้ยง หรือขึ้นกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์นั้นๆ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต PHAs สามารถจำแนกได้ตามการเลี้ยงเชื้อ ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มที่ต้องการสารอาหารที่จำเป็นในปริมาณจำกัด (Limiting substrate) เช่น ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม ไนโตรเจน หรือซัลเฟอร์ จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่ แบคทีเรีย *Ralstonia eutrophus*, *Protomonas oleovorans* เป็นต้น
2. กลุ่มที่ไม่ต้องการสารอาหารที่จำเป็นในปริมาณจำกัด (Non-Limiting substrate) สามารถสะสมพอลิเมอร์ระหว่างการเจริญเติบโต จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่ แบคทีเรีย *Azotobacter vinelandii*, recombinant *E. coli* และ *Alcaligenes latus*



ภาพที่ 2.4 *A. latus* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นแท่งสั้น โคโลนีเดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นๆ (<http://www.nrc-cnrc.gc.ca/fra/actualites/cnrc/2007/03/07/marche-sirop-erable.html>)

ภาพที่ 2.4 แสดงจุลินทรีย์ชนิด *A. latus* ซึ่งที่ไม่ต้องการสารอาหารที่จำเป็นในปริมาณจำกัด เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นแท่งสั้น โคโลนีเดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นๆ เมื่อพิจารณาปริมาณการสะสมของ PHAs ในเซลล์ของจุลินทรีย์ต่างๆ ดังตารางที่ 2.3 พบว่าจุลินทรีย์จำพวก *Alcaligenes* spp. นั้นสามารถสะสม PHAs ได้มากที่สุด ถึง 96 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แห้ง

ตารางที่ 2.3 ปริมาณ PHAs ที่สะสมในจุลินทรีย์แต่ละชนิด
(<http://members.rediff.com/jogsn/BP6.htm>)

ชนิดของจุลินทรีย์	น้ำหนักต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (%)
<i>Ralstonia eutropha</i>	96
(reclassified <i>Alcaligenes eutrophus</i>)	75
<i>Azospirillum</i>	73
<i>Azotobacter</i>	57
<i>Baggiatoa</i>	67
<i>Leptothrix</i>	70
<i>Methylocystis</i>	67
<i>Pseudomonas</i>	57
<i>Rhizobium</i>	80
<i>Rhodobacter</i>	

เมื่อพิจารณาในแง่ของการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันยังพบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการผลิต PHAs ที่แตกต่างกัน เช่น *R. eutropha* หรือ *A. eutrophus* นั้นสามารถใช้น้ำตาลฟรุกโตสได้ดี (Khanna และ Srivastava, 2005) *A. latus* สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ดี (Grothe และคณะ 1999) *Azotobacter valandii* สามารถใช้กลูโคสได้ดี *PS. oleovolan* สามารถใช้ n-octane ได้ดี และยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุกรรมสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิต PHAs ได้หลากหลาย เช่น *E. coli* เป็นต้น

จากข้อมูลในตารางที่ 2.4 จะเห็นได้ว่าแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้นมีหลากหลายชนิด การเลือกแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ เนื่องจากเหตุผลทางด้านราคาของวัตถุดิบหรือแหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยจำกัดหลักของการผลิต PHAs (Choi และ Lee, 1997) ทำให้ในปัจจุบันการใช้จุลินทรีย์ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุกรรมมาผลิต PHAs ได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งเช่น การนำ *E. coli* ที่มีการปรับแต่งพันธุกรรม (Recombinant *E. coli*) มาเลี้ยงในกากน้ำตาลเพื่อผลิต PHAs ซึ่ง กากน้ำตาลเป็นของเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำตาลและมีราคาถูก

ตารางที่ 2.4 การผลิต PHAs โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (Lee, 1996)

Bacterium	PHA	Major carbon source	Culture time(h)	Cell conc. (g/L)	PHA conc. (g/L)	PHA content (%)	Productivity (g/L.h)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Glucose	50	164	121	76	2.42
<i>A. eutrophus</i>	P(3HB)	CO ₂	40	91.3	61.9	67.8	1.55
<i>A. eutrophus</i>	P(3HB)	Tapioca hydrolysate	59	106	61.9	57.5	1.03
<i>A. eutrophus</i>	P(3HB-co-3HV)	Glucose+propionic acid	46	158	117	74	2.55
<i>Alcaligenes latus</i>	P(3HB)	Sucrose	18	143	71.4	50	3.97
<i>Alcaligenes. latus</i>	P(3HB)	Sucrose	D=0.16h ⁻¹	-	16.2	-	2.6
<i>Azotobacter vinelandii</i>	P(3HB)	Glucose	47	40.1	32	79.8	0.68
<i>Chromobacterium violaceum</i>	P(3HV)	Valeric acid	-	39.5	24.5	62	-
<i>Methylobacterium organophilum</i>	P(3HB)	Methanol	70	250	130	52	1.68
<i>Protomonas extoquens</i>	P(3HB)	Methanol	170	233	149	64	0.88
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	P(3HBx-co-3HO)	n-Octane	D=0.2h ⁻³	11.6	2.9	25	0.58
<i>P. oleovorans</i>	P(3HBx-co-3HO)	n-Octane	38	37.1	12.1	33	0.32
Recombinant <i>Escherichia coli</i>	P(3HB)	Glucose	39	101.4	81.2	80.1	2.08
Recombinant <i>Klebsiella aerogenes</i>	P(3HB)	Molasses	32	37	24	65	0.75

2.5 แหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs

จากที่กล่าวมาแล้วว่าการขยายการผลิตไบโอพอลิเมอร์ขึ้นสู่ระดับอุตสาหกรรมนั้นมีข้อจำกัดสำคัญอยู่ที่ต้นทุนของวัตถุดิบ ซึ่งการพิจารณาถึงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHAs ที่เหมาะสมนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญ โดยเฉพาะปัจจัยด้านราคาของวัตถุดิบนั้น ดังนั้นงานวิจัยในปัจจุบันได้มีการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการผลิต PHAs ซึ่งการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันนั้นก็ทำให้โครงสร้างของ PHAs ที่ผลิตได้แตกต่างกันด้วย (Steinbuchel และ Valentin, 1995)

Bassas และคณะ (2006) ได้ทดลองนำกรดไขมันที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนอะตอมแตกต่างกันมาใช้ในการผลิต PHAs โดยจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* NCIBIM 40045 พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิต ไบโอพอลิเมอร์ PHAs ได้ โดยให้น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) อยู่ในช่วง 200-230 กิโลดาลตัน (KDa) Khanna และ Srivastava (2005) ทดลองใช้แหล่งคาร์บอนหลากหลายชนิด เช่น น้ำตาลฟรุกโตส กรดแลกติก น้ำตาลซูโครส กากน้ำตาล กลีเซอรอล น้ำตาลกลูโคส กรดอะซิติก โซลอส กรดโพรไพโอนิก แป้ง และน้ำตาลแลคโตส โดยจุลินทรีย์ *Ralstonia eutropha* ซึ่งให้ผลว่าจุลินทรีย์สามารถผลิต PHAs ได้สูงสุดจากการใช้น้ำตาล ฟรุกโตส

Yu และคณะ (2005) ศึกษาผลของการป้อนน้ำตาลกลูโคสและโซเดียมโพรไพโอเนต ในการผลิต PHBV ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ของ PHAs อีกชนิดหนึ่ง โดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าการป้อนโซเดียมโพรไพโอเนต ที่มีความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร จุลินทรีย์จะสะสม HB ต่อ HV ในอัตราส่วน 70 ต่อ 30 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ โซเดียมโพรไพโอเนตเป็น 7 กรัมต่อลิตร จุลินทรีย์จะสะสม HB ต่อ HV ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 แสดงให้เห็นว่าโซเดียมโพรไพโอเนต ที่ป้อนเข้าไปในระหว่างการผลิต PHAs สามารถเพิ่มอัตราส่วนของโคพอลิเมอร์ HV ได้ดีขึ้น

Lee และ Gilmore (2006) ได้ใช้จุลินทรีย์ *R. eutropha* เพื่อนำมาหมักของเสียจากอุตสาหกรรมไอศกรีม ซึ่งสามารถผลิต PHAs เท่ากับ 16.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไขมัน

Grothe และคณะ (1999) ทดลองสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs แบบกะโดยใช้ น้ำตาลซูโครส เริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ *A. latus* ATCC 29713 หลังจากกระบวนการหมักพบว่าจุลินทรีย์สามารถให้ผลผลิตสูงสุดของ PHAs เป็น 2.97 กรัมต่อลิตร

Liu และคณะ (1998) ได้ใช้จุลินทรีย์ *E. coli* ที่ผ่านการปรับแต่งพันธุกรรม เพื่อผลิต PHAs จากกากน้ำตาลโดยการหมักแบบกะ พบว่าจุลินทรีย์สามารถสะสม PHAs จากกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลได้ 40 กรัมต่อลิตร ได้ถึง 77 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์แห้ง

Lee และคณะ (1994) ได้ตรวจสอบ *E. coli* ที่ได้รับ DNA สายผสม ในการผลิต PHAs โดยใช้อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ซึ่ง *E. coli* สายพันธุ์ XL1-blue เมื่อเจริญใน Lactose Broth ร่วมกับการเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดการสะสม PHAs ในเซลล์มากขึ้นเท่ากับ 0.369 กรัม PHAs ต่อ กรัม glucose หรือเท่ากับ 7 กรัม PHAs ต่อลิตร

จะเห็นได้ว่าการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันนั้น ก็จะทำให้ผลผลิตของ PHAs ที่แตกต่างกัน ปัจจัยด้านราคาของแหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ ดังนั้นการสรรหาแหล่งวัตถุดิบที่มีราคาถูกนั้นจะสามารถช่วยให้การผลิต PHAs สามารถเติบโตเข้าสู่ระดับอุตสาหกรรม ซึ่งในต่างประเทศไม่ว่าจะเป็น บราซิล อเมริกา หรือประเทศทางสหภาพยุโรป ได้มีการผลิตกันอย่างจริงจัง แต่ PHAs ที่ผลิตได้ยังมีราคาแพง ประเทศไทยนั้นได้เปรียบประเทศอื่นๆ ในด้านของความหลากหลายของวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในการผลิต PHAs โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัตถุดิบทางการเกษตรไม่ว่าจะเป็นแป้งมันสำปะหลัง อ้อย หรือแม้กระทั่งข้าวฟ่างหวาน ที่ให้ผลผลิตสูง

รวมทั้งราคายังอยู่ในเกณฑ์ต่ำ และสามารถเพาะปลูกได้ตลอดปี ดังนั้นแนวทางของการผลิต PHAs ในประเทศไทยจึงได้เปรียบประเทศอื่นๆ อีกมาก

2.6 กระบวนการหมักเพื่อผลิต PHAs (Fermentation processes for PHAs production)

สำหรับกระบวนการหมัก PHAs โดยทั่วไปนั้นแบ่งได้ 3 วิธีดังนี้

2.6.1 การหมักแบบกะ (Batch fermentation)

การเพาะเลี้ยงแบบกะเป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่กำหนดปริมาตรไว้แน่นอนในระยะเวลาที่เหมาะสม จุลินทรีย์จะเจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่กำหนด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมจะเกิดจากการสะสมของของเสีย หรือผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์วิธีนี้ถือเป็นระบบปิด คือมีการกำหนดปริมาตรเริ่มต้นของอาหารไว้ โดยที่อัตราการเจริญเติบโตจะลดลงเรื่อยๆ และมีแนวโน้มเป็นศูนย์เนื่องจากสภาวะการขาดแคลนอาหารและจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม (สาโรจน์ และคณะ 2544)

สำหรับกระบวนการหมักแบบกะเพื่อผลิต PHAs นี้ ได้มีการค้นคว้าวิจัยมาเป็นเวลานาน โดยที่กระบวนการหมักแบบกะนั้น จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตจะมีการสะสม PHAs หลังจากกระบวนการเจริญสูงสุด และแหล่งไนโตรเจน หรือฟอสฟอรัส เริ่มจะขาดแคลน และการเก็บเกี่ยว PHAs ออกจากเซลล์จุลินทรีย์จะเก็บครั้งเดียวเมื่อจุลินทรีย์มีการสะสมของ PHAs สูงสุด โดยที่ระยะเวลาของการเก็บเกี่ยวขึ้นขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ และชนิดของแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่า จุลินทรีย์ *A. eutrophus* เมื่อหมักแบบกะโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน เวลาในการเก็บเกี่ยวก็จะแตกต่างกัน รวมทั้งปริมาณของ PHAs ที่ผลิตได้ก็จะแตกต่างกันด้วย

2.6.2 การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation)

การหมักแบบกึ่งกะหรือการหมักแบบครั้งคราวเป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะในสภาพที่มีภาวะการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จากวัตถุดิบเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นสูง และสามารถให้อัตราผลผลิต (Productivity) และจำนวนเซลล์ สูงกว่าการหมักแบบกะ โดยการหมักแบบกึ่งกะจะควบคุมอัตราการเติมอาหารที่จะทำให้การเพาะเลี้ยงอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตหรือเกิดผลิตภัณฑ์ตลอดเวลา โดยการเติมอาหารจะเติมลงไปอย่างต่อเนื่องแต่ไม่มีการเก็บเกี่ยวน้ำหมักออกจากระบบ (สาโรจน์ และคณะ 2544) ในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะเพื่อผลิต PHAs โดยส่วนมากจะมีการหมักโดย จุลินทรีย์ *A. lotus* เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากสามารถให้ผลผลิตของเซลล์สูงและ จุลินทรีย์ชนิดนี้ยังสามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก เช่นน้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน

2.6.3 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องนั้นเป็นการแก้ปัญหาของการขาดสมดุลของสภาวะการหมัก ซึ่งเป็นการแก้ปัญหาของการหมักแบบกะ ที่การเจริญของจุลินทรีย์ถูกจำกัดโดยผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเอง (Product inhibition) การหมักแบบต่อเนื่องจะสามารถทำให้กระบวนการเจริญของจุลินทรีย์ดำเนินต่อไปได้ เนื่องจากการเติมอาหารใหม่ในอัตราการเติมที่เหมาะสมลงไป ทำให้เกิดสถานะคงตัว (Steady state) จุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตขึ้นใหม่จะมีความสมดุลกับจุลินทรีย์ที่ไหลออกจากถังหมัก (สาโรจน์ และคณะ 2544)

ในกระบวนการผลิต PHAs นั้นสามารถผลิตด้วยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ซึ่งจากการทดลองของ Yu และคณะ (2005) ได้ทดลองเพิ่มผลผลิตของโคพอลิเมอร์ PHAs โดยกระบวนการหมัก

แบบต่อเนื่อง โดยใช้โซเดียมโพรไพโอเนต (Sodium propionate) เป็นสารชักนำ พบว่าการเพิ่มอัตราส่วนของโคพอลิเมอร์จะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของโซเดียมโพรไพโอเนตด้วย และจากตารางที่ 2.3 การเลี้ยงจุลินทรีย์ *A. latus* แบบต่อเนื่อง โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิต PHAs ได้ 2.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมัก (Factors affecting on fermentation processes)

2.7.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Microorganism strain)

Steinbuechel (1991) ได้ศึกษาศักยภาพของการผลิต PHAs รวมทั้งองค์ประกอบของ PHAs จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ต่างกัน จะมีศักยภาพในการผลิต PHAs ได้ต่างกัน ตลอดทั้งโครงสร้างประกอบของ PHAs ที่แตกต่างกันด้วย และผลการทดลองของ Timm และคณะในปี ค.ศ. 1990 ก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากกลไกการสังเคราะห์ PHB จาก Butyric acid โดยใช้จุลินทรีย์ *Alcaligenes* spp. และ *Rhodospirillum rubrum* ก็สามารถอธิบายความแตกต่างของสายพันธุ์ต่อศักยภาพการผลิต PHAs ได้เช่นกัน

2.7.2 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source)

แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่มีผลต่อโครงสร้างและการสะสมของ PHAs ในเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งแหล่งไนโตรเจนจะเป็นปัจจัยที่ต้องมีการจำกัดเพื่อให้จุลินทรีย์มีการสะสมของ PHAs และผลจากการศึกษาของ Rhee และคณะ ในปี 1982 ได้ทำการทดลองผลิต PHAs จากจุลินทรีย์ *A. eutrophus* พบว่าเมื่อให้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน จะทำให้ได้ปริมาณของ PHAs และสัดส่วนของ 3HB/3HV แตกต่างกันไป ซึ่งแสดงในตารางที่ 2.5 ดังนี้

2.7.3 ระยะเวลาการหมัก (Fermentation time)

ผลการทดลอง Timm และคณะในปี ค.ศ. 1990 พบว่าการผลิต PHAs ของจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* หลังจากที่ถูกเลี้ยงเข้าสู่ระยะ Stationary phase แล้ว ปริมาณการสะสม PHAs ภายในเซลล์จะเริ่มลดลงซึ่งก่อนหน้านี้ Lageveen (1998) ผลิต PHAs จาก n-octane โดยใช้จุลินทรีย์ *Pseudomonas oleovorans* พบว่าช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเกี่ยว PHAs อยู่ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น แต่มีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่สามารถสะสม PHAs ไปพร้อมกับการเจริญเติบโตเช่น *A. latus* สามารถที่จะสะสม PHAs ไปพร้อมๆกับการเจริญ พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (Polyhydroxyalkanoates ; PHAs)

2.7.4 แร่ธาตุต่างๆ (Minerals)

จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ต้องการแร่ธาตุที่ต่างกันไป ทั้งนี้การจำกัดปริมาณของแร่ธาตุแต่ละชนิดจะต้องเหมาะสมกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตด้วย เช่น การผลิต PHAs โดยใช้ *P. oleovorans* จะต้องจำกัดปริมาณไนโตรเจนให้น้อยลงถึง 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น

2.7.5 อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง (Temperature / pH)

การผลิต PHAs มักจะผลิตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 7.0 ทั้งนี้สภาวะดังกล่าวอาจเหมาะสมกับการผลิต PHAs ของจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่

2.7.6 การให้อากาศ (Aeration)

จากการทดลองของ วนิดา วัฒนการุณ (2536) พบว่าการผลิต PHB จากจุลินทรีย์ *Ps. oleovorans* เมื่อให้ปริมาณของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ต่อปริมาณพลาสติกเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์จะเหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าซึ่งจะส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์ PHAs ได้สูง

ตารางที่ 2.5 แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อองค์ประกอบการผลิต PHAs (Rhee; 1982)

Carbon source	Nitrogen source	Cell dry Weigh (g/l)	PHAs content (wt%)	PHAs	
				3HB	3HV
Glucose	Yeast extract	3.2	45.2	98.4	1.6
	Urea	1.4	14.8	85.6	14.4
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.8	29.3	93.3	6.7
Sucrose	Yeast extract	1.5	18.9	98.3	1.7
	Urea	1.3	4.0	93.5	6.5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.2	15.1	92.0	8.0
Sorbitol	Yeast extract	3.1	44.8	93.4	6.9
	Urea	1.8	37.2	85.7	14.3
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.7	28.1	93.5	6.5
Mannitol	Yeast extract	3.4	58.7	94.1	5.9
	Urea	2.2	18.2	92.5	7.5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.8	29.0	93.3	6.7
Na-gluconate	Yeast extract	2.3	34.5	91.9	8.1
	Urea	1.6	5.3	78.1	21.9
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.7	41.1	66.7	13.3

2.8 การผลิต PHAs เชิงพาณิชย์

ในเชิงพาณิชย์ผู้ผลิตต้องพิจารณาปัจจัยต่างๆดังต่อไปนี้

2.8.1 จุลินทรีย์ที่นำมาเพาะเลี้ยงต้องเป็นชนิดที่เพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว

2.8.2 สารอาหารที่ใช้เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องนำมาใช้ในการพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์

เพราะค่าใช้จ่ายด้านสารอาหารเป็นค่าใช้จ่ายในการผลิต PHAs ดังนั้นจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ควรเป็นสายพันธุ์ที่ให้อัตราการผลิต PHAs สูง เมื่อเทียบกับปริมาณอาหารที่ให้

1.1 จุลินทรีย์ที่ผลิต PHAs ในเชิงพาณิชย์ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. จุลินทรีย์ที่สะสม PHAs ในเซลล์เพิ่มขึ้นได้โดยต้องมีการจำกัดธาตุอาหารที่สำคัญ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โพแทสเซียม ออกซิเจน หรือกำมะถัน เพื่อให้เกิดความเครียดกับจุลินทรีย์ แต่ต้องมีปริมาณคาร์บอนที่มากพอ ซึ่งจุลินทรีย์จะเร่งสะสมพลังงานสำรอง (PHAs) ไว้ภายในเซลล์ ตัวอย่างจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ เช่น *A. eutrophus*, *Protomonas etorquens*, *P. oleovorans* เป็นต้น

2. จุลินทรีย์กลุ่มนี้ไม่จำเป็นต้องจำกัดธาตุอาหารเพื่อให้จุลินทรีย์สังเคราะห์ PHAs โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีความสามารถในการสังเคราะห์ PHAs ได้ด้วยตัวเอง ตลอดระยะการเจริญเติบโต ตัวอย่างจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เช่น *A. latus Azotobacter vielandii* สายพันธุ์กลายหรือ recombinant *E.coli* เป็นต้น

1.2 ตัวอย่างพลาสติกย่อยสลายได้ต่างๆ ที่ผลิตเป็นสินค้าระดับอุตสาหกรรมในต่างประเทศ

1. BKK (ไบเออร์ เยอรมันนี) ผลิตโดยใช้เทคโนโลยีพอลิเอสเตอร์เอไมด์ (Polyester amide technology) และไม่มีการใช้วัตถุดิบจากพืช ระยะเวลาร่อยสลาย ตัวอย่างเช่น พลาสติกขนาด 200 ไมครอน (0.2 มิลลิเมตร) จะใช้เวลาในการย่อยสลาย 1 เดือน พลาสติก BKK ที่ผลิตขึ้นมานี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับพลาสติกชนิด PE หรือ PP การนำมาใช้งานใช้ทำกระถางต้นไม้แบบย่อยสลายได้ ตะกร้าใส่ต้นไม้ ถุงขยะ ในครัวเรือนและผลิตผ้าอนามัย มีลักษณะเฉพาะทางอุตสาหกรรม คือ อัดและฉีดเสริมโครงสร้างได้ด้วยพีชจำพวก ป่าน ปอ ไม้ หรือชอล์ค มีกำลังการผลิต 4,000 ตันต่อปี

2. ECO-PLA (คาร์กิลโวลีเมอร์ สหรัฐอเมริกา) ผลิตโดยใช้เทคโนโลยีพอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid technology) จากน้ำจากข้าวโพดหรือหัวผักกาดหวานและมีการใช้วัตถุดิบจากพืช ระยะเวลาร่อยสลาย 4-6 สัปดาห์ พลาสติก ECO-PLA ที่ผลิตขึ้นมานี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับพลาสติกชนิด PE, PP, PS หรือ PET การนำมาใช้งาน เช่น ใช้ทำแผ่นฟิล์มในเกษตรกรรม กระป๋องโยเกิร์ต แผ่นรองซับผ้าอ้อมหรือสิ่งทอ (ผสมฝ้าย) ราคาประมาณ 49 บาทต่อกิโลกรัม มีลักษณะเฉพาะทางอุตสาหกรรมคือ เป่า อัด ฉีด ขึ้นรูปเชื่อมที่อุณหภูมิต่ำ มีกำลังการผลิต 13,000 ตันต่อปี

3. Biopol (มอนซานโต สหรัฐอเมริกา) ผลิตโดยการหมักน้ำตาลโดยจุลินทรีย์ ในอนาคตอาจผลิตได้จากพืชโดยอาศัยความก้าวหน้าทางพันธุวิศวกรรม มีการใช้วัตถุดิบจากพืช ใช้เวลาในการย่อยสลายหลายสัปดาห์ถึงหลายเดือน พลาสติก Biopol ที่ผลิตขึ้นมานี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับพลาสติกชนิด PVC, PE หรือ PP การนำมาใช้งาน ใช้ในการบรรจุอาหาร บรรจุภัณฑ์สำหรับผลิตภัณฑ์เคมีทางการเกษตร เคลือบกระดาษ ทำที่วางลูกกอล์ฟ ตาข่ายดักปลา เครื่องโหนดไฟฟ้า ราคาต่อกิโลกรัมละ 560 บาท มีเป้าหมายที่จะทำให้อาชีพลดลงสิบเท่าตัวก่อนปี ค.ศ.2005 ด้วยการใชพืชที่พัฒนาทางพันธุวิศวกรรม มีลักษณะทางอุตสาหกรรม คือ ฉีด เป่า อัด มีกำลังการผลิต 1,000 ตันต่อปี

4. Mate-Bi (โนวันมอนต์ อิตาลี) การผลิตเป็นการผสมผสานกันระหว่างพอลิเมอร์ชีวภาพสังเคราะห์กับแป้งข้าวสาลี ข้าวโพด หรือมันเทศ มีการใช้วัตถุดิบจากพืช ระยะเวลาร่อยสลายตั้งแต่ 2-3 นาทีถึง 4 เดือน พลาสติก Mater-Bi ที่ผลิตขึ้นมีลักษณะคล้ายคลึงกับพลาสติกชนิด PE หรือ PP การนำมาใช้งานใช้ทำซองส้อมในร้านอาหารฟาสต์ฟู้ด หรือสำหรับบรรจุอาหาร โฟมกันกระแทก สลัดผักกันน้ำ ถุงหรือฟิล์มห่อของ ราคาต่อกิโลกรัมละ 175-210 บาท (สูงกว่าพอลิเมอร์ที่ใช้อยู่ 3 เท่า) มีลักษณะเฉพาะทางอุตสาหกรรม คือ หลอมด้วยความร้อนตามวิธีทั่วไป ฉีด อัด เป่า มีกำลังการผลิต 8,000 ตันต่อปี

5. Biomax (ดูปองท์ สหรัฐอเมริกา) ผลิตโดยใช้เทคโนโลยี PET (Polyethylene technology) และมีการใช้วัตถุดิบจากพืชระยะเวลาร่อยสลาย 8 สัปดาห์ โดยมีผลพอลิเอสเตอร์ที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าอัตราส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ตกค้างและจะสลายไปในเวลา 9 เดือน ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ต่อการย่อยสลายพลาสติก Biomax ที่ผลิตขึ้นมานี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับพลาสติก ชนิด PE, PP หรือพอลิเอสเตอร์ การนำมาใช้งานในการผลิตแผ่นรองซับผ้าอ้อม แผ่นฟิล์มสำหรับรองพลาสติกหลายชั้น (Lamination) กระถางต้นไม้ ถุงหมัก ราคาประมาณ 196 บาทต่อกิโลกรัม มีลักษณะเฉพาะทางอุตสาหกรรม คือ ฉีดขึ้นรูป มีกำลังการผลิต 30,000 ตันต่อปี

6. Plymat (โรเวอร์ช ฝรั่งเศส) ผลิตโดยการทำแป้งข้าวไรซ์ให้เป็นเจล เปลี่ยนให้มีโครงสร้างแข็งแรงยืดหยุ่นด้วยแอลกอฮอล์ธรรมชาติ ตามกระบวนการของสถาบันวิจัยพืชเยอรมัน (IGV) มีการใช้วัตถุดิบ

จากพืช พลาสติก Polymat ที่ผลิตขึ้นนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับพลาสติกชนิด PE หรือ PP การนำมาใช้งานใช้ทำงาน และช้อนส้อมในร้านอาหาร รางให้อาหารสัตว์ที่เลี้ยงตามทุ่งหญ้า ใช้ระยะเวลาในการย่อยสลาย 4-6 สัปดาห์ สำหรับการแตกตัว และอีก 6 เดือน สำหรับการย่อยสลาย ราคา กิโลกรัมละ 84-126 บาท มีลักษณะเฉพาะทางอุตสาหกรรมคือ ฉีดเข้าเป้าหมายทางท่อที่ร้อน เสริมโครงสร้างด้วย ไฟเบอร์ของป่าน ปอ และลินิน มีกำลังการผลิตประมาณ 5,000 ตันต่อปี

2.9 การย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradability)

PHAs สามารถย่อยสลายได้ในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น ในดิน น้ำ (ทั้งในน้ำจืดและน้ำทะเล) สิ่งเน่าเปื่อย (compost) และในสภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic condition) และไม่มีออกซิเจน (Anaerobic condition) หรือมีน้อย (Anoxic condition) เช่น โรงบำบัดน้ำเสีย ในกรณีของ Biopol® พบว่า PHAs สามารถย่อยสลายเกือบสมบูรณ์ภายในเวลา 10 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 55 และอัตราส่วน C:N เท่ากับ 18:1 โคพอลิเมอร์ PHB/PHV ในอัตราส่วนร้อยละ 92/8 โดยน้ำหนัก สามารถย่อยสลายเกือบสมบูรณ์ภายในเวลา 20 วัน ภายใต้สภาวะการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนในน้ำทิ้ง ในขณะที่พอลิเอสเตอร์สังเคราะห์อื่นๆ เช่น PLA PBS และ PBSA ยังไม่เกิดการย่อยสลายขึ้นภายในเวลา 100 วัน ภายใต้สภาวะเดียวกัน ภายใต้สภาวะฝังกลบโคพอลิเมอร์ PHBV สามารถย่อยสลายภายในเวลา 6 เดือน พอลิเอสเตอร์สังเคราะห์ที่มีโครงสร้างสายโซ่ตรงจะมีการสูญเสียน้ำหนักอย่างเห็นได้ชัดภายในเวลา 1 ปีในดินที่ใช้ในการเพาะปลูก และการสูญเสียน้ำหนักนี้ยังสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่เป็นกรดอันเนื่องมาจากการย่อยสลายของเศษอาหารซึ่งประกอบด้วยขยะของแข็งจากชุมชนร้อยละ 34 โดยประมาณ

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

(Research methodology)

3.1 วัตถุดิบ (Raw materials)

แบ่งออกเป็น 2 ชนิดได้แก่

- 1) น้ำอ้อยที่ผ่านการหีบ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานน้ำตาลมิตรผล อ.ภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ
- 2) น้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวาน สายพันธุ์ มข. 40 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัยการผลิตเอทานอลเป็นพลังงานทดแทนจากข้าวฟ่างหวานของ รศ.ดร.ประสิทธิ์ ใจศีล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2 จุลินทรีย์ (Microorganisms)

จุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ซึ่งสั่งซื้อมาจากศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กรุงเทพมหานคร ประกอบด้วย

1. แบคทีเรีย *Alcaligenes latus* TISTR 1403
2. แบคทีเรีย *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095
และสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณที่ปลูกอ้อย ได้แก่
3. แบคทีเรีย *Hydrogenophaga* sp.
4. แบคทีเรียที่ได้จากการคัดแยกจากดิน (*Bacillus* SV13)

3.3 วัสดุและอุปกรณ์ (Materials and Equipments)

แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังต่อไปนี้

3.3.1 เครื่องมือวัดและวิเคราะห์ (Analytical machines)

1. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
2. เครื่องปั่นความเร็วสูง (Centrifuge)
3. หม้อนึ่งอัดความดัน (Auto clave)
4. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
5. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balances)
6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
7. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร
8. ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven)
9. ตู้บ่มแบบเขย่า (Incubator shaker)
10. เครื่องวัดความหวาน (Hand refractometer)
11. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
12. กล้องจุลทรรศน์ (Microscopy)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
14. หม้อนึ่งอัดความดัน (Auto clave)

15. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
16. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow)
17. ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven)
18. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
19. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Fermenter) ขนาด 3 ลิตร
20. เครื่องวัดความหวาน (Hand refractometer)
21. เครื่องวัดจุดหลอมเหลว (Differential scanning calorimetry ; DSC)
22. เครื่องวัดอุณหภูมิการย่อยสลาย (Thermo-gravimetry; TG)

3.3.2 อุปกรณ์ (Equipments)

1. ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. กระบอกตวงขนาด 100 และ 1000 มิลลิลิตร
3. ปีกเกอร์ขนาด 50 และ 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร
4. ไมโครปิเปตขนาด 200, 1000 และ 10000 ไมโครลิตร
5. ซ้อนตักสาร
6. สายยาง
7. ขวด Vial
8. ไมโครทิวบ์
9. แท่งแก้วคนสาร
10. โถดูดความชื้น
11. คลิปหนีบกระดาษ
12. ซ้อนตักสาร
13. สายยางซิลิโคน
14. ขวด Vial
15. ไมโครทิวบ์
16. แท่งแก้วคนสาร
17. โถดูดความชื้น
18. จานอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

3.3.3 สารเคมี (Chemicals)

1. ไดแอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$
2. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
3. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$
4. แมกนีเซียมซัลเฟต $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$
5. โซเดียมโมลิบเดต $(\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$
6. คอปเปอร์ซัลเฟต $(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$
7. คลอโรฟอร์ม (CHCl_3)
8. โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl 6% active chlorine)
9. เมทานอล (CH_3OH)

10. อะซีโตน (C_3H_6O)
11. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)
12. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)
13. ยูเรีย ($(NH_2)_2CO$)
14. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
15. ไอรอนซัลเฟต ($FeSO_4$)
16. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)
17. กรดบอริก (H_3BO_3)
18. โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)
19. ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)
20. แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)
21. โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4 \cdot 4H_2O$)
22. เมทานอล (CH_3OH)
23. อะซีโตน (C_3H_6O)

3.4 วิธีดำเนินการทดลอง (Methods)

ก) กรณีน้ำคั้นข้าวฟ่างหวาน (Sweet sorghum juice)

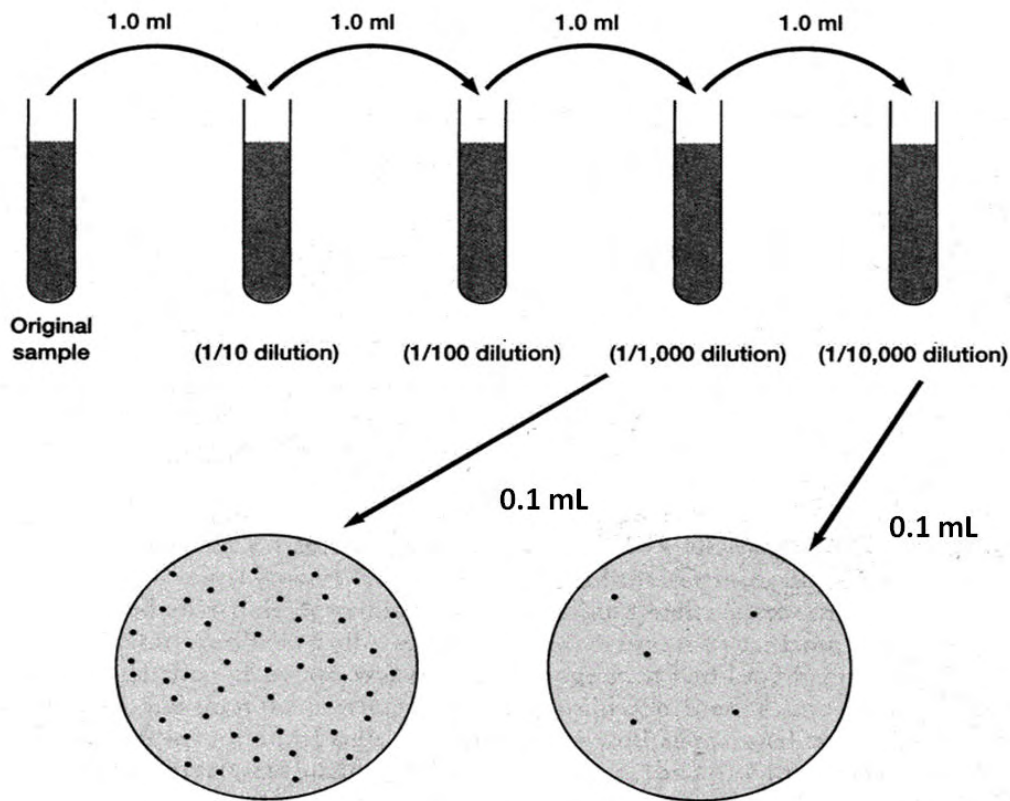
3.4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักในวัตถุดิบ

การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบหลักต่างๆในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลองนี้จะเป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญที่มีผลต่อกระบวนการหมักเพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ (PHAs) โดยที่น้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานที่ผ่านการคั้นจากลำต้นแล้วจะนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ยังไม่ได้นำไปหมักทันที จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน ดังนี้ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลซูโครส โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดโดยวิธี ฟีนอล-ซัลฟูริก (Phenol-sulfuric acid) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Brix) โดยใช้แฮนด์รีแฟรคโตมิเตอร์ (Hand refractometer) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี เจตาล (Total Kjeldahl Nitrogen;TKN) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้พี-เอชมิเตอร์ (pH meter)

3.4.2 การศึกษาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอพอลิเมอร์โดยใช้น้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์จากน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวาน โดยใช้จุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกจากดินในไร่อ้อย จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิง (Referenced strains) ที่สามารถผลิต PHAs ได้ 3 สายพันธุ์ดังนี้ จุลินทรีย์บริสุทธิ์สายพันธุ์ *A. eutrophus* TISTR 1095, *A. latus* TISTR 1403 และ *Hydrogenophaga* sp. การเก็บตัวอย่างดินจะเก็บตัวอย่างดินที่อยู่ในไร่อ้อยที่มีการผสมกากน้ำตาลเพื่อเป็นอาหารสำหรับอ้อยและเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสได้ดี โดยเก็บตัวอย่างดินลึกลงไปจากผิวดินประมาณ 15-30 เซนติเมตร จากนั้นนำดินดังกล่าวเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างดินที่ได้นำมาคัดแยกจุลินทรีย์โดยใช้ตัวอย่างดิน 1 กรัมเติมน้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (0.9% NaCl) แล้วนำไปเจือจางในระดับต่างๆ (Serial dilution method) ดังรูปที่ 3.1 นำตัวอย่างน้ำจากหลอดทดลอง 0.1 มิลลิลิตร ไปเกลี่ยเชื้อ (Spread plate) เพื่อให้จุลินทรีย์แยกออกมาเป็นโคโลนีเดี่ยวในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งอาหารเพียงอย่างเดียวโดยใช้ปริมาณน้ำตาลรวมเป็น 10 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะจำกัดแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen limitation) (ปรับปรุงจาก Grothe และคณะ 1990) โดยการเติมสี Nile blue A ซึ่งละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เป็น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$) (Spiekermann และคณะ 1999) จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วนำจานอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ส่องภายใต้ลำแสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 280 - 360 นาโนเมตร (nm) เพื่อสังเกตการณ์เรืองแสงของโคโลนี นำโคโลนีเดี่ยวที่มีการเรืองแสงมาเพาะเลี้ยงแล้วทดสอบการสะสม พี เอช เอ อีกครั้งโดยการย้อมสี Sudan black B และสังเกตการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีการสะสม พี เอช เอ นั้นจะมีการติดสีดำของ Sudan black B จุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกนั้นจะถูกจัดกลุ่มโดยการสังเกตเบื้องต้นจากลักษณะของโคโลนี และการติดสีของแบคทีเรีย ซึ่ง

จุลินทรีย์กลุ่มที่ถูกคัดเลือกจะนำไปเปรียบเทียบการผลิต PHAs กับจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิงทั้งสามสายพันธุ์ดังกล่าวเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมในการผลิต PHAs โดยใช้ น้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานต่อไป



ภาพที่ 3.1 การเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่า (Ten fold serial dilution method)

สำหรับกระบวนการหมักเพื่อเปรียบเทียบศักยภาพการผลิต PHAs ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์นั้น จะกำหนดให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้น (Total sugar) ที่ใช้ในการหมักเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารอาหารเร่งการผลิตไบโอพอลิเมอร์ หรือเรียกว่า Mineral salt medium ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยบรรจุอาหารในปริมาณ 100 มิลลิลิตร เชยาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยกำหนดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เริ่มต้นให้เท่ากันในแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงภายในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เท่ากับ 0.1 (กล้าเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 2% โดยปริมาตร) ทั้งนี้เมื่อสิ้นสุดการหมักจะวิเคราะห์ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight; DCW) ปริมาณไบโอพอลิเมอร์ (PHAs) และปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดเพื่อสามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาประเมินความเหมาะสมสำหรับการเลือกใช้จุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ในระดับขยายขนาด ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร

3.4.3 การจำแนกบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน

จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินที่มีศักยภาพในการผลิตไบโอพอลิเมอร์สามารถบ่งบอกชนิดของจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี 16S rDNA และการหาลำดับเบสของจุลินทรีย์ (Sequencing method) จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้เขียนเป็นแผนภาพต้นไม้ (Phylogenetic tree)

3.4.4 การศึกษาค่าความเป็นกรด ต่าง ที่มีผลต่อการเจริญและผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs

จากข้อ 3.4.2 จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพที่จะนำมาผลิต พีเอชเอ จากน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานจะถูกนำไปเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานเป็นหลักโดยกำหนดค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นแปรผันแตกต่างกัน 9 ระดับดังนี้ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 หลังจากกระบวนการหมักเสร็จสิ้น (ประมาณ 24 ชั่วโมง) จะนำผลที่ได้ทำการทดลองต่อไป

3.4.5 การศึกษาชนิดของไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญและผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs

จุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกนั้นจะนำมาเลี้ยงเปรียบเทียบ แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนชนิดดังนี้ ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (No added) ยูเรีย (Urea) เปป्टอน (Peptone) ยีสต์สกัด (Yeast extract) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ในปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร จากผลที่ได้จะนำไปทำการทดลองต่อไป

3.4.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs จากน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวาน โดยใช้วิธีการหมักแบบกะ (Batch fermentation) ในระดับห้องปฏิบัติการ Flask scale)

1. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอพอลิเมอร์โดยการหมักแบบกะ

สำหรับการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมแก่การเจริญและผลิตไบโอพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมานี้จะใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design expert ver. 7.0 เพื่อออกแบบการทดลอง โดยขั้นแรกจะมีการคัดกรองปัจจัยหลัก (Main factor) ที่มีผลต่อการเจริญและผลิตไบโอพอลิเมอร์ โดยวิธีการของ Plackett และ Burman (1946) จากนั้นนำปัจจัยหลักที่มีผลมาทำการทดลองต่อโดยออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD) เพื่อให้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตไบโอพอลิเมอร์

2. การคัดกรองปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์

จากข้อ 3.4.2 สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักแล้ว จุลินทรีย์ที่ได้จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ ที่ได้จากการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design expert ver. 7.0 เพื่อออกแบบการทดลองโดยที่ให้อำนาจที่มีผลโดยแปรผันปัจจัยต่างๆดังนี้

ตารางที่ 3.1 การออกแบบการทดลองเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHAs

Factors	Name	Level	
		Low (-1)	High (+1)
A (g/L)	Total sugar	10	40
B(g/L)	KH_2PO_4	1	4
C(g/L)	Na_2HPO_4	1	4
D(g/L)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	0.4
E(g/L)	Urea	2	4
F(mL/L)	Trace element	1	5

การคัดกรองปัจจัยโดยวิธี Placket-burman design เพื่อใช้ในการคัดกรองปัจจัยที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติออก จากนั้นนำปัจจัยที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อตัวตอบสนองมาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิต PHAs โดยให้ ปริมาณน้ำหนักแห้งของจุลินทรีย์ (Dry cell weight (DCW)) และปริมาณไบโอพอลิเมอร์ (PHB) เป็นค่าตอบสนอง (Response) สำหรับการพิจารณาความเหมาะสมของสารอาหารและปริมาณของสารอาหารที่เติมเข้าไป โดยกำหนดระดับของปัจจัยที่จะใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ เป็นค่าต่ำและค่าสูงดังตาราง 3.1 มีรายละเอียดดังนี้ น้ำตาลรวม (Total sugar) ระดับต่ำ 10 กรัมต่อลิตร ระดับสูง 40 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ระดับต่ำ 1 กรัมต่อลิตร ระดับสูง 4 กรัมต่อลิตร ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ระดับต่ำ 0.5 กรัมต่อลิตร ระดับสูง 4 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ระดับต่ำ 0.1 กรัมต่อลิตร ระดับสูง 0.4 กรัมต่อลิตร ยูเรีย (Urea) ระดับต่ำ 1 กรัมต่อลิตร ระดับสูง 4 กรัมต่อลิตร และสารอาหารรอง (Trace element) ระดับต่ำ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ระดับสูง 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการทดลองจะได้ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตพีเอชเอ ปัจจัยดังกล่าวจะนำไปออกแบบการทดลองต่อโดยใช้การออกแบบการทดลอง โดยการออกแบบพื้นผิวตอบสนองต่อไป (Response Surface Methods and Designs; RSM)

ตารางที่ 3.2 การทดลองแบบ Placket-Burman design (N=12)

Expt. no.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1
2	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
3	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
6	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1
7	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1
8	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
9	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
10	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1
11	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
12	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1

หมายเหตุ ปัจจัย A-F เป็นปัจจัยที่จะกลั่นกรอง และปัจจัย G-L เป็น Dummy variables

ตารางที่ 3.3 การทดลองแบบ Placket-Burman design (N=12) จากค่าจริง

Expt. no.	A (g/L)	B (g/L)	C (g/L)	D (g/L)	E (g/L)	F (g/L)	Responses	
							DCW (g/L)	PHB (g/L)
1	10	1	4	0.1	4	5		
2	10	1	1	0.4	2	5		
3	40	1	4	0.4	2	5		
4	40	1	4	0.4	4	1		
5	40	1	1	0.1	4	1		
6	10	4	4	0.1	4	5		
7	40	4	1	0.1	2	5		
8	40	4	4	0.1	2	1		
9	10	4	4	0.4	2	1		
10	10	4	1	0.4	4	1		
11	10	1	1	0.1	2	1		
12	40	4	1	0.4	4	5		

หมายเหตุ จากตารางเป็นค่าจริงที่จะนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารแต่ละสภาวะและทำการทดลองโดยการสุ่มสิ่งทดลอง และดำเนินการตามกรรมวิธีดังตารางที่ 3.3

จากรูปปัจจัยที่มีการแปรผันในการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอพอลิเมอร์ในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรโดยบรรจุอาหารในปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเท่ากับร้อยละ 2 โดยปริมาตร ซึ่งในชุดการทดลองนี้ประกอบด้วยชุดการทดลองทั้งหมด 12 ชุด โดยที่ในกระบวนการหมักภายในแต่ละชุดการทดลองจะติดตามปัจจัยตอบสนองต่อกระบวนการหมักเพื่อการผลิตและสะสมไบโอพอลิเมอร์ดังต่อไปนี้

1. การเจริญของจุลินทรีย์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD 600 nm) (Patwardhan และ Srivastava, 2004)

2. น้ำหนักแห้งของเซลล์จุลินทรีย์ (Biomass)

การวัดน้ำหนักแห้งของเซลล์จุลินทรีย์นั้นจะสามารถวัดโดยใช้อาหารที่มีการเจริญของ จุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Micro centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสออกแล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ แล้วนำไปทำให้เย็นในตู้ดูดความชื้น (Desicator) จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักแห้งโดยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3. ปริมาณไบโอพอลิเมอร์ (PHAs) สามารถวิเคราะห์ได้ดังนี้ (Law และ Slepecky, 1960)

3.1 นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และเติม 6 % Active chlorine ของ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในตัวอย่าง

3.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์

3.3 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยเครื่องเซนติฟิวก์ที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสทิ้งแล้ว ล้างตะกอน ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

3.4 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.5 เทตัวอย่างลงในหลอดทดลองแล้วเติมคลอโรฟอร์มร้อน (60 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เพื่อให้คลอโรฟอร์มสกัดเอา PHAs ที่อยู่ในชั้นน้ำออกมา

3.6 ดูดสารละลายในชั้นของคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไประเหยคลอโรฟอร์มออก จะได้ผงสีขาวของ PHAs ติดอยู่ข้างหลอด

3.7 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.8 ปลอຍให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร โดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น เป็น Blank แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ PHAs (Law และ Slepecky, 1960)

4. ปัจจัยอื่นๆ ที่ได้จากคำนวณในกระบวนการหมัก

4.1 ผลได้ของเซลล์ต่อปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ถูกใช้ไป ($Y_{x/s}$)

4.2 ผลได้ของปริมาณไบโอพอลิเมอร์ต่อปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ถูกใช้ไป ($Y_{p/s}$)

4.3 ผลได้ของปริมาณไบโอพอลิเมอร์ต่อปริมาณเซลล์ ($Y_{p/x}$)

หลังจากกระบวนการหมักสิ้นสุดแล้วจะนำข้อมูลของปริมาณของมวลเซลล์ที่เกิดขึ้นและปริมาณไบโอพอลิเมอร์ที่สะสมในเซลล์จุลินทรีย์ในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์ผลของความสัมพันธ์ของสารแต่ละชนิดว่ามีอิทธิพลต่อการผลิตมวลเซลล์และไบโอพอลิเมอร์หรือไม่ จากนั้นนำปัจจัยหลักที่มีผลต่อการทดลองมาวิเคราะห์เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ต่อไป

3.4.7 การศึกษากระบวนการหมักแบบกะเพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร

จากข้อมูลที่ได้จากกระบวนการหมักในระดับฟลasks ในข้อ 3.4.6 สามารถขยายขนาดของกระบวนการหมักแบบกะในระดับถังหมักขนาด 3 ลิตร โดยปริมาตรการทำงานภายในถังหมัก (Working volume) เป็น 1.5 ลิตร โดยใช้กล้าเชื้อของจุลินทรีย์ที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.4.2 ในปริมาณร้อยละ 2 โดยปริมาตร ให้อัตราการกวนเป็น 200 รอบต่อนาที และปริมาณอากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อนาที (vvm) ระหว่างกระบวนการหมักจะวิเคราะห์ปัจจัยต่างๆดังข้อ 3.4.6 ข้อมูลที่ได้ดังกล่าวจะนำไปใช้เป็นข้อมูลในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะต่อไป

3.4.8 การศึกษาการผลิตไบโอพอลิเมอร์โดยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ

หลังจากกระบวนการหมักแบบกะจะนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการหมักแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร โดยใช้ปริมาตรเริ่มต้นของการหมักเป็น 1 ลิตร ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดของน้ำคั้นข้าวฟ่างที่ใช้สำหรับการป้อน (Feed stock) เท่ากับ 70.17 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมอาหารเข้าสู่ถังหมักสองครั้ง ครั้งละ 250 มิลลิลิตร จนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1.5 ลิตร โดยมีการให้อากาศเข้าสู่ถังหมัก 1.5 ลิตรต่อนาที ความเร็วการกวนเป็น 200 rpm

3.4.9 การศึกษาคุณสมบัติของไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวาน

หลังจากกระบวนการหมักไบโอพอลิเมอร์ที่ได้จากการสกัดจากเซลล์จุลินทรีย์จะนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางความร้อนและคุณสมบัติทางกายภาพ โดยใช้วิธีมาตรฐาน ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. คุณสมบัติทางความร้อน (Thermal properties) โดยเครื่อง differential scanning calorimetry (DSC)

การศึกษาคูสมบัติทางความร้อนของไบโอพอลิเมอร์ ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมีดังนี้ อุณหภูมิ ณ จุดหลอมเหลว (Melting temperature; Tm) อุณหภูมิคล้ายแก้ว (Glass transition temperature; Tg) และอุณหภูมิที่ไบโอพอลิเมอร์มีสถานะเริ่มเป็นผลึก (Crystallization temperature; Tc) โดยจะเปรียบเทียบกับสารไบโอพอลิเมอร์มาตรฐาน

2. การย่อยสลายโดยความร้อนของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ โดย Thermogravimetry analysis (TGA)

สำหรับการย่อยสลายทางความร้อนจะใช้วิเคราะห์จากพอลิเมอร์เมื่อได้รับความร้อนโดยอาศัยการวัดน้ำหนักของวัสดุที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงอุณหภูมิด้วยเครื่องชั่งที่มีความไวสูง

ข) กรณีน้ำอ้อยคั้น (Sugarcane juice)

3.4.10 การศึกษาองค์ประกอบในน้ำอ้อยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

1) การเตรียมวัตถุดิบเบื้องต้น โดยนำน้ำอ้อยที่ผ่านการหีบจากโรงงานน้ำตาลมิตรผล จังหวัดชัยภูมิมาเก็บรักษาหรือถนอมคุณภาพต่างๆ ของน้ำอ้อยไม่ให้เปลี่ยนแปลงเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบ (Stock) ก่อนนำไปใช้ โดยเก็บรักษาไว้ที่ตู้แช่แข็งที่ควบคุมอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำมาใช้งานต้องละลายน้ำแข็งก่อน โดยการตั้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 รอบ เพื่อแยกกากตะกอนที่มีขนาดใหญ่ออก

2) การวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ในน้ำอ้อย

- ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Phenol-sulfuric acid)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Brix) โดยใช้แฮนด์รีแฟร็กโตมิเตอร์ (Hand refractometer)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยพี-เอช มิเตอร์ (pH meter)
- ค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี TKN (Total Kjeldahl Nitrogen)
- ชนิดของน้ำตาลต่างๆ ในน้ำอ้อยโดยใช้เครื่อง HPLC

3.4.11 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs จากน้ำอ้อยโดยใช้วิธีการหมักแบบกะในขวดเขย่า

1) การเตรียมกล้าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ 2 สายพันธุ์

-กล้าเชื้อที่ 1 จุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ *Alcaligenes latus* TISTR 1043 นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสมบูรณ์ (Nutrient broth: NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงให้เจริญในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยควบคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา

1-2 วัน จากนั้นนำมา 10 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารสมบูรณ์ (Nutrient broth: NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงให้เจริญในตูบ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยควบคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ

-กล้าเชื้อที่ 2 จุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสมบูรณ์ (Nutrient broth: NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงให้เจริญในตูบ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยควบคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1-2 วัน จากนั้นนำมา 10 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารสมบูรณ์ (Nutrient broth: NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงให้เจริญในตูบ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยควบคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ



ภาพที่ 3.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อกลูโคส (พลาสติกคู่ซ้ายมือ) และซูโครส (พลาสติกคู่ขวามือ) ก่อนที่จะนำไปเตรียมกล้าเชื้อของ *Alcaligenes eutrophus* และ *A. latus*



ภาพที่ 3.3 การเตรียมกล้าเชื้อของ *Alcaligenes eutrophus* และ *A. latus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูโคส (พลาสติกคู่ซ้ายมือ) และอาหารเลี้ยงเชื้อซูโครส (พลาสติกคู่ขวามือ)

2) ศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *A. latus* และ *A. eutrophus* ในน้ำอ้อย

-นำกล้าเชื้อที่ 1 ที่มีการเจริญของจุลินทรีย์ *A. latus* TISTR 1403 มา 10 มิลลิลิตร (Inoculums size 10%) ลงในอาหารสูตรเกลือแร่หรืออาหารหลัก ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20 gL^{-1} เลี้ยงให้เจริญในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยควบคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 2-3 วัน

-นำกล้าเชื้อที่ 2 ที่มีการเจริญของจุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 มา 10 มิลลิลิตร (Inoculums size 10%) ลงในอาหารสูตรเกลือแร่หรืออาหารหลัก ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20 gL^{-1} เลี้ยงให้เจริญในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยควบคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 2-3 วัน

3.4.12 การศึกษาปริมาณน้ำตาลรวมในน้ำอ้อยที่มีความเหมาะสมต่อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs

การศึกษาปริมาณน้ำตาลรวมในน้ำอ้อยที่มีความเหมาะสมต่อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs นั้น จะมีการแปรผันปริมาณน้ำตาลรวมของน้ำอ้อย เพื่อผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยมีการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเป็น 4 ระดับ ($20, 30, 40, 50 \text{ gL}^{-1}$) ในฟลาสขนาด 250 มิลลิลิตร (ปริมาตรทำงาน 100 มิลลิลิตร) ที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C pH 6.5-7 กล้าเชื้อ 10% C:N ratios = 6.8:1.0 เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่

1. ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดโดยวิธี ฟีนอล-ซัลฟูริก
2. การเจริญของจุลินทรีย์ (Growth curve)
โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD 600 nm)
(Patwardhan และ Srivastava, 2004)
3. การวัดน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์จุลินทรีย์ (Biomass)
4. การเก็บเกี่ยวและการวัดปริมาณ PHAs

3.4.13 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้นำไปใช้ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs ในระดับขยายส่วนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

โดยนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่านั้น มาใช้เพื่อผลิต PHAs ในระดับขยายส่วนโดยใช้กระบวนการหมักแบบกะภายในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักเท่ากับ 2 ลิตร (Working volume) อัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที พีเอช (pH) 6.5-7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2 vvm โดยปรับให้เครื่องทำงานอัตโนมัติ เพื่อควบคุมค่าความเข้มข้นออกซิเจน (pO_2) ในน้ำหมักให้มีค่าคงที่ที่ 30 %



ภาพที่ 3.4 การหมักน้ำอ้อยในระดับขยายส่วน (ภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร)

3.4.15 การศึกษากระบวนการเก็บเกี่ยวไบโอพอลิเมอร์ PHAs ที่สร้างและสะสมอยู่ในกลุ่มเซลล์จุลินทรีย์

แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 วิธี ดังต่อไปนี้

- (1) การวิเคราะห์ปริมาณไบโอพอลิเมอร์ (PHAs) โดยวิเคราะห์โดยใช้วิธีของ Law และ Slepecky, 1960 โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และเติม 6% Active chlorine ของโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในตัวอย่าง
2. นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์
3. นำไปปั่นเหวี่ยงโดยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
4. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
5. เทตัวอย่างลงในหลอดทดลองแล้วเติมคลอโรฟอร์มร้อน (60 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เพื่อให้คลอโรฟอร์มสกัดเอา PHAs ที่อยู่ในชั้นน้ำออกมา
6. ดูดสารละลายในชั้นของคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไประเหยคลอโรฟอร์มออก จะได้ผงสีขาว ของ PHAs ติดอยู่ข้างหลอด
7. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
8. ปลอ่ยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นเป็น Blank แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ PHAs

(2) วิธีการสกัดจะใช้วิธีการปรับปรุงโดยการใส่การสกัด Soxhlet extraction

โดยมีรายละเอียดการทดลองดังต่อไปนี้

1. เซลล์แห้งของจุลินทรีย์ *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 ที่ได้จากหมักจะนำมาเติมด้วย โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (Sodium hypochlorite) อัตราส่วน 1g:10 mL
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ โดยใช้ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์จุลินทรีย์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
4. เซลล์จุลินทรีย์ที่ได้นำไปสกัดโดยคลอโรฟอร์ม ใน Soxhlet ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง
5. นำสารละลายที่ได้ไปตกตะกอนในเมทานอลเย็นหรือเอทานอลเย็น จากนั้นนำไประเหยใน Vacuum ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ผงสีขาวของ PHAs แล้วทำให้แห้งภายใน Desiccators จนน้ำหนักคงที่ ของแต่ละชุดการทดลอง

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

(Results and Discussion)

ก) กรณีน้ำคั้นข้าวฟ่างหวาน (Sweet sorghum juice)

4.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

จากการรวบรวมน้ำคั้นที่ได้จากการบีบสกัดบริเวณลำต้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์ มข.40 (รูปที่ 4.1) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัยการผลิตเอทานอลเป็นพลังงานทดแทนจากข้าวฟ่างหวาน ของ รศ.ดร. ประสิทธิ์ ใจศีล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งการบีบสกัดน้ำคั้นจากลำต้นของข้าวฟ่างหวานนั้น จะนำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีอายุ 90-1-00 วัน (ภาพที่ 4.1) มาเข้าเครื่องบีบสกัดขนาดเล็กดังรูปที่ 2 ซึ่งเครื่องบีบสกัดดังกล่าวจะมีความคล้ายคลึงกับเครื่องหีบน้ำอ้อยในโรงงานอุตสาหกรรมทั่วไป เพียงแต่มิขนาดเล็กลง โดยเครื่องบีบน้ำข้าวฟ่างจะสามารถบีบน้ำจากลำต้นของข้าวฟ่างหวานได้โดยตรง โดยที่ข้าวฟ่างหวานให้ผลผลิตเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 5-6 ตันต่อไร่ และสามารถปลูกได้อย่างน้อยปีละ 3 ครั้ง (<http://www.aggiethai.com> : Topic: ม.ขอนแก่นเปิดตัวข้าวฟ่างหวาน) ทำให้น้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานมีศักยภาพในการนำมาผลิต PHAs ในแง่ของปริมาณของวัตถุดิบ ซึ่งเมื่อพิจารณาศักยภาพของน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานในแง่ของสารอาหารที่จำเป็นต่างๆ ในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์แล้วจะให้ผลดังต่อไปนี้



ภาพที่ 4.1 แสดงการคั้นน้ำข้าวฟ่างหวานจากลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้เครื่องบีบอัด

4.1.1 ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด (Total sugar)

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานโดยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก นั้นพบว่าปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดเท่ากับ 207.43 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อพิจารณาน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลซูโครส ที่

วิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ มข. 40 ในงานวิจัยครั้งนี้มีปริมาณน้ำตาลดังนี้ น้ำตาลกลูโคส 12.32 กรัมต่อลิตร น้ำตาลฟรุคโตส 5.75 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 175.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ที่มีการนำข้าวฟ่างหวานมาจากแหล่งต่างๆ และฤดูกาลเก็บเกี่ยวแตกต่างกัน ดังตาราง 4.1 พบว่าน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวาน มข. 40 นี้มีปริมาณน้ำตาลซูโครสมากกว่าน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานจากแหล่งเพาะปลูกอื่น และมากเพียงพอต่อการนำไปใช้เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยปกติแล้วปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมแก่การผลิต PHAs นั้นจะมีค่าประมาณ 30-40 กรัมต่อลิตร ขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิต ดังนั้นจะเห็นได้ว่าน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวาน 1 ลิตรนั้นจะสามารถเจือจางเพื่อใช้ในการหมักเพื่อผลิต PHAs ได้ 4-5 ลิตร ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบราคาของน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานกับพืชน้ำตาลชนิดอื่นแล้ว น้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานมีราคาถูกมากกว่า และการปลูกข้าวฟ่างหวานนั้นในแต่ละปีสามารถปลูกได้ถึง 3 รอบ ทำให้อัตราของผลผลิตน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานสูงกว่าพืชน้ำตาลชนิดอื่นๆ

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆที่พบในน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานจากพื้นที่ต่างๆกัน

พื้นที่ เพาะปลูก	เดือนที่เก็บ เกี่ยว	ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ (กรัมต่อลิตร)			รวม (กรัมต่อลิตร)	ที่มา
		ซูโครส	กลูโคส	ฟรุคโตส		
ไทย	กรกฎาคม	175.97	12.32	5.75	194.04	งานวิจัยนี้
สหรัฐอเมริกา	ตุลาคม	143.3	39.3	61.0	242.6	Liang และคณะ. (2010)
ไทย	*	124.1	20.9	16.8	161.8	Laopaiboon และคณะ. (2009)
ฮังการี	กันยายน	75.1	25.0	18.1	118.2	Sipos และคณะ. (2009)
กรีซ	พฤศจิกายน	211.9	20.1	-	232.0	Mamma และคณะ. (1995)

*ไม่ได้ระบุ

4.1.2 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (°Brix)

การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้นั้น ค่าที่วัดได้เป็นการประมาณค่าของน้ำตาลที่สามารถละลาย เนื่องจากในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานมีองค์ประกอบของน้ำตาลละลายอยู่เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจากการวัดด้วยแฮนด์เรฟรักโตมิเตอร์ (Hand refractometer) พบว่าในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานจะมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (°Brix) เท่ากับ 21 บริกซ์ ซึ่งคิดเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดประมาณ 210 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์โดยใช้วิธีฟีนอล-ซัลฟูริก ดังที่กล่าวมาแล้ว

4.1.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่วัดด้วยเครื่อง pH meter นั้นพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานเริ่มต้นมีค่าประมาณ 5.4 ซึ่งมีความเป็นกรดและยังไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ส่วนมากเนื่องจากจุลินทรีย์ส่วนมากแล้วสามารถเจริญได้ดีในสูตรอาหารที่มีช่วงของค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6.5-7.0

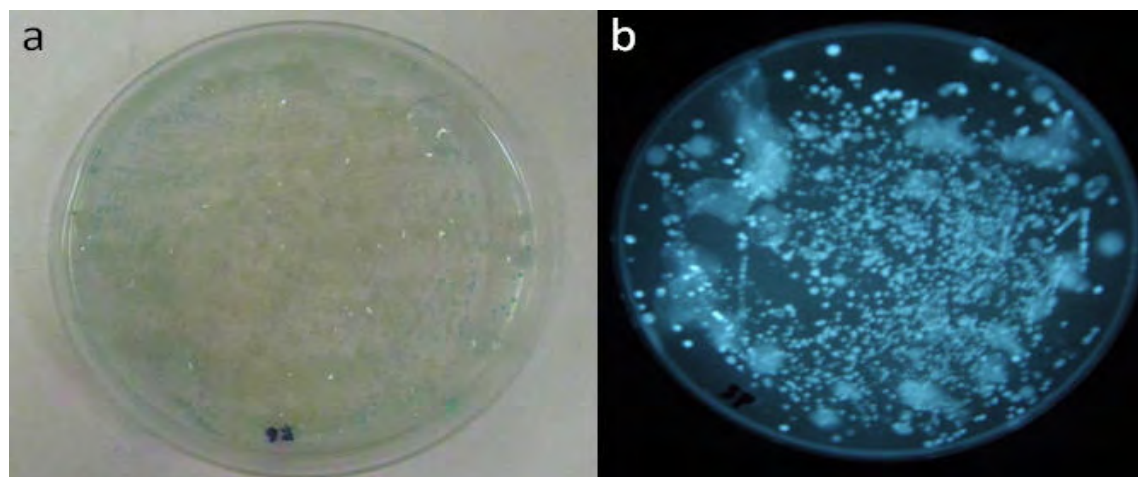
4.1.4 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานที่นำมาศึกษาครั้งนี้โดยวิธี TKN พบว่ามีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 0.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วควรมีการเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเข้าไปในอาหารอีก เนื่องจากปริมาณดังกล่าวอาจไม่เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และเมื่อทำการเจือจางให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่มีความเหมาะสมจะทำให้ปริมาณไนโตรเจนลดลงด้วย

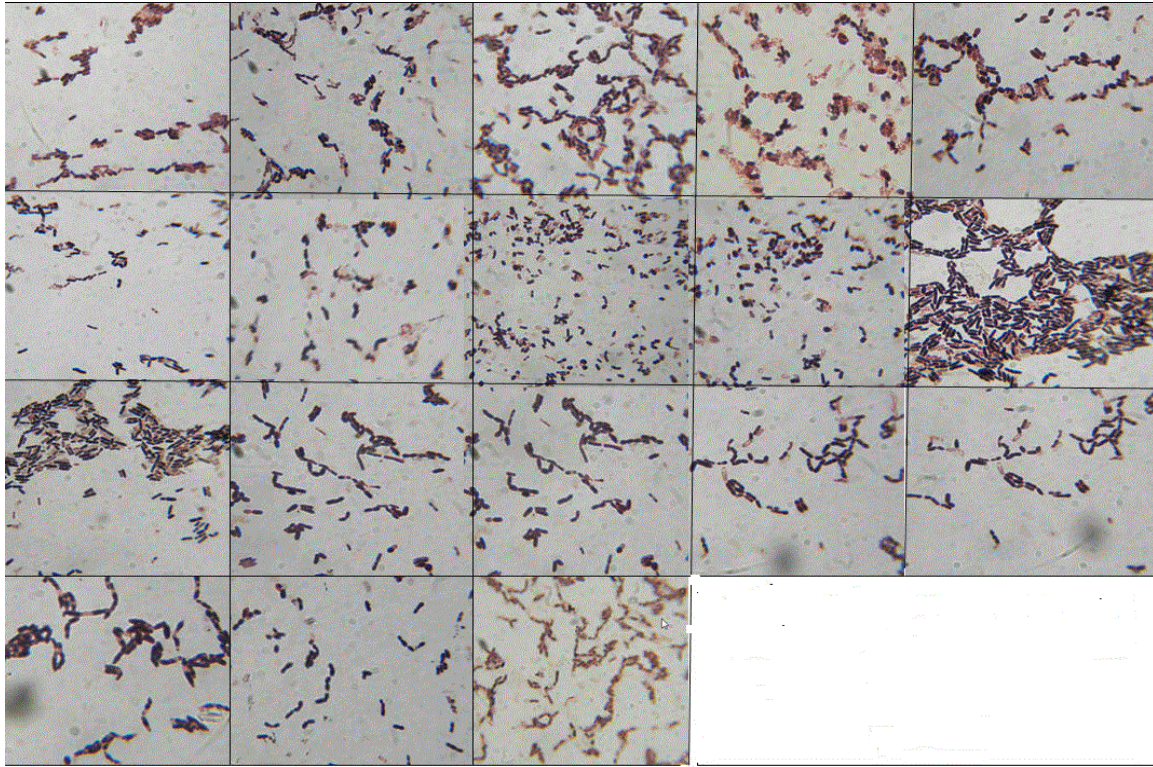
4.2 การศึกษาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอพอลิเมอร์โดยใช้น้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ของ *A. lotus* TISTR 1043 ในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานแล้วพบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตต่ำดังนั้นจึงได้มีการคัดแยกจุลินทรีย์ (Screening) ที่สามารถเจริญเติบโตและผลิตสารไบโอพอลิเมอร์จากน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานได้

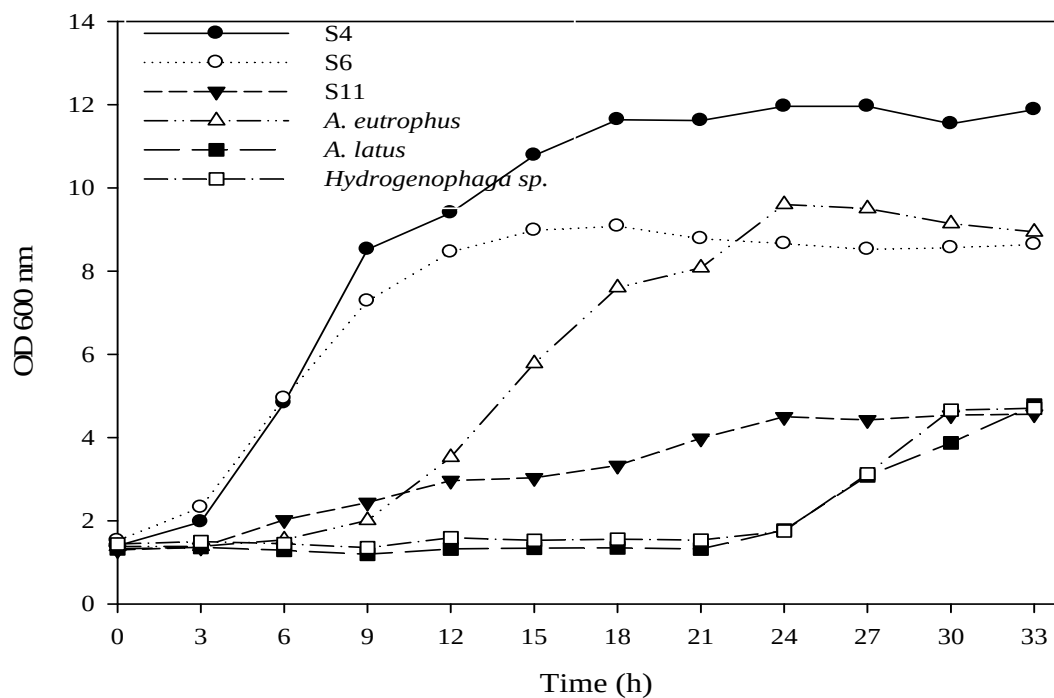
การคัดแยกจุลินทรีย์นั้นจะคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารไบโอพอลิเมอร์จากดินที่เก็บตัวอย่างมาจากพื้นที่การเพาะปลูกอ้อย โดยใช้น้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารแข็งที่มีการเติมสี Nile blue A แล้วสังเกตจากการเรืองแสงของจุลินทรีย์ภายใต้แสงยูวีดังภาพที่ 4.2 จุลินทรีย์ที่มีการเรืองแสงจะนำมาขยายจำนวนและทดสอบการเจริญ จากนั้นจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกจะนำมาทดสอบรวมกับการย้อมสี Sudan black B และสังเกตลักษณะการติดสีดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นอีกหนึ่งวิธีในศึกษาการสะสมไบโอพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่ติดสีดำนั้นจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีการสะสมไบโอพอลิเมอร์ในเซลล์ดังแสดงในภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.2 การศึกษาการสะสม PHAs ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในอาหารที่มีการเติมสี Nile blue A ในอาหารเร่งการผลิต PHAs (ซ้าย; ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารแข็งที่มีการเติมสี Nile blue A, ขวา; ลักษณะของโคโลนีภายใต้แสงยูวี)



ภาพที่ 4.3 การติดสีดำของ Sudan black B ของจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกจากดิน



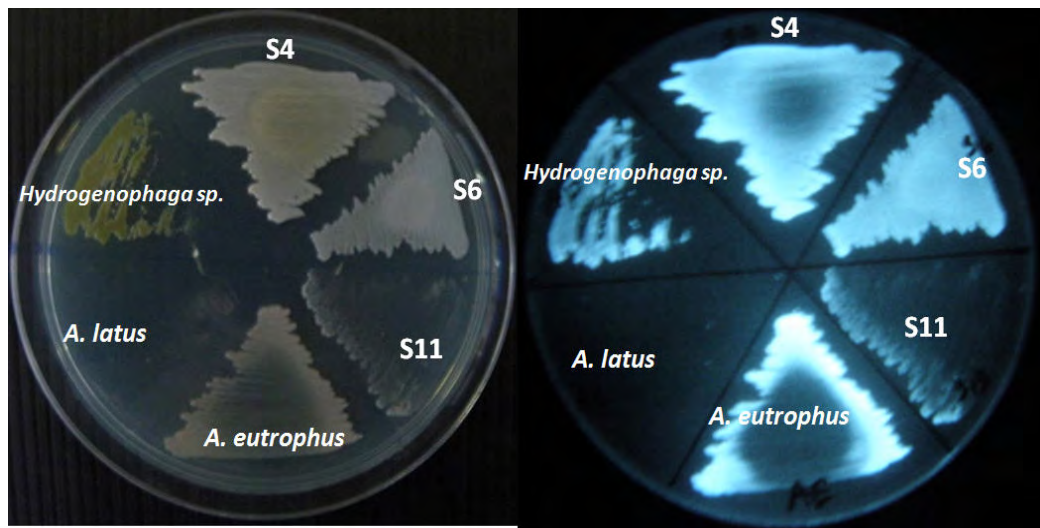
ภาพที่ 4.4 การเปรียบเทียบการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกจากดิน รหัส S4 S6 S13 *A. eutrophus* TISTR 1095 *A. latus* TISTR 1043 และจุลินทรีย์ *Hydrogenoflaga sp.* ในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรวมประมาณ 20 กรัมต่อลิตร

จุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกเบื้องต้นโดยสังเกตจากโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันในอาหารสมบูรณ์ (Nutrient broth) จำนวน 18 โคโลนีที่มีการเรืองแสง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเร่งการผลิต PHB ที่มี น้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอนหลักจากนั้นนำโคโลนีที่เจริญเติบโตในอาหารแข็ง มาย้อมโดยสี Sudan black B สังเกตการติดสีดำ Sudan black B ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังรูปที่ 4.3 ซึ่งจากลักษณะของ จุลินทรีย์ทั้ง 18 โคโลนี พบว่าสามารถแยกที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันได้ 3 กลุ่ม จากนั้นจุลินทรีย์ที่ได้นำมา เพาะเลี้ยงในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อีก 3 ชนิด ที่สามารถผลิตไบโอพอลิเมอร์ได้คือ *A. eutrophus*, *A. latus* และ *Hydrogenoflava* sp.

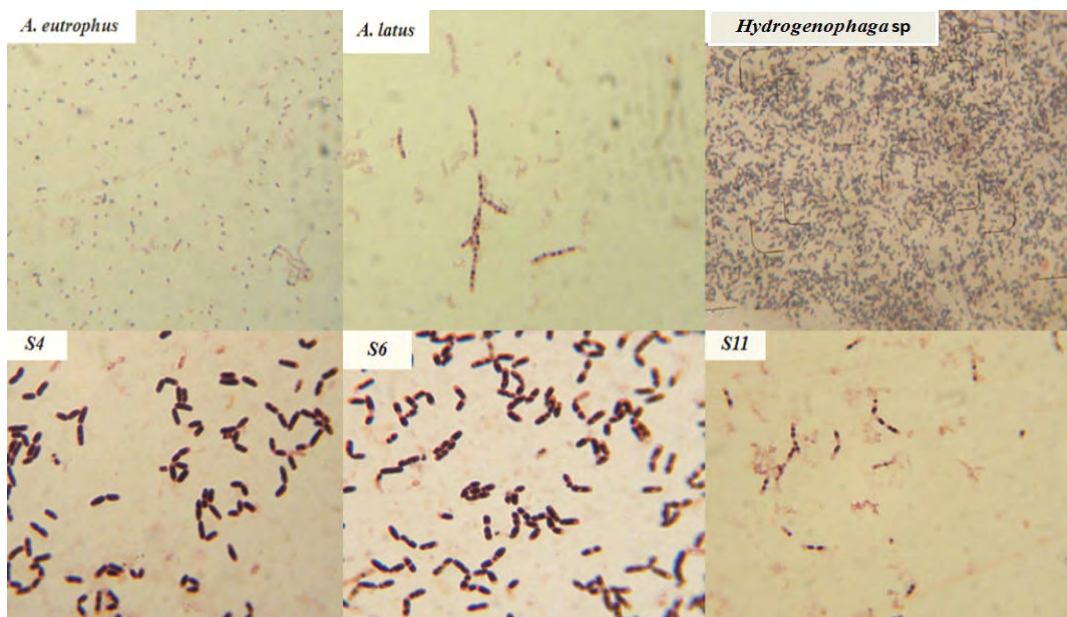
จากการวัดค่าการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้มาจากการคัดแยกทั้ง 3 ชนิด โดยวัดความขุ่นของเซลล์ (OD=600 nm) ในอาหารเร่งการผลิตไบโอพอลิเมอร์ที่มีน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานเป็นองค์ประกอบหลัก เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ *A. eutrophus*, *A. latus* และ *Hydrogenoflava* sp. ดังรูปที่ 4.4 พบว่าจุลินทรีย์ รหัส S4 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและสูงสุดใน ชั่วโมงที่ 30 จุลินทรีย์ *A. eutrophus* จุลินทรีย์รหัส S6 และจุลินทรีย์รหัส S11 ตามลำดับ ส่วนในกรณีของจุลินทรีย์ *A. latus* และ *Hydrogenoflava* sp. นั้นมีการ เจริญที่ต่ำมากดังจะเห็นได้จากภาพที่ 4.4 พบว่าถึงแม้ว่าจะระยะเวลาผ่านไป 33 ชั่วโมงแล้ว จุลินทรีย์ทั้งสองชนิด นั้นยังมีอัตราการเจริญที่อยู่ในระดับต่ำ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานอาจจะมีสารยับยั้ง (Inhibitor) บางชนิดที่ทำให้จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดเจริญเติบโตได้ไม่ดีหรือใช้เวลาในการปรับสภาพนานกว่า จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เมื่อทำการวัดการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยการวัดปริมาณน้ำหนักแห้ง (Dry cell weight; DCW) และปริมาณ PHB ที่เกิดขึ้น ดังตารางที่ 4.2 พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สายพันธุ์ S4 มีปริมาณ น้ำหนักแห้งและปริมาณ PHB สูงกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆอีกทั้งยังสามารถให้อัตราผลผลิตที่สูงกว่าจุลินทรีย์ ชนิดอื่น (PHB productivity= 0.097 g/Lh) และเมื่อนำจุลินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดมาเลี้ยงในอาหารที่จำกัดแหล่ง ไนโตรเจนและพร้อมกันนี้มีการเติมสี Nile blue A ลงในอาหารแข็ง จากนั้นนำไปสังเกตการเรืองแสงภายใต้ รังสียูวีดังภาพที่ 4.5 พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ S4 มีการเรืองแสงโดยให้ความเข้มของแสงใกล้เคียงกับ จุลินทรีย์ สายพันธุ์อ้างอิง *A. eutrophus* และ *Hydrogenoflava* sp. และเมื่อเปรียบเทียบการติดสีของ Sudan black B (ภาพที่ 4.6) ในเซลล์จุลินทรีย์สายพันธุ์ S4 แล้วพบว่าจุลินทรีย์มีการติดสีดำอย่างชัดเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถผลิต PHB ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ S4 เพื่อผลิต PHB โดยใช้ น้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานต่อไป

ตาราง 4.2 การผลิต PHB จากจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกจากดินและสายพันธุ์อ้างอิงอย่างละ 3 สายพันธุ์

Name of isolates	Nile blue A	Sudan black B	Dry cell weight (g/L)	PHA (g/L)	Yield of PHA (%)	PHA Productivity (g/Lh)
S4	+++	+++	3.02	1.74	57.62	0.097
S6	+++	+++	2.07	1.48	51.56	0.082
S11	++	++	1.30	0.29	21.17	0.0088
The referenced strains						
<i>A. eutrophus</i>	+++	++	1.6	0.91	38.72	0.038
<i>A. latus</i>	-	+	1.3	0.21	20.33	0.0029
<i>Hydrogenoflava</i> sp.	++	++	1.11	0.35	31.53	0.0049



ภาพที่ 4.5 ลักษณะของการสะสมไบโอพอลิเมอร์ PHB โดยการเรืองแสงภายใต้แสงยูวี (ขวา) ของโคโลนี จุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกจากดิน 3 สายพันธุ์ และจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิง 3 สายพันธุ์ ในอาหารแข็งที่ ประกอบด้วยสี Nile blue A



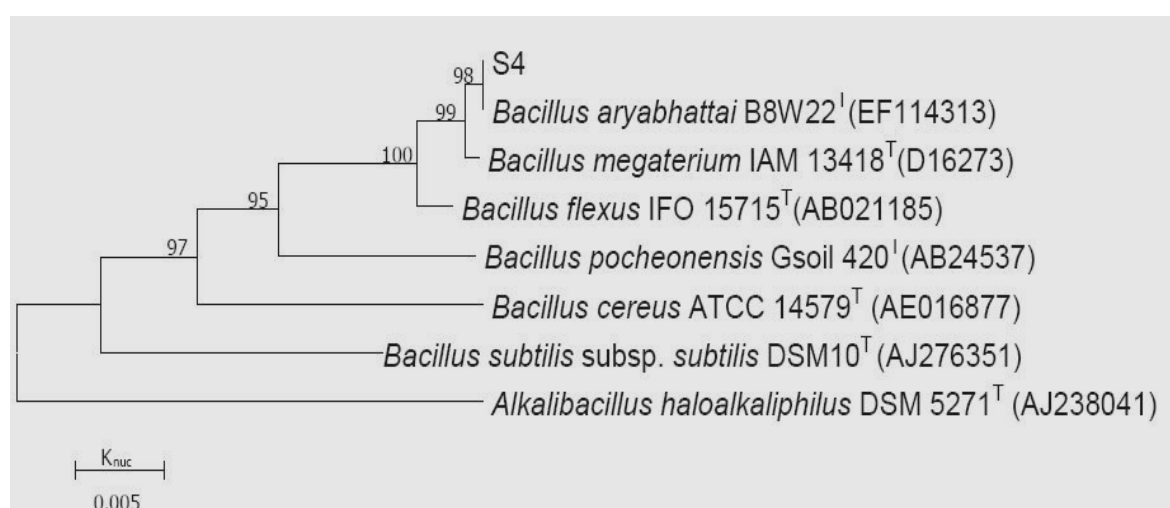
ภาพที่ 4.6 ลักษณะของการสะสมไบโอพอลิเมอร์ PHB ในเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยก จากดิน 3 สายพันธุ์ และจุลินทรีย์สายพันธุ์อ้างอิง 3 สายพันธุ์ โดยการติดสีดำของ Sudan black B

4.3 การจำแนกบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน

จากผลที่ได้พบว่าจุลินทรีย์ S4 สามารถให้ผลผลิตทั้งน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ที่สูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวเมื่อนำมาบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยวิธี 16S rDNA และหาลำดับเบสของจุลินทรีย์ (Sequencing method) พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus aryabhattai* B8W22 (รูปที่) ถึงร้อยละ 99.7 (99.7 % similarly) และยังมี ความคล้ายคลึงกับจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus megaterium* ร้อยละ 99.3 (ภาพที่ 4.7-4.8) โดยจุลินทรีย์ *B. megaterium* นี้เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มีการค้นพบว่าสามารถผลิต PHB ได้ ส่วนในกรณีของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *B. aryabhattai* นั้นยังไม่มีรายงานว่ามีการนำไปผลิตสารหรือผลิตภัณฑ์ใดๆ โดยจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้ค้นพบครั้งแรกโดย Shivaji และคณะ (2009) จากการเก็บตัวอย่างของอากาศจากบรรยากาศชั้นบนที่ระดับความสูงระหว่าง 40-41 กม.

% Similarity of 16S rDNA compare with closely related species							
Seq->	1	2	3	4	5	6	7
1 S4	100.0%	99.7%	98.5%	99.3%	93.0%	94.1%	95.9%
2 <i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 ^T (EF114313)	99.7%	100.0%	98.7%	99.5%	93.1%	94.2%	95.9%
3 <i>Bacillus flexus</i> IFO 15715 ^T (AB021185)	98.5%	98.7%	100.0%	98.6%	93.5%	94.9%	96.1%
4 <i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418 ^T (D16273)	99.3%	99.5%	98.6%	100.0%	93.1%	94.2%	95.7%
5 <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> DSM10 ^T (AJ276351)	93.0%	93.1%	93.5%	93.1%	100.0%	93.7%	93.8%
6 <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 ^T (AE016877)	94.1%	94.2%	94.9%	94.2%	93.7%	100.0%	93.9%
7 <i>Bacillus pocheonensis</i> Gsoil 420 ^T (AB245377)	95.9%	95.9%	96.1%	95.7%	93.8%	93.9%	100.0%

ภาพที่ 4.7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับสายพันธุ์อ้างอิง



ภาพที่ 4.8 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของจุลินทรีย์

4.4 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ต่อการเจริญและผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs

ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0-7.0 ทั้งนี้จากผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 พบว่าจุลินทรีย์ *B. aryabhatai* สามารถเจริญเติบโตและผลิต PHB ได้ดีในช่วง 6.0 – 7.0 แต่จะสะสม PHA ภายในเซลล์ได้สูงสุดที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 (PHA content = 42.31% w/w) ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะดังกล่าวเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.3 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ต่อการเจริญและผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs

pH	Dry cell weight (g/L)	PHA (g/L)	PHA content (%)
5.0	2.10	0.70	33.33
5.5	1.80	0.60	33.33
6.0	2.20	0.90	40.91
6.5	2.60	1.10	42.31
7.0	2.80	1.10	39.28
7.5	2.70	0.50	18.52
8.0	2.70	0.50	18.52
8.5	2.70	0.40	14.81
9.0	3.00	0.50	16.67

4.5 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs

เซลล์จุลินทรีย์มีองค์ประกอบของไนโตรเจนอยู่ประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ดีบนแหล่งอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน บางชนิดเจริญได้ดีบนแหล่งอาหารที่ประกอบด้วยอนินทรีย์ไนโตรเจน

จากตารางที่ 4.4 พบว่าจุลินทรีย์ *B. aryabhatai* มีการเจริญและผลิต PHAs ได้ดีในแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน โดยเมื่อใช้ Urea เป็นแหล่งไนโตรเจนจุลินทรีย์จะมีการเจริญสูงสุดโดยสามารถผลิตเซลล์ได้ 4.00 กรัมต่อลิตร และผลิต PHAs ได้ 2.10 กรัมต่อลิตร Yeast extract สามารถผลิตเซลล์ได้ 3.50 กรัมต่อลิตร และผลิต PHA ได้ 1.90 กรัมต่อลิตร และ Peptone สามารถผลิตเซลล์ได้ 3.40 กรัมต่อลิตร และผลิต PHA ได้ 1.80 กรัมต่อลิตร ในกรณีของอาหารที่ประกอบด้วยอนินทรีย์ไนโตรเจนนั้นพบว่าการเจริญและผลิต PHAs ของจุลินทรีย์ *B. aryabhatai* มีการเจริญได้ค่อนข้างต่ำ โดยที่ NH_4Cl สามารถผลิตเซลล์ได้ 3.00 กรัมต่อลิตร และผลิต PHAs ได้ 1.2 กรัมต่อลิตร และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ สามารถผลิตเซลล์ได้ 2.5 กรัมต่อลิตร และผลิต PHB ได้ 1.0 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kulpreecha และคณะ (2009) ที่มีการใช้ Urea ทดแทนการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นเพื่อทำการผลิต PHAs จากน้ำอ้อยโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ *B. megaterium* เนื่องจาก Urea เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่จุลินทรีย์สามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี (สมใจ, 2537) และเมื่อพิจารณาได้ด้านของราคาแล้ว Urea จะมีราคาค่อนข้างต่ำกว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนสำหรับการผลิต PHAs ลงได้

ตารางที่ 4.4 การผลิต PHB จากแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

Nitrogen sources	Dry cell weight (g/L)	PHAs (g/L)	PHAs content (%)
No added	1.00	0.40	40.00
Urea	4.0	2.10	52.50
Peptone	3.40	1.80	52.90
Yeast extract	3.50	1.90	54.30
NH ₄ Cl	3.00	1.20	40.00
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.50	1.00	40.00

4.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs จากน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวาน โดยใช้วิธีการหมักแบบกะ ในขวดเขย่า (Flask scale)

4.6.1. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอพอลิเมอร์โดยจุลินทรีย์

4.6.2.1.1 การคัดกรองปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์

จากผลการทดลองที่ได้ตั้งตาราง การศึกษาปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์ *B. aryabhattai* นั้นพบว่าปัจจัยหลักจำนวน 2 ปัจจัยคือ ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวาน (Total sugar) และปริมาณยูเรีย (Urea) ที่เติมเข้าไป มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ต่อค่าตอบสนอง โดยปัจจัยทั้งสองมีผลในทางบวกต่อค่าตอบสนองทั้ง ปริมาณ DCW และปริมาณ PHAs (ตารางภาคผนวกที่ 1-2) แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ *B. aryabhattai* สามารถเจริญและผลิต PHAs ได้โดยไม่ต้องมีการจำกัดแหล่งไนโตรเจน ซึ่งปัจจัยหลักที่มีผลดังกล่าวจะนำไปใช้เพื่อแปรผันในการทดลองต่อไป ในส่วนของ KH₂PO₄ Na₂HPO₄ MgSO₄ 7H₂O และ Trace element ไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ อาจเนื่องมาจากสารเหล่านี้มีเพียงพอในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานหรือจุลินทรีย์ชนิดนี้อาจมีความจำเป็นในการใช้สารเหล่านี้ในปริมาณน้อย

ตารางที่ 4.5 แผนผังการทดลองแบบ Plackett and Burman Design (N = 12) สำหรับการทดลองในการคัดกรองปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB จากจุลินทรีย์ *B. aryabhatai*

Expt. no.	A (g/L)	B (g/L)	C (g/L)	D (g/L)	E (g/L)	F (g/L)	Responses	
							DCW (g/L)	PHAs (g/L)
1	10	1	4	0.1	4	5	1.34	0.48
2	10	1	1	0.4	2	5	1.09	0.27
3	40	1	4	0.4	2	5	3.93	1.01
4	40	1	4	0.4	4	1	5.88	2.1
5	40	1	1	0.1	4	1	5.55	2.2
6	10	4	4	0.1	4	5	2.69	1.11
7	40	4	1	0.1	2	5	3.59	0.76
8	40	4	4	0.1	2	1	3.26	0.81
9	10	4	4	0.4	2	1	2.46	0.07
10	10	4	1	0.4	4	1	3	0.41
11	10	1	1	0.1	2	1	2.06	0.17
12	40	4	1	0.4	4	5	5.58	1.27

4.6.2.1.2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs จากจุลินทรีย์ *B. aryabhatai*

ในการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตไบโอพอลิเมอร์ของจุลินทรีย์ *B. aryabhatai* โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) มีปัจจัยหลักที่ศึกษา 2 ปัจจัย คือปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด (40 – 120 กรัมต่อลิตร) และปริมาณยูเรียที่เติมเข้าไป (4 – 20 กรัมต่อลิตร) การทดลองจะกำหนดระดับของแต่ละปัจจัย 5 ระดับ คือ ที่ระดับลบแอลฟา ระดับต่ำ ระดับกลาง ระดับสูง และระดับบวกแอลฟา ดังตารางที่ 4.6 ซึ่งมีจำนวนการทดลองทั้งหมด 13 หน่วยการทดลอง (ตารางที่ 4.7)

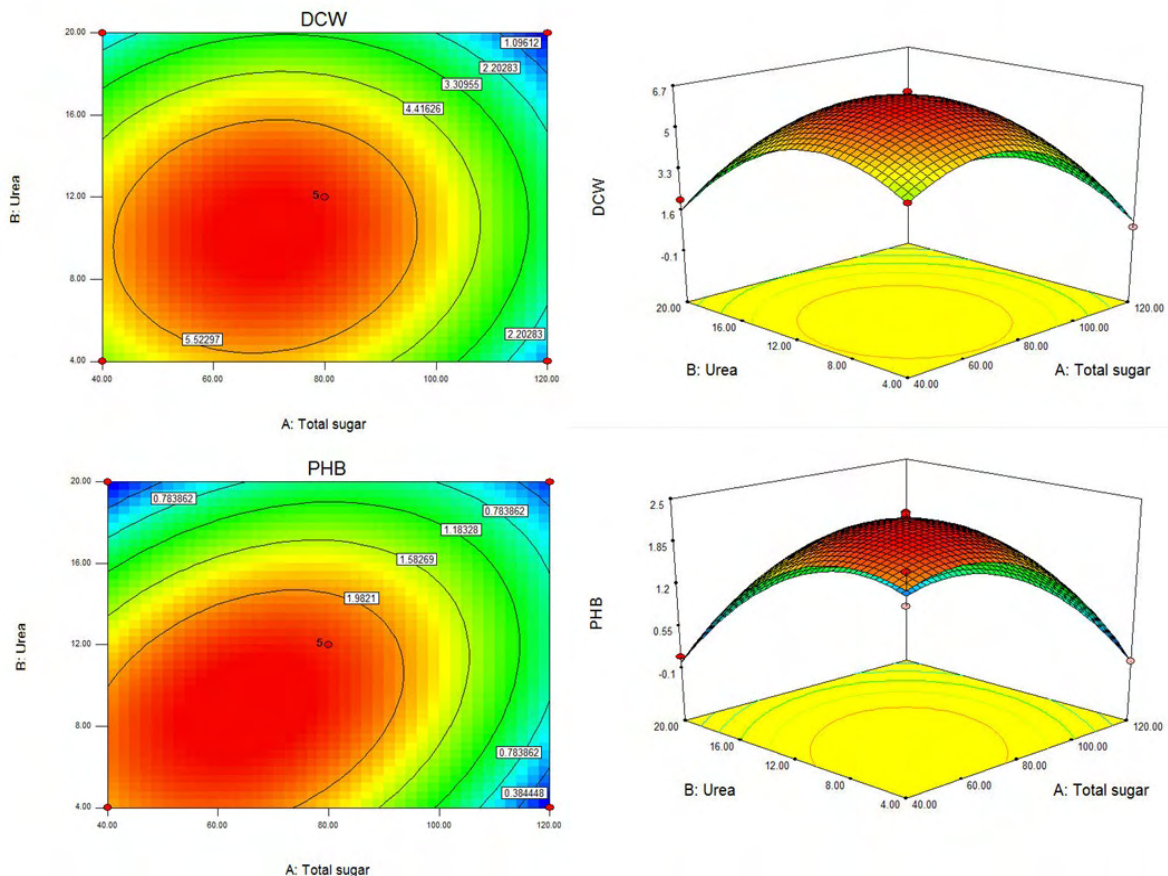
ตารางที่ 4.6 ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs จากน้ำคั้นข้าวฟ่างหวาน

Factors (g/L)	Factor level				
	$-\alpha(-2)$	-1	0	+1	$+\alpha(+2)$
Total sugar	23.43	40	80	120	136.57
Urea	0.69	4	12	20	23.31

ตารางที่ 4.7 ผลของระดับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณยูเรียต่อปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณไบโอพอลิเมอร์

Run	Total sugar (g/L)	Urea (g/L)	DCW (g/L)	PHAs (g/L)
1	40	20	2.05	0.074
2	23.43	12	2.98	0.88
3	120	4	0.89	0
4	80	12	6.46	2.27
5	80	12	6.48	2.3
6	80	0.69	3.48	1.07
7	80	12	6.44	2.22
8	80	23.31	0.22	0.012
9	80	12	6.43	2.24
10	120	20	0.14	0
11	80	12	5.98	2.01
12	40	4	4.3	2.2
13	136.57	12	0	0

หลังจากกระบวนการหมักเสร็จสิ้นผลที่ได้ดังตาราง 4.8 จะนำมาพิจารณาเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs และนำไปสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรวมในน้ำข้าวฟ่างและปริมาณยูเรียที่เติมเข้าไปในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ต่อการเจริญซึ่งวัดจากปริมาณเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ (DCW) (สมการที่ 1) และปริมาณไบโอพอลิเมอร์ PHB (สมการที่ 2) พบว่าแบบจำลองคณิตศาสตร์นี้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) มากกว่า 0.75 (DCW = 0.99 และ PHA = 0.98) พิจารณาระดับนัยสำคัญของแบบจำลอง (Model significant) พบว่าแบบจำลองมีระดับความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) และเมื่อทำการทดสอบความเหมาะสมของแบบจำลอง (Lack of fit significant) พบว่ามีความเหมาะสม ($p > 0.05$) สามารถใช้เป็นตัวแทนของชุดข้อมูลได้ จากข้อมูลดังกล่าวสามารถสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface) และแผนภาพ Contour ได้ดังภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 Contour และ Response surface แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs กับปริมาณ Urea และปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด

ซึ่งจากภาพจะเห็นได้ว่าการเพิ่มปริมาณน้ำตาลรวมและปริมาณยูเรียจะสามารถเพิ่มปริมาณของเซลล์แห้ง (DCW) และปริมาณของไบโอพอลิเมอร์ได้ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลรวมและปริมาณยูเรียจนถึงจุดๆหนึ่งจุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ทำให้ไม่มีการผลิตไบโอพอลิเมอร์ด้วย ซึ่งเมื่อพิจารณาจุดที่มีความเหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิต PHB ตามกราฟ Contour พบว่าพื้นที่สีแดงเป็นจุดที่มีความเหมาะสมเช่นเดียวกันกับจุดสูงสุดบนกราฟ Response surface ซึ่งสามารถเขียนแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้ดังนี้

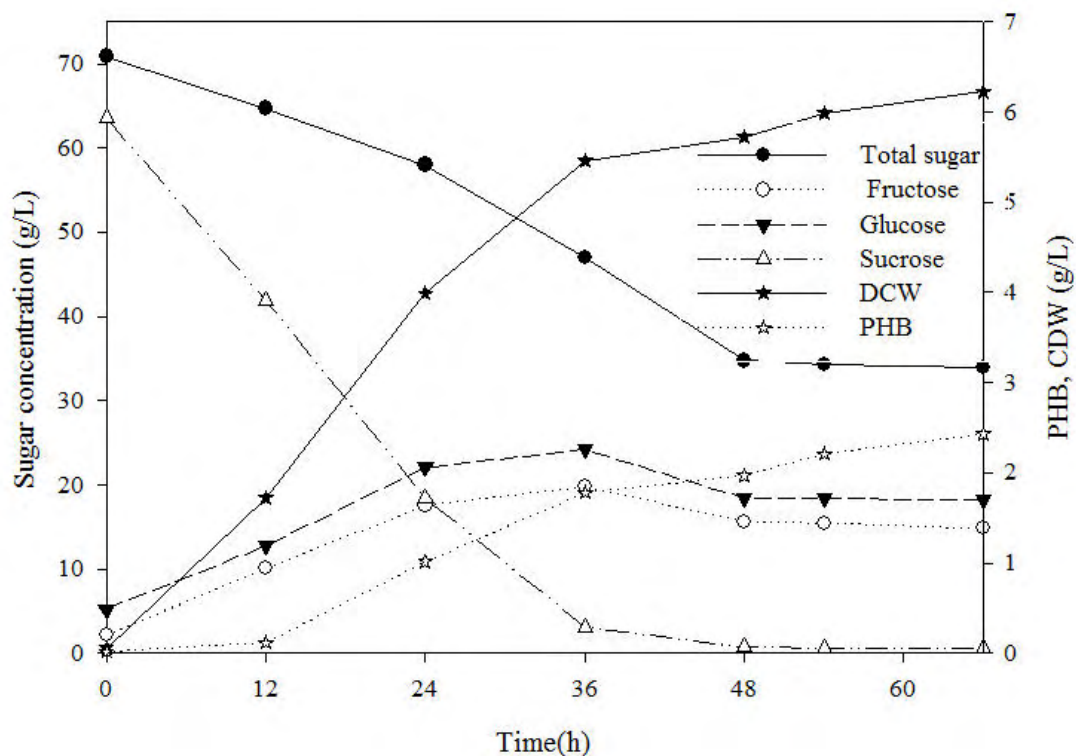
$$DCW = +6.36 - 1.19 * A - 0.95 * B + 0.38 * A * B - 2.39 * A^2 - 2.21 * B^2 \text{ -----(1)}$$

$$PHB = +2.21 - 0.44 * A - 0.45 * B + 0.53 * A * B - 0.86 * A^2 - 0.81 * B^2 \text{ -----(2)}$$

จากข้อมูลดังกล่าวจะสามารถหาสูตรอาหารที่เหมาะสมได้ซึ่งสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต PHA มีองค์ประกอบดังนี้ ปริมาณน้ำตาลรวม 70.57 กรัมต่อลิตร Urea 9.37 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 1 กรัมต่อลิตร Na_2HPO_4 4 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 กรัมต่อลิตร และ Trace element 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสูตรอาหารดังกล่าวสามารถทำนายปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณไบโอพอลิเมอร์ได้จากแบบจำลอง โดยปริมาณเซลล์แห้งมีค่าทำนายเท่ากับ 6.61 กรัมต่อลิตร ปริมาณไบโอพอลิเมอร์มีค่าทำนายเท่ากับ 2.36 กรัมต่อลิตร

เมื่อนำสูตรอาหารที่ได้จากการทำนายดังกล่าวไปทดลองเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.10 จุลินทรีย์มีการเจริญอย่างรวดเร็วพร้อมกันนี้ยังมีการผลิต PHB ร่วมด้วย โดยจากกราฟจุลินทรีย์จะเริ่มเข้าสู่ช่วงการเจริญแบบคงที่ (Stationary phase) ที่เวลา 36 ชั่วโมง และผลิตเซลล์ได้สูงที่เวลา 66 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณ 6.22 กรัมต่อลิตร และ PHA เท่ากับ 2.43 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณ PHA ที่ได้จากการทดลองจริงมีค่าใกล้เคียงกับการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในเบื้องต้น

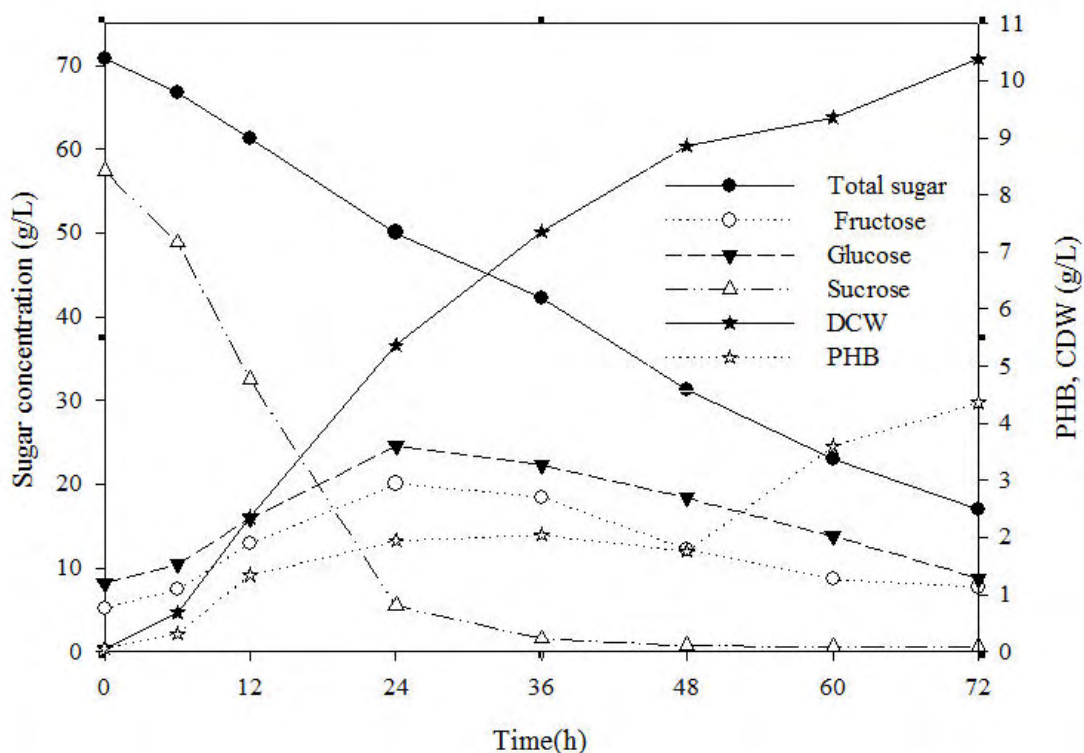
เมื่อเปรียบเทียบแนวโน้มการใช้น้ำตาลแต่ละชนิดของจุลินทรีย์พบว่าปริมาณน้ำตาลรวมจะถูกใช้และเริ่มคงที่ใน ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก เช่นเดียวกันกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ถูกใช้ไป แต่ในกรณีของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตสนั้นจะมีการเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลทั้งสองชนิดดังกล่าว ซึ่งน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสจะเริ่มลดลงอีกครั้งในปริมาณเล็กน้อย เนื่องจากน้ำตาลซูโครสที่เปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลทั้งสองชนิดเริ่มหมดทำให้ภาวะสมดุลของการเปลี่ยนน้ำตาลดังกล่าวเปลี่ยนไปจุลินทรีย์จึงหันไปใช้น้ำตาลที่เหลืออยู่ แต่ทั้งนี้จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้น้ำตาลได้หมด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการสะสมของสารพิษหรือการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง หรืออาจแม้กระทั่งปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่หมดไป ทำให้สภาวะดังกล่าวไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญ ทำให้จุลินทรีย์หยุดการเจริญเติบโต



ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs ระหว่างการเพาะเลี้ยง *B. arybhatai* ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาทีและอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.7 ผลการศึกษากระบวนการหมักแบบกะเพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร

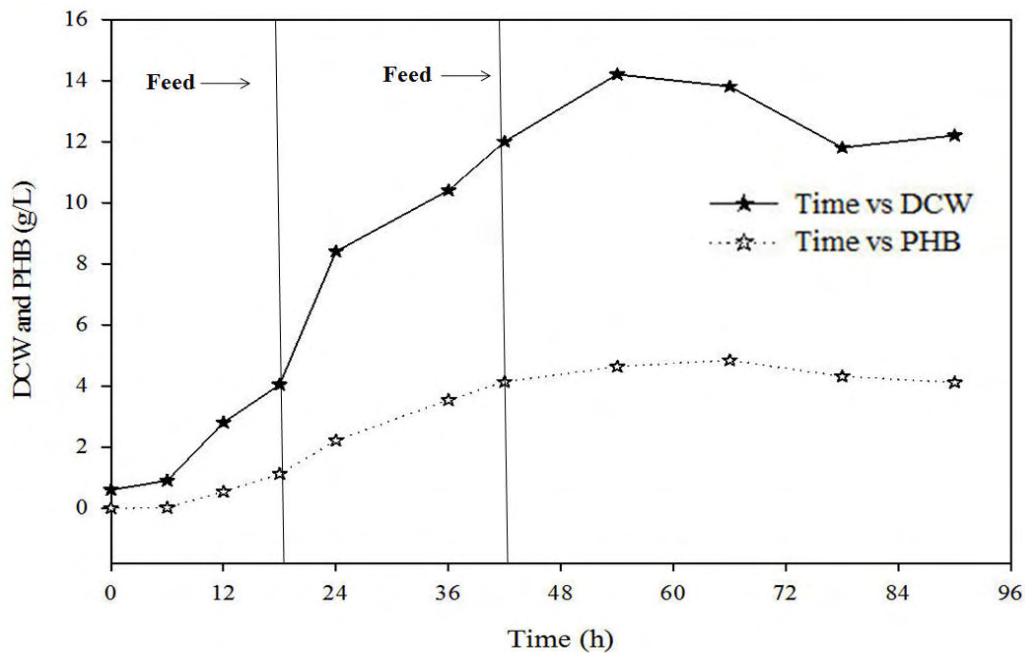
เมื่อนำสูตรอาหารที่ได้จากสภาวะการหมักแบบกะในระดับฟลaskขยายขนาดการทำงานภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร พบว่าจุลินทรีย์มีการผลิตเซลล์ได้ 10.38 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิต PHB ได้ถึง 4.36 กรัมต่อลิตร สูงกว่าการเลี้ยงจุลินทรีย์ในระดับฟลask และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นอีกหลังจากชั่วโมงที่ 72 ส่วนแนวโน้มการใช้น้ำตาลชนิดต่างนั้นจุลินทรีย์จะใช้น้ำตาลซูโครสเกือบหมดในชั่วโมงที่ 36 แต่ในกรณีของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตสนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจากเริ่มต้น จนสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 จุลินทรีย์จึงเริ่มมีการใช้น้ำตาลทั้งสอง ดังภาพที่ 4.11 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการขยายขนาดการหมักในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้น ทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตมวลเซลล์และ PHA ได้สูงกว่าระดับฟลask ถึง 1.7 และ 1.8 เท่าตามลำดับ และจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้นมีสภาวะแวดล้อมเอื้ออำนวยต่อการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า เพราะในถังหมักมีการใช้ไบโวกวนทำให้สารมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน และมีการแลกเปลี่ยนออกซิเจนและสัมผัสกับอาหารได้ดีขึ้น



ภาพที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs ระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง *B. arybhatai* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.8 ผลการศึกษากระบวนการหมักแบบกึ่งกะเพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร

จากกระบวนการหมักแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งมีการเติมอาหารไปสองช่วงคือ ชั่วโมงที่ 18 และชั่วโมงที่ 42 ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์อยู่ในช่วงการเจริญแบบ log phase ทำให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มมวลเซลล์และผลิต PHAs ได้อย่างต่อเนื่องโดยให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 14.20 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 54 และ PHAs เท่ากับ 4.84 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 66 ดังภาพที่ 4.12



ภาพที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs ระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง *B. arybhattai* แบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร

จากการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อผลิต PHB ในระดับต่างๆสามารถสรุปประสิทธิภาพการผลิตในแง่ของผลได้ (yield) และอัตราการเจริญ (productivity) ดังแสดงในตารางที่ 4.8 ซึ่งพบว่า การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระดับฟลอสก์จะให้ปริมาณของผลผลิตต่างๆต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพอย่างเห็นได้ชัด จากนั้นเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการหมักแบบกะและแบบกึ่งกะ การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบกึ่งกะจะสามารถผลิตมวลเซลล์และเพิ่มปริมาณ PHAs ได้อีกซึ่งการหมักแบบกึ่งกะนี้เหมาะสมที่จะนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไบโอพอลิเมอร์

ตารางที่ 4.8 ปริมาณผลได้ (Yield) ที่ได้จากการหมักน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยการหมักแบบต่างๆ

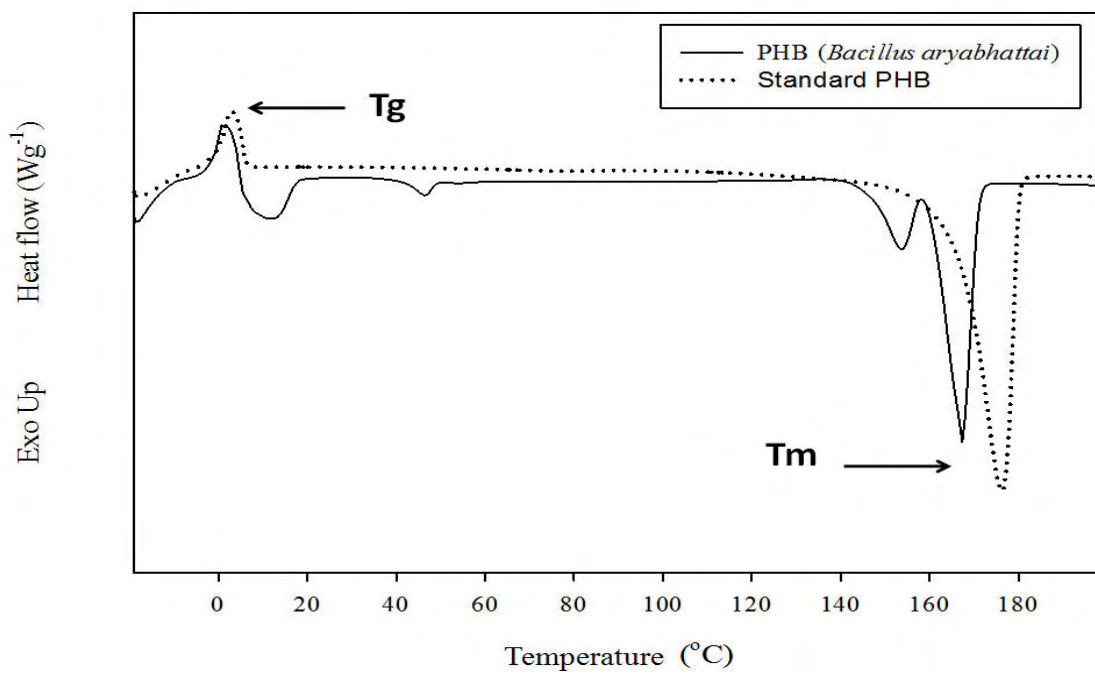
Fermentation procedures	Biomass (g/L)	PHA (g/L)	Biomass yield, $Y_{x/s}$	Product yield, $Y_{p/s}$	PHA content (%w/w)	Productivity (g/Lh)
Batch						
Predict	6.61	2.36	-	-	35.7	-
Flask	6.22	2.43	0.17	0.066	39.07	0.037
Fermentor (3L)	10.38	4.36	0.19	0.081	42.00	0.061
Fed-batch						
Fermentor (3L)	14.20	4.84	-	-	34.08	0.073

4.9 การศึกษาคุณสมบัติของไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวาน

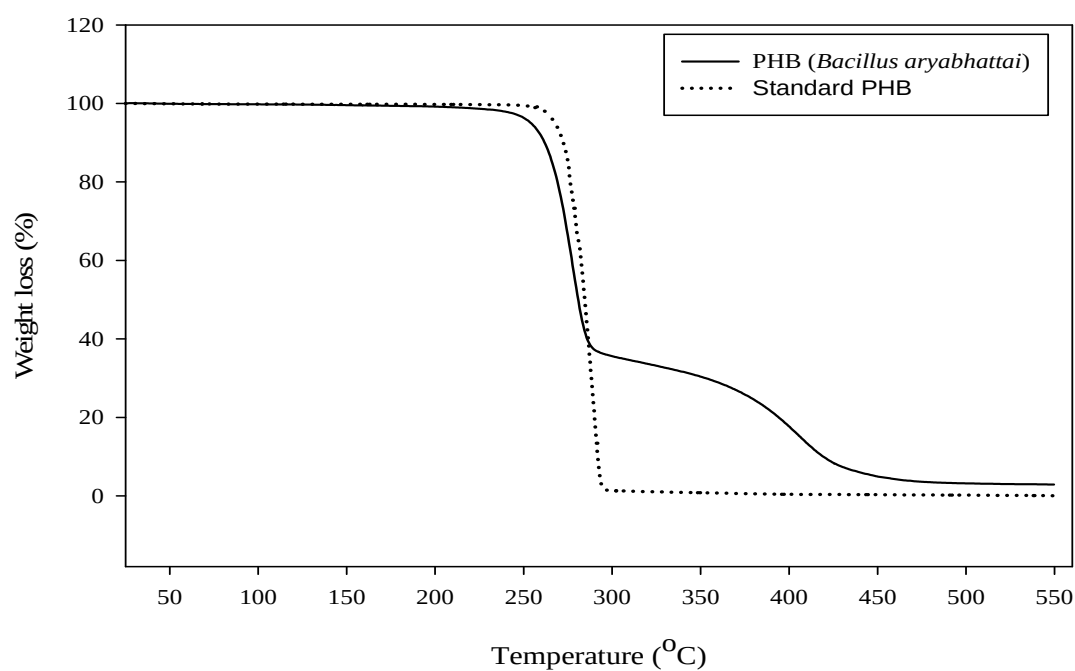
จากภาพที่ 4.13 PHB ที่สกัดได้จากไบโอพอลิเมอร์ PHB ที่สกัดได้จากเซลล์ของจุลินทรีย์ *Bacillus arybhattai* โดยใช้ น้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งอาหารจะนำไปทดสอบโดยเครื่อง DSC เพื่อหาอุณหภูมิที่พอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงเป็นสถานะคล้ายแก้ว (T_g) และอุณหภูมิ ณ จุดหลอมเหลว (T_m) ของไบโอพอลิเมอร์ จากภาพที่ 4.13 ไบโอพอลิเมอร์ที่สกัดได้จะนำมาเปรียบเทียบกับสาร PHAs มาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าอุณหภูมิจุดหลอมเหลวของสารมาตรฐานที่นำมาวิเคราะห์นั้นมีอุณหภูมิที่พอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงเป็นสถานะคล้ายแก้ว (T_g) เท่ากับ 2.81 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ ณ จุดหลอมเหลว (T_m) เท่ากับ 176.29 องศาเซลเซียส ในส่วนของ PHB ที่สกัดได้นั้นมีอุณหภูมิที่พอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงเป็นสถานะคล้ายแก้ว (T_g) เท่ากับ 1.11 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ ณ จุดหลอมเหลว (T_m) เท่ากับ 167.30 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่า PHB มาตรฐานทำให้ PHB ที่สกัดได้จากการหมักของจุลินทรีย์ *Bacillus arybhattai* ในน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวานนี้สามารถขึ้นรูปโดยความร้อนได้ง่ายกว่า PHB มาตรฐาน เนื่องจากพบว่าอุณหภูมิของการหลอมเหลวของ PHB มาตรฐานนั้นใกล้เคียงกับอุณหภูมิของการย่อยสลาย ดังภาพที่ 4.15 แสดงอุณหภูมิของการย่อยสลายของ PHB มาตรฐานและ PHB ที่ได้จากการหมัก โดยการวิเคราะห์โดยเครื่อง TGA (ภาพที่ 4.15) ซึ่งจะเห็นได้ว่า PHB จากการหมักนี้ มีอุณหภูมิการย่อยสลายใกล้เคียงกับ PHB มาตรฐาน แต่จะมีการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์เมื่ออุณหภูมิประมาณ 450 องศาเซลเซียส แต่ในขณะที่ PHB มาตรฐานสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิเพียง 300 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.13 โปโอพอลิเมอร์ PHB ที่สกัดได้จากเซลล์ของจุลินทรีย์ *Bacillus aryabhattai* โดยใช้กากคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งอาหาร



ภาพที่ 4.14 แสดงอุณหภูมิที่พอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงเป็นสถานะคล้ายแก้ว (T_g) และอุณหภูมิ จุดหลอมเหลว (T_m) ของ PHB มาตรฐานและ PHB ที่สกัดได้จากเซลล์ของจุลินทรีย์ *B. aryabhattai*



ภาพที่ 4.15 การสลายตัวโดยความร้อนของ PHB มาตรฐานและ PHB ที่สกัดได้จากเซลล์ของจุลินทรีย์ *B. aryabhattai*

ข) กรณีน้ำอ้อยคั้น (Sugarcane juice)

4.10 ผลการศึกษาองค์ประกอบในน้ำอ้อยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

4.10.1 ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด (Total sugar)

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ในน้ำอ้อยโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Phenol-sulfuric acid) พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดเท่ากับ 105.50 กรัมต่อลิตร¹

4.10.2 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (°Brix)

การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้นั้น ค่าที่วัดได้เป็นการประมาณค่าของน้ำตาลที่สามารถละลาย เนื่องจากในน้ำอ้อยมีองค์ประกอบของน้ำตาลละลายอยู่เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจากการวัดด้วยแฮนด์รีแฟร็กโตมิเตอร์ (Hand refractometer) พบว่าในน้ำอ้อยจะมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (°Brix) เท่ากับ 11.6 บริกซ์ ซึ่งคิดเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 116 กรัมต่อลิตร

4.10.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่วัดด้วยเครื่อง pH meter นั้นพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำอ้อยเริ่มต้นมีค่าประมาณ 3.4 ซึ่งมีความเป็นกรดและยังไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *A. lotus* TISTR 1043 เนื่องจากจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีในสูตรอาหารที่มีช่วงของค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6.5-7.0 (Grothe และคณะ, 1999; Khanna และ Srivastava., 2005)

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ในน้ำอ้อย

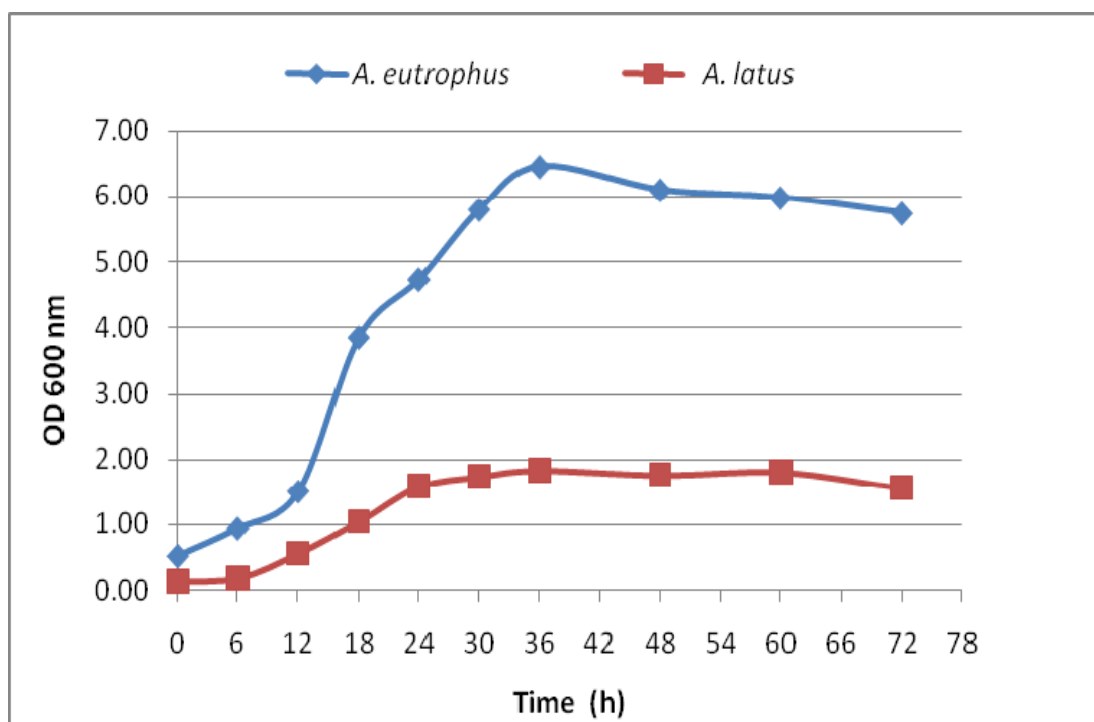
ส่วนประกอบในน้ำอ้อยคั้น	เปอร์เซ็นต์ (%w/v)
น้ำ (Water)	87.34
เยื่อ (fiber)	1.06
ของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้	11.60
	100%
ส่วนประกอบในของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ เท่ากับ 116 g/L	เปอร์เซ็นต์ (%w/v)
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (105 g/L)	90.9
ไนโตรเจน	1.2
อื่นๆ เช่น เกลือ กรดอินทรีย์อิสระ สารที่ไม่ใช่น้ำตาล เป็นต้น	7.9
	100%
ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด (Total sugar) เท่ากับ 105.5 g/L	เปอร์เซ็นต์ (%w/v)
น้ำตาลกลูโคส มีปริมาณ 21.8 g/L	20.7
น้ำตาลฟรุคโตส มีปริมาณ 26.0 g/L	24.6
น้ำตาลซูโครส มีปริมาณ 36.6 g/L	34.7

น้ำตาลมอลโตส	มีปริมาณ ~ 1.0 g/L	<0.95
น้ำตาลแลคโตส	มีปริมาณ ~ 1.0 g/L	<0.95
น้ำตาลชนิดอื่นๆ	มีปริมาณ ~ 19.1 g/L	<18.1
		100%

4.11 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs จากน้ำอ้อยโดยใช้วิธีการหมักแบบกะในขวดเขย่า

4.11.1 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้จุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ ในความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดในน้ำอ้อย 20 กรัมต่อลิตร

นำกล้าเชื้อที่มีการเจริญของจุลินทรีย์ *A. latus* TISTR 1043 และจุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 มาอย่างละ 10 มิลลิลิตร (Inoculum size 10%) ลงในอาหารสูตรเกลื้อแร่หรืออาหารหลัก ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร เลี้ยงให้เจริญในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 2-3 วัน ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ (Growth curve) โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD 600 nm) ดังแสดงในรูปที่ 4-1 พบว่าอัตราการเจริญของจุลินทรีย์แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดโดย จุลินทรีย์ *A. latus* TISTR 1043 มีอัตราการเจริญค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร¹ ดังนั้น จึงเลือกใช้จุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 ในการผลิต PHAs ต่อไป

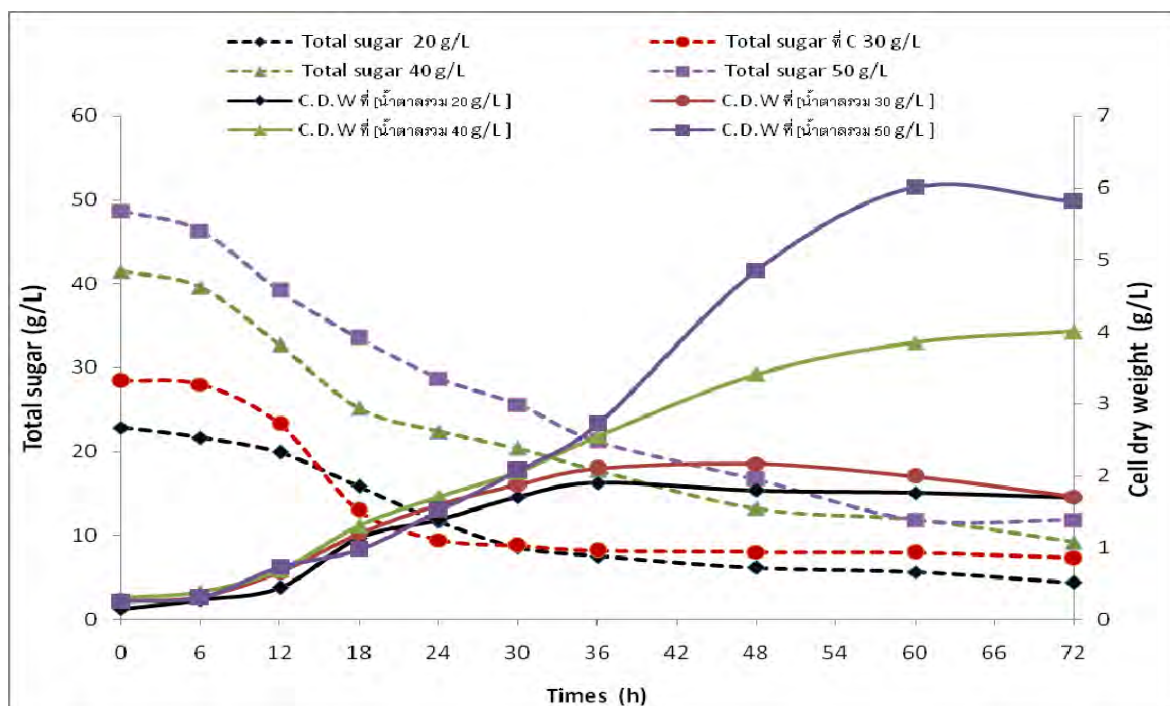


ภาพที่ 4.16 เปรียบเทียบการเจริญโดยวิธีวัดค่าความขุ่น (OD 600 nm) ของเซลล์จุลินทรีย์ *A. latus* TISTR 1043 และ จุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 ในน้ำอ้อย 20 กรัมต่อลิตร

4.11.2 ผลการศึกษาการผลิตไบโอพอลิเมอร์ (PHAs) จากน้ำอ้อยในขวดเขย่าโดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (แปรผันปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดในน้ำอ้อย 4 ระดับ)

การศึกษาปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด (Total sugar) ในน้ำอ้อยที่มีความเหมาะสมแก่การผลิต PHAs นั้นแปรผันปริมาณน้ำตาลรวมของน้ำอ้อย เพื่อผสมลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยกำหนดให้มีการแปรผัน 4 ระดับ (20, 30, 40, 50 กรัมต่อลิตร) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (ปริมาตรทำงาน 100 มิลลิลิตร) ซึ่งเพาะเลี้ยงในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่า C:N ratios 6.8:1.0 เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยการเปลี่ยนแปลงต่างๆ เช่น ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHAs และปริมาณน้ำตาลที่เหลือให้ผลดังต่อไปนี้

4.11.1.1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของชีวมวลเซลล์ (Dry cell Biomass) และปริมาณการใช้น้ำตาลรวมทั้งหมด



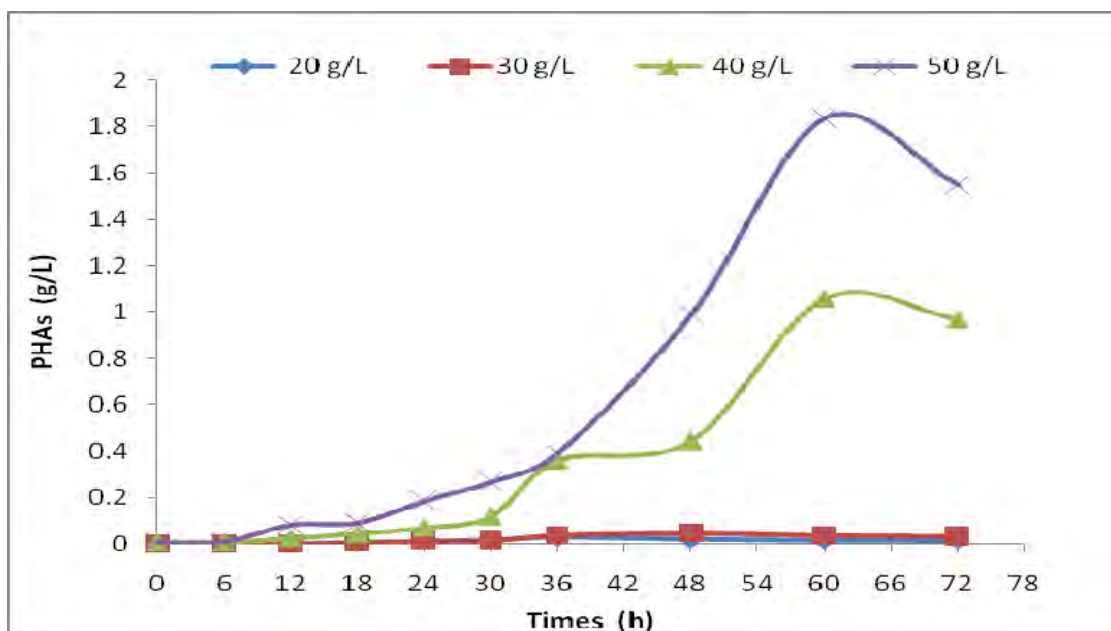
ภาพที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด และน้ำหนักรเซลล์แห้งของเซลล์ระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลรวม (Total sugar) ในน้ำอ้อยเป็น 20, 30, 40, 50 กรัมต่อลิตร การเจริญของจุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 ในน้ำอ้อยในขวดเขย่า แสดงดังในภาพที่ 4.17 พบว่าที่เวลา 0-36 ชั่วโมง การเจริญของจุลินทรีย์จะใกล้เคียงกัน ในทุกๆ ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม แต่หลังจาก 36 ชั่วโมง ผ่านไป ค่อยพบความแตกต่างของการเจริญ ซึ่งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร มีการเจริญสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมงได้ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งสูงสุดคือ 1.8994 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นค่าจึงเริ่มคงที่จนถึงเวลาการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง และที่ปริมาณน้ำตาลรวม 30 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญของจุลินทรีย์มีลักษณะใกล้เคียงกับที่สภาวะน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 40 กรัมต่อลิตร นั้นอัตราการเจริญของจุลินทรีย์มีค่าสูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง และมีค่า

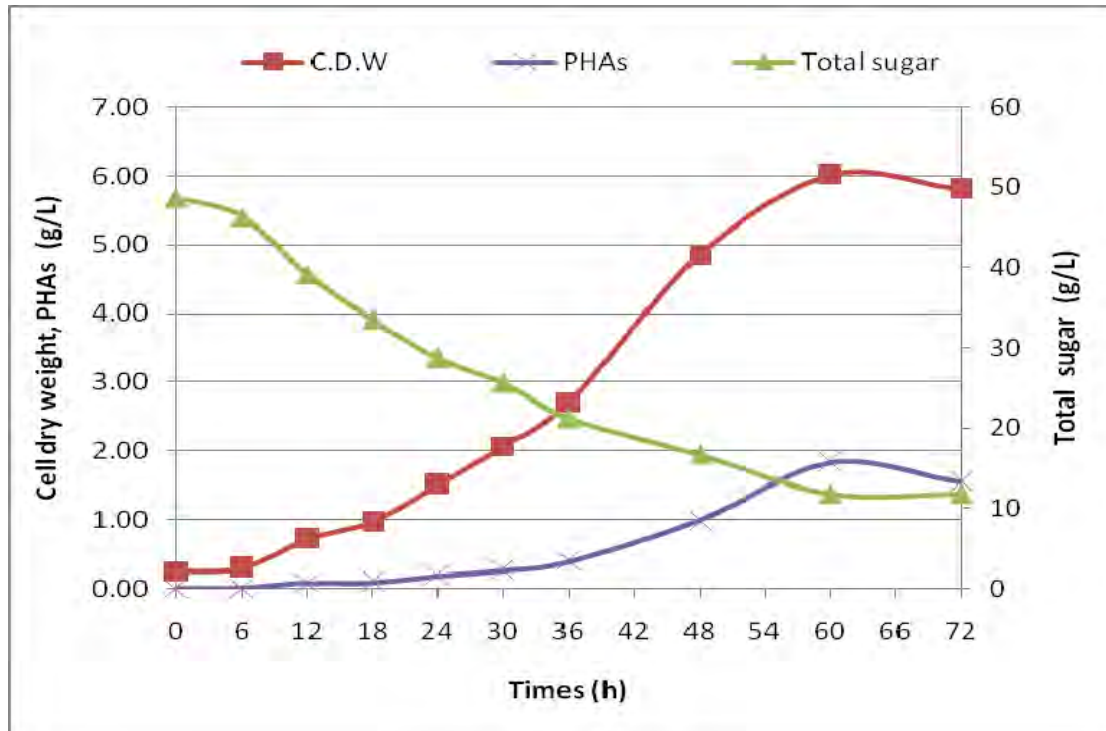
มากกว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลรวม 20, 30 กรัมต่อลิตร อย่างเห็นได้ชัด โดยได้ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งสูงสุดคือ 3.9988 กรัมต่อลิตร สำหรับที่ความเข้มข้นน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเป็นสภาวะที่ดีที่สุดต่อการเพาะเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบกับที่สภาวะความเข้มข้นอื่นๆ โดยในช่วงเวลาหลังจาก 36 ชั่วโมงผ่านไป อัตราการเจริญจะเร็วมาก สังเกตได้จากความชันของกราฟ การเจริญมีค่าสูงที่สุดที่เวลา 60 ชั่วโมง และคงที่ไปจนกระทั่ง 72 ชั่วโมง ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งมีค่าเท่ากับ 6.0129 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณการใช้ น้ำตาลของจุลินทรีย์ พบว่ามีความสอดคล้องกับอัตราการเจริญ สังเกตได้จากความชันของกราฟในช่วงเวลา 0-36 ชั่วโมง อัตราการลดลงของน้ำตาลมีค่าใกล้เคียงกันทุกๆ ความเข้มข้นแต่หลังจากเวลา 36 ชั่วโมง อัตราการลดลงของน้ำตาลสำหรับที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาล 40 และ 50 กรัมต่อลิตร มีค่ามากขึ้นตามลำดับจากการวิเคราะห์พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมที่เวลาสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีค่า 4.39, 7.28, 9.19 และ 11.86 กรัมต่อลิตร สำหรับที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

4.11.1.2 ปริมาณไบโอพอลิเมอร์ (PHAs)

เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs (ซึ่งวิเคราะห์ในรูปแบบของสาร Polyhydroxybutyrate: PHB) ภายหลังจากสิ้นสุดระยะเวลาการหมักแบบกะ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4.18 พบว่าการผลิต PHAs (ซึ่งสะสมอยู่ในเซลล์) สอดคล้องกับการเจริญ (ตามกราฟรูปที่ 4.17) เนื่องจากความเข้มข้นของเซลล์ค่อนข้างต่ำสำหรับที่ความเข้มข้นน้ำตาล 20, 30 กรัมต่อลิตร ค่า PHAs ที่ได้จึงค่อนข้างต่ำเช่นกัน คือ 0.0273 และ 0.0480 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นน้ำตาล 40, 50 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHAs มีค่าสูงขึ้นอย่างชัดเจนโดยมีค่า 1.0580 และ 1.8377 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภาพที่ 4.19 เป็นกราฟความสัมพันธ์ (profile) การเจริญ การผลิต PHAs ของจุลินทรีย์และการลดลงของน้ำตาล สำหรับการเพาะเลี้ยงที่สภาวะน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสภาวะที่ดีที่สุด จะเห็นได้ว่าการเจริญและการผลิต PHAs ของจุลินทรีย์มีลักษณะไปด้วยกันและสอดคล้องกับการลดลงของน้ำตาล



ภาพที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงการผลิตไบโอพอลิเมอร์ ระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมดแตกต่างกัน ที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.19 การเปลี่ยนแปลงการเจริญและการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs ระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาทีและ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อผลิต PHAs ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ กัน ในหัวข้อที่ผ่านมา สามารถสรุปเป็นประสิทธิภาพการผลิตในแง่ของผลได้ (yield) และอัตราการเจริญ (productivity) ดังตารางที่ 4.10 ซึ่งพบว่า ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 60 ชั่วโมง ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร มีค่าผลได้และอัตราการผลิตสูงสุด ไม่ว่าจะพิจารณาในแง่ผลได้ชีวมวล (biomass yield), $Y_{x/s}$ ผลได้ PHAs (product yield), $Y_{p/s}$ หรือผลได้ PHAs จำเพาะ (specific product yield), $Y_{p/x}$

ตารางที่ 4.10 ปริมาณผลได้ (Yield) และผลผลิตที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกัน (เวลาสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงที่ 60 ชั่วโมง)

ความเข้มข้นของ น้ำตาลรวมทั้งหมด (g/L)	Biomass (g/L)	PHAs (g/L)	Biomass yield, $Y_{x/s}$	Product yield, $Y_{p/s}$	Specific product yield, $Y_{p/x}$	Productivity (g/Lh)
20	1.8994	0.0273	0.1241	0.0018	0.0145	0.0008
30	2.1611	0.0480	0.1073	0.0024	0.0224	0.0010
40	3.9988	0.9681	0.1238	0.0230	0.1858	0.0134
50	6.0129	1.8377	0.1634	0.0499	0.3056	0.0306

ตารางที่ 4.10 เป็นการพิจารณาประสิทธิภาพการผลิตได้แก่ผลได้ (yield) และอัตราการผลิต (productivity) จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร โดยคิดที่เฉพาะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ 60 ชั่วโมงเท่านั้น เพื่อให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้นจึงวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าผลได้และอัตราการผลิตสำหรับที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร โดยคิดเปรียบเทียบที่เวลาการเพาะเลี้ยงตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงที่เวลาสุดท้ายคือ 72 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบสรุปได้ในตารางที่ 4.11 จะเห็นว่าที่เวลาการเพาะเลี้ยงที่ 60 ชั่วโมง ให้ค่าผลได้ (yield) และอัตราการผลิต (productivity) สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาอื่นๆ

ตารางที่ 4.11 ปริมาณผลได้ (Yield) ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยของความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 gL⁻¹ ที่เวลาต่างๆ

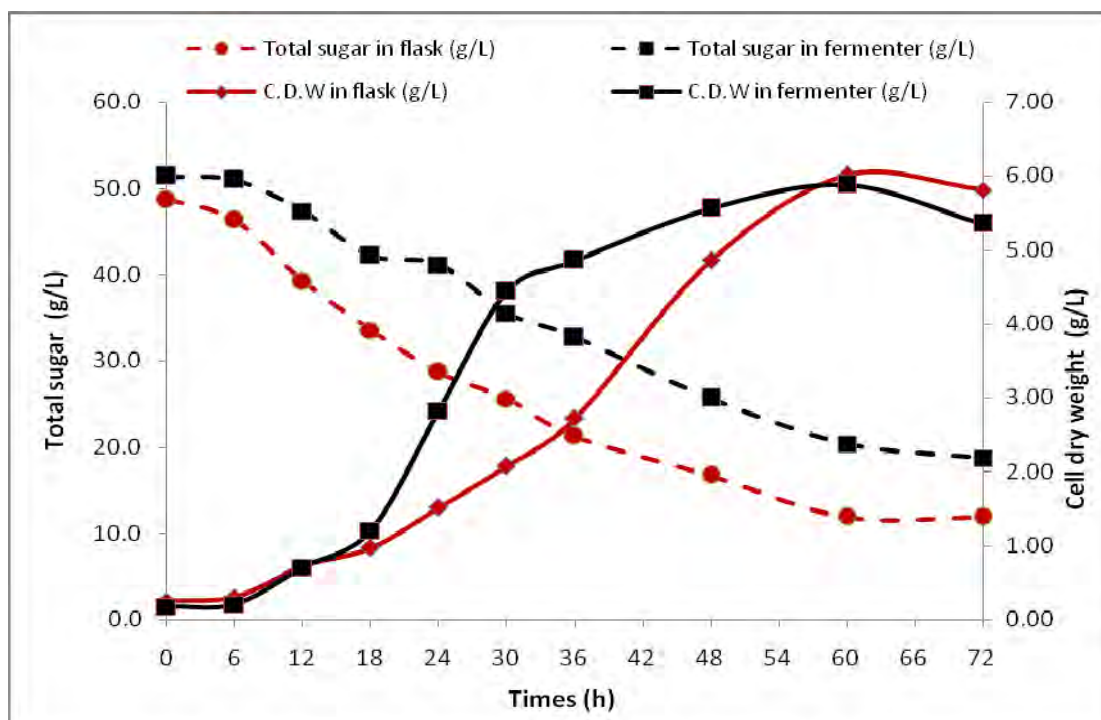
เวลา hr	C.D.W (g/L)	PHAs (g/L)	Total sugar (g/L)	Biomass yield, Y _{x/s}	Product yield, Y _{p/s}	Specific product yield, Y _{p/x}	Productivity (g/Lh)
0	0.2529	0.0085	48.66				
6	0.3043	0.0117	46.28	0.1279	0.0049	0.0384	0.0020
12	0.7233	0.0829	39.16	0.0761	0.0087	0.1146	0.0069
18	0.9703	0.0917	33.55	0.0642	0.0061	0.0945	0.0051
24	1.5143	0.1854	28.68	0.0758	0.0093	0.1224	0.0077
30	2.0729	0.269	25.57	0.0898	0.0117	0.1298	0.0090
36	2.7154	0.393	21.24	0.0990	0.0143	0.1447	0.0109
48	4.8515	0.9913	16.67	0.1517	0.0310	0.2043	0.0207
60	6.0129	1.8377	11.86	0.1634	0.0499	0.3056	0.0306
72	5.8071	1.5478	11.86	0.1578	0.0421	0.2665	0.0215

4.13 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ในระดับขยายส่วน (Up scale) ในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพ (fermenter) ขนาด 5 ลิตร โดยใช้วิธีการหมักแบบกะ

สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาการผลิต PHAs ในระดับขวดเขย่าจากหัวข้อที่ผ่านมาคือ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม (Total sugar) 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสภาวะความเข้มข้นน้ำตาลรวมที่ให้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุด จึงได้ใช้สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลค่านี้นี้สำหรับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักเท่ากับ 2 ลิตร (Working volume) อัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที พีเอช (pH) 6.5-7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2 vvm โดยปรับให้เครื่องทำงานอัตโนมัติ เพื่อควบคุมค่าความเข้มข้นออกซิเจน (pO₂) ในน้ำหมักให้มีค่าคงที่ที่ 30 %

ผลการทดลอง แสดงดังภาพที่ 4.20 ซึ่งเป็นกราฟข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยได้มีการนำข้อมูลจากการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่ามาเปรียบเทียบเพื่อให้เห็นผลไปพร้อมกัน จะเห็นว่าลักษณะการลดลงของน้ำตาลมีลักษณะคล้ายกัน แต่การเพาะเลี้ยงในขวดเขย่ามีการใช้น้ำตาลไปมากกว่า เนื่องจากความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือมีค่าต่ำกว่าเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับที่การเลี้ยงในสภาวะถึง

หมักขนาด 5 ลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นเซลล์สุดท้ายที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน (ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 60-72 ชั่วโมง) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาที่เวลาช่วง 18-60 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วง growth phase จะเห็นว่าอัตราการเจริญของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักมีค่ามากกว่าเมื่อเทียบกับในขวดเขย่า ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสภาวะแวดล้อมในถังหมักเอื้อต่อการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า เพราะในถังหมักมีการใช้ใบกวนทำให้สารมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) ได้ดีและเกิดลักษณะการเคลื่อนที่ของของไหลแบบปั่นป่วน (turbulent flow) ส่งผลดีในแง่ของการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) ไม่ว่าจะเป็นสารอาหารหรือออกซิเจน สำหรับในช่วงท้าย (60 -72 ชั่วโมง) ที่อัตราการเจริญสำหรับการเพาะเลี้ยงในถังหมักไม่ได้แตกต่างไปจากในขวดเขย่านั้น ทั้งนี้จะเป็นเพราะว่าเป็นช่วงที่ความเข้มข้นน้ำตาลเหลือน้อยซึ่งไม่ส่งผลเท่าที่ควรต่อปัจจัยที่เกี่ยวกับการถ่ายเทมวลสาร นอกจากนี้ช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่เซลล์ปรับสภาพเข้าสู่สภาวะคงที่ (stationary phase) ดังนั้น เมตาบอลิซึมภายในเซลล์จึงไม่แตกต่างกันมากนักทั้งสองสภาวะ



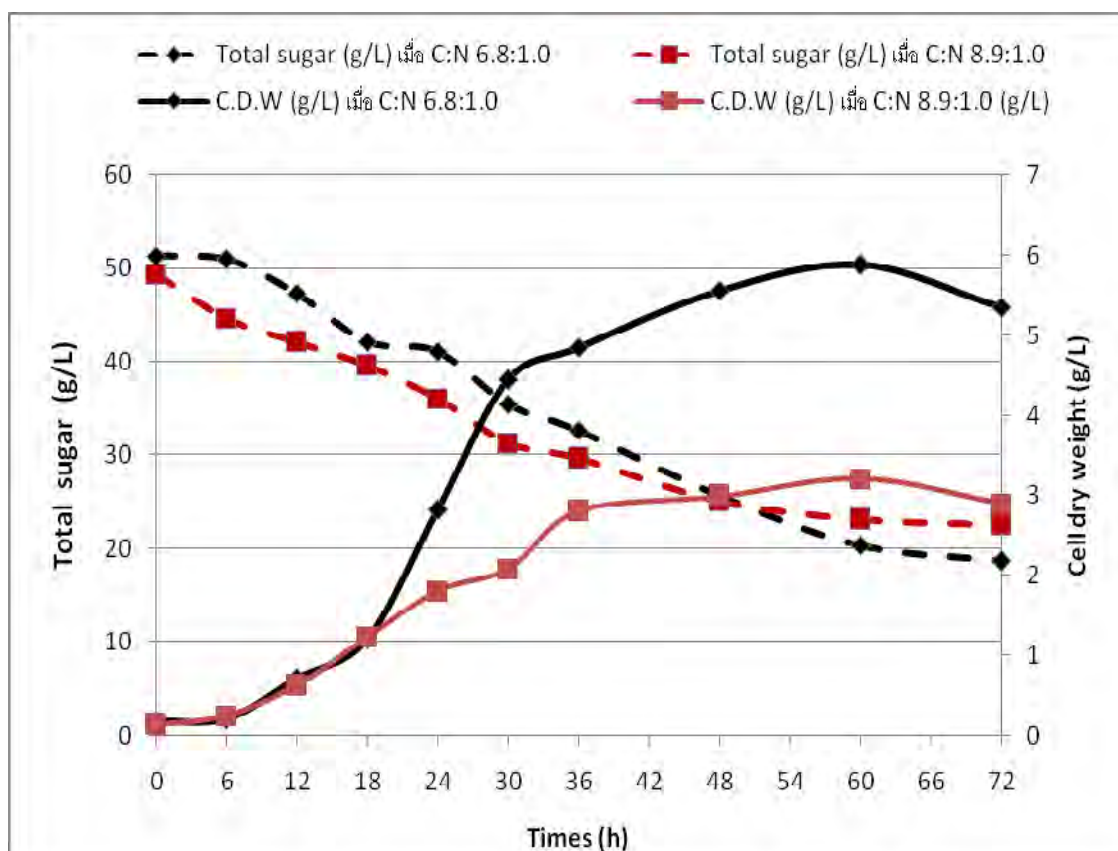
ภาพที่ 4.20 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล และน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ ในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมด 50 กรัมต่อลิตร ในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร และในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ C:N ratios = 6.8:1.0

4.14 ผลการศึกษา ค่า C:N ratios ในน้ำอ้อยในสภาวะถึงหมักปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร

ไนโตรเจนก็เป็นปัจจัยหนึ่งในการสะสมสาร PHAs ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 การศึกษาผลของไนโตรเจนต่อการเพาะเลี้ยงทำโดยการปรับปริมาณการเติม แอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบ่งเป็น 2 สภาวะ ได้แก่

4.14.1 เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในสูตรอาหารน้ำอ้อย (C:N ratio = 6.8:1.0)

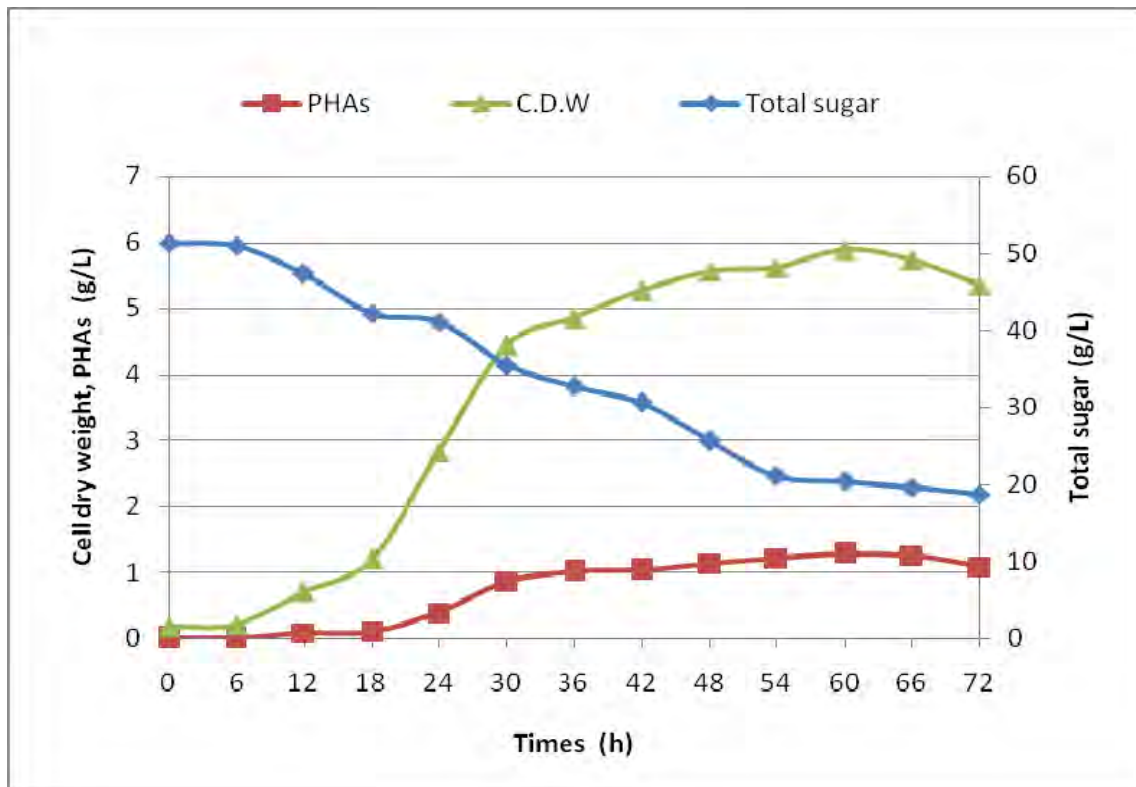
4.14.2 ไม่เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ หรือ Crude น้ำอ้อย (C:N ratio = 8.9:1.0)



ภาพที่ 4.21 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล และน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ ระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมด 50 gL^{-1} ในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่แปรผันค่า C:N ratios

จากภาพที่ 4.21 แสดงให้เห็นว่าการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในสูตรอาหารน้ำอ้อย (C:N ratio = 6.8:1.0) ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีกว่าไม่เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (C:N ratio = 8.9:1.0) อย่างเห็นได้ชัด โดยในช่วง 18-60 ชั่วโมง การเจริญของเซลล์ในกรณีที่มีการปรับค่า C:N ให้เท่ากับ 6.8:1 จะมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าซึ่งสังเกตได้จากความชันของกราฟ และที่เป็นข้อได้เปรียบอีกอย่างหนึ่งคือการลดลงของน้ำตาล มีค่าใกล้เคียงกันในขณะที่อัตราการเจริญสูงกว่า แสดงว่าผลได้ชีวมวลสำหรับการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการปรับค่า C:N จะมีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการปรับค่า C:N (crude sugar cane)

ส่วนกราฟภาพที่ 4.22 แสดงถึงค่า PHAs ที่ผลิตได้โดยเซลล์ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีการปรับค่า C:N เท่ากับ 6.8:1.0 ส่วนตารางที่ 4.12 เป็นการพิจารณาประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงและการผลิต PHAs ในแง่ของผลได้และอัตราการผลิต PHAs ที่เวลาการเพาะเลี้ยงต่างๆ ซึ่งพบว่า ผลได้ชีวมวลและอัตราการผลิต PHAs ในช่วงเวลา 48-60 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกันโดยที่ 60 ชั่วโมงมีค่าสูงสุด



รูปที่ 4.22 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล และน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ และการผลิตไบโอพอลิเมอร์ ระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมด 50 กรัมต่อลิตร ในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ที่ C:N ratios = 6.8:1.0

ตารางที่ 4.12 ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ (Biomass) และปริมาณไบโอพอลิเมอร์ (PHAs) ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ C:N ratios = 6.8:1.0

เวลา hr	C.D.W (g/L)	PHB (g/L)	Total sugar (g/L)	Biomass yield, $Y_{x/s}$	Product yield, $Y_{p/s}$	Specific product yield, $Y_{p/x}$	Productivity (g/Lh)
0	0.1764	0.0071	51.35				
6	0.2058	0.0091	50.94	0.5020	0.0222	0.0442	0.0015
12	0.7057	0.0788	47.32	0.1751	0.0196	0.1117	0.0066
18	1.2055	0.1012	42.15	0.1310	0.0110	0.0839	0.0056
24	2.8227	0.3904	41.10	0.2754	0.0381	0.1383	0.0163
30	4.4399	0.8609	35.47	0.2796	0.0542	0.1939	0.0287
36	4.8515	1.0174	32.70	0.2601	0.0546	0.2097	0.0283
42	5.2632	1.0377	30.56	0.2532	0.0499	0.1972	0.0247
48	5.5572	1.1275	25.67	0.2164	0.0439	0.2029	0.0235
54	5.616	1.2174	21.06	0.1854	0.0402	0.2168	0.0225
60	5.8806	1.2812	20.36	0.1898	0.0413	0.2179	0.0214
66	5.7336	1.2522	19.57	0.1804	0.0394	0.2184	0.0190
72	5.3514	1.0870	18.69	0.1639	0.0333	0.2031	0.0151

4.5 การเปรียบเทียบการผลิตสารไบโอพอลิเมอร์ PHAs ในแง่ของจุลินทรีย์และแหล่งวัตถุดิบ

ตารางที่ 4.13 เป็นข้อมูลการผลิต PHAs จากการเพาะเลี้ยงสำหรับจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ รวมถึงชนิดของแหล่งอาหารที่ใช้ เพื่อที่จะให้เห็นถึงประสิทธิภาพการผลิตในแง่ของผลได้ชีวมวลและอัตราการผลิตโดยเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้ของงานวิจัยนี้กับงานวิจัยที่ผ่านมา จะเห็นได้ว่าค่าผลได้และอัตราการผลิต PHAs ค่อนข้างจะต่ำสำหรับงานวิจัยนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของคนอื่น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะงานวิจัยของ Kim และคณะ, Yamance และคณะ ในปี 1996 ใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งต่างจากงานวิจัยนี้ที่ใช้น้ำอ้อยดิบ (crude sugar cane) ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำตาลชนิดต่างๆ รวมทั้งสารอื่นๆ ที่อาจจะมีผลยับยั้งต่อการเจริญ

ตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบการผลิต PHAs จากวัตถุดิบต่างชนิดกัน

Bacteria	<i>A. eutrophus</i>	<i>A. latus</i>	<i>A. eutrophus</i>	<i>A. eutrophus</i>	<i>A. eutrophus</i>
Carbon source	Glucose	Sucrose	Sweet sorghum	Sugar cane juice	Sugar cane juice
Limiting Nutrient	Nitrogen	None	Nitrogen	Nitrogen	Nitrogen
Fermentation Method	Glucose concentration control	pH-stat	pH-stat	pH-stat in fermenter	pH-stat in flask
Culture time	50	28.45	48	60	60
Cell concentration (g/L)	164	143	13.40	5.88	6.01
PHB concentration (g/L)	121	71.4	6.87	1.28	1.84
PHB content (%)					
Specific product yield ($Y_{p/x}$)	76	50	51.3	21.8	30.6
PHB productivity (g/Lh)	2.42	2.5	0.143	0.021	0.031
PHB yield (gPHB/g substrate)	0.3	0.17	0.27	0.0413	0.0499
sugar consumed ($g L^{-1}$)	403.3	420	25.4	30.99	33.8
Reference	Kim et al.1994	Yamance et al.1996	Kaewkannetra et al.2007	current research **	

หมายเหตุ ** ข้อมูลจากงานวิจัยครั้งนี้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ
(Conclusions and Suggestion)

5.1 สรุปผลการทดลอง (Conclusions)

องค์ประกอบหลักที่พบในน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานพบว่าประกอบไปด้วยน้ำตาลหลายชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส 12.32 กรัมต่อลิตร น้ำตาลฟรุคโตส 5.75 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 175.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจากการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ *A. latus* TISTR 1043 มาทดลองเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมในน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวาน 20 กรัมต่อลิตร พบว่าจุลินทรีย์ *A. latus* TISTR 1043 มีอัตราการเจริญค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงได้มีการคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินที่สามารถผลิต PHAs จากน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานได้โดยนำไปเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อ้างอิงที่สามารถผลิต PHAs ได้ 3 สายพันธุ์คือ *A. latus*, *A. eutrophus* และ *Hydrogenophaga* sp. พบว่าจากจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกจากดิน สายพันธุ์ S4 มีความเหมาะสมต่อการนำมาผลิต PHAs และได้รับการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลว่ามีความคล้ายคลึงกับจุลินทรีย์ *B. aryabhattai* ดังนั้นจึงได้ *B. aryabhattai* เพื่อใช้ในการผลิต PHAs จากน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวาน ที่มีการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างและชนิดของไนโตรเจน พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวให้ผลผลิตของ PHA สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 และอยู่เรื่อยเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. aryabhattai* เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก (ประมาณ 24 ชั่วโมง) จากนั้นนำจุลินทรีย์มาเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานเป็นองค์ประกอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิต PHA โดยมีการกลั่นกรองปัจจัยโดยใช้วิธีการของ Placket และ Burman และพบว่า มีเพียง Total sugar และ Urea เท่านั้นที่มีผลต่อการเจริญ *B. aryabhattai* และผลิต PHB จากน้ำคั้นต้นข้าวฟ่างหวาน หลังจากนั้นนำปัจจัยทั้งสองมาออกแบบการทดลองแบบ CCD ทำให้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับ *B. aryabhattai* ดังนี้ Total sugar 70.57 กรัมต่อลิตร Urea 9.37 กรัมต่อลิตร Na_2HPO_4 4 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 1 กรัมต่อลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 กรัมต่อลิตร และ Trace element 1 mL/L ในระดับฟลasks สามารถผลิตเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.22 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHAs สูงสุดเท่ากับ 2.43 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาในการหมักทั้งสิ้น 66 ชั่วโมง คิดเป็นผลได้มวลเซลล์ (Biomass yield, $Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.17 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลรวมที่ถูกใช้ คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ (Product yield, $Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.066 กรัม PHAs ต่อกรัมน้ำตาลรวมที่ถูกใช้ จุลินทรีย์สามารถสะสม PHA เท่ากับ 39.07 %w/w และคิดเป็นอัตราการผลิต (Productivity) เท่ากับ 0.037 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง สำหรับสภาวะการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร พบว่าที่เวลาหมัก 72 ชั่วโมง ได้ปริมาณเซลล์แห้งจุลินทรีย์สูงสุดเท่ากับ 10.38 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHAs สูงสุดเท่ากับ 4.36 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้มวลเซลล์ ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.19 คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.081 จุลินทรีย์สามารถสะสม PHAs เท่ากับ 42.00 %w/w และคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 0.061 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะสามารถเพิ่มมวลเซลล์ ได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 14.20 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 54 และ PHAs เท่ากับ 4.84 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 66

ในกรณีของน้ำอ้อย จากการศึกษาองค์ประกอบหลักน้ำอ้อยพบว่าประกอบไปด้วยน้ำของแข็งที่สามารถละลายได้และส่วนที่เป็นเยื่อ (fiber) อีกทั้งในน้ำอ้อยนั้นประกอบไปด้วยน้ำตาลหลายชนิดในหน่วย กรัมต่อลิตร เช่น น้ำตาลกลูโคส (21.8) น้ำตาลฟรุคโตส (26.0) น้ำตาลซูโครส (36.6) น้ำตาลแล็กโตส (~1) น้ำตาลมอลโตส (~1) และน้ำตาลอื่นๆ (~ 19.1) ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ *Alcaligenes latus* TISTR 1043 มาเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมในน้ำอ้อย 20 กรัมต่อลิตร พบว่า *A. latus* TISTR 1043 มีอัตราการเจริญค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญของ *A. eutrophus* TISTR 1095 ดังนั้นจึงได้เลือก *A. eutrophus* TISTR 1095 เพื่อใช้ในการผลิต PHAs จากน้ำอ้อย จากการแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรวม 4 ระดับ (20, 30, 40, 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 คือ 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้เซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.0129 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHAs สูงสุดเท่ากับ 1.8377 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาในการหมักทั้งสิ้น 60 ชั่วโมง คิดเป็นผลได้มวลเซลล์ (Biomass yield, $Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.1634 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลรวมที่ถูกใช้ คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ (Product yield, $Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.0499 กรัม PHAs ต่อกรัมน้ำตาลรวมที่ถูกใช้ คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Specific product yield, $Y_{p/x}$) เท่ากับ 0.3056 กรัม PHAs ต่อกรัมเซลล์แห้ง และคิดเป็นอัตราการผลิต (Productivity) เท่ากับ 0.0306 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง สำหรับสภาวะการหมักระดับขยายส่วนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร พบว่าที่เวลาหมัก 60 ชั่วโมงได้ปริมาณเซลล์แห้งจุลินทรีย์สูงสุดเท่ากับ 5.8806 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHAs สูงสุดเท่ากับ 1.2812 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้มวลเซลล์ ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.1897 คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.0413 คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ ($Y_{p/x}$) เท่ากับ 0.2180 และคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 0.0213 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งจากค่าผลได้และอัตราการผลิตนี้แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการใช้น้ำอ้อยเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิต PHAs ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากภายในน้ำอ้อยอาจมีสารยับยั้ง (inhibitor) บางชนิดที่เป็นพิษต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถผลิต PHAs ได้อย่างเต็มที่ โดยถ้าคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ Product yield ($Y_{p/s}$) และค่า Specific product yield ($Y_{p/x}$) ในพลาสติกและถังหมักมีค่าประมาณ 5%, 4% และ 31 %, 22% ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ (Suggestion)

จากผลการศึกษาการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักสองชนิด จะชี้ให้เห็นว่า การใช้คั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานมีศักยภาพเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการผลิต PHAs อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาเพื่อเพิ่มอัตราการสะสมของจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ปริมาณของ PHAs สูงขึ้นดังต่อไปนี้

- 1) ควรมีการศึกษาจุลินทรีย์เพิ่มเติมโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพการผลิตสูงขึ้น เช่น Recombinant *E. coli* เป็นต้น
- 2) ในแง่ของกระบวนการผลิตเอง อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมในการเติมสารเร่งการเจริญเติบโตอย่างอื่นเพื่อเติมลงไปในการอาหารที่ใช้เลี้ยงร่วมด้วย เช่น วิตามินต่างๆ ไบโอดีท หรือเพิ่มแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกร่วมด้วยเช่น น้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor)
- 3) ควรศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการควบคุมการสักรัด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการเก็บเกี่ยวสารผลิตภัณฑ์ให้ได้ทั้งปริมาณ (Yield) สูงและความบริสุทธิ์ (purity) สูง เพื่อให้สามารถเพิ่มมูลค่านำไปใช้ในอุตสาหกรรมยาได้

ในขณะที่ในกรณีการใช้น้ำอ้อยเป็นสารอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 เพื่อผลิต PHAs นั้นมีศักยภาพพอ อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการผลิต PHAs จากน้ำอ้อยให้มีความมากขึ้น ดังต่อไปนี้

- 4) ควรมีการศึกษาจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นที่มีการคัดแยกได้จากแหล่งดินหรือแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น บริเวณดินที่ใช้เพาะปลูกอ้อย เป็นต้น หรืออาจมีการศึกษาเพิ่มเติมการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพการผลิตสูงขึ้น เช่น Recombinant *E. coli* เป็นต้น
- 5) ในแง่ของกระบวนการผลิตเอง อาจมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของปริมาณออกซิเจนที่มีผลในรูปของอัตราการให้ออกซิเจนหรือเปอร์เซ็นต์ค่าอิ่มตัวของออกซิเจนในน้ำหมัก นอกจากนั้น อาจศึกษาถึงผลของการเติมไนโตรเจนในน้ำอ้อย (C:N) รวมไปถึงวิธีการเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ เช่น การเพาะเลี้ยงแบบกะเปรียบเทียบกับแบบกึ่งกะ (fed-batch) การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous) และการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะซ้ำ (repeated fed batch) เป็นต้น
- 6) ควรศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการควบคุมการสักรัด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการเก็บเกี่ยวสารผลิตภัณฑ์ให้ได้ทั้งปริมาณ (Yield) สูงและความบริสุทธิ์ (purity) สูง ซึ่งอาจรวมทั้งวิธีการสักรัดและสภาวะการสักรัดที่เหมาะสม (อุปกรณ์สักรัดและชนิดของสารสักรัด เป็นต้น)

เอกสารอ้างอิง

(References)

- ประสิทธิ์ ใจศิลป์. (2549). ม.ขอนแก่นเปิดตัวข้าวฟ่างหวาน. ค้นเมื่อ 15 กุมภาพันธ์ 2551, เข้าถึงข้อมูลจาก <http://www.aggiethai.com>
- วนิดา วัฒนการุณ (2536). การควบคุมกระบวนการสังเคราะห์พอลิ-เบต้า-ไฮดรอกซีอัลคาโนเอท ใน *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, วรสิทธิ์ โทจำปาและประวิทย์ วงคงคาเทพ. (2544). วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ ฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สาร PHAs [ออนไลน์] [อ้างเมื่อ 18 กุมภาพันธ์ 2553] เข้าถึงได้จาก: <http://clgc.rdi.ku.ac.th/article/es/bio/bio.html>
- อ้อย [ออนไลน์] [อ้างเมื่อ 17 กุมภาพันธ์ 2553] เข้าถึงได้จาก: [http://www.natres.psu.ac.th/Department/Plant Science/510-211/sugarcane.htm](http://www.natres.psu.ac.th/Department/Plant%20Science/510-211/sugarcane.htm)
- Abe H, Doi Y, Aoki H, Akehata T, Hori Y, Yamaguchi A. Physical properties and enzymic degradability of copolymers of (R)-3-hydroxybutyric and 6-hydroxyhexanoic acids. **Macromolecules** 1995; 28(23): 7630–7637.
- Agus J, Kahar P, Abe H, Doi Y, Tsuge T. Molecular weight characterization of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*. **Polym Degrad Stab** 2006; 91: 1138–1146.
- Ajandouz EH, Castan S, Jakob S, Puigserver A. A fast, sensitive HPLC method for the determination of esterase activity on alpha-tocopheryl acetate. **J. Chromatogr. Sci** 2006; 44(10): 631–633.
- Alias Z, Tan IK. Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. **Bioresour Technol** 2005; 96(11): 1229-1234.
- Altekar M, Homon CA, Kashem MA, Mason SW, Nelson RM, Patnaude LA, Yingling J, Taylor PB. Assay optimization: A statistical design of experiments approach. **Journal of the Association for Laboratory Automation** 2006; 11: 33-41.
- Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews** 1990; 54(4): 450-472.
- Andrea Legat A, Gruber C, Zangger K, Wanner G, Stan-Lotter H. Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other haloarchaeal species. **Appl Microbiol Biotechnol** 2010; 87(3): 1119–1127.

- Arshad MU, Jamil N, Naheed N, Hasnain S. Analysis of bacterial strains from contaminated and non-contaminated sites for the production of biopolymers. **Afr Biotechnol** 2007; 6: 1115-1121.
- Arun A. Arthi R, Shanmugabalji V, Eyini M. Microbial production of poly- β -hydroxybutyrate by marine microbes isolated from various marine environments. **Bioresource Technology** 2009; 100: 2320-2323.
- Atlas RM. **Handbook of microbiological media**. 3rd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Pr; 2004.
- Baisier WM, Labuza TP. Maillard browning kinetics in a liquid model system. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** 1992; 40: 707–713.
- Barnard GN, Sanders JK. The poly- β -hydroxybutyrate granule *in vivo*. A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells. **J Biol Chem** 1989; 264(6): 3286–3291.
- Braunegg G, Genser K, Bona R, Haage G. Production of PHAs from agricultural material. **Macromol Symp** 1999; 144: 375-383.
- Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. **Bergey's manual of determinative bacteriology: volume 2, the proteobacteria**. 2nd ed. New York; Springer: 2005.
- Burdon KL. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. **J Bacterial** 1946; 52: 665-678.
- Byrom D. Production of poly- β -hydroxybutyrate: Poly- β -hydroxyvalerate copolymers. **FEMS Microbiology Letters** 1992; 103(2-4): 247-250.
- Chen GQ. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. In: Chen GQ, ed. **Plastics from bacteria**. Springer Berlin: Heidelberg; 2010.
- Chen CW, Trong-Ming D, Hsiao-Feng Y. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerated) by *Haloferax mediterranei*. **Process Biochem** 2006; 41: 2289-2296.
- Chen GQ, Zhang G, Park SJ, Lee SY. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Appl. Microbiol. Biotechnol** 2001; 57: 50-55.
- Chen G, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials** 2005; 26(33): 6565-6578.
- Chien C, Chen C, Choi M, Kung S, Wei Y. Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment. **Journal of Biotechnology** 2007; 132(3): 259-263.
- Choi JI, Lee SY. High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol** 1999; 65: 4363–4368.
- Cromwick AM, Foglia T, Lenz RW. The microbial production of poly(hydroxyalkanoates) from

- tallow. **Appl Microbiol Biotechnol** 1996; 46: 464–469.
- Dai Z, Zou X, Chen G. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) as an injectable implant system for prevention of post-surgical tissue adhesion. **Biomaterials** 2009; 30(17): 3075–3083.
- Dawes EA, Senior PJ. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Adv Microb Physiol** 1973; 10: 135–266.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem** 1956; 28:350–356.
- Durner R, Witholt B, Egli T. Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates. **Appl Environ Microbiol** 2000; 66: 3408–3414.
- Egli T. The concept of multiple-nutrient-limited growth of microorganisms and some of its possible applications in biotechnology processes. **Chimia** 1999; 53: 525–528.
- Emeruwa AC, Hawirko RZ. Poly-β-Hydroxybutyrate Metabolism during growth and sporulation of *Clostridium botulinum*. **J bacterial** 1973; 116 (2): 989–993.
- Erdogdu F. **Optimization in food engineering**. New York: CRC Press; 2009.
- Evan JD, Sikdar SK. Biodegradable plastic: An idea whose time has come. **Chemtech** 1990; 20: 38–42.
- Federle TW, Barlaz MA, Pettigrew CA, Kerr KM, Kemper JJ, Nuck BA, Schechtman LA. Anaerobic biodegradation of aliphatic polyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) and poly(ε-caprolactone). **Biomacromolecules** 2002; 3: 813–822.
- Finkler C, Giacomet C, Muschner VC, Salzano FM, Freitas LB. Molecular investigations of pathogenesis-related Bet v1 homologues in *Passiflora* (*Passifloraceae*). **Genetica** 2005; 124; 117–125.
- Gouda MK, Swellam AE, Omar SH. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research** 2001; 156(3): 201–207.
- Grondahl L, Chandler-Temple A, Trau M. Polymeric grafting of acrylic acid onto poly(3-hydroxybutyrate-co-valerate): surface functionalization for tissue engineering applications. **Biomacromolecules** 2006; 6: 2197–2203.
- Grothe E, Young MM, Chisti Y. Fermentation optimization for the production of poly(β-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme Microb Technol.* 1999; (25): 132–141.

- Griebel R, Merrick JM. Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate: effect of mild alkaline extraction on native poly- β -hydroxybutyrate granules. **J Bacteriol** 1971; 108: 782–789.
- Griebel R, Smith Z, Merrick JM. Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate. I. Purification, composition and properties of native poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. **Biochemistry** 1968; 7(10): 3676–3681.
- Halami PH. Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. **World J Microbiol Biotechnol** 2008; 24: 805–812.
- Helm J, Wendlandt K-D, Jechorek M, Stottmeister U. Potassium deficiency results in accumulation of ultra-high molecular weight poly-beta-hydroxybutyrate in a methane-utilizing mixed culture. **J Appl Microbiol** 2008; 105: 1054-1061.
- Hogarth DM. Genetics of sugarcane. In: D.J. Heinz, Editor. Sugarcane improvement through breeding. Amsterdam: Elsevier; 1987: 255–271.
- Hrabak O. Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate. **FEMS Microbiology Letters** 2006; 103: 251–255.
- Jacquel N, Lo CW, Wei YH, Wu HS, Wang SS. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). **Biochemical Engineering Journal** 2008; 39(1): 15-27.
- James PC. Cane sugar handbook. 11th ed. New York: A Wiley Interscience Publication; 1985.
- Jing H, Kitts DD. Chemical and biochemical properties of casein–sugar Maillard reaction products. **Food and Chemical Toxicology** 2002; 40: 1007–1015.
- Jogdand SN. Bioplastic [Online] 1999 [cited 2008 May 26]. Available from: <http://members.rediff.com/jogsn/>
- Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y, Castro-Sowinski S. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Critical Reviews in Microbiology** 2005; 31: 55-67.
- Kallio RE, Harrington AA. Sudanophilic granules lipid of *Pseudomonas methanica*. **J Bacteriol** 1960; 80: 321-324.
- Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: Bioplastics with a green agenda. **Current Opinion in Microbiology** 2010; 13(3): 321-326.
- Khanna S, Srivastava A K. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. **Process Biochemistry** 2005; 40 (6): 2173-2182.
- Kim BS. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microb Technol** 2000; 27: 774–777.
- Kim BS, Chang HN. Control of glucose feeding using exit gas data and its application to the production of PHB from tapioca hydrolysate by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol Techniques** 1995; 9: 311–314.

- Kim GJ, Lee IY, Choi DK, Yoon SC, Park YH. High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* BM01 using glucose. **J Microbiol Biotechnol** 1996; 6:221–224.
- Kim YB, Lenz RW. Polyesters from microorganisms. In : Babel W, Steinbüchel A., editor. **Biopolyesters**. Springer Berlin: Heidelberg; 2001. Vol. 71; 51-79.
- Kim HO, Wee YJ, Kim JN, Yun JS, Ryu HW. Production of lactic acid from cheese whey by batch and repeated batch cultures of *Lactobacillus* sp. RKY2. **Appl Biochem Biotechnol** 1995; 131: 694-704.
- Koller M, Atlić A, Dias M, Reiterer A, BrauneGG, G. Microbial PHA production from waste raw materials. In: Chen GQ, editor. **Plastics from bacteria**. Springer Berlin: Heidelberg; 2010.
- Kominek LA, Halvorson HO. Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. **J Bacteriol** 1965; 90(5): 1251–1259.
- Lana X, Liua P, Xiaa S, Jiaa C, Mukunzia D, Zhang X, et al. Temperature effect on the non-volatile compounds of Maillard reaction products derived from xylose–soybean peptide system: Further insights into thermal degradation and cross-linking. **Food chemistry** 2010; 120(2): 967-972.
- Law JH, Slepecky RA. Assay of poly-3-hydroxybutyric acid. **Chem J Bacteriol** 1961; 82: 33–36.
- Lee SY. Bacterial polyhydroxyalkanoates, **Biotechnol. Bioeng** 1995; 49: 1–14.
- Lee J, Lee SY, Park S, Middelberg APJ. Control of fed-batch fermentations. **Biotechnol Adv** 1999; 17: 29–48.
- Leejarkpai T. **Bioplastics**. MTEC: Bangkok; 2006.
- Lin LP, Sadoff HL. Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of beta-hydroxybutyrate. **J Bacteriol** 1968; 95(6): 2336–2343.
- Luengo JM, García B, Sandoval A, Naharro G, Olivera ER. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology** 2003; 6(3): 251-260.
- Madison LL, Huisman GW. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiol Mol Biol Rev** 1999; 63(1): 21–53.
- Merrick JM, Doudoroff M. Depolymerization of poly-β-hydroxybutyrate by an intracellular enzymes system. **J Bacteriol** 1964; 88: 60–71.
- Meyer A. **Praktikum der botanischen bakterienkunde**. Jena, 1903.
- Mizuno K, Ohta A, Hyakutake M, Ichinomiya Y, Tsuge T. Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. **Polymer Degradation and Stability** 2010; 95(8): 1335-1339.
- Moreira JR. Sugar cane for energy recent results and progress in Brazil. **Energy Sustain Develop** 2000; 17: 43–54.

- Myers RH, Montgomery DC. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1995.
- Nakata HM. Effect of pH on intermediates produced during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. **J Bacteriol** 1963; 86: 577-581.
- Nath A, Dixit M, Bandiya A, Chavda S, Desai AJ, Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. **Bioresour Technol** 2008; 99: 5749–5755.
- Nikel PI, Pettinari MJ, Méndez BS, Galvagno MA. Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly(3-hydroxybutyrate) production by a recombinant *Escherichia coli* strain using agro-industrial by products. **Int Microbiol** 2005; 8(4): 243-250.
- Norback JB. Techniques for optimization of food processes. **Food Tech** 1980; 34(2): 86-88.
- Obruca S, Marova I, Melusova S, Mravcova L. Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037. **Ann Microbiol. Heidelberg: Springer Berlin**; 2011.
- Oeding V, Schlegel HG. β -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. **Biochem J** 1973; 134: 239-248.
- Ojumu TV, Yu J, Solomon BO. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacteria biodegradable polymer. **African Journal of Biotechnology** 2004; 3(1): 18-24.
- Olabi AG, Casalino G, Benyounis KY, Rotondo A. Minimisation of the residual stress in the heat affected zone by means of numerical methods. **Materials & Design** 2007; 28(8): 2295-2302.
- Ostle AG, Holt JG. Nile blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. **Appl Environ Microbiol** 1982; 44: 238–241.
- Page WJ, Cornish A. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. **Appl Environ Microbiol** 1993; 59: 4236–4244.
- Pomeranz Y, Meloan CE. **Food Analysis: Theory and practice**. 3rd ed. New York: Chapman & Hall; 1994.
- Postma J, van Veen JA, Walter S. Influence of difference initial soil moisture contents on the distribution and population dynamics on introduced *Rhizobium leguminosarum*. **Soil Biol Biochem** 1989; 21: 437-442.
- Purushothaman M, Anderson R, Narayana S, Jayaraman V. Industrial byproducts as

- cheaper medium components influencing the production of polyhydroxyalkanoates (PHA)-biodegradable plastics. **Bioprocess Biosyst Eng** 2001; 24: 131-136.
- Ramadas NV., Singh SK., Soccol CR., Pandey A. Polyhydroxybutyrate Production using Agro-industrResidue as Substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. **Braz. Arch. Biol. Technol** 2009; 52: 17-23.
- Reddy CS, Ghai R, Rashmi, Kalia VC. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology** 2003; 87(2): 137–146.
- Ryu HW, Hahn SK, Chang YK, Chang HN. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. **Biotechnol Bioeng** 1997; 55: 28-32.
- Segura D, Cruz T, Espin J. Encystment and alkylresorciol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis. **Arch Microbiol** 2003; 179: 437-443.
- Silva JA, Tobella LM, Becerra J, Godoy F, Martínaz MA. Biosynthesis of poly-beta-hydroxyalkanoate by *Brevundimonas vesicularis* LMG P-23615 and *Sphingopyxis macrogoltabida* LMG 17324 using acid-hydrolyzed sawdust as carbon source. **J Biosci Bioeng** 2004; 103(6): 542-546.
- Spiekermann P, Rehm BHA, Kalscheuer R, Baumeister D, Steinbüchel A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Arch Microbiol** 1999; 171: 73–80.
- Steinbüchel A, Hein S. Biochemical and Molecular Basis of Microbial Synthesis of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** 2001; 71: 81-123.
- Steinbüchel A, Aerts K, Babel W, Föllner C, Liebergesell M, Madkour MH et al. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. **Can J Microbiol** 1995; 41(Suppl1): 94–105.
- Steinbüchel A, Lutke-Eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochem Eng J** 2003; 16: 81-96.
- Stowe RA, Mayer RP. Efficient screening of process variables. **Ind Eng Chem** 1966; 58(2): 36–40.
- Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. **Progress in Polymer Science** 2000; 25(10): 1503-1555.

- Sumaya-Martínez T, Castillo-Morales A, Favela-Torres E, Huerta-Ochoa S, Prado-Barragán LA. Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*): I. A study of hydrolysis parameters using response surface methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2005; 85(1): 98–104.
- Tanaka T, Yabe T, Teramachi S, Iwata T. Mechanical properties and enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] fibers stretched after isothermal crystallization near *t_g*. **Polymer Degradation and Stability** 2007; 92(6): 1016-1024.
- Taniguchi I, Kagotani K, Kimura Y. Microbial production of poly (hydroxyalkanoate) from waste edible oils. **Green Chem** 2003; 5(5): 545–548.
- Tesema Y, Raghavan D, Stubbs J. Bone cell viability on methacrylic acid grafted and collagen immobilized porous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **J Appl Polym Sci** 2005; 98: 1916–1921.
- Uppal SK, Thind KS, Gill RS. Feasibility of ethanol production from cultivated sugarcane varieties of Punjab. *Sugar Technol* 2006; 8: 180–183.
- Valappil SP, Misra SK, Boccaccini AR, Keshavarz T, Bucke C, Roy I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. **J. Biotechnol** 2007; 127: 475-487.
- Van Elsas JD, van Overbeek LS. In: Kjelleberg S, editor. Bacterial responses to soil stimuli. **Starvation in bacteria**. Plenum: New York; 1993.
- Vicente G, Martínez M, Aracil J, Optimization of integrated biodiesel production. Part I. A study of the biodiesel purity and yield. **Bioresour Technol** 2007; 98: 1724–1733.
- Wang Y, Inoue Y. Effect of dissolved oxygen concentration in the fermentation medium on transformation of the carbon sources during the biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) by *Alcaligenes latus*. **International Journal of Biological Macromolecules** 2001; 28(3): 235-243.
- Wang J, Yu J. Kinetic analysis on inhibited growth and poly(3-hydroxybutyrate) formation of *Alcaligenes eutrophus* on acetate under nutrient-rich conditions. **Process Biochemistry** 2000; 36: 201-207.
- Wang F, Lee SY. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3703-3706.
- Wang J, Bakken LR. Screening of soil bacteria for poly-β-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. **Microb Ecol** 1998; 35: 94–101.
- Wheals AE, Basso LC, Alves DMG, Amorin HV. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol* 1999; 17: 482–487.

- Williams KR. Statistical approaches to experimental data-comparing screening designs. **Ind. Eng. Chem** 1963; 55(6): 29-32.
- Williams S, Varahramyan K, Maszara W. Statistical optimization and manufacturing sensitivity analysis of 0.18 μm SOI MOSFETs. **Microelectronic Engineering** 1999; 49(3-4): 245-261.
- Williamson DH, Wilkinson JF. The isolation and estimation of the poly- β -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. **J Gen Microbial** 1958; 19: 198-209.
- Wiriyaacharee P. **Advanced experimental design**. Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University: Chiang Mai; 2004.
- Yezza A, Halasz A, Levadoux W, Hawari J. Production of polyhydroxy- β -butyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. **Appl Microbiol Biotechnol** 2007; 77(2): 269-274.
- Yilmaz M, Soran H, Beyatli Y. Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. **World J Microbiol Biotechnol** 2005; 21: 565-566.
- Young FK, Kastner JR, May SW. Microbial production of poly-3-hydroxybutyric acid from D-xylose and lactose by *Pseudomonas cepacia*. **Appl Environ Microbiol** 1994; 60: 4195-4198.
- Yu DG, Lin WC, Lin CH, Yang MC. Cytocompatibility and antibacterial activity of a PHBV membrane with surface-immobilized water-soluble chitosan and chondroitin-6-sulfate. **Macromol Biosci** 2006; 6: 348-357.
- Zhang F, Miller CA, Robinson BK, Abbas PJ, Hu N. Changes across time in spike rate and spike amplitude of auditory nerve fibers stimulated by electric pulse trains. **J.Assoc. Res. Otol** 2007; 8:356-372.
- Zhao YH, Li HM, Qin LF, Wang HH, Chen GQ. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. **FEMS Microbiology Letters** 2007; 276(1): 34-41.
- Zhaolin D, Xuenan S. A new method of recovering polyhydroxyalkanoate from *Azotobacter chroococcum*. **Chinese Science Bulletin** 2000; 45(3): 252-256.
- Zinn M, Witholt B, Egli T. Dual nutrient limited growth: models, experimental observations, and applications. **J Biotechnol** 2004; 113: 263-279.
- Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS, **Wine analysis and production**. Gaithersburg: Chapman & Hall; 1999.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. อาหารสมบูรณ์ (Nutrient broth, Nutrient agar) (สัดส่วนต่อปริมาตร 1 ลิตร)

1. Nutrient broth (NB)

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม

2. Nutrient agar (NA)

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Agar	15	กรัม

2. อาหารเร่งการผลิตไบโอพอลิเมอร์ (Mineral salt medium)

1. อาหารสูตรเกลือแร่หรืออาหารหลัก) (สัดส่วนต่อปริมาตร 1 ลิตร)

สูตรอาหารที่ปรับปรุงจากสูตรอาหารของ Grothe และคณะ

Total sugar	40.00	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.40	กรัม
KH_2PO_4	1.50	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	4.54	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20	กรัม
Trace element solution	10.0	มิลลิลิตร

2. สูตรอาหารรอง (Trace element solution) (สัดส่วนต่อปริมาตร 1 ลิตร)

FeSO_4	1.46	กรัม
CaCl_2	4.70	กรัม
H_3BO_3	0.03	กรัม
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.20	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10	กรัม
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.03	กรัม
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.03	กรัม
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมได้ข้างต้นจะนำไปปรับค่าความเป็นกรดต่างให้มีค่าอยู่ระหว่าง 6.5-7.0 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยที่ต้องแยกการฆ่าเชื้อระหว่างอาหารสูตรอาหารหลักและสูตรอาหารรอง จากนั้นเติมธาตุอาหารรองในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อลิตรของอาหารหลัก

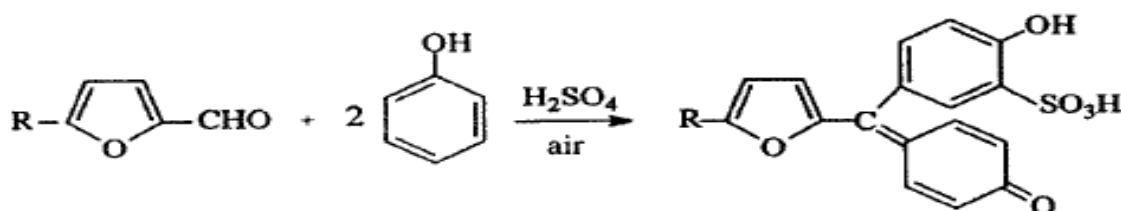
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ

1. การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol – sulfuric

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีการนี้สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้ในช่วง 1- 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่จะใช้วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจงว่า น้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิซ หรือน้ำตาลธรรมชาติที่พบอยู่ในรูป monosaccharide, disaccharide, oligosaccharide และ polysaccharide ก็สามารถวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีนี้ได้ (Zoecklien และคณะ, 1995)

หลักการของปฏิกิริยา

น้ำตาล monosaccharide, disaccharide, oligosaccharide และ polysaccharide จะทำปฏิกิริยากับฟีนอล และกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของสารที่มีความสามารถดูดซับแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 480 – 490 นาโนเมตร สำหรับกลไกปฏิกิริยาในกรณีน้ำตาล oligosaccharide และน้ำตาล polysaccharide นั้นน้ำตาลจะถูกตัดพันธะอีเทอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรด พร้อมกันนั้นก็เกิดปฏิกิริยาขจัดน้ำออกแทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) ที่จะเกิดรวมตัวกับฟีนอลกลายเป็นไตรเอริลมีเทนซึ่งเป็นสารประกอบสีส้ม (triaryl methane dyes) (Scherz and Bonn, 1998)



รูปภาคผนวกที่ 1 ปฏิกิริยาของการวิเคราะห์น้ำตาลโดยรวม (Mikkelsen and Corton, 2004)

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอล 5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

วิธีการ

1. ใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำกับสารไร้ตัวอย่าง (blank) ด้วยโดยใช้น้ำกลั่นปริมาณเท่ากันแทนตัวอย่าง
2. เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 2-3 นาที
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในสารผสมในข้อ 2) จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (ระวังกรดผสมน้ำจะร้อนเดือด) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที
4. นำสารตัวอย่างในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน และค่าการดูดกลืนแสง

2. วิเคราะห์ปริมาณไบโอพอลิเมอร์ (PHAs) โดยวิธีของ Law และ Slepecky, 1960

1. นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และเติม 6% Active chlorine ของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในตัวอย่าง
2. นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์
3. นำไปปั่นเหวี่ยงโดยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
4. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
5. เทตัวอย่างลงในหลอดทดลองแล้วเติมคลอโรฟอร์มร้อน (60 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เพื่อให้คลอโรฟอร์มสกัดเอา PHAs ที่อยู่ในชั้นน้ำออกมา
6. ดูดสารละลายในชั้นของคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไประเหยคลอโรฟอร์มออก จะได้ผงสีขาว ของ PHAs ติดอยู่ข้างหลอด
7. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
8. ปลอ่ยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นเป็น Blank แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ PHAs (Law และ Slepecky, 1960)

3. การวิเคราะห์ทีเคเอ็น (Total Kjeldahl Nitrogen: TKN) โดยวิธี Total Kjeldahl Nitrogen

ไนโตรเจนที่พบในน้ำตามแม่น้ำ ลำคลอง บึง น้ำโสโครก น้ำทิ้งที่มาจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ มีอยู่หลายรูปแบบ คือ ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของแอมโมเนีย-ไนโตรเจน หรือไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ที่เรียกว่าออร์แกนิกไนโตรเจนก็ได้

ทีเคเอ็น หมายถึง ผลบวกระหว่างออร์แกนิกไนโตรเจน และแอมโมเนียไนโตรเจนที่อยู่ในโปรตีนของพืชหรือสัตว์ หรือที่เกิดจากกระบวนการของสิ่งมีชีวิต ยกตัวอย่างเช่น ในปัสสาวะมียูเรีย ซึ่งในยูเรียจะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย เป็นต้น

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดย่อยสลายที่ประกอบด้วยหลอดย่อยสลาย
2. ชุดเครื่องกลั่น
3. เครื่องวัด pH

สารเคมี

1. น้ำปราศจากแอมโมเนีย ในที่นี้ใช้น้ำ Deionize
2. 6 N NaOH
3. สารละลายย่อยสลาย

ละลายโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 134 กรัม ในน้ำปราศจากแอมโมเนีย 650 ลบ.ซม. แล้วค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 200 ลบ.ซม. ละลายเมอร์คิวริกออกไซด์ (HgO) ใน 3M H_2SO_4 แล้วผสมสารละลายทั้ง

สองให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำที่ปราศจากแอมโมเนียเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 14 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการตกตะกอน

4. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน

ละลายฟีนอล์ฟทาลีน 80 มก. ในเมทานอล 100 ลบ.ซม.

5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์-โซเดียมไธโอซัลเฟต

ละลาย NaOH 500 กรัม และ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 700 ลบ.ซม. ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

6. สารละลายอินดิเคติงบอริกแอซิด (Indicating boric acid solution)

ละลายบอริก 20 กรัม ในน้ำกลั่นเพียงเล็กน้อย เติมนิกซ์อินดิเคเตอร์ลงไป 10 ลบ.ซม. แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

7. นิกซ์อินดิเคเตอร์

ละลายเมทิลเรดอินดิเคเตอร์ (Methyl red indicator) 200 มก. ในเอทิลแอลกอฮอล์(ร้อยละ 95) 100 ลบ.ซม. ละลายเมทิลินบลู 100 มก. แล้วผสมสารละลายทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน สารละลายนี้ควรมีการเตรียมทุกเดือน ข้อสังเกต สารละลายอินดิเคติงบอริกแอซิดจะมีสีม่วง ถ้าไม่มีแอมโมเนียละลายอยู่ ถ้ามีแอมโมเนียละลายอยู่จะมีสีเขียว แสดงว่าสารละลายนี้ใช้ไม่ได้ให้เตรียมใหม่

วิธีวิเคราะห์

1. นำน้ำตัวอย่าง 50 ml มาปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย 6 N NaOH จากนั้นถ่ายน้ำตัวอย่างใส่หลอด Kjeldahl
2. เติมสารละลายสำหรับย่อยสลาย (Digestion reagent) ลงไป 10 ml
3. นำไปย่อยสลายในชุดย่อยที่อุณหภูมิ 300-350°C จนกระทั่งได้สารละลายสีเหลืองจางลงใสไม่มีสีแล้วปิดเครื่อง (ใช้เวลาประมาณ 30-40 นาที) ปลอยตัวอย่างให้เย็น
4. เติมน้ำปราศจากแอมโมเนียปริมาตร 60 ml
5. เติมฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์ 5-6 หยด
6. เติมสารละลาย NaOH- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10 ml โดยปล่อยให้ไหลลงบริเวณข้างหลอด
7. นำไปต่อเข้ากับเครื่องกลั่นโดยปลายด้านหนึ่งต่อกับขวดรูปชมพู่ที่มี Indicating boric acid solution 50 ml
8. เปิดเครื่องกลั่น กลั่นเป็นเวลา 6 นาที (เก็บส่วนที่กลั่นได้ประมาณ 700 ml
9. นำส่วนที่กลั่นได้ไปไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน H_2SO_4 0.02 M บันทึกค่าที่ไตเตรตเท่ากับ A สำหรับน้ำตัวอย่าง และเท่ากับ B ที่เป็นน้ำกลั่น

การคำนวณ

$$\text{TKN (mg/l)} = \frac{(A-B) \times 280}{\text{Sample (ml)}}$$

โดยที่ A = ปริมาตร 0.02 M H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง
B = ปริมาตร 0.02 M H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรต Blank

4. การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้โดยใช้รีแฟรคโตมิเตอร์ (Refractometer)

การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยรีแฟรคโตมิเตอร์ เป็นการวัดโดยอาศัยหลักการของการหักเหแสงของสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น ในสารตัวอย่างมีโมเลกุลหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการหักเหแสง การใช้เครื่องมือวัดการหักเหของแสงมีสเกลเป็นองศาบริกซ์ โดยมีการเปรียบเทียบกับสารละลายซูโครส ค่าที่ได้เป็นสเกลการหักเหแสง (Refractive Index scale) ซึ่งสามารถอ่านค่าองศาบริกซ์โดยตรงของสารตัวอย่าง

วิธีการวิเคราะห์ (พัฒนา เหล้าไพบูลย์และพรเทพ ถนนแก้ว, 2548)

1. ใช้ผ้าสะอาดนุ่มชุบน้ำ ทำความสะอาดปริซึมและเช็ดให้แห้ง
2. ใช้น้ำกลั่นหยดลงปริซึม 1-2 หยด ปิดฝาครอบ (Dry light plate) โดยให้น้ำกลั่นกระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นมองผ่านเลนส์ตา และปรับเลขให้เป็นศูนย์ โดยใช้ไขควงหมุนน็อตที่อยู่ใกล้กับฝาครอบ เมื่อปรับได้แล้ว ให้ทำความสะอาดปริซึมอีกครั้ง
3. ใช้หลอดหยดสารตัวอย่างใส่ลงในปริซึม 1-2 หยด
4. ปิดแผ่นฝาครอบโดยให้สารตัวอย่างกระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม
5. ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเพราะจะมีผลทำให้ค่าที่อ่านนั้นผิดไปได้
6. มองผ่านเลนส์ตาและอ่านค่าตรงระดับเส้นรอยต่อที่ตัดกับพื้นสีฟ้า
7. ค่าที่อ่านได้มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์ ซึ่งเทียบเท่ากับเปอร์เซ็นต์น้ำตาล (จำนวนกรัมของน้ำตาลต่อ 100 กรัมของสารตัวอย่าง)
8. ใช้กระดาษเช็ดเลนส์เช็ดสารตัวอย่างที่ติดอยู่กับปริซึมออก แล้วทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้ง ก่อนนำเครื่องมือไปเก็บใส่กล่อง

5. การวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-ด่าง

การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) คือ การวัดสภาพความเป็นกรดหรือเป็นด่างของสารละลาย ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย (Aqueous Solution) โดยวัดความต่างศักย์ที่เกิดขึ้น (Potential) ระหว่างอิเล็กโทรดอ้างอิง (Reference Electrode) กับอิเล็กโทรดตรวจวัด (Sensing Electrode) ความต่างศักย์ที่เกิดขึ้นจากจำนวนของไฮโดเจนไอออน (H^+) อิเล็กโทรดจะเปลี่ยนความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากไอออน (Ionic Potential) ให้เป็นความต่างศักย์ไฟฟ้า (Electronic Potential) แล้วขยายให้มีความต่างศักย์สูงขึ้นด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- ปีกเกอร์ (Beaker)
- ขวดน้ำกลั่น
- กระดาษทิชชู

วิธีการตรวจวิเคราะห์

1. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ควรเปิดเครื่องก่อนใช้งาน 15 นาที

2. ปรับเทียบมาตรฐาน (Standardization) เครื่องให้พร้อมก่อนที่จะวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)
ตัวอย่าง โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่ทราบค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0, 7.0 และ 10.0
3. ตัวอย่างน้ำที่จะนำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต้องปล่อยให้มีความนิ่งก่อน จึงจะนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ได้ เพราะค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) จะเปลี่ยนไปตามอุณหภูมิ
4. ก่อนวัดเขย่าตัวอย่างให้เข้ากันดี เทใส่บีกเกอร์ (Beaker) แล้วจุ่มอิเล็กโทรด พร้อมเขย่าตัวอย่างน้ำ จนตัวเลขแสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) หยุดนิ่ง อ่านค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่างน้ำ
5. เมื่อจะวัดตัวอย่างต่อไป ให้ใช้ขวดน้ำกลั่นฉีดล้างอิเล็กโทรด แล้วซับด้วยกระดาษให้แห้ง จึงทำการวัดตัวอย่างถัดไป
6. เมื่อใช้งานเสร็จ ล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่นแล้วเช็ดให้แห้ง เก็บอิเล็กโทรดโดยแช่ไว้ในสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte)

ภาคผนวก ค
ลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจุลินทรีย์ *Bacillus aryabhattai* (S4)

AGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGA
CGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACC
GAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGNGATGATTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTAC
AGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCNACGATGCATAGCCGAC
CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAA
ACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTANGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCATTGG
AACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG
TGGAGGAACACCAGTGCGCAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCG
CCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA
CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTG
GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGAT
CTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTG
CAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC
ATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACAC
ACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAG

ภาคผนวก ง
ข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางสถิติ

Experimental design and response of Plackett-Burman study

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 Analysis of Variance of selected Factorial model (Response: Biomass)

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-value	
Model	5.6818	6	0.946967	7.758206	0.02	significant
A-Total sugar	1.569633	1	1.569633	12.85952	0.0158	
B-KH ₂ PO ₄	0.020833	1	0.020833	0.170681	0.6966	
C-Na ₂ HPO ₄	0.0003	1	0.0003	0.002458	0.9624	
D-MgSO ₄	0.425633	1	0.425633	3.487083	0.1208	
E-Urea	1.5987	1	1.5987	13.09766	0.0152	
F-Trace element	2.0667	1	2.0667	16.93184	0.0092	
Residual	0.6103	5	0.12206			
Cor Total	6.2921	11				

				95% CI	95% CI	
Factor	Coefficient estimate	df	Standard error	Low	High	VIF
Intercept	2.415	1	0.100855	2.155745	2.674255	
A-Total sugar	0.361667	1	0.100855	0.102411	0.620922	1
B-KH ₂ PO ₄	0.041667	1	0.100855	-0.21759	0.300922	1
C-Na ₂ HPO ₄	-0.005	1	0.100855	-0.26426	0.254255	1
D-MgSO ₄	0.188333	1	0.100855	-0.07092	0.447589	1
E-Urea	-0.365	1	0.100855	-0.62426	-0.10574	1
F-Trace element	-0.415	1	0.100855	-0.67426	-0.15574	1

ตารางภาคผนวกที่ ง-2 Analysis of Variance of selected Factorial model (Response: PHB)

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-value	
Model	1.076267	6	0.179378	8.514768	0.0164	significant
A-Total sugar	0.163333	1	0.163333	7.753165	0.0387	
B-KH ₂ PO ₄	0	1	0	0	1.0000	
C-Na ₂ HPO ₄	0.013333	1	0.013333	0.632911	0.4624	
D-MgSO ₄	0.083333	1	0.083333	3.955696	0.1034	
E-Urea	0.320133	1	0.320133	15.1962	0.0114	
F-Trace element	0.496133	1	0.496133	23.55063	0.0047	
Residual	0.105333	5	0.021067			
Cor Total	1.1816	11				

				95% CI	95% CI	
Factor	Coefficient estimate	df	Standard error	Low	High	VIF
Intercept	0.82	1	0.041899	0.712294	0.927706	
A-Total sugar	0.116667	1	0.041899	0.008961	0.224372	1
B-KH ₂ PO ₄	0	1	0.041899	-0.10771	0.107706	1
C-Na ₂ HPO ₄	-0.033333	1	0.041899	-0.14104	0.074372	1
D-MgSO ₄	0.083333	1	0.041899	-0.02437	0.191039	1
E-Urea	-0.163333	1	0.041899	-0.27104	-0.05563	1
F-Trace element	-0.203333	1	0.041899	-0.31104	-0.09563	1

Central Composite Design experiment (CCD)

ตารางภาคผนวกที่ ง-3 Sequential Model Sum of Squares [Type I] (Biomass)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	161.709	1.000	161.709			
Linear vs Mean	18.603	2.000	9.301	1.398	0.2915	
2FI vs Linear	0.563	1.000	0.563	0.077	0.788	
Quadratic vs 2FI	65.251	2.000	32.626	317.952	< 0.0001	Suggested
Cubic vs Quadratic	0.477	2.000	0.238	4.941	0.065	Aliased
Residual	0.241	5.000	0.048			
Total	246.844	13.000	18.988			

ตารางภาคผนวกที่ ง-4 Lack of Fit Tests (Biomass)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	161.709	1.000	161.709			
Linear vs Mean	18.603	2.000	9.301	1.398	0.2915	
2FI vs Linear	0.563	1.000	0.563	0.077	0.788	
Quadratic vs 2FI	65.251	2.000	32.626	317.952	< 0.0001	Suggested
Cubic vs Quadratic	0.477	2.000	0.238	4.941	0.065	Aliased
Residual	0.241	5.000	0.048			
Total	246.844	13.000	18.988			

ตารางภาคผนวกที่ ง-5 Model Summary Statistics (Biomass)

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	2.579	0.219	0.062	-0.236	105.247	
2FI	2.707	0.225	-0.033	-0.680	143.051	
Quadratic	0.320	0.992	0.986	0.952	4.109	Suggested
Cubic	0.220	0.997	0.993	0.951	4.201	Aliased

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

ตารางภาคผนวกที่ ง-6 Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III] (Biomass)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	84.4166	5	16.883	164.536	< 0.0001	significant
A-Total sugar	11.3630	1	11.363	110.738	< 0.0001	
B-Urea	7.2397	1	7.240	70.554	< 0.0001	
AB	0.5625	1	0.563	5.482	0.0517	
A^2	39.7447	1	39.745	387.330	< 0.0001	
B^2	33.9840	1	33.984	331.190	< 0.0001	
Residual	0.7183	7	0.103			
Lack of Fit	0.5382	3	0.179	3.985	0.1075	not significant
Pure Error	0.1801	4	0.045			
Cor Total	85.1349	12				

ตารางภาคผนวกที่ ง-7 Sequential Model Sum of Squares [Type I] (PHB)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	17.950	1.000	17.950			
Linear vs Mean	3.188	2.000	1.594	1.585	0.2524	
2FI vs Linear	1.130	1.000	1.130	1.139	0.3136	
Quadratic vs 2FI	8.679	2.000	4.340	123.029	< 0.0001	Suggested
Cubic vs Quadratic	0.182	2.000	0.091	7.019	0.0354	Aliased
Residual	0.065	5.000	0.013			
Total	31.194	13.000	2.400			

ตารางภาคผนวกที่ ง-8 Lack of Fit Tests (PHB)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Linear	10.003	6.000	1.667	126.591	0.0002	
2FI	8.873	5.000	1.775	134.749	0.0002	
Quadratic	0.194	3.000	0.065	4.916	0.0790	Suggested
Cubic	0.012	1.000	0.012	0.924	0.3909	Aliased
Pure Error	0.053	4.000	0.013			

ตารางภาคผนวกที่ ง-9 Model Summary Statistics (PHB)

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	1.0028	0.2407	0.0888	-0.2555	16.6277	
2FI	0.9959	0.3260	0.1014	-0.4660	19.4148	
Quadratic	0.1878	0.9814	0.9680	0.8895	1.4635	Suggested
Cubic	0.1139	0.9951	0.9882	0.9350	0.8611	Aliased

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

ตารางภาคผนวกที่ ง-10 Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III] (PHB)

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	12.997	5.000	2.599	73.693	< 0.0001	significant
A-Total sugar	1.547	1.000	1.547	43.873	0.0003	
B-Urea	1.640	1.000	1.640	46.498	0.0002	
AB	1.130	1.000	1.130	32.036	0.0008	
A^2	5.199	1.000	5.199	147.398	< 0.0001	
B^2	4.609	1.000	4.609	130.680	< 0.0001	
Residual	0.247	7.000	0.035			
Lack of Fit	0.194	3.000	0.065	4.916	0.0790	not significant
Pure Error	0.053	4.000	0.013			
Cor Total	13.243	12.000				

ตารางภาคผนวกที่ ง-11 Model predictions of biomass and PHB

Factor	Name	Level	Low Level	High Level	Std. Dev.	Coding	
A	Total sugar	70.568	40	120	0	Actual	
B	Urea	9.3728	4	20	0	Actual	
Response	Prediction	SE Mean	95% CI low	95% CI high	SE Pred	95% PI low	95% PI high
DCW	6.609	0.140	6.277	6.940	0.349	5.78	7.436
PHB	2.365	0.082	2.171	2.560	0.205	1.880	2.850

ภาคผนวก จ
ข้อมูลดิบในการทดลอง

กรณีน้ำอ้อยคั้น

ตารางที่ จ-1 แสดงข้อมูลการเจริญโดยวัดความขุ่นของเซลล์ (OD 600 nm) ในการศึกษาความเป็นไปได้ของ จุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 และจุลินทรีย์ *A. latus* TISTR 1043 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร

เวลา (h)	OD 600 nm	
	<i>A. eutrophus</i>	<i>A. latus</i>
0	0.510	0.117
6	0.930	0.17
12	1.500	0.546
18	3.850	1.032
24	4.730	1.575
30	5.800	1.73
36	6.460	1.828
48	6.100	1.755
60	5.980	1.8
72	5.740	1.55

ตารางที่ จ-2 แสดงข้อมูลการเจริญของจุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 โดยวัดความขุ่นของเซลล์ (OD 600 nm) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกัน สภาวะเขย่า 200 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ C:N ratios = 6.8:1.0

เวลา (h)	OD 600 nm			
	20 g/L	30 g/L	40 g/L	50 g/L
0	0.51	0.850	0.998	0.860
6	0.93	1.055	1.275	1.035
12	1.5	2.235	2.325	2.460
18	3.85	4.050	4.450	3.300
24	4.73	5.440	5.800	5.150
30	5.8	6.350	6.970	7.050
36	6.46	7.140	8.650	9.235
48	6.1	7.350	11.600	16.500
60	5.98	6.750	13.100	20.450
72	5.74	5.800	13.600	19.750

ตารางที่ จ-3 แสดงข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกัน สภาวะเขย่า 200 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ C:N ratios = 6.8:1.0

เวลา (h)	ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเซลล์ (g/L)			
	20 g/L	30 g/L	40 g/L	50 g/L
0	0.1500	0.2499	0.2934	0.2529
6	0.2734	0.3102	0.3749	0.3043
12	0.4410	0.6572	0.6836	0.7233
18	1.1320	1.1908	1.3084	0.9703
24	1.3908	1.5995	1.7054	1.5143
30	1.7054	1.8671	2.0494	2.0729
36	1.8994	2.0994	2.5434	2.7154
48	1.7936	2.1611	3.4108	4.8515
60	1.7583	1.9847	3.8518	6.0129
72	1.6877	1.7054	3.9988	5.8071

ตารางที่ จ-4 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรวมที่เวลาแตกต่างกันของการหมักโดยจุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 สภาวะเขย่า 200 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ C:N ratios = 6.8:1.0

เวลา (h)	ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด (g/L)			
	20 g/L	30 g/L	40 g/L	50 g/L
0	22.82	28.43	41.5	48.66
6	21.67	27.96	39.55	46.28
12	19.9	23.25	32.67	39.16
18	15.85	12.97	25.17	33.55
24	11.69	9.48	22.36	28.68
30	8.57	8.78	20.36	25.57
36	7.52	8.2	17.78	21.24
48	6.17	8.02	13.19	16.67
60	5.63	7.96	11.92	11.86
72	4.39	7.28	9.19	11.86

ตารางที่ จ-5 แสดงข้อมูลปริมาณการผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs ของจุลินทรีย์ *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมแตกต่างกัน สภาวะเขย่า 200 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ C:N ratios = 6.8:1.0

เวลา (h)	ปริมาณไบโอพอลิเมอร์ PHAs (g/L)			
	20 g/L	30 g/L	40 g/L	50 g/L
0	0.0017	0.0014	0.0081	0.00855
6	0.0019	0.0018	0.0085	0.0117
12	0.0025	0.0021	0.027	0.0829
18	0.0092	0.0073	0.0459	0.0917
24	0.0114	0.0143	0.0716	0.1854
30	0.0182	0.017	0.12	0.269
36	0.0273	0.0395	0.3614	0.393
48	0.0206	0.0480	0.4461	0.9913
60	0.0164	0.0389	1.058	1.8377
72	0.0155	0.0358	0.9681	1.5478

ข้อมูลดิบในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ จ-6 แสดงข้อมูลค่าความขุ่นของเซลล์ (OD 600 nm) ปริมาณน้ำตาล และน้ำหนักเซลล์แห้งของ จุลินทรีย์ และการผลิตไบโอพอลิเมอร์ ระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมด 50 gL^{-1} ในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ที่ C:N = 6.8:1.0

เวลา (h)	OD _{600 nm}	Total sugar (g/L)	PHB	C.D.W (g/L)
0	0.6	51.35	0.0071	0.1764
6	0.7	50.94	0.0091	0.2058
12	2.4	47.32	0.0788	0.7057
18	4.1	42.15	0.1012	1.2055
24	9.6	41.1	0.3904	2.8227
30	15.1	35.47	0.8609	4.4399
36	16.5	32.7	1.0174	4.8515
42	17.9	30.56	1.0377	5.2632
48	18.9	25.67	1.1275	5.5572
54	19.1	21.06	1.2174	5.616
60	20	20.36	1.2812	5.8806
66	19.5	19.57	1.2522	5.7336
72	18.2	18.69	1.087	5.3514

ตารางที่ จ-7 แสดงข้อมูลปริมาณการวัดไบโอพอลิเมอร์ PHAs ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ C:N = 6.8:1.0

Time (h)	OD _{235 nm}				dilution	PHB (g/L)	PHB×dilution
	1	2	3	เฉลี่ย			
0	0.079	0.085	0.082	0.082	5	0.0014	0.0071
6	0.093	0.101	0.096	0.096	5	0.0018	0.0091
12	0.309	0.305	0.302	0.305	10	0.0079	0.0788
18	0.391	0.385	0.386	0.382	10	0.0101	0.1012
24	1.353	1.36	1.364	1.38	10	0.0390	0.3904
30	0.3	0.34	0.323	0.33	100	0.0086	0.8609
36	0.379	0.385	0.383	0.384	100	0.0102	1.0174
42	0.394	0.398	0.394	0.391	100	0.0104	1.0377
48	0.423	0.457	0.434	0.422	100	0.0113	1.1275
54	0.455	0.468	0.459	0.453	100	0.0122	1.2174
60	0.478	0.473	0.475	0.475	100	0.0128	1.2812
66	0.461	0.469	0.465	0.465	100	0.0125	1.2522
72	0.398	0.405	0.404	0.408	100	0.0109	1.0870

ตารางที่ จ-8 แสดงข้อมูลค่าความขุ่นของเซลล์ ($OD_{600\text{ nm}}$) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ C:N = 8.9:1.0

เวลา (h)	$OD_{600\text{ nm}}$			
	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3	เฉลี่ย
0	0.14	0.69	0.6	0.48
6	0.27	1.26	1.06	0.86
12	2.11	2.09	2.2	2.13
18	3.98	4.5	4.1	4.19
24	6.4	6.1	5.94	6.15
30	6.7	7.76	6.83	7.10
36	7.32	8.8	12.5	9.54
48	9.8	9.4	11.3	10.17
60	11.14	10.4	11.2	10.91
72	10.9	9.5	9.12	9.84

ตารางที่ จ-9 แสดงข้อมูลการวัดปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด ($OD_{490\text{ nm}}$) โดยวิธี Phenol – sulfuric ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ C:N = 8.9:1.0

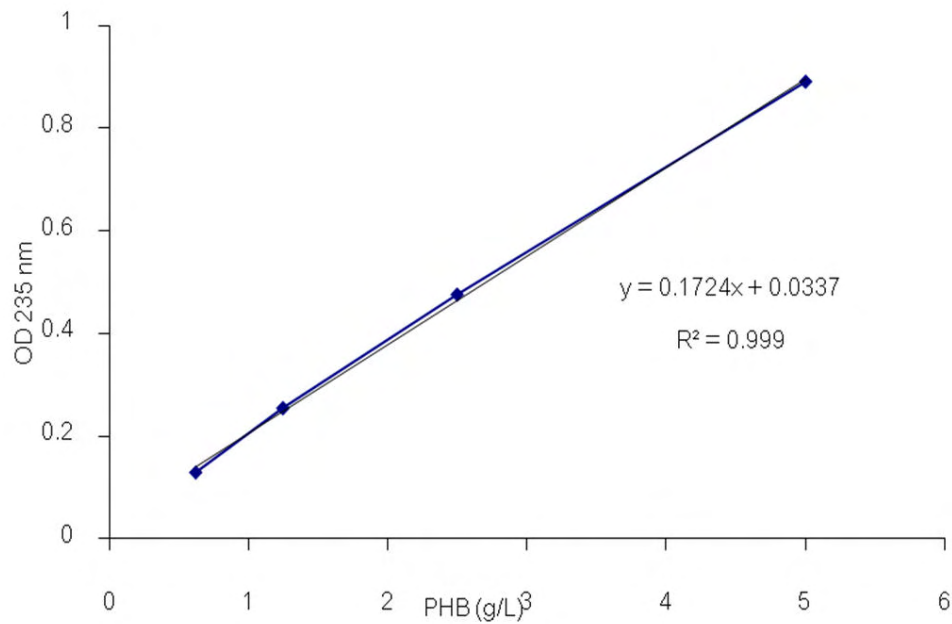
เวลา hr	Total sugar (g/L)			
	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3	เฉลี่ย
0	47.21	50.99	50.13	49.44
6	42.15	44.01	47.96	44.71
12	41.1	39.82	45.26	42.06
18	39.83	38.55	40.39	39.59
24	35.4	35.47	37.35	36.07
30	35.17	35.47	36.45	35.70
36	34.19	34.64	35.17	34.67
48	33.89	34.12	32.08	33.36
60	19.3	20.29	29.65	23.08
72	17.84	18.83	20.95	19.21

ตารางที่ จ-10 แสดงข้อมูลปริมาณการวัดไบโอพอลิเมอร์ PHAs ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ C:N = 8.9:1.0

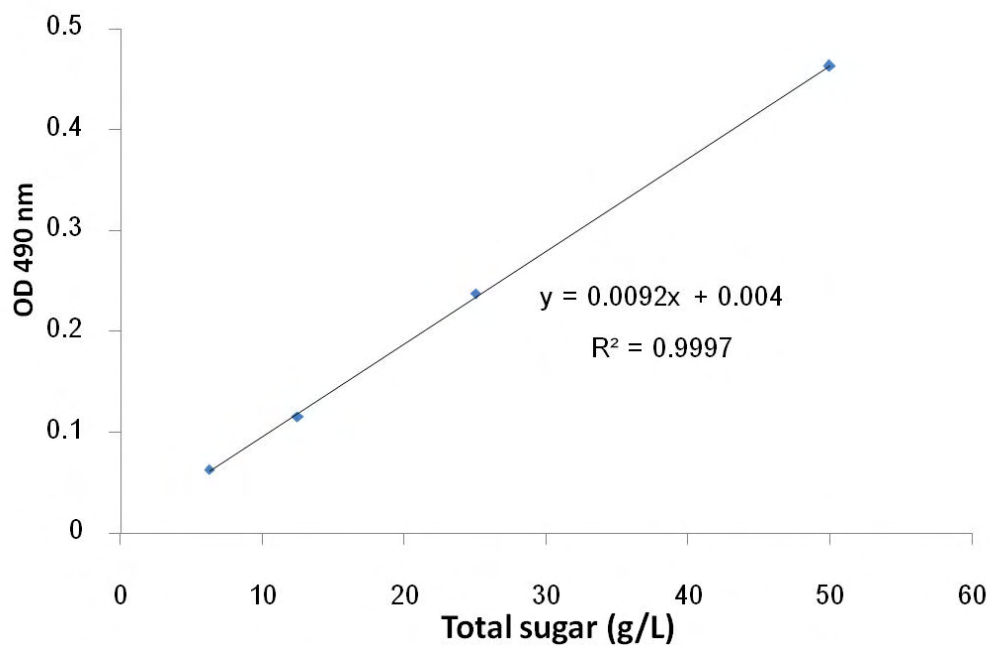
เวลา hr	Cell dry weight (g/L)			
	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3	เฉลี่ย
0	0.0412	0.2029	0.1764	0.1402
6	0.0794	0.3705	0.3117	0.2538
12	0.6204	0.6145	0.6469	0.6273
18	1.1702	1.3231	1.2055	1.2330
24	1.8818	1.7936	1.7465	1.8073
30	1.9700	2.2817	2.0082	2.0866
36	2.1523	2.5875	3.6754	2.8051
48	2.8815	2.7639	3.3226	2.9893
60	3.2755	3.0579	3.2931	3.2089
72	3.2049	2.7933	2.6816	2.8933

ภาคผนวก ฉ กราฟมาตรฐาน

กรณีน้ำคั้นข้าวฟ่างหวาน



ภาพภาคผนวกที่ ฉ-1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณไบโอพอลิเมอร์ PHAs

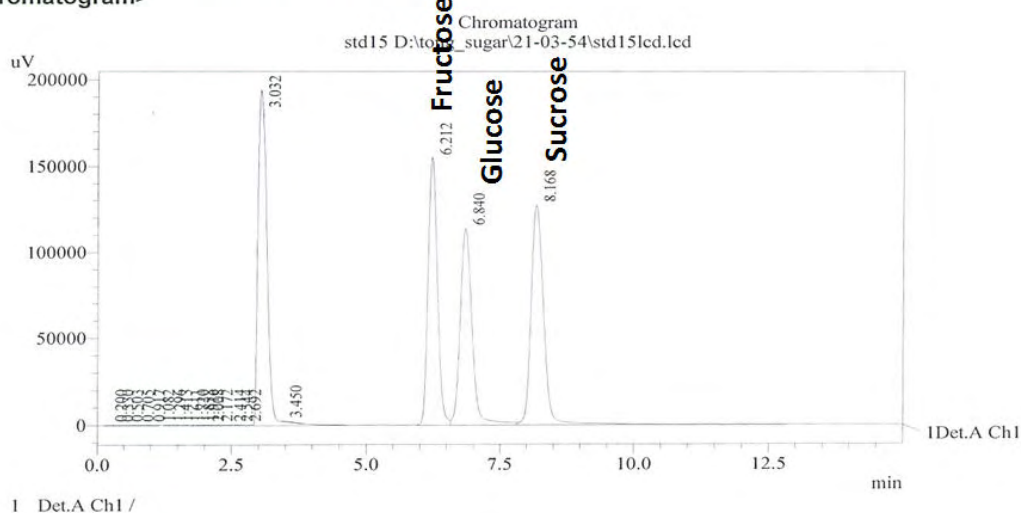


ภาพภาคผนวกที่ ฉ-2 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด
โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก

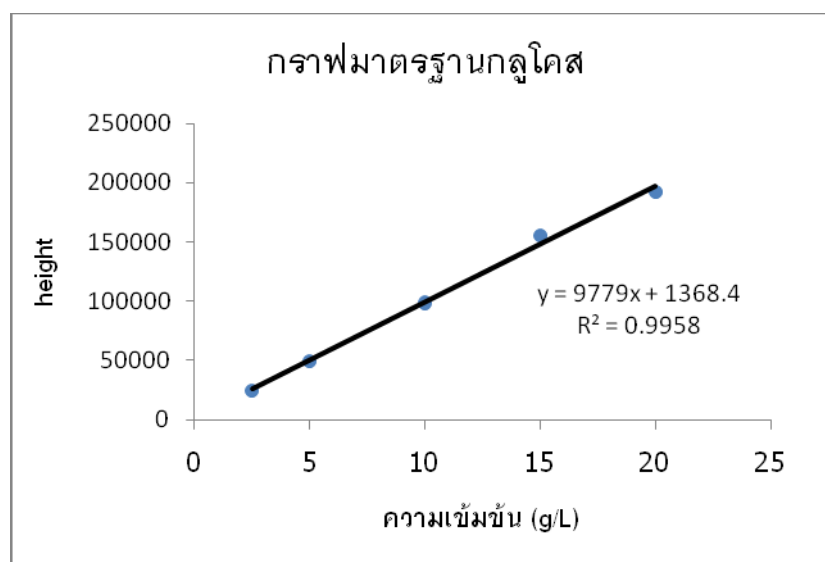
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : std15
 Sample ID : 1
 Vial # :
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : std15lcd.lcd
 Method File Name : sugar.lcm
 Batch File Name :
 Report File Name : Report_tong_sugar.lcr
 Data Acquired : 23/3/2554 11:30:10
 Data Processed : 23/3/2554 12:28:57

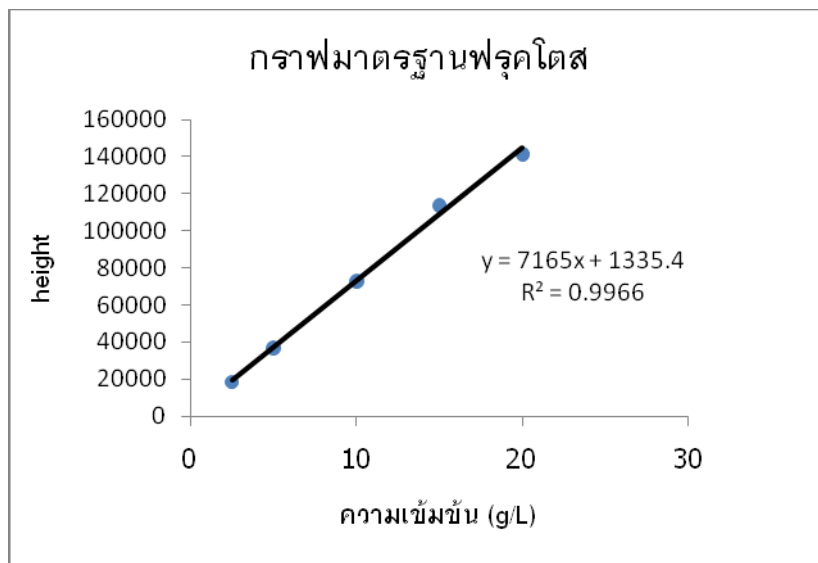
<Chromatogram>



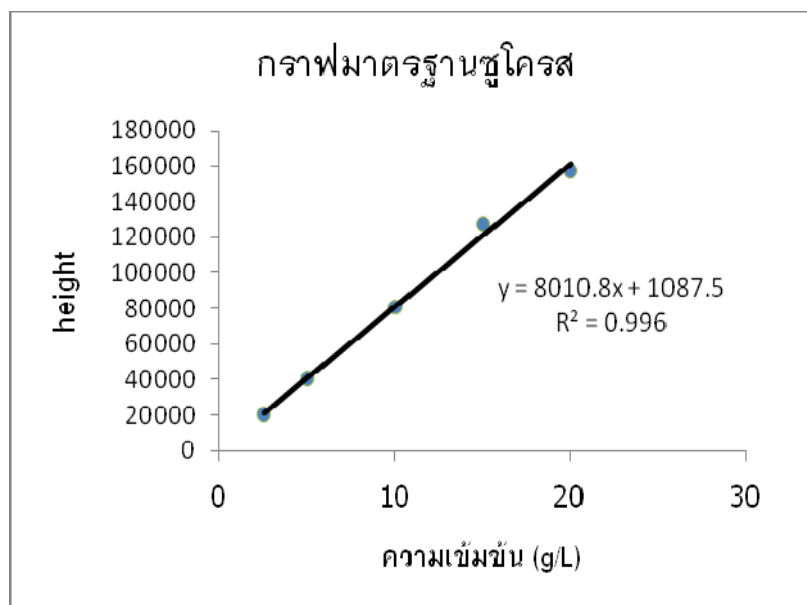
ภาพภาคผนวกที่ ฉ-3 โครมาโตแกรมแสดงพีคของน้ำตาลแต่ละชนิด



ภาพภาคผนวกที่ ฉ-4 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



ภาพภาคผนวกที่ ฉ-5 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรุคโตส

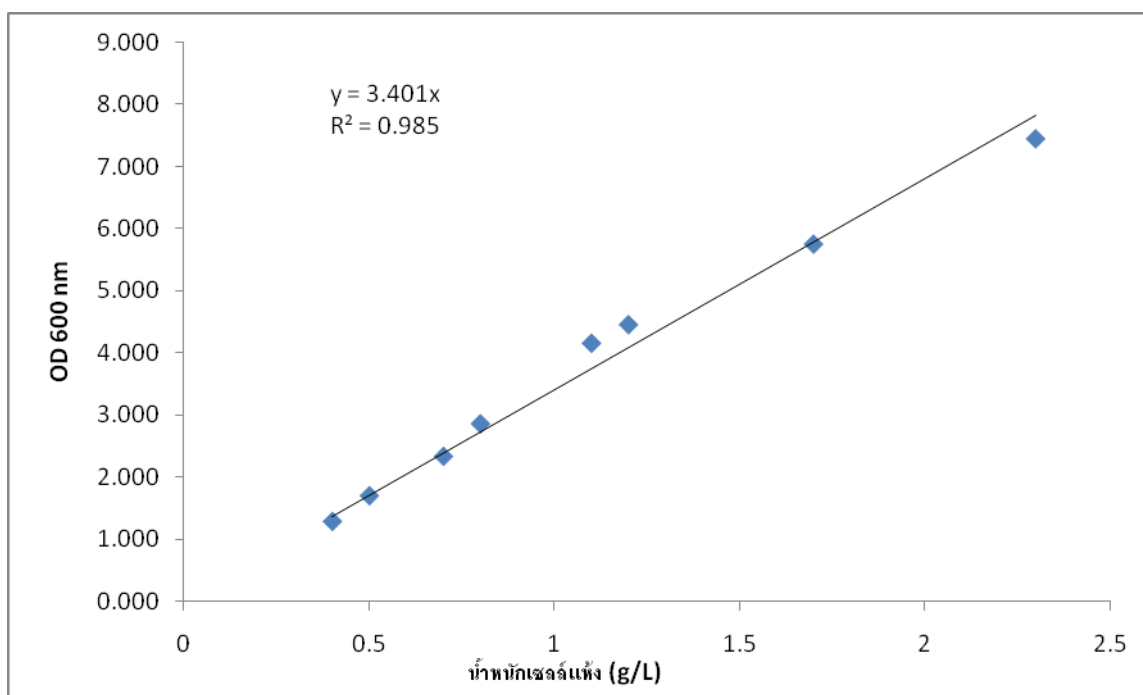


ภาพภาคผนวกที่ ฉ-6 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส

กรณีน้ำอ้อยคั้น

ตารางที่ จ.1 ค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{235}) และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้ง *A. eutrophus* TISTR 1095 เมื่อใช้น้ำตาลรวมทั้งหมด 40 กรัมต่อลิตร กล้าเชื้อ 10%

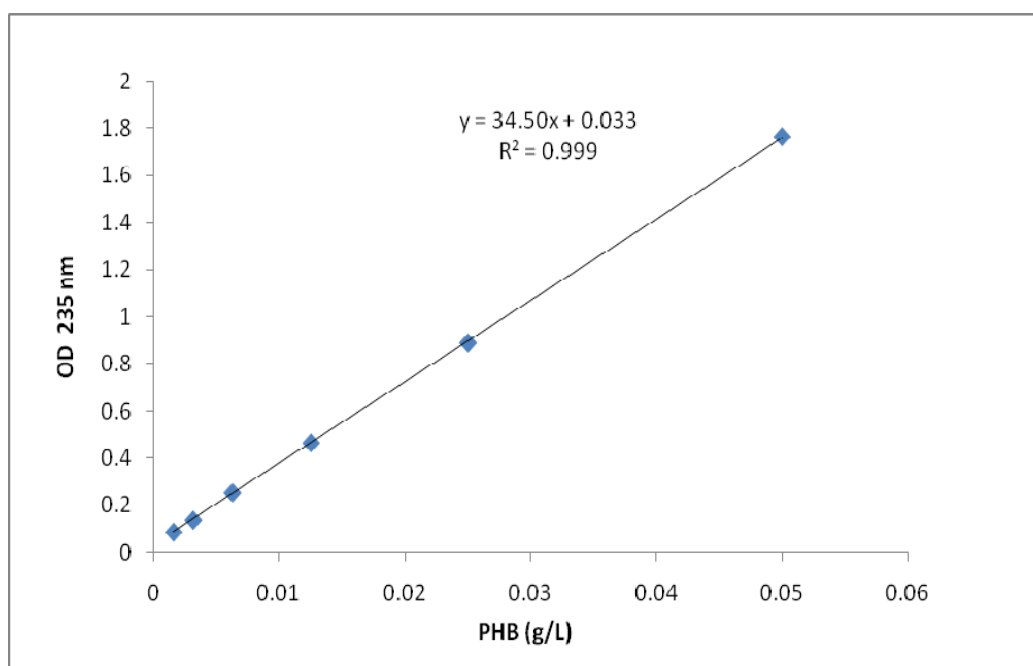
เวลา (ชั่วโมง)	นน.เซลล์ (g/L)	$OD_{600\text{ nm}}$
6	0.4	1.275
9	0.5	1.69
12	0.7	2.325
15	0.8	2.85
18	1.1	4.150
21	1.2	4.45
24	1.7	5.750
27	2.3	7.45



ภาพภาคผนวก จ-7 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ ๑.2 ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{235}) และค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (PHB) ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณไบโอพอลิเมอร์ PHAs จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Law และ Slepecky, 1960

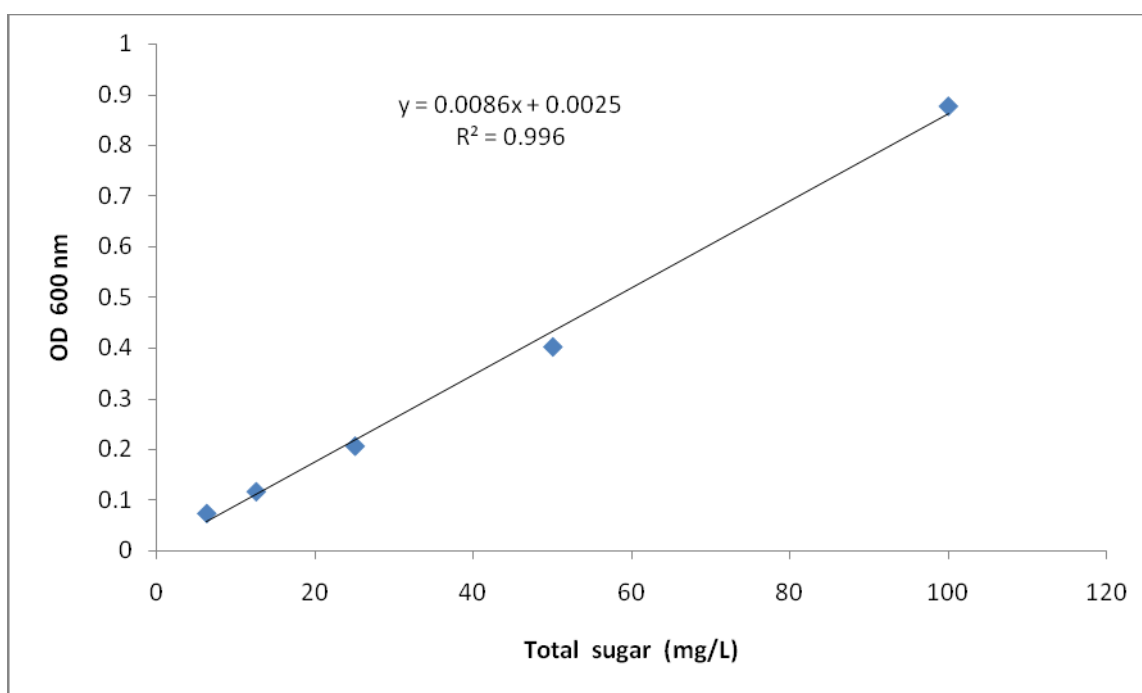
PHB (g/L)	$OD_{235\text{ nm}}$
0.00156	0.088
0.00313	0.139
0.00625	0.255
0.01250	0.466
0.02500	0.889
0.05000	1.762



ภาพภาคผนวก ๑-8 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณไบโอพอลิเมอร์ PHAs

ตารางที่ ๓.3 ค่าการดูดกลืนแสง (OD₄₉₀) และค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (กลูโคส) ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลรวมทั้งหมด จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol – sulfuric

Total sugar (mg/L)	OD _{490 nm}
6.25	0.074
12.50	0.117
25.00	0.207
50.00	0.403
100.00	0.878



ภาพภาคผนวก ๓-9 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก

ภาคผนวก ฉ
การเผยแพร่ผลงานวิจัยและการถ่ายทอดเทคโนโลยี

ในระหว่างการดำเนินการวิจัยภายใต้โครงการวิจัยนี้ ได้มีการเผยแพร่ผลงานวิจัยในรูปแบบต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. การนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการ ณ ต่างประเทศ

จำนวนผลงานวิจัยที่ได้รับการยอมรับให้ไปนำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ในต่างประเทศ จำนวน 5 เรื่อง

1.1 **P. Kaewkannetra** and S. Promkotra (2010) Microstructural evolution of synthesized polyhydroxyalkanoates (PHAs) corresponding to their blends. In 6th International Conference on Diffusion in Solids and Liquids (DSL-2010) Biotechnology Symposium and Exhibition, 5-7 July 2010, Paris, France. (Oral presentation)

1.2 **Pakawadee Kaewkannetra**, Jaruwat Soonthornchiya, Samart Moonamart (2010) Increasing of tapioca flour by blending and forming with commercial PHBV and biopolymer obtained from fermented sugar cane juice for producing as bioplastic. In 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, September 14th-18th, 2010, Rimini, Italy. (Poster presentation)

1.3 Varavut Tanamool, Tsuyoshi Imai, Paiboon Danvirutai, **Pakawadee Kaewkannetra** (2010) Screening, identification and production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by sucrose utilizing microbes isolated from soil environments. In 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, September 14th-18th, 2010, Rimini, Italy. (Poster presentation)

1.4 Waranya Suwannasing, Samart Mooamart, **Pakawadee Kaewkannetra** (2010) Feasibility of sugar cane juice as a sole carbon for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production via batch fermentation by *Alcaligenes latus* 1403 and *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095. In 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, September 14th-18th, 2010, Rimini, Italy. (Poster presentation)

1.5 Varavut Tanamool, **Pakawadee Kaewkannetra** (2010). Direct screening of potential polyhydroxyalkanoates (PHAs) bacterial from soil environment using sweet sorghum as a sole carbon source. In The World Congress on Engineering and Technology (CET 2011), October 28 - November 2, 2011, Shanghai China. (Poster presentation)

2. บทความวิจัยในวารสารวิชาการระดับชาติ/ นานาชาติ

จำนวนบทความวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Thailand Citation Index (TCI) และในวารสารวิชาการนานาชาติที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Scopus และ Science Direct ที่มี impact factor หรือมี peer reviews จำนวน 7 เรื่อง

2.1) **P. Kaewkannetra**, S. Promkotra (2011) Microstructural Evolution of Synthesized Poly- hydroxyalkanoates (PHAs) Corresponding to Their Blends. Defect and Diffusion Forum (312-315): 668-693. (Impact factor =0.483)

2.2) **Pakawadee Kaewkannetra**, Jaruwat Soonthornchiya, Samart Moonamart (2011) Increasing of tapioca flour by blending and forming with commercial PHBV and biopolymer obtained from fermented sugar cane juice for producing as bioplastic, Journal of Biotechnology, 150 (S1): 385. (Impact factor =2.881)

2.3) Varavut Tanamool, Tsuyoshi Imai, Pailoon Danvirutai, **Pakawadee Kaewkannetra** (2011) Screening, identification and production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by sucrose utilizing microbes isolated from soil environments, Journal of Biotechnology, 150 (S1): 361. (Impact factor =2.881)

2.4) Waranya Suwannasing, Samart Mooamart, **Pakawadee Kaewkannetra** (2011) Feasibility of sugar cane juice as a sole carbon for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production via batch fermentation by *Alcaligenes latus* 1403 and *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095, Journal of Biotechnology, 150(S):229. (Impact factor =2.881)

2.5) Waranya Suwannasing, Samart Mooamart, **Pakawadee Kaewkannetra** (2011) Yields of polyhydroxyalkanoates (PHAs) during batch fermentation of sugar cane juice by *Alcaligenes latus* and *Alcaligenes eutrophus*, Journal of Life Science, 5: 35-38. Print ISSN: 1934-7391 Online ISSN: 1934-7405.

2.6) Varavut Tanamool, Tsuyoshi Imai, Pailoon Danvirutai, **Pakawadee Kaewkannetra** (2011). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *hydrogenophaga* sp. isolated from soil environment during batch fermentation. Journal of Life Science, 5, 2011: 1003-1012. Print ISSN: 1934-7391 Online ISSN: 1934-7405.

2.7 สามารถ มูลอามาตย์, **ผกาวดี แก้วกันเนตร**, วรัญญา สุวรรณสิงห์. การหมักน้ำอ้อยแบบกะ เพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิดพีเอชเอ. วารสารวิจัย มช. 17 (2): 227-235.

3. ผลงานวิจัยลักษณะอื่นๆ

3.1 ตำราต่างประเทศ

1. Pakawadee Kaewkannetra (2012) Fermentation of sweet sorghum into added value product of biopolymer. Book chapter in “Biopolymer Production and Applications” Edited by Johan Verbeek (ISBN 978-953-51-0226-7) INTECH, Rijeka, Croatia. pp. 42-60.

3.2 การสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่

ภายใต้โครงการวิจัยนี้ ได้นักวิจัยรุ่นใหม่ในฐานะผู้ช่วยวิจัย โดยผลิตผ่านการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 2 คนได้แก่

1. นส. วรัญญา สุวรรณสิงห์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท เมื่อกันยายน 2554
2. นาย วรารุช ณะมูล สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอก เมื่อเมษายน 2555

3.3 ความร่วมมือวิจัยในต่างประเทศ

ภายใต้โครงการวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือวิจัยในต่างประเทศ ได้รับความร่วมมือกับต่างประเทศในการร่วมมือวิจัยตลอดจนการเป็น Host Professor และ Host Institute เพื่อแลกเปลี่ยนนักวิจัยระหว่างกันดังรายละเอียดดังนี้

1. นาย วรารุช ณะมูล ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก Prof. Tsuyoshi Imai, Yamaguchi University, Ube, Japan ให้เดินทางไปทำวิจัยที่ประเทศญี่ปุ่น 2 ครั้ง ในระหว่างการศึกษา ระดับปริญญาเอก ในระหว่างเดือนตุลาคม-ธันวาคม 2553 และในระหว่างเดือนกันยายน-ธันวาคม 2554
2. Prof. Tsuyochi Imal เดินทางมาเป็น Visiting Professor ภายใต้การสนับสนุนของ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ต่อโครงการของผศ.ดร.ผกาดี แก้วกันเนตร ในระหว่างวันที่ 20 เมษายน -8 พฤษภาคม 2554
3. นส. วรัญญา สุวรรณสิงห์ ซึ่งกำลังศึกษาต่อในระดับปริญญาเอกของ ผศ.ดร.ผกาดี แก้วกันเนตร ซึ่งได้รับทุนวิจัยปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก) รุ่นที่ 13 ได้รับความร่วมมือจาก Prof. Tsuyochi Imal ในการเป็น Host Professor และ Host Institute เพื่อเดินทางไปทำวิจัยในต่างประเทศในระหว่างการศึกษาภายใต้ทุนโครงการดังกล่าว

1.1) Oral presentation

P. Kaewkannetra and S. Promkotra (2010) Microstructural evolution of synthesized polyhydroxyalkanoates (PHAs) corresponding to their blends. In 6th International Conference on Diffusion in Solids and Liquids (DSL-2010) Biotechnology Symposium and Exhibition, 5-7 July 2010, Paris, France.

6TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON
DIFFUSION IN SOLIDS AND LIQUIDS,
DSL2010



PARIS - FRANCE ■ 5 - 7 JULY, 2010

Prof. Pakawadee Kaewkannetra
Fermentation Research Centre for Value Added Agricultural Products, Department of Biotechnology, Faculty of
Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand.

INVITATION LETTER

YOUR PERSONAL CODE IS: DSL499 (*)
(*) Use this ID CODE to for any further communication with us!

Dear Prof. Pakawadee Kaewkannetra,

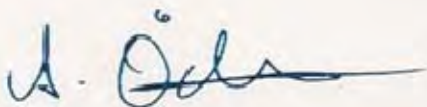
The Organising Committee takes great pleasure in inviting you to take part in the **6th International Conference on Diffusion in Solids and Liquids (DSL-2010)** that will be held at **Hotel Concorde La Fayette** (Village 5, 50 place de l'Ellipse, CS 70050, 92081 / PARIS LA DEFENSE CEDEX) Paris, France, from 05-07 JULY, 2010. More details on the event can be found on our web page www.dsl2010-paris.com

your contribution entitled:
'Microstructural evolution of synthesized polyhydroxyalkanoates (PHAs) corresponding to their blends'
P. Kaewkannetra, S. Promkotra

has been accepted to be presented, as ORAL presentation, during DSL2010.

DSL2010 promises to be an exciting meeting, both scientifically and culturally, and we look forward to meeting you in Paris for truly rewarding days!

Sincerely,



Professor Andreas Öchsner (DSL General Chairman)
Department of Applied Mechanics
Faculty of Mechanical Engineering
Technical University of Malaysia
81310 UTM Skudai, Johor – Malaysia

Professor M.E.R. Shanahan - Head of Local Committee
Laboratoire de Mécanique Physique (LMP)-UMR CNRS 5469,
Université Bordeaux 1, 351 Cours de la Libération,
33405 TALENCE Cedex - France

NOTE that this 'Invitation Letter' MUST be accompanied by the receipt of your registration payment to guarantee your participation in the DSL 2010 CONFERENCE

Confidential

Page 1/1

26/3/2010

1.2) Poster presentation

Pakawadee Kaewkannetra, Jaruwat Soonthornchiya, Samart Moonamart (2010) Increasing of tapioca flour by blending and forming with commercial PHBV and biopolymer obtained from fermented sugar cane juice for producing as bioplastic. In 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, September 14th-18th, 2010, Rimini, Italy.



Increasing of tapioca flour by blending and forming with commercial PHBV and biopolymer obtained from fermented sugar cane juice for producing as bioplastic

P. Kaewkannetra^{1*}, J. Soonthornchaya¹, S. Moonamart¹, S. Promkotra²

¹Department of Biotechnology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

²Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

*Corresponding author: pekner@kku.ac.th



Abstract

The objective of this work is to increase value of tapioca flour by blending and forming biopolymer obtained from fermented sugar cane juice comparing to commercial biopolymer in solid form of Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHBV). Typically, PHBV is known as biodegradable, biocompatible, semi-bacterial polyester and has similar properties to polypropylene (PE). Finally, the commercial PHBV was preliminary investigated as sheet films with bio-based material of tapioca flour. The 3% (w/v) PHBV was dissolved with hot chloroform at about 60°C while the 3% (w/v) flour was mixed with water. Hereafter, different ratios (v/v) of PHBV and the flour were mixed (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 and 100:0). Two mixtures were blended and formed as bioplastic films using conventional solvent-casting techniques. The biopolymer obtained after fermentation of sugar cane juice was also done in the same way with the flour. The bioplastic films are characterized by various physical and chemical techniques such as polarized light microscopy, differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffractometry (XRD). The results revealed remarkably crystalline structure with cross-polarized light on optical microscope. The optimal blended films with a ratio of 40:60 were obtained by observation of their morphology and immiscibility of the blends is gradually increased on increasing the starch portions. The blended films are mostly brittle and had specific glass temperatures (T_g) depended on the portion. Melting transition temperatures (T_m) of blended films are slightly higher than the bacterial synthesized biopolymer as examined by DSC. These results are correspondent to their highly crystallinity from diffractograms (XRD). In addition, microstructure of the blended films is reduced largely crystallinity by the solution casting.

Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) is an intracellular biopolymer synthesized by numerous microorganisms mostly bacterial strains. Even though PHAs have a potential use to apply as completely biodegradable and biocompatible thermoplastics, however the high cost of production has obstructed their commercial application. Much more attention has been attempted to reduce production cost of PHAs by improvement in both more efficient production and recovery processes and development to use better bacterial strains such as recombinant *Escherichia coli*. Since, synthetic plastics are still widely used. They caused air pollution and then global warming problems, respectively. Therefore, promising applications of environmental friendly degradable biopolymers lead to long-term performance. The interest in biodegradable films is point to natural polymers which is soluble and quite cheap. Additional agricultural biodegradable, such as starch are blended to enhance their mechanical properties. However, the results are still the bad.

Materials and Methods

Phenolase (Phe) and PHBV Biosynthesis

PHAs are produced by pure bacterial strains of *Alcaligenes eutrophus* TST R 3095 via batch fermentation using sugarcane juice as a carbon source and the culture condition used followed to Kaewkannetra et al. (2008). After 60 hrs, PHAs was recovered using aqueous slices recalled from Hahn et al. (1995) as centrifugation, cell disruption by 6% sodium hypochlorite, extraction by hot chloroform and PHAs were dried overnight at room temperature. Finally, white powder of PHAs was obtained.

Preparation of Blended Films

The PHAs at 3% (w/v) is prepared by dissolving with chloroform and heated the mixture at 60°C for 1 hr. Starch suspensions of various starch are made in de-ionized water at 30% (w/v). The PHAs solution and starch suspension are blended in different ratios (1:100, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 100:0). The blended films are obtained by pouring into Petri dishes and allowing solvent evaporation overnight at room temperature. Blended films were investigated in physicochemical properties and their structures.

Microstructural Characterization

Polarization Optical Microscopy (POM): Morphology of blended films is observed by using polarized light microscopy. Cross-polarized light can be estimated dichroic angle and roughly crystalline structure of the synthesized PHAs.

Differential Scanning Calorimetry (DSC): The melting temperatures (T_m) and the enthalpy of fusion (ΔH_f) of the blended films are determined by DSC (Mettler Toledo DSC 822e Calorimeter).

X-ray Diffractometry (XRD): Monochromatic Cu-K α radiation (wavelength = 1.5406 Å) was produced by D8 Bruker X-ray Diffractometer.

References

1. J. Rodrigues, R.F. Faria, A.B. Lugão (2005) Crystallization of the PHBP 60 blends evaluation by DSC, J. Thermal. Anal. Cal., 79:319-331.
2. B. Chaiton, B. Gole, M. Lohar, T. Chakraborty (2003) Preparation and characterization of PHB-starch blend. J. Biomater. Sci., 15: 33-37.

Results and Discussion

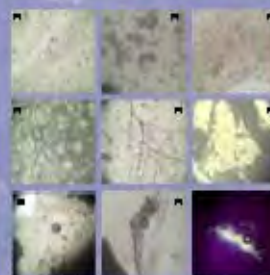


Fig. 1 Polarized light micrographs of blended films (top) which correspond to sample numbers 1-12 in Table 1, and (b) synthesized PHAs powder that no cross-polarized light in (b) and with cross-polarized light with dichroic angle in (a). The interval of a small scale is 0.01 mm.



Fig. 2 DSC thermograms showing heat flow versus temperature for PHAs (a) and blended PHAs (b) with varying starch ratios in the same ratio of 10:90.

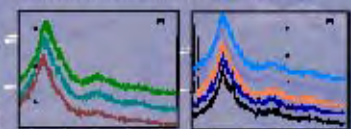


Fig. 3 XRD diffractograms (a) increasing starch portions of samples 1-12, (b) sample no. 11-12 (synthesized and commercial PHAs) powder blended with starch (10:90) (c) glycerol (10:90) and starch (10:90).

Table 1 Blended film properties (DSC, XRD, POM, and TGA) PHAs, B = synthesized PHAs, F = flour, P = powder

Sample number	Blended PHAs (w/v)	Starch (w/v)	PHAs (%)	Starch (%)	Wt loss (%)
1	PHAs (10:90)	Starch	-	100	100
2	PHAs (20:80)	Starch	-	80	80
3	PHAs (30:70)	Starch	-	70	70
4	PHAs (40:60)	Starch	-	60	60
5	PHAs (50:50)	Starch	-	50	50
6	PHAs (60:40)	Starch	-	40	40
7	PHAs (70:30)	Starch	-	30	30
8	PHAs (80:20)	Starch	-	20	20
9	PHAs (90:10)	Starch	-	10	10
10	PHAs (100:0)	Starch	-	0	0
11	PHAs (100:0)	Starch	-	0	0
12	PHAs (100:0)	Starch	-	0	0

Table 2 Melting temperatures (T_m), melting enthalpy (ΔH_f) and the degree of crystallinity of blended films.

Sample number	Melting Temperature (T_m)	Melting Enthalpy (ΔH_f)	Degree of Crystallinity
1	132.21	123.80	65.36
2	132.21	123.80	65.36
3	132.21	123.80	65.36
4	132.21	123.80	65.36
5	132.21	123.80	65.36
6	132.21	123.80	65.36
7	132.21	123.80	65.36
8	132.21	123.80	65.36
9	132.21	123.80	65.36
10	132.21	123.80	65.36
11	132.21	123.80	65.36
12	132.21	123.80	65.36

Conclusion

Both commercial and synthesized polyhydroxyalkanoates (PHAs) can possibly blend with cheap agricultural material as starch for improvement of physico-chemical properties and leading to produce bioplastics. The optimized concentration of the blend is 3% (w/v) PHAs in chloroform and 30% (w/v) of starch in de-ionized water. The proper ratio of the blended films between PHAs to starch is shared for 40 to 60 based on their morphology. Increasing additional starch will cause highly brittle of the films. The synthesized PHAs present semi-crystalline polymer by cross-polarized light with dichroic angle. The DSC and XRD results provide structural characteristics of the films. Short chain of synthesized PHAs can differentiate from the commercial PHAs. The small changing of the points out the phase transition which is revealed by the melting enthalpy. The blended films present the estimated crystallinity by XRD. The blended films is increased slightly crystallinity. These confirm an evidence of the combination of each component.

Acknowledgement

This work is mainly supported by an funding supported by an funding between Khon Kaen University (FY 2551) and Thailand Research Fund (TRF) FY 2551 (Contract no. DBG 5380013 for P. Kaewkannetra). In addition J. Soonthornchaya, et al (2551) also would like to sincerely acknowledge Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand for making fund.

1.3) Poster presentation

Varavut Tanamool, Tsuyoshi Imai, Paiboon Danvirutai, **Pakawadee Kaewkannetra** (2010) Screening, identification and production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by sucrose utilizing microbes isolated from soil environments. In 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, September 14th-18th, 2010, Rimini, Italy.

⁴Corresponding author: pubs@kku.ac.th

[illegible]

Many symbols of peace from previous centuries have widely used in daily. However, here some old symbols are still seen in the long way in various ways. The same symbols are also put in the old and new buildings and even in the design of the building. Therefore, many structures around the world have been believed to have their own meaning and are still in use today.

[illegible]

Soil sample was collected from sugarcane plantation area in the southern part of Thailand. Then it was processed at 4°C prior to use.

Downloaded from <http://ajphaphysiol.physiology.org/> at UNIV OF CALIFORNIA on May 12, 2015

[illegible]

Four incidents involving the public facilities were identified as being in compliance, no violations of the facility were identified. The remaining three incidents were identified as being in compliance, no violations of the facility were identified.

The following are the names of the individuals who were arrested in connection with the above mentioned case:

a) Tšibol is signed as a native name (Tšibol) or as a loanword with the sign Tšibol is signed as a native name (Tšibol) and as a loanword (Tšibol).

Three isolates containing *YH/a* granules accumulated in their cells were confirmed using Gelatin Block II staining method and showed in Fig. 2. Only 4 isolates exhibited (code no. V10, V11, V12 and the reference negative strain of *Acetivibrio aerophilus*) showed a positive result by representing small black color. However, the V10 isolate showed strong black color. Thus, the isolate was further identified and recognized as its a capacity for *YH/a* production.

FFS and FCS to improve the reliability of the data. The results of the FFS and FCS are shown in Table 2.

Fig. 4 (a). Transfer function $H_{21}(s)$ for a normalized 10 dB of the V_{21} at δf . The error given in the same figure is calculated as $\pm 0.5 \times 10^{-3} \times 10^3$ at $\delta f = 10$ dB. The error is ± 0.5 at $\delta f = 10$ dB. The error is ± 0.5 at $\delta f = 10$ dB.



Fig. 4. Nucleic acid composition of *Staphylococcus aureus* strains. The nucleic acid composition of the strains is shown in the table. The nucleic acid composition of the strains is shown in the table.

[illegible]

Microbial conversion of *Algaespirillum penicilliforme* has proven to be potential to produce H_2 from sucrose medium. Further study will be focused on the possibility to use sugar based agricultural crops such as sugar cane and wheat straw as carbon sources for the production of H_2 by *A. penicilliforme*. In addition, other fermentation processes of food waste, animal waste and manure will be investigated as well.

[illegible]

It will rain in 100% of cases.

On a scale from 0% to 100% the chance of rain is 100%.

Everyone has rain, all 100% of them have rain (100%).

How do you know? You know it, you know it, you know it.

It will rain in 100% of cases, all 100% of them have rain, a 100%.

[illegible]

1.4) Poster presentation

Waranya Suwannasing, Samart Mooamart, **Pakawadee Kaewkannetra** (2010) Feasibility of sugar cane juice as a sole carbon for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production via batch fermentation by *Alcaligenes latus* 1403 and *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095. In 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, September 14th-18th, 2010, Rimini, Italy.

Feasibility of sugar cane juice as a sole carbon for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production via batch fermentation by *Alcaligenes latus* 1403 and *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095

Waranya Suwannasing^a, Samart Moonamart^b, Pakawadee Kaewkannetra^a



^aDepartment of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, 40002, Thailand
^bResearch Center for Biotechnology, Faculty of Science, Khon Kaen University, 40002, Thailand
^cDepartment of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, 40002, Thailand

*Corresponding author: pakawadee.k@kku.ac.th



Abstract

Potential use of sugarcane juice as a sole carbon source for production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) via batch fermentation by pure isolated strains of *Alcaligenes latus* TISTR 1403 and *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 is investigated. Sugarcane juice was characterized and composed of total sugar 105.5 g/L (36.6 g/L sucrose, 26.0 g/L fructose, 21.6 g/L glucose and 21.1 g/L other sugars). Then, the *A. latus* and the *A. eutrophus* with 10% inoculum size were separately cultivated in the medium containing 20 g/L initial total sugar in 250 mL shake flasks under controlled condition of 30°C, 200 rpm, pH 6.5-7. It was found that the *A. eutrophus* grew better than the *A. latus*. Thus, only the *A. eutrophus* was further cultivated in different initial total sugar concentrations (20, 30, 40 and 50 g/L) under controlled condition (200 rpm, 30°C, pH 6.5-7 and 10% inoculum size). The optimal total sugar concentration reached at 50 g/L. The dry cell mass (DCM) and medium PHAs were obtained at 6.013 g/L and 1.84 g/L after 60 hr fermentation converted to biomass yield (Y_{bi}) and product yield (Y_{ph}) of 0.163 and 0.05. While, specific product yield (Y_{ph}) and productivity were 0.306 and 0.031 g/L-hr. To increase the PHAs production, 5 L fermenter (2 L working volume) was considered using the optimal condition obtained from the flask scale under aerobic condition (30% dissolved oxygen). The DCM and the medium PHAs were 5.88 g/L and 1.281 g/L resulted to values of Y_{bi} , Y_{ph} , Y_{ph} and productivity at about 0.193, 0.043, 0.218 and 0.023 g/L-hr, respectively.

Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are an intracellular microbial product mostly produced by bacterial strains. The structure and their properties are similar to polypropylene which the advantage are biodegradable and can be produced by renewable resource such as cassava, potato, starch, molasses, sweet sorghum and even sugarcane. However, cost of PHAs production is more expensive than polychlorinated plastic. Therefore cost of the production depends on raw material used. Thus, this study aims to use sugarcane juice as a raw substrate by pure strains of *Alcaligenes latus* TISTR 1403 and *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 to produce PHAs via batch fermentation.

Materials and Methods

Microorganisms and culture condition

Pure bacterial strains of *Alcaligenes latus* TISTR 1403 and *A. eutrophus* TISTR 1095 were cultured in nutrient broth under aerobic condition controlled of 30°C, 200 rpm and pH 6.5-7. After 24 hrs, 10% (v/v) inoculum was added into 100 mL minimal medium (Sato et al., 1996) which was varied initial total sugar concentrations at 20, 30, 40 and 50 g/L. The culture was further incubated for 72 hours at 30°C, 200 rpm and pH 6.5-7.0. This sample was withdrawn for 5 mL each every 6 hr for monitor dry cell mass, total sugar concentration. When large scale PHAs production was carried on in 5 L fermenter (2 L working volume) using optimal 50 g/L total sugar concentration obtained from flask scale. Fermentation condition was controlled as followed: 200 rpm, 2 hrs aeration rate, 30°C and pH 6.5-7.0 and pO₂ constant 30%.



Fig 1. Flask scale fermentation



Fig 2. Large scale fermentation

Analytical techniques

- 1) Dry cell mass: After centrifugation, cell pellet was then washed by distilled water and dried at 50 °C until to get constant dry cell weight.
- 2) Total sugar concentration: Total sugar in the sugarcane juice was measured using HPLC method (Zachar et al., 1996).
- 3) PHAs content: PHAs content was determined using sequencing steps of oil disruption, centrifugation, extraction and separation. Finally, the PHAs in powder was re-suspended with conc. sulfuric before measuring the optical density at 235 nm (Law and Shapley, 1993).

Presenter

Waranya Suwannasing
 Grad. School of Khon Kaen University
 Department of Biotechnology,
 Faculty of Technology,
 Khon Kaen University, Khon Kaen, THAILAND
 E-mail: waran_pon@hotmail.com



Results

Table 1. Composition of sugarcane juice

Parameter	Value
Total sugar (g/L)	105.5
Sucrose	36.6
Glucose	21.6
Fructose	26.0
Others	21.1
Total soluble solid (Brix)	33.6
pH	3.4



Fig 3. (Left) Sugarcane and (Right) its juice

Optimal condition for *Alcaligenes* production in flask scale

Initial total sugar concentrations were varied at 20, 30, 40 and 50 g/L. The optimal total sugar concentration at 50 g/L was obtained and gave the DCM 6.013 g/L and medium PHAs 1.84 g/L after 60 hr fermentation. While, biomass yield (Y_{bi}), product yield (Y_{ph}), specific product yield (Y_{ph}) and productivity were obtained at 0.163, 0.05, 0.306 and 0.031 g/L-hr, respectively. The optimal condition obtained at 50 g/L total sugar, 30°C, 200 rpm and pH 6.5-7.0 were used. The results are summarized as Table 2.

Table 2. Biomass and PHAs production in different initial sugar concentrations

Total sugar concentration (g/L)	Biomass (g/L)	PHAs (g/L)	Biomass yield, Y_{bi}	Product yield, Y_{ph}	Specific product yield, Y_{ph}	Productivity (g/L-hr)
20	1.8304	0.0293	0.1548	0.0018	0.0146	0.0008
30	2.1611	0.0461	0.1699	0.0054	0.0254	0.0010
40	3.0088	0.0681	0.1728	0.0230	0.1338	0.0154
50	6.0120	1.8397	0.1634	0.0400	0.2465	0.0306

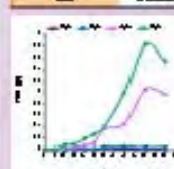


Fig 4. PHAs content in function of time under variation of total sugar at 20, 30, 40 and 50 g/L

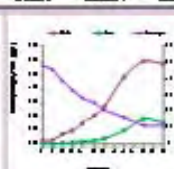


Fig 5. Cell dry weight and PHAs production in function of time and total sugar at 20, 30, 40 and 50 g/L

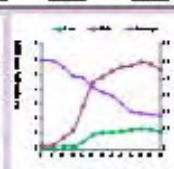


Fig 6. Cell dry weight and PHAs production in function of time and total sugar at 20, 30, 40 and 50 g/L

Production *Alcaligenes* in 5 L fermenter

To increase PHAs production, 5 L fermenter (2 L working volume) was considered using the optimal condition obtained from the flask scale under aerobic condition of 30% dissolved oxygen. The DCM and the medium PHAs were obtained at 5.88 g/L and 1.281 g/L calculated to values of Y_{bi} , Y_{ph} , Y_{ph} and productivity at about 0.193, 0.043, 0.218 and 0.023 g/L-hr, respectively.

Conclusion

1. Preliminary study showed that *A. eutrophus* can be grown better than *A. latus* in the medium with optimal concentration of 20 g/L sugarcane juice.
2. The optimal 50 g/L total sugar concentration in the juice for PHAs production obtained in both flask and fermenter and gave maximum PHAs, Y_{bi} , Y_{ph} and Y_{ph} .
3. The results obtained clearly showed that agricultural sugar based material of sugarcane juice can be used as a cheap carbon source for PHAs production.

Acknowledgement

This work is mainly supported by co-funding between Khon Kaen University (FY 2009) for S. moonamart and Thailand Research Fund (TRF) FY 2010 (Contract no. DBG5380013 for P. Kaewkannetra). In addition W. Suwannasing also would like to thanks the FoNAPP Research Center and Graduate School of Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand for postgraduate fund and travel award.

1.5 Poster presentation

Varavut Tanamool, **Pakawadee Kaewkannetra** (2010). Direct screening of potential polyhydroxyalkanoates (PHAs) bacterial from soil environment using sweet sorghum as a sole carbon source. In The World Congress on Engineering and Technology (CET 2011), October 28 - November 2, 2011, Shanghai China.



Direct screening of potential polyhydroxyalkanoates (PHA) bacterial from soil

Worawat YANAGUCHI^{1,2} and Polinwanee KADWANKHETRA^{3*}
¹Graduate School of Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
²Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
³Corresponding author : polinw@kku.ac.th



YANAGUCHI UNIVERSITY

Abstract

Interesting environmental friendly biopolymer of polyhydroxyalkanoates (PHA) are defined as thermoplastic material which can be further produced as biodegradable plastic. Thus, this work aims to produce PHAs by sweet sorghum juice utilizing bacteria isolated from sugar cane plantation soil. Nine isolates A was added into solid medium containing sweet sorghum juice during screening. Among 18 isolates showed a strong bright colour under UV light and then they were confirmed under light microscope after Sudan black B staining. On basis of genus morphology, only 3 isolates were chosen and coded as S4, S5 and S11. Then, batch fermentation was carried by each 3 isolated strains compared to 3 referenced strains of *Alcaligenes eutrophus*, *A. latus* and *Hydrogenophaga* sp. under controlled condition of pH 7, 35°C and 20 g/L of initial total sugar in sweet sorghum juice. The results clearly showed that the isolate S4, can be produced a maximum PHAs at 57.62% dry weight and gave maximum productivity at 0.007 g/L/h compared among the strains used. The S4 was further identified by fulllength 16S rDNA gene sequence homology to be closely related to *Shewanella aerobialia* (99.7% similarity). Surprisingly, since it was found in soil after freshly collected from upper atmosphere and no one reports application of the strain to produce added value of PHAs.

Introduction

PHAs are defined as a kind of biodegradable plastic and biocompatibility, which can be produced from a number of microorganisms mostly bacteria. Many researchers attempted to isolate soil or marine bacteria to produce PHAs from inexpensive raw material such as agrotophic biomass waste, molasses, starch and sugar cane juice etc. Sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) is a cheap agricultural feed crop. The juice from sweet sorghum stem contains of high total sugar content in form of sucrose and also other sugars in small amounts of glucose and fructose. The properties of sweet sorghum juice can be used as an ideal carbon source medium for microbial growth to produce added value products such as bioethanol, hydrogen, lactic acid etc. In this research study, we attempted to isolate utilizing sweet sorghum juice bacteria from soil environment and to investigate a potential use of the sorghum juice as a sole carbon source and produce PHAs via bio-batch fermentation by isolated bacteria and compared to PHAs-producing referenced bacteria of *A. eutrophus*, *A. latus* and *Hydrogenophaga* sp.

Materials and methods

2.1 Collection of soil sample



Figure 1 shows a person in a field collecting soil samples from the base of sweet sorghum plants.

2.2 Preparation of sweet sorghum juice

Sweet sorghum (SU 40) was kindly provided from Faculty of Agriculture Science, Khon Kaen University, Thailand. Then, the stem was cut and the juice obtained after filtering by cotton sheet. The juice then was kept at -20 °C for prevention of microbial contamination.

2.3 Screening of utilizing sweet sorghum juice bacteria

One gram of soil was weighed and added into 50 ml flask containing 100 ml nutrient broth (NB). Flasks were incubated in orbital shaking incubator at 35 °C and 200 rpm for 24 h. The medium was spread on solid minimal salt media containing sweet sorghum juice as a sole carbon source and supplemented with a solution of 0.5 mg/ml blue A to generate substrate (D4450) to give a final concentration in media of 0.5 µg/ml. The plates were incubated at 35 °C for 54 h. Several PHA-producing colonies of soil bacteria were observed under UV light [2]. PHA-producing bacteria were confirmed by Sudan black B staining procedure were observed by microscopic technique. The different strains were selected by their genus morphology and polymer accumulation behavior under light microscope and identified by full length 16S rDNA gene sequence homology.

2.4 PHAs production from sweet sorghum juice

The fermentative utilization of sweet sorghum juice was studied by inoculating the selected strains and compared with 3 referenced PHAs-producing strains as *A. latus*, *A. eutrophus* and *Hydrogenophaga* sp. The culture media containing sweet sorghum juice which composed of (g/L): 20 g Total sugar of sweet sorghum juice, 1.5 g KH₂PO₄, 0.57 g NaH₂PO₄, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 1 g (NH₄)₂CO₃ and 1 ml trace element solution which the prepared method was described by Gerzbe, et al, 1996. In addition, cell dry weight (CDW) and PHAs were investigated.

2.5 Recovery and quantification of PHAs

PHAs concentration was determined by method of Liwand Gheysy, 1991

Results and Discussion

3.1 Bacterial isolation

Various soil bacteria were able to grow on solid sweet sorghum juice medium with Nile blue A stain. These dyes could diffuse into the cytoplasm of the colonies during growth and subsequently into the PHAs inclusions. The positive PHAs-producing colonies were reported UV fluorescence at the wavelength 260 – 280 nm and shows brighter colonies. In the present study, we have chosen only 9 isolates strong bright colored and they were re-inoculated on solid nitrogen limited medium. After 48 h, each colony was observed under light microscope. The different genera cell morphologies of bacteria were investigated and it could be categorized into three groups. The isolates named as S4, S5 and S11 were selected from 18 colonies showed as Fig.1.



Figure 1 shows three petri dishes with bacterial colonies. The colonies are bright and fluorescent under UV light.

Fig. 1 Variable colonial bacteria on solid sweet sorghum juice medium with Nile blue A (a) isolation of PHAs-producing bacteria from soil, (b) the isolate S4, S5, S11 and 3 referenced bacterial strains (*A. eutrophus*, *A. latus* and *Hydrogenophaga* sp.) under UV light and (c) the isolates S4, S5, S11 and 3 referenced bacterial strains under visible light.

In Fig. 1, the isolates S4, S5 and S11 show strong bright colony on solid sweet sorghum juice medium with Nile blue A. They were re-inoculated on solid sweet sorghum juice medium and compared with three PHAs-producing strains (*A. eutrophus*, *A. latus* and *Hydrogenophaga* sp.). After 48 h, isolate S4, S5 and pure culture of *A. eutrophus* and *Hydrogenophaga* sp. were inoculated very strong bright colonies (Fig. 1b). By contrast, isolate S11 grew slowly and *A. latus* gradually grows on sweet sorghum juice, its shows negative result on solid medium with Nile blue A may be due to some inhibition from other dyes or sweet sorghum juice.

3.2 PHAs production from sweet sorghum juice

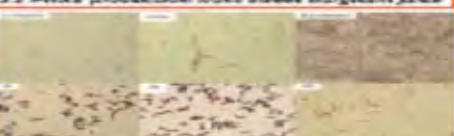


Figure 2 shows micrographs of bacteria containing PHA inclusion. The red shape in black color represents PHA granules.

Fig. 2 Micrographs of bacteria containing PHA inclusion, red shape in black color represents PHA granules

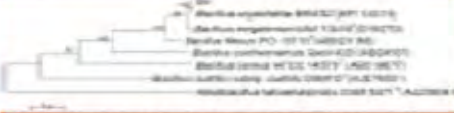


Figure 3 shows a phylogenetic tree of the isolate S4. The tree shows the relationship between the isolate S4 and other bacterial strains.

Fig. 3 Phylogenetic tree of the isolate S4. The tree shows the relationship between the isolate S4 and other bacterial strains. The isolate S4 is closely related to *Shewanella aerobialia* (99.7% similarity).

3.3 Identification of isolated strain

The isolated S4 was identified using the full length sequence 16S rDNA technique and compared to those available in the public databases. It was found that, it was closely related to that bacterial strain *Shewanella aerobialia* (99.7% similarity). The phylogeny based on three full length 16S rDNA sequences and related *S. aerobialia* is shown in Fig. 3. They can use various carbon sources for their growth (data not shown) and can also be accumulated PHAs in their cell and grow well on sweet sorghum juice more than other referenced PHAs-producing strains. It should be noted that *S. aerobialia* can be used as novel strain for PHAs production instead of other Gram-negative bacteria.

3.3.1 Identification of isolated strain

The isolated S4 was identified using the full length sequence 16S rDNA technique and compared to those available in the public databases. It was found that, it was closely related to that bacterial strain *Shewanella aerobialia* (99.7% similarity). The phylogeny based on three full length 16S rDNA sequences and related *S. aerobialia* is shown in Fig. 3. They can use various carbon sources for their growth (data not shown) and can also be accumulated PHAs in their cell and grow well on sweet sorghum juice more than other referenced PHAs-producing strains. It should be noted that *S. aerobialia* can be used as novel strain for PHAs production instead of other Gram-negative bacteria.

Conclusion
References
Acknowledgements

2.1) International Journal

P. Kaewkannetra, S. Promkotra (2011) Microstructural Evolution of Synthesized Poly- hydroxyalkanoates (PHAs) Corresponding to Their Blends. Defect and Diffusion Forum (312-315): 668-693. (Impact factor =0.483)

Defect and Diffusion Forum Vols. 312-315 (2011) pp 688-693
 Online available since 2011/Apr/20 at www.scientific.net
 © (2011) Trans Tech Publications, Switzerland
 doi:10.4028/www.scientific.net/DDF.312-315.688

Microstructural Evolution of Synthesized Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Corresponding to Their Blends

P. Kaewkannetra^{1,a} and S. Promkottra^{2,b}

¹Fermentation Research Centre for Value Added Agricultural Products (FerVAAP), Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand.

²Department of Geotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand.

^apaknar@kku.ac.th, ^bsarunya@kku.ac.th

Keywords: microstructure, polyhydroxyalkanoates (PHAs), biopolymer, blended film.

Abstract. Biopolymers of polyhydroxyalkanoates (PHAs) are produced by pure bacterial strain of *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 via batch fermentation using sugarcane juice as a carbon source, and yielded up to 21% (w/w) after recovery process. The PHAs are blended with bio-based materials such as tapioca and corn starch including glycerol and methanol to improve their microstructures. The combination of various plasticizers with PHAs is studied in different ratios. The PHAs and starch are mixed for 3% w/v and 30% w/v in hot chloroform, respectively. The varieties of PHAs to starch solution ratios are situated for casting as of films. The PHAs blended films are characterized by polarized light microscopy, differential scanning calorimetry (DSC) and x-ray diffractometry (XRD). The initial PHAs indicate remarkably crystalline structure with cross-polarized light on optical microscope. Macroscopic scales of their films are very brittle and flexible. However, their microscopic scales present small patches of particular components from each starch. Immiscibility of the blends is gradually increased on adding the starch portions. Additional glycerol shows more strongly interfacial adhesion between starch and PHAs, and methanol produces specifically thin films. Melting transition temperatures of blended films are slightly higher than the biosynthesized PHAs as examined by DSC. Corn starch mixture causes highly brittle films than tapioca mixtures, which indicates poor adhesion between corn starch and the PHAs. This result is correspondent to their highly crystallinity from diffractogram. Microstructural evolution of the blended films is increased slightly crystallinity by the solution casting.

Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are intracellular energy and carbon storage material synthesized by numerous microorganisms mostly bacteria strains [1] PHAs can be stored up to 80% of dry cell mass [2]. There are two bacterial groups, based on the culture conditions, that can be used for PHAs production. One which includes *Alcaligenes eutrophus* required the limitation of nutrient elements in the presence of excess of carbon source for the efficient synthesis of the PHAs[3]. For another group such as *A. Latus* does not require nutrient limitation. Even though PHAs have potential application as completely biodegradable and biocompatible thermoplastics, however the high cost of production has obstructed their commercial application. Much more attention has been attempted to reduce production cost of PHAs by improvement in both more efficient production and recovery processes and development to use better bacterial strain such as recombinant *Escherichia coli*. Since, synthetic plastics are still widely used. They caused air pollution and then global warming problems, respectively. Therefore, promoting applications of environmental friendly degradable biopolymers lead to long-term performance. The interest in biodegradable films is point to natural polymers which is edible and quite cheap. Additional agricultural biomaterials, such as starch are blended to enhance their mechanical properties. However, the results are still limited [4].

Thus, this work aims to develop film sheets of commercial and synthesized PHAs via with additive starch and plasticizers. Two types of cheap agricultural products of tapioca and corn

All rights reserved. No part of contents of this paper may be reproduced or transmitted in any form or by any means without the written permission of TTP, www.ttp.net. (ID: 48,48,107,38-03/05/11,1550:53)

click for
feedback



starches are typically used for mixing and two plasticizers, glycerol and methanol are applied for improving flexibility of the films. Microstructures of the blended films are examined using several techniques. Morphology of blended films is observed by a polarization optical microscope (POM). Their structural evolutions are analyzed by differential scanning calorimetry (DSC) and x-ray diffractometry (XRD). The melting temperatures (T_m) are carried out by the DSC which identify a phase transition. Microstructural characteristics can be identified the degree of crystallinity of the blended films by X-Ray diffraction. Evaluating degree of crystallinity is the descriptive the amorphous scattering curve under the real intensity curve.

Materials and Experiments

PHAs production: Biopolymers of polyhydroxyalkanoates (PHAs) are produced by pure bacterial strain of *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 via batch fermentation using sugarcane juice as a carbon source and the culture condition used followed to Kaewkannara et al (2008) [5]. After 50 hrs fermentation, intracellular product of PHAs was recovered using sequent steps modified from Hahn et al (1995) [6] such as centrifugation ($\times 7000$ g for 10 mins) to separate wet cell mass from fermentation broth, cell disruption with a detergent of 6% sodium hypochlorite, extraction by hot chloroform via soxhlet and PHAs were dried overnight at room temperature. Finally, white powder of PHAs yield obtained up to 21% (w/w).

Preparation of Blended Films: The PHAs solution of 3% (w/v) is prepared by dissolving with chloroform and heated the mixture at 60°C for 1 hr. Starch suspensions of tapioca and corn starch are made with de-ionized water for 30% (w/v). The PHAs solution and starch suspension are blended in different ratios (0:100, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 100:0). The blended films are obtained by pouring the mixing solution onto Petri dishes with a 10 cm diameter as a casting surface and allowing solvent evaporation overnight at room temperature. Beside, addition of glycerol and methanol are mixed for film developing. Blended films were collected and further investigated in physicochemical properties and their structures. Comparison of a commercial PHAs polymer and synthesized PHAs are also completed. Collections of some ratios of the PHAs to the additives are listed in Table 1.

Table 1 - Blended films preparation (C = commercial PHAs, S = synthesized PHAs, F = film, P = powder)

Sample Number	Basic Polymer (3% w/v)	Starch (30% wt/vol)	Plasticizer	Ratios (%) (Polymer : Starch : Plasticizer)
1	PHAs (C, F)	Tapioca	-	40:60:0
2	PHAs (C, F)	Tapioca	-	30:70:0
3	PHAs (C, F)	Tapioca	-	20:80:0
4	PHAs (S, F)	Tapioca	-	40:60:0
5	PHAs (C, F)	-	-	100:0:0
6	PHAs (C, F)	Tapioca	Glycerol	36:54:10
7	PHAs (C, F)	Tapioca	Methanol	38:57:5
8	PHAs (C, F)	Tapioca	Methanol	36:54:10
9	PHAs (C, F)	Tapioca	Methanol	34:51:15
10	PHAs (C, F)	Corn	-	40:60:0
11	PHAs (S, P)	-	-	100:0:0
12	PHAs (C, P)	-	-	100:0:0
13	-	Tapioca (P)	-	100:0:0

Analytical Techniques

Polarization Optical Microscope (POM): Microstructural morphology of blended films is observed by using polarized light microscopy. Cross-polarized light can be estimated distinctive angle and roughly crystalline structure of the synthesized PHAs.

Differential Scanning Calorimetry (DSC): The melting temperatures (T_m) and the enthalpy of fusion (ΔH_m) of the blended films are determined by DSC. The cast film samples are weighed on hermetic aluminum pans and analyzed by a Mettler Toledo DSC 830a Colorimeter. The heating rate and cooling rate for the samples are 10°C/min and 20°C/min, respectively. The maximum area of endothermic peaks can be obtained the melting temperatures and enthalpy of fusion.

X-ray Diffractometry (XRD): Monochromatic Cu-K α radiation (wavelength = 1.5406 Å) was produced by a D8 Bruker X-ray diffractometer. The film samples are packed tightly in a sample holder. The 2 θ diffraction angle is scan through the regions of 5-55°. The operation conditions are including the step interval of 0.02 and step time of 0.5 degree/min. The degree of crystallinity of the blended films is quantified following the method of Nara & Komya (1983) [7]. Diffractograms of each sample are read and subtracted background by XPert Plus software program, version 1.0, 23.04.1999. The equation of the degree of crystallinity is $X_c = A_c / (A_c + A_a)$ where X_c is the degree of crystallinity, A_c is the crystallized area on the X-ray diffractogram and A_a is the amorphous area on the X-ray diffractogram. The diffractograms are edited and quantified by ImageJ software program [8].

Results and Discussion

Microstructural morphology

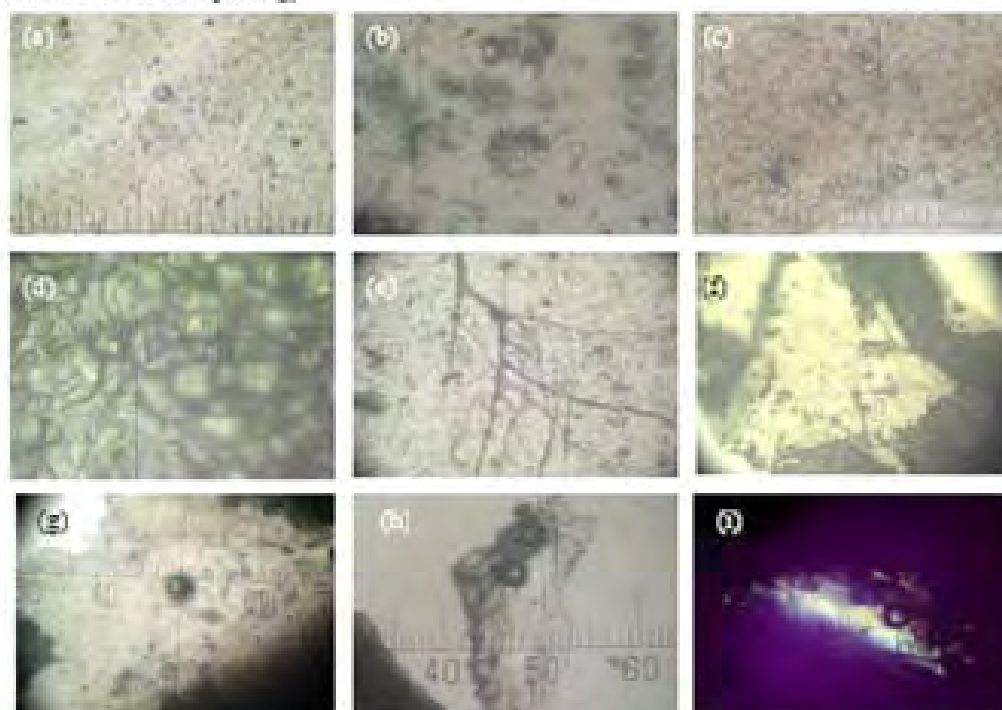


Figure 1 - Photomicrographs of blended films (a-g) which corresponding to sample numbers 1-7 in Table 1, and (h, i) synthesized PHAs powder that no cross-polarized light in (h) and with cross-polarized light with distinctive angle in (i). The interval of a small scale is indicated 10 micrometer.

Optical microscope is used to investigate the morphology of PHAs, raw materials and their blended films. The films are brittle and easily crack. Increasing additional starch will cause highly brittle of the films, especially corn starch. Plasticized films show homogeneous surfaces and less pores or cracks. Their microstructures are compacted comparing to without any plasticizers. Moreover, the films with methanol can be made very thin blended films. Their micrographs are shown in Fig 1 as above.

Differential Scanning Calorimetry (DSC): The melting temperatures imply to phase change. The synthesized-blended PHAs film (no.4) and the commercial PHAs film (no.1) show no significantly amount of T_m . However, the melting enthalpy (ΔH_m) especially for the PHAs film in Fig. 2a (no.4) which is lower than sample no. 1 (Fig. 2b), as shown in Table 2. The polymer chain from the natural products (no.4, no.11) is shorter than general commercial polymers. Thus, it consumes less energy. Glycerol plasticized film (no.6) shows the highest melting enthalpy. This indicates that the glycerol plasticizer can heal starch film brittleness and recover elasticity. Intermolecular force of the blends is reduced and the mobility of the polymer chain is increased. Glycerol is a hydrophilic material; then it is compatible with the hydrophilic blended films.

The transition temperature of the PHAs film and tapioca alone without any plasticizer can happen by the quantity of mixing starch to different degree. The melting temperatures of the PHAs in the blend is presented between 170-75°C which do not significantly change when compare to the melting enthalpy.

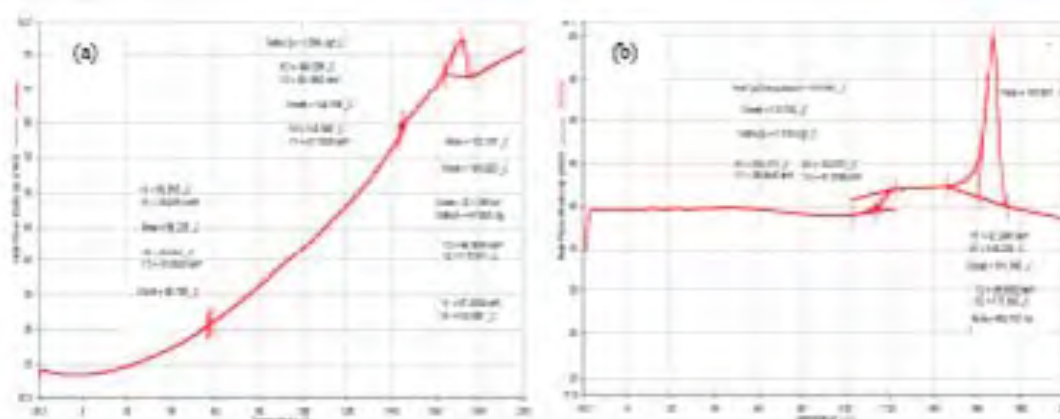


Figure 2 - DSC thermograms of synthesized PHAs (a) and commercial PHAs (b) blending with tapioca in the same ratio of 40:60.

X-ray Diffractometry (XRD): A biopolymer can be considered relatively crystalline and relatively amorphous. The crystallinity portion give sharp narrow peaks and the amorphous component gives a very broad peak. The ratio between these intensities or areas of crystalline and amorphous can be used to calculate the degree of crystallinity of biopolymer [9]. The main crystalline peaks in the X-ray diffraction pattern are attributed starting to 5-35°2 θ . The x-ray patterns of these blended films give the stronger diffraction peaks at around 12.5 to 13.5°. The strongest diffraction peak of the diffractogram of pure PHAs appeared at 13.38° 2 θ .

The degree of crystallinity from diffractograms of the blended films and others are calculated and showed in Table 2. Although, too much crystallinity causes brittleness, high crystallinity will increase the strength of microstructural films. Immiscibility of the blends is gradually increased on increasing the starch portions (Fig. 3a). The comparison of samples no.4, 6, 7, 11 and 12 indicate slightly high crystallinity in the sample no.12, as shown in Fig. 3b. Glycerol and methanol have no

influence the XRD peaks of the blended films. Thus, these plasticizers can not change the position of the XRD peaks.

Corn starch mixtures cause more brittle and crack films than tapioca mixtures. Additional glycerol shows more strongly interfacial adhesion between starch and PHAs and still keeping close to the normal of the degree of crystallinity of the blended films. Other additional plasticizer, methanol, presents specifically low degree of crystallinity. Microstructural evolution of the blended films (no.5) is increased slightly crystallinity by the solution casting when compare to the powder sample (no.12).

Table 2 - Melting temperatures (T_m), melting enthalpy (ΔH_m) and the degree of crystallinity of blended films. The sample number is corresponding to the number in Table 1.

Sample Number	Melting Temperatures (T_m , °C)	Melting Enthalpy (ΔH_m , J/g)	Degree of Crystallinity
1	173.41	133.90	67.58
2	119.85	213.76	63.85
3	-	-	63.59
4	172.21	95.67	61.06
5	173.05	175.94	68.48
6	174.27	380.44	63.36
7	172.91	175.92	52.18
8	173.07	134.50	52.25
9	173.07	162.95	57.10
10	172.57	159.83	44.51
11	171.18	120.72	54.42
12	170.38	141.41	61.67
13	-	-	62.86

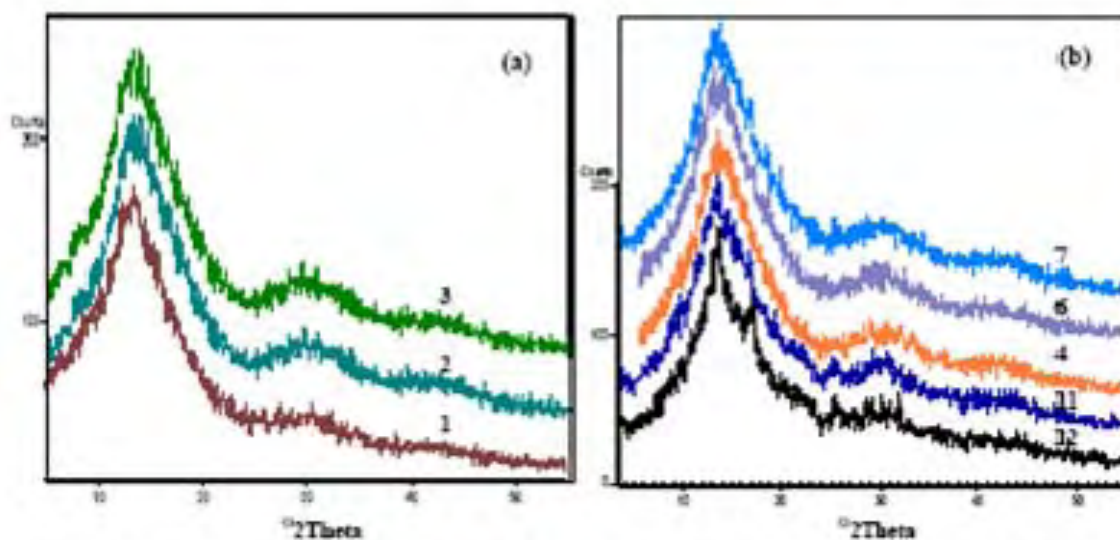


Figure 3 - Comparison of diffractograms (a) increasing starch portions of sample no.1-3 and (b) sample no.12 (commercial PHAs) compared to no.11 (synthesized PHAs) powder blended with plasticizers of tapioca (no.4), glycerol (no.6) and methanol (no.7).

Summary

Both commercial and synthesized polyhydroxyalkanoates (PHAs) can possibly blend with cheap agricultural products as tapioca and corn starch for improvement of physicochemical properties and leading to production of value added product as environmental friendly bioplastics. However, yield of PHAs also can be improved in several ways. The optimized concentration of the blend is 3% (w/v) of PHAs in chloroform and 30% (w/v) of additional starch in de-ionized water. The proper ratio of the blended films between PHAs to starch solution is shared for 40 to 60 based on their morphology. Increasing additional starch will cause highly brittle of the films. Glycerol plasticized film reveals homogeneous texture with dense structure. Additional plasticizers of glycerol and methanol are intended to enhance elasticity of the blended films. On the polarized optical microscope, the synthesized PHAs present semi-crystalline polymer by cross-polarized light with distinctive angle. The DSC and XRD results provide information of microstructural characteristics of the films. Short chain polymer of synthesized PHAs can differentiate from the commercial PHAs. The small changing of the melting temperature points out the phase transition which is revealed by the melting enthalpy. The blended films present the estimated crystallinity by XRD. Microstructural evolution of the blended films is increased slightly crystallinity by the solution casting. These confirm an evidence of the combination of each component.

Acknowledgement

This research project is co-funded by Thailand Research Fund (TRF) and Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand under strategic basic research projects (Production of value added products) for FY 2010 (contract no. DBG5380013).

References

- [1] F. Wang and S. Y. Lee: *Appl. Environ. Microb.*, Vol. 63 (1975), p. 3703
- [2] H. M. Muller and D. Seebach: *Chem. Inter.*, Vol. 32 (1993), p. 477
- [3] E. Grothe, M. Moo-Young and Y. Chisti: *J. Enz. Micro. Technol.*, Vol. 25 (1990), p. 132.
- [4] H. Verhoogt, B.A. Ramsay and B.D. Favis: *Polymer*, Vol. 35 (1994), p. 51
- [5] P. Kaewkannetra, P. Tanonkeo, V. Tanamool and T. Imai: *J. Biotechn.*, Vol. 136S (2008), p. S412
- [6] S.K. Hahn, Y.K. Chang and S.Y. Lee: *Appl. Environ. Microb.*, Vol. 60 (1995), p. 34
- [7] S. Nara and T. Komiya: *Starch-Stärke*, Vol. 35 (1983), p. 407
- [8] W. Rasband: *ImageJ 1.43v* (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).
- [9] A. El-Hadi, R. Schnabel, E. Straube, G. Muller and S. Henning: *Polymer Testing*, Vol. 21 (2002), p. 665

2.2) International Journal

Pakawadee Kaewkannetra, Jaruwat Soonthornchiya, Samart Moonamart (2011) Increasing of tapioca flour by blending and forming with commercial PHBV and biopolymer obtained from fermented sugar cane juice for producing as bioplastic, Journal of Biotechnology, 150 (S1): 385. (Impact factor =2.881)


[Hub](#) | [ScienceDirect](#) | [Scopus](#) | [Applications](#)

[Register](#) | [Login](#) | [Go to SciVal Suite](#)

[Home](#) | [Browse](#) | [Search](#) | [My settings](#) | [My alerts](#)
[Help](#)

Articles All fields

Images Journal/Book title

Author

Volume Issue Page

[Advanced search](#) [Search tips](#)

5 articles found for: AUTHOR(S)(Pakawadee Kaewkannetra)
[Save this search](#) | [Save as search alert](#) | [RSS Feed](#)

Font Size:

☒ Full-text available
☐ Abstract only

Search within results

Refine results

Content Type
☐ Journal (5)
Journal/Book Title
☐ Journal of Biotechnology (4)
☐ International Journal of Minerals, Metallurgy &... (1)

Topic
☐ acidithiobacillus ferrooxidans (1)
☐ biodiesel production (1)
☐ cane juice (1)
☐ co2 concentration (1)
☐ commercial phbv (1)
[View more](#)

Year
☐ 2010 (4)
☐ 2009 (1)

Most Cited
Click here to see the most cited articles from your search. [Show Articles](#)

E-mail articles | Export citations | Download multiple PDFs | Open all previews

Sort by: [Relevance](#) | [Date](#)

- Increasing of tapioca flour by blending and forming with commercial PHBV and biopolymer obtained from fermented sugar cane juice for producing as bioplastic**
Journal of Biotechnology, Volume 150, Supplement 1, November 2010, Page 385
Pakawadee Kaewkannetra, Jaruwat Soonthornchaya, Samart Moonamart
[Show preview](#) | PDF (51 K) | [Related articles](#) | [Related reference work articles](#)
- Conversion of industrial wastewater to electricity via microbial fuel cells (MFCs)**
Journal of Biotechnology, Volume 150, Supplement 1, November 2010, Page 166
Pakawadee Kaewkannetra, Prapitras Dujanuntat
[Show preview](#) | PDF (54 K) | [Related articles](#) | [Related reference work articles](#)
- Influences of CO₂ concentrations and salinity on acceleration of microalgal oil as raw material for biodiesel production**
Journal of Biotechnology, Volume 150, Supplement 1, November 2010, Page 110
Prayoon Enmak, Pakawadee Kaewkannetra
[Show preview](#) | PDF (59 K) | [Related articles](#) | [Related reference work articles](#)
- Screening, identification and production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by sucrose utilizing microbes isolated from soil environments**
Journal of Biotechnology, Volume 150, Supplement 1, November 2010, Page 301
Varavut Tanamool, Tsuyoshi Imai, Palboon Danvirutai, Pakawadee Kaewkannetra
[Show preview](#) | PDF (54 K) | [Related articles](#) | [Related reference work articles](#)
- Bioteaching of zinc from gold ores using *Acidithiobacillus ferrooxidans*** Original Research Article
International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials, Volume 15, Issue 4, August 2009, Pages 305-374
Pakawadee Kaewkannetra, Francisco José García-García, Tze Yen Chiu
[Show preview](#) | [Related articles](#) | [Related reference work articles](#)

5 articles found for: AUTHOR(S)(Pakawadee Kaewkannetra)
[Save this search](#) | [Save as search alert](#) | [RSS Feed](#)

[Home](#) | [Browse](#) | [Search](#) | [My settings](#) | [My alerts](#)
[Help](#)

About ScienceDirect
What is ScienceDirect
Content details
Set up
How to use
Subscriptions

Contact and support
Contact and support

About Elsevier
About Elsevier
About SciVerse
About SciVal
Terms and Conditions
Privacy policy
Information for advertisers



Copyright © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved. SciVerse® is a registered trademark of Elsevier Properties S.A., used under license. ScienceDirect® is a registered trademark of Elsevier B.V.

[P-I.116]

Increasing of tapioca flour by blending and forming with commercial PHBV and biopolymer obtained from fermented sugar cane juice for producing as bioplastic

Pakawadee Kaewkannetra^{1,2,*}, Jaruwat Soonthornchiya^{1,2}, Samart Moonamart¹

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

² Fermentation Research Centre for Value added Agricultural Products (FerVAAP), Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Keywords: tapioca starch; PHBV (poly-3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate); sugar cane; blended films; bioplastic

The objective of this work is to increase value of tapioca flour by blending and forming biopolymer obtained from fermented sugar cane juice comparing to commercial biopolymer in solid form of Poly-3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV). Typically, PHBV is known as biodegradable, biocompatible, semi-bacterial polyester and has similar properties to polypropylene (PE). Firstly, the commercial PHBV was preliminary investigated as sheet films with bio-based material of tapioca flour. The 3% (w/v) PHBV was dissolved with hot chloroform at about 60°C while the 3% (w/v) flour was mixed with water. Then, different ratios (v/v) of PHBV and the flour were mixed (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 and 100:0). Two mixtures were blended and formed as bioplastic films using conventional solvent-casting techniques. The biopolymer obtained after fermentation of sugar cane juice was also done in the same way with the flour. The bioplastic films are characterized by various physical and chemical techniques such as polarized light microscopy, differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffractometry (XRD). The results revealed remarkably crystalline structure with cross-polarized light on optical microscope. The optimal blended films with a ratio of 40: 60 were obtained by observation of their morphology and immiscibility of the blends is gradually increased on increasing the starch portions. The blended films are mostly brittle and had specify glass temperatures (T_g) depended on the portion. Melting transition temperatures (T_m) of blended films are slightly higher than the bacterial synthesized biopolymer as examined by DSC. These results are correspondent to their highly crystallinity from diffractograms (XRD). In addition, microstructure of the blended films is reduced largely crystallinity by the solution casting.

References

- J. Rodrigues, D.F. Parra, A.B. Lugao, Crystallization of film of PHB/PEG blends evaluation by DSC, *J. Thermal Analysis and Calorimetry* 79 (2005) 379–381.
- S. Godbole, S. Gote, M. Latkar, T. Chakrabarti, Preparation and characterization of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate-starch blend films, *Bioresource Technology* 86 (2003) 33–37.
- Y. Song, Q. Zheng, Improved tensile strength of glycerol-plasticized gluten bioplastic containing hydrophobic liquids, *Bioresource Technology* 99 (2008) 7665–7661.
- A. El-Hadi, R. Schnabel, E. Straube, G. Muller, S. Henning, Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (3-hydroxyalkanoates) PHAs and their blends, *Polymer testing*, 21 (2002) 665–674.

doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.482

[P-I.117]

Evaluation of bacterial lysis procedures for the efficient release of cellular proteins and polymers of biomedical interest

E. García-Fruitós^{1,2}, R. Mendoza^{1,2}, A. Villaverde^{2,3}, E. Rodríguez-Carmona^{1,2,*}

¹ CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Spain

² Institut de Biociències i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain

³ Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193 Barcelona, Spain

Keywords: bacterial lysis; cellular proteins; heterologous protein; cell disruption

The development of metabolic engineering, protein engineering and production strategies has supported the success in heterologous protein production for the manufacture of pharmaceutical or industrial proteins. One of the major disadvantages of bacteria as hosts for protein production is that they generally do not excrete high levels of polypeptides to the medium. Therefore, lysis of microbial cells is often required for their complete isolation, release and recovery from the cells. Moreover, the new nanomedical and nanotechnological applications of recombinant proteins (and other bacterial molecules) including diagnostics, biosensors, regenerative medicine, drug delivery, etc. have forced the application of methods that assure safety and no risk of possible bacterial contamination. Many treatments are available for the disruption of bacterial cells, including mechanical, physical, chemical and enzymatic procedures.

The general aim of this work is understanding the effectiveness of cell lysis procedures by comparing the effects of four approaches based on physical strategies, one chemical procedure and two combined procedures, on *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* strains as bacterial models. For this purpose, the different methods were tested in terms of cell viability by measuring the change in viable bacteria (CFU) before and after the procedures and in terms of total cell protein in supernatant samples.

The obtained results showed that heat shock (100°C) and heat shock+sonication combination methods were the most effective in terms of reducing cell viability for the three assayed bacteria. Moreover, the highest amount of released cell protein was achieved by different methods, depending on the bacterial species.

doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.483

[P-I.118]

Effect of auxotrophies on yeast growth in aerated fed-batch reactor

L. Paciello¹, C. Landi¹, E. de Alteriis², L. Brambilla³, P. Parascandola^{1,*}

¹ University of Salerno, Italy

² University of Naples Federico II, Italy

³ University of Milano-Bicocca, Italy

Keywords: CEN.PK strains; auxotrophy; complementation; fed-batch culture

Mutant and deletion strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* having one/several auxotrophies are largely used in the development of recombinant strains for heterologous protein production because they ensure maintenance of plasmids with selectable markers. The production is usually carried out by cul-

2.3) International Journal

Varavut Tanamool, Tsuyoshi Imai, Paiboon Danvirutai, **Pakawadee Kaewkannetra** (2011) Screening, identification and production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by sucrose utilizing microbes isolated from soil environments, Journal of Biotechnology, 150 (S1): 361. (Impact factor =2.881)


[Hub](#) | [ScienceDirect](#) | [Scopus](#) | [Applications](#)
[Register](#) | [Login](#) | [Go to Scival Suite](#)

[Home](#) | [Browse](#) | [Search](#) | [My settings](#) | [My alerts](#) | [Help](#)

Articles All fields
Images Journal/Book title

Author
Volume Issue Page

[Advanced search](#)
[Search tips](#)

5 articles found for: AUTHORS(Pakawadee Kaewkannetra)
[Save this search](#) | [Save as search alert](#) | [RSS Feed](#)

Font Size: [A](#) [A](#) [A](#)

☒ Full-text available
☐ Abstract only

Limit to
Exclude

Content Type
☐ Journal (5)

Journal/Book Title
☐ Journal of Biotechnology (4)
☐ International Journal of Minerals, Metallurgy &... (1)

Topic
☐ acidithiobacillus ferrooxidans (1)
☐ biodiesel production (1)
☐ cane juice (1)
☐ co2 concentration (1)
☐ commercial phbv (1)
[View more](#)

Year
☐ 2010 (4)
☐ 2009 (1)

Limit to
Exclude

[Email articles](#) | [Export citations](#) | [Download multiple PDFs](#) | [Open all previews](#)

Sort by: [Relevance](#) | [Date](#)

- [Increasing of tapioca flour by blending and forming with commercial PHBV and biopolymer obtained from fermented sugar cane juice for producing as bioplastic](#)
Journal of Biotechnology, Volume 150, Supplement 1, November 2010, Page 385
Pakawadee Kaewkannetra, Jaruwat Soonthornchaya, Saman Moonamart
[Show preview](#) | [PDF \(51 K\)](#) | [Related articles](#) | [Related reference work articles](#)
- [Conversion of Industrial wastewater to electricity via microbial fuel cells \(MFCs\)](#)
Journal of Biotechnology, Volume 150, Supplement 1, November 2010, Page 100
Pakawadee Kaewkannetra, Praepilas Dujjanutak
[Show preview](#) | [PDF \(54 K\)](#) | [Related articles](#) | [Related reference work articles](#)
- [Influences of CO₂ concentrations and salinity on acceleration of microalgal oil as raw material for biodiesel production](#)
Journal of Biotechnology, Volume 150, Supplement 1, November 2010, Page 110
Prayoon Enmak, Pakawadee Kaewkannetra
[Show preview](#) | [PDF \(55 K\)](#) | [Related articles](#) | [Related reference work articles](#)
- [Screening, identification and production of polyhydroxyalkanoates \(PHAs\) by sucrose utilizing microbes isolated from soil environments](#)
Journal of Biotechnology, Volume 150, Supplement 1, November 2010, Page 310
Varavut Tanamool, Tsuyoshi Imai, Palboon Danvirutai, Pakawadee Kaewkannetra
[Show preview](#) | [PDF \(54 K\)](#) | [Related articles](#) | [Related reference work articles](#)
- [Biobleaching of zinc from gold ores using Acidithiobacillus ferrooxidans](#) Original Research Article
International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials, Volume 10, Issue 4, August 2009, Pages 308-374
Pakawadee Kaewkannetra, Francisco Jose Garcia-Garcia, Tze Yen Chiu
[Show preview](#) | [Related articles](#) | [Related reference work articles](#)

My Applications
[Add](#)

Most Cited

Click Here to see the most cited articles from your search. [Show Articles](#)

[Hide Applications](#)

5 articles found for: AUTHORS(Pakawadee Kaewkannetra)
[Save this search](#) | [Save as search alert](#) | [RSS Feed](#)

[Home](#) | [Browse](#) | [Search](#) | [My settings](#) | [My alerts](#) | [Help](#)

About ScienceDirect
What is ScienceDirect
Content details
Set up
How to use
Subscriptions

Contact and Support
Contact and Support

About Elsevier
About Elsevier
About Scival
Terms and Conditions
Privacy policy
Information for advertisers



Copyright © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved. Sciverse® is a registered trademark of Elsevier Properties B.V., used under license. ScienceDirect® is a registered trademark of Elsevier B.V.

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ผกาดี แก้วกันเนตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น

133 | หน้า

hydroxylation at N-methyl leucines lead to dramatic changes of their bioactive spectra. Previously, a rare actinomycetes named *Sebekia benihana* was identified to be able to hydroxylate CyA at the position of 4th N-methyl leucine. Using whole genome scanning, we identified more than 20 novel Cytochrome P450 hydroxylase (CYP) genes from *S. benihana*, followed by the complete sequencing and *in silico* characterization. Since a rare actinomycetes species including *S. benihana* is not currently feasible for routine genetic manipulation, we also established some of the most commonly-practiced genome engineering techniques such as foreign gene expression system as well as specific targeted-gene disruption in *S. benihana*. Using these genetic techniques, we characterized and identified the major CYP-mediated regio-specific CyA modification mechanism in *S. benihana*, and set the stage for maximization of its potential as a bioconversion host of various valuable metabolites including CyA in rare actinomycetes species.

doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.418

[P-I.53]

Screening, identification and production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by sucrose utilizing microbes isolated from soil environments

Varavut Tanamool^{1,2,*}, Tsuyoshi Imai³, Paiboon Danvirutai^{2,4}, Pakawadee Kaewkannetra^{2,4}

¹ Graduate School of Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

² Fermentation Research Centre for Value added Agricultural Products (FerVAAP), Khon Kaen University, Thailand

³ Department of Civil and Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Yamaguchi University, Tokiwadai Ube, Japan

⁴ Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Keywords: screening; identification; polyhydroxyalkanoates (PHAs)

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and their derivatives are polyester and can be used as a substitute for synthesized plastic. Increasing the industrial interest of biopolymer of PHAs, sucrose utilizing microbes from soil collected from sugarcane plantation were screened for evaluation of their ability to accumulate PHAs. Among 72 isolates were picked and transferred to mineral salt medium (MSM) containing sucrose as a sole carbon source, 33 strains can be grown on sucrose agar medium and were further studied to observe PHAs accumulation in their cells using microscopic technique. The results revealed that 3 isolates had positive for PHAs producing strains. Only one strain presented a strong Sudan Black and Nile blue A staining and was identified by 16S rDNA nucleotide sequence homology. From its morphology and physical properties, the isolated strain showed closely related to *Hydrogenophaga pseudoflava* (99% identity). To consider PHAs production by the isolated strain, grown on media containing 20 gL⁻¹ sucrose and 1 gL⁻¹ ammonium sulphate at pH 7 under controlled temperature of 35 °C. Maximum dry cell weight (DCW) and maximum PHAs production were obtained at 3.61 gL⁻¹ and 2.41 gL⁻¹ after 36 and 42 hours of batch fermentation. The sucrose uptake in culture medium measured by total organic carbon (TOC) analyzer was 14.73 g within 48 hours. The highest PHAs inclusions in microbial cell was 68.15% (g PHAs/g DCW) giving maximum PHAs yield (Y_{PHS}) of 0.17 (g PHAs/g sucrose) and a productivity of 0.057 g PHAsL⁻¹h⁻¹. The extracted PHAs were compared with the analytic PHAs and were confirmed to be PHAs by several standard techniques. This study highlights the potential of the bacterial diversity in the soil environment and this characteristic may be an exploitable application for the industrial production of PHAs.

ronment and this characteristic may be an exploitable application for the industrial production of PHAs.

References

- Spiekermann, P., Rehm, B. H. A., Kalscheuer, R., Baumeister, D., and Steinbüchel, A. 1999, A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds, *Arch Microbiol.* 171:73–80.
- Choi, M. H., J. J. Song, and S. C. Yoon, 1995, Biosynthesis of copolyesters by *Hydrogenophaga pseudoflava* from various lactones, *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1):60–67.

doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.419

[P-I.54]

Construction of the ethanol-induced flocculating yeast for fuel ethanol production

Q. Li*, Q. M. Zhang, F. W. Bai, X. Q. Zhao

Dalian University of Technology, China

Keywords: Yeast flocculation; fuel ethanol; integration vector; TPS1 promoter

Yeast flocculation plays an important role in ethanol fermentation industry for easier and cheaper cell separation and recovery. During batch fermentation, it is desired that yeast cells are highly suspended at the beginning to maintain cell growth and fermentation, while yeast flocs are formed at completion of fermentation to enhance product recovery (Govender et al., 2008).

In this study, a conditionally flocculating yeast strain was constructed by integrating a 5217 bp *FLO1*-derived flocculating gene (named *FLO1_{spsc}*) from the self-flocculating yeast SPSC01 directed under the control of a specific trehalose-6-phosphate synthase (*TPS1*) promoter from SPSC01, which was proved to response specifically to ethanol. At the same time, a constitutively flocculating yeast strain was constructed by inserting the *PGK1* promoter amplified from the model yeast strain S288C upstream of *FLO1_{spsc}*. After linearization the DNA fragment containing the expression cassette of *FLO1_{spsc}* was transformed into an industrial yeast strain *S. cerevisiae* 4126 for integration at the *HO* locus (Warren et al., 2001). Corrected integration was confirmed by PCR amplification.

Ethanol fermentation both in the shake-flask and fermentor using 250 g/L glucose showed the engineered yeast harbouring a specific *TPS1* promoter from SPSC01 (designated as strain ZLH01) displayed higher ethanol fermentation rate and ethanol yield than that with *PGK1* promoter (named as strain BHL01), especially under high temperature (37 and 40 °C) in the flask. Helm's Flocculation Test (Bendiak, 1994) and the focused beam reflectance measurement (Ge et al., 2005) confirmed the good flocculating properties of both of the engineered strains, with larger floc size in BHL01 showing constitutive flocculation. Conditional expression of *FLO1_{spsc}* in ZLH01 was confirmed by Real-time PCR, and no inhibition of flocculation was detected even at an ethanol concentration of 120 g/L. This study proved that ethanol induced flocculation directed by *TPS1_{spsc}* promoter is promising for construction of new genetically engineered flocculating yeasts for high gravity fuel ethanol production (Li et al., 2009).

Acknowledgement

This work was supported by High-Tech Research and Development Program of China (No. 2007AA10Z358).

2.4) International Journal

Waranya Suwannasing, Samart Mooamart, **Pakawadee Kaewkannetra** (2011) Feasibility of sugar cane juice as a sole carbon for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production via batch fermentation by *Alcaligenes latus* 1403 and *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095, Journal of Biotechnology, 150(S):229. (Impact factor =2.881)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ผกาวดี แก้วกันเนตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น

20–38, 45–72, and 9–15%, respectively. In addition, ZnCl_2 was used as a bio-solid activation agent and the ZnCl_2 could enhance the pore structure development during the pyrolytic process. Results indicated the proper ZnCl_2 immersed concentration, pyrolytic temperature and time could produce adsorbents from the biosolid. Pore size distribution examination indicated that the mesopore was domain in the pyrolyzed residues and the specific surface area could be up to $750 \text{ m}^2/\text{g}$.

doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.068

[P-E.47]

Isolation and characterization of new diesel-degrading yellow *Gordonia* sp. A-2

P.C. Lee¹, J.H. Kim^{1,*}, S.H. Kim¹, J.H. Yoon², Y.H. Park¹, S.H. Ko³

¹ Ajou University, Republic of Korea

² KRIBB, Republic of Korea

³ Ecophile company, Republic of Korea

Keywords: *Gordonia*; Diesel-degrading; Isolation

New diesel-degrading bacterium AJU A-2 was isolated from heavy oil-contaminated soil and its metabolic capability and physiological characteristics were investigated. The strain AJU A-2 was identified as a member of the genus *Gordonia* on the basis of chemotaxonomic characteristics and phylogenetic inference-based 16S rDNA sequence. The 16S rDNA sequence of strain AJU A-2 was most similar to that of the type strain of *Gordonia amicalis* KCTC 9940^T. The AJU A-2 can grow well over a broad range of pH values (5 – 9) and can grow on 5% (v/v)-diesel-containing mineral media. The yellow AJU A-2 produces structurally diverse carotenoids and their profile is influenced by culture conditions.

doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.069

[P-E.48]

Use of a packed bed column, acting as a chemostat selector to isolate bacterial community able to aerobically degrade azo dyes

Cleotilde Juárez Ramírez*, Eduardo Contreras Blancas, Fortunata Santoyo Tepole, Nora Ruiz Ordaz, Juvencio Galíndez Mayer, Oswaldo Ramos Monroy

ENCB, Mexico

Keywords: Azo dyes; 4-aminobenzenesulfonic acid; 4-aminonaphthalenesulfonic acid; bacterial association

The application of inexpensive biotic processes, not only for color removal but also for the complete mineralization of azo dyes present in waste waters from textile industries, has been increased in the last years. Simple decolorization of azo dyes in anaerobic conditions can produce hazardous intermediaries that usually must be aerobically degraded. For this reason, sequential anaerobic/aerobic treatment processes have been recommended; however, azo dye mineralization can be attained by a purely oxidative wastewater treatment. Because azo linkage rupture can also be achieved by microorganisms containing oxygen-insensitive azoreductases, the anaerobic stage can be obviated, obtaining a complete mineralization of azo dyes by a single aerobic treatment.

In this work, a continuously fed bubble column, packed with fragments of porous volcanic stone, was used to isolate biofilm-forming microorganisms, able to use the azo dyes Acid Orange 7; 4-[(2-hydroxy-1-naphthyl)azo] benzenesulfonic acid (AO7) and Acid Red 88; 4-(2-Hydroxy-1-naphthylazo)-1-naphthalenesulfonic acid

(AR88) as carbon and nitrogen sources.

In the microbial community isolated in the packed bed reactor, five bacterial strains were identified by 16S rDNA fragment amplification procedure, they were: *Pigmentiphaga kullae*, *Labrys neptuniae*, *Kocuria* sp., *Bacillus* sp. and *Curvibacter gracilis*.

The volumetric removal rates R_V and the removal efficiencies of both azo dyes and their intermediary metabolites; 4-aminobenzenesulfonic acid (4-ABS), 4-aminonaphthalene-sulfonic acid (4-ANS) and 1-amino-2-naphthol (1A2N), were evaluated in the same packed bed biofilm reactor used to select the bacterial community. The azo dyes loading rates B_V varied from 3.5 to $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. AO7 removal rates were always proportional to B_V , thus AO7 removal efficiency was 100%. AR88 was 97%, except for the intermediary byproduct 4-ANS, no other metabolite was detected in the outflowing medium. Overall removal efficiency, measured through Chemical oxygen demand (COD) was 94%. The results obtained show that both azo dye were aerobically degraded by the bacterial community.

doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.070

[P-E.49]

Feasibility of sugar cane juice as a sole carbon for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production via batch fermentation by *Alcaligenes latus* TISTR 1043 and *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095

Waranya Suwannasing*, Pakawadee Keawkannetra, Samart Mooamart

Khon Kaen University, Thailand

Keywords: sugar cane juice; polyhydroxyalkanoates (PHAs); fermentation; *Alcaligenes latus*; *Alcaligenes eutrophus*

This work aims to investigate feasibility of sugar cane juice can be used as a sole carbon for biopolymer of polyhydroxyalkanoates (PHAs) production via batch fermentation by pure bacterial strains of *Alcaligenes latus* TISTR 1043 and *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095. Sugar cane juice was characterized and composed of total sugar 105.5 gL^{-1} (36.6 gL^{-1} sucrose, 26.0 gL^{-1} fructose, 21.8 gL^{-1} glucose and 21.1 gL^{-1} other sugars). Then, the *A. latus* and the *A. eutrophus* were separately cultivated in the medium containing 20 gL^{-1} initial total sugar in 250 mL shake flasks under controlled condition of 30 °C, 200 rpm, pH 6.5–7 and with 10% inoculum size. It was found that the *A. eutrophus* grown better than the *A. latus*. Thus, the *A. eutrophus* was further cultivated in different initial total sugar concentrations (20, 30, 40 and 50 gL^{-1}) under controlled condition (200 rpm, 30 °C, pH 6.5–7 and 10% inoculum size). The optimal total sugar concentration of 50 gL^{-1} was reached. The dry cell mass (DCM) and maximum PHAs were obtained at 6.013 gL^{-1} and 1.84 gL^{-1} after 60 hr fermentation converted to biomass yield ($Y_{X/S}$) and product yield ($Y_{P/S}$) of 0.163 and 0.050. While, specific product yield ($Y_{P/X}$) and productivity were 0.306 and 0.031 $\text{gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$. To increase the PHAs production, 5 L fermentor (2 L working volume) was considered using the optimal condition obtained from the flask scale under aerobic condition (30% dissolve oxygen). The DCM and the maximum PHAs were 5.881 gL^{-1} and 1.281 gL^{-1} calculated to values of $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$ and productivity at about 0.190, 0.041, 0.218 and 0.0213 $\text{gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively. However, potential of sugar cane juice as a sole carbon is still low. Further work will be focused on improvement of the efficiency for PHAs production. C:N ratios and percentages of dissolve oxygen will be concerned.

doi:10.1016/j.jbiotec.2010.09.071

2.5) International Journal

Waranya Suwannasing, Samart Mooamart, **Pakawadee Kaewkannetra** (2011) Yields of polyhydroxyalkanoates (PHAs) during batch fermentation of sugar cane juice by *Alcaligenes latus* and *Alcaligenes eutrophus*, Journal of Life Science, 5: 960-966.
Print ISSN: 1934-7391 Online ISSN: 1934-7405.



Yields of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) during Batch Fermentation of Sugar Cane Juice by *Alcaligenes latus* and *Alcaligenes eutrophus*

Waranya Suwannasing^{1,2}, Samart Moonamart³ and Pakawadee Kaewkannetra³

1. Department of Biotechnology, Graduate School of Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

2. Fermentation Research Center for Value Added Agricultural Products (FerVAAP), Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

3. Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Received: May 25, 2011 / Accepted: June 29, 2011 / Published: November 30, 2011.

Abstract: In this work, sugar cane juice was fermented to produce polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Alcaligenes latus* TISTR 1403 and *A. eutrophus* TISTR 1095. The juice was characterized and composed of total sugars 105.5 g·L⁻¹ (sucrose 36.6 g·L⁻¹, fructose 26.0 g·L⁻¹, glucose 21.8 g·L⁻¹ and other sugars 21.1 g·L⁻¹). Each inoculum (10%, v/v) was separately cultivated in the medium containing 20 g·L⁻¹ total sugars under condition (30°C, 200 rpm, pH 6.5-7). It was found that the *A. eutrophus* can be grown better than the *A. latus*. Only the *A. eutrophus* was further cultured under different total sugar concentrations (20, 30, 40 and 50 g·L⁻¹). The optimal contents of total sugar, dry cell mass (DCM) and maximum PHAs were obtained at 50 g·L⁻¹, 6.013 g·L⁻¹ and 1.84 g·L⁻¹, respectively after 60 h fermentation which were converted to biomass yield ($Y_{x/s}$), product yield ($Y_{p/s}$), specific product yield ($Y_{p/x}$) and productivity of 0.163, 0.05, 0.306 and 0.031 g·L⁻¹h⁻¹. Large scale of PHAs production was conducted in 5 L fermentor using the optimal condition obtained under 30% dissolved oxygen. The DCM and the maximum PHAs were 5.881 g·L⁻¹ and 1.281 g·L⁻¹ which were calculated to values of $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, $Y_{p/x}$ and productivity at 0.19, 0.04, 0.218 and 0.021 g·L⁻¹h⁻¹, respectively.

Key words: *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes eutrophus*, fermentation, PHAs, sugar cane juice.

1. Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable, biocompatible, and natural polymers. Typically, they can be produced intracellularly by various microorganisms mostly produced by bacteria as storage material for carbon and energy reserves under unbalanced growth condition such as nutrient limitation [1-5]. Naturally, properties of PHAs are similar to thermoplastic that was obtained from petrochemical industry such as polypropylene (PP) and polyethylene (PE). They also can be produced from

agricultural products such as sugar cane, sweet sorghum, molasses and even from palm oil mill effluent as carbon sources by various microorganisms mostly bacterial strains [4-6]. The composition of PHAs depends on the microorganism and nature of the carbon sources allowing the formulation of new polymers with different physicochemical properties as short or mid-chain and long-chain fatty acids. However, the most common forms founded in microorganism cells are polyhydroxybutyrate (PHB) and polyhydroxyvalerate (PHV). Commercially, production of PHAs costs 10 times more expensive than PE [7]. The important limitations factors in the production of PHAs are special growth condition required, the expensive raw materials such as the

Corresponding author: Pakawadee Kaewkannetra, Ph.D., assistant professor, research fields: biomass and bioenergy technology, biopolymer production, chemical engineering. E-mail: paknar@kku.ac.th.

**Yields of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) during Batch Fermentation of Sugar Cane Juice
by *Alcaligenes latus* and *Alcaligenes eutrophus***

961

producer microorganisms and substrate composition, cultures condition, fermentation processes (batch, fed-batch, repeated batch or fed-batch, and continuous modes) and the highest cost of their recovery [1, 8-10].

Alcaligenes eutrophus and *A. latus* are gram-negative bacteria which can be accumulated a large amount of PHAs inside their cells [1, 6, 11] and especially, *A. latus* is the most widely used strain for commercial production of PHAs [12]. It can be utilized many carbon sources [13]. Previous study has reported the optimization of PHB produced by *A. latus* which used sucrose as a carbon source and accumulated up to 63% of dry cell mass after 93 h under optimal condition [11]. Later, *A. latus* was studied to produce PHB by using maple sap which is rich in sucrose. The biomass and PHB concentration were obtained at 4.4 g·L⁻¹ and 3.41 g·L⁻¹ after 27 h of fermentation [14, 15]. It was proved that the bacteria can be utilized sucrose as a cheaper carbon source than glucose [11, 14-19].

Therefore, this study aims to study the potential use of sugar cane juice as a raw substrate by pure bacterial strains of *Alcaligenes latus* TISTR 1403 and *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 to produce PHAs via batch fermentation. In addition, the feasibility will be evaluated.

2. Materials and Methods

2.1 Microorganisms and Culture Condition

Pure bacterial strains of *Alcaligenes latus* TISTR 1403 and *A. eutrophus* TISTR 1095 were purchased from Thailand Institute of Science and Technology Research (TISTR) (Bangkok, Thailand). Then, they were maintained on agar slant and Petri dishes on nutrient medium [6]. The inoculums were prepared in nutrient broth under aerobic condition (30°C, 200 rpm and pH 6.5-7 for 24 h) prior to inoculate into sterile production medium.

2.2 Preparation of Sugar Cane Juice

Sugar cane juice was kindly received from sugar cane industry (Chaiphaphum, Thailand). The juice was

kept in refrigerator at -20 °C prior to use. The juice was thaw and centrifuged to remove other particulates. In addition, the juice was sterilized and then added into the culture medium.

2.3 Batch Fermentation in Flask Scale

Seed inoculums of 10% (v/v) were added into 250 mL flask containing 100 mL modified minimal medium 3 (the prepared method described by Grothe et al.) [11]. One liter of the medium contained: sucrose (20 g), KH₂PO₄ (1.5 g), Na₂HPO₄ (3.57 g), MgSO₄·7H₂O (0.2 g), (NH₄)₂SO₄ (1 g), and trace element solution (1 mL). It should be noted that the concentration of sucrose was replaced by sterilized sugar cane juice used as sole carbon source. The culture was further incubated for 72 hours at 30°C, 200 rpm and pH 6.5-7.0. In addition, the initial total sugar concentrations at 20, 30 40 and 50 g·L⁻¹ were also varied and the medium were collected every 6 h to monitor cell growth, dry cell mass, and total sugar concentration.

2.4 Batch Fermentation in Fermentor

Only, the culture of *A. eutrophus* was then inoculated into a 5-L fermentor with working volume of 2 L using optimal total sugar concentration obtained from the previous flask scale. Fermentation condition was controlled as following: 200 rpm, 2 vvm aeration rate, 30°C and pH 6.5-7.0. Dissolved oxygen (DO) concentration was monitored with a DO electrode during the whole cultivation and maintained at 30% constant of air saturation by adjusting the aeration rate and agitation rate speed in response to the change of oxygen requirement. In addition, the pH was also monitored with a pH electrode and kept at 6.5-7.0 by adding solutions of sulfuric acid (H₂SO₄) or sodium hydroxide (NaOH) if necessary.

2.5 Analytical Methods

2.5.1 Dry Cell Mass (DCM)

The DCM was determined by the absorbance

Yields of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) during Batch Fermentation of Sugar Cane Juice by *Alcaligenes latus* and *Alcaligenes eutrophus*

961

producer microorganisms and substrate composition, cultures condition, fermentation processes (batch, fed-batch, repeated batch or fed-batch, and continuous modes) and the highest cost of their recovery [1, 8-10].

Alcaligenes eutrophus and *A. latus* are gram-negative bacteria which can be accumulated a large amount of PHAs inside their cells [1, 6, 11] and especially, *A. latus* is the most widely used strain for commercial production of PHAs [12]. It can be utilized many carbon sources [13]. Previous study has reported the optimization of PHB produced by *A. latus* which used sucrose as a carbon source and accumulated up to 63% of dry cell mass after 93 h under optimal condition [11]. Later, *A. latus* was studied to produce PHB by using maple sap which is rich in sucrose. The biomass and PHB concentration were obtained at 4.4 g·L⁻¹ and 3.41 g·L⁻¹ after 27 h of fermentation [14, 15]. It was proved that the bacteria can be utilized sucrose as a cheaper carbon source than glucose [11, 14-19].

Therefore, this study aims to study the potential use of sugar cane juice as a raw substrate by pure bacterial strains of *Alcaligenes latus* TISTR 1403 and *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 to produce PHAs via batch fermentation. In addition, the feasibility will be evaluated.

2. Materials and Methods

2.1 Microorganisms and Culture Condition

Pure bacterial strains of *Alcaligenes latus* TISTR 1403 and *A. eutrophus* TISTR 1095 were purchased from Thailand Institute of Science and Technology Research (TISTR) (Bangkok, Thailand). Then, they were maintained on agar slant and Petri dishes on nutrient medium [6]. The inoculums were prepared in nutrient broth under aerobic condition (30°C, 200 rpm and pH 6.5-7 for 24 h) prior to inoculate into sterile production medium.

2.2 Preparation of Sugar Cane Juice

Sugar cane juice was kindly received from sugar cane industry (Chaiyaphum, Thailand). The juice was

kept in refrigerator at -20 °C prior to use. The juice was thaw and centrifuged to remove other particulates. In addition, the juice was sterilized and then added into the culture medium.

2.3 Batch Fermentation in Flask Scale

Seed inoculums of 10% (v/v) were added into 250 mL flask containing 100 mL modified minimal medium 3 (the prepared method described by Grothe et al.) [11]. One liter of the medium contained: sucrose (20 g), KH₂PO₄ (1.5 g), Na₂HPO₄ (3.57 g), MgSO₄·7H₂O (0.2 g), (NH₄)₂SO₄ (1 g), and trace element solution (1 mL). It should be noted that the concentration of sucrose was replaced by sterilized sugar cane juice used as sole carbon source. The culture was further incubated for 72 hours at 30°C, 200 rpm and pH 6.5-7.0. In addition, the initial total sugar concentrations at 20, 30 40 and 50 g·L⁻¹ were also varied and the medium were collected every 6 h to monitor cell growth, dry cell mass, and total sugar concentration.

2.4 Batch Fermentation in Fermentor

Only, the culture of *A. eutrophus* was then inoculated into a 5-L fermentor with working volume of 2 L using optimal total sugar concentration obtained from the previous flask scale. Fermentation condition was controlled as following: 200 rpm, 2 vvm aeration rate, 30°C and pH 6.5-7.0. Dissolved oxygen (DO) concentration was monitored with a DO electrode during the whole cultivation and maintained at 30% constant of air saturation by adjusting the aeration rate and agitation rate speed in response to the change of oxygen requirement. In addition, the pH was also monitored with a pH electrode and kept at 6.5-7.0 by adding solutions of sulfuric acid (H₂SO₄) or sodium hydroxide (NaOH) if necessary.

2.5 Analytical Methods

2.5.1 Dry Cell Mass (DCM)

The DCM was determined by the absorbance

962 Yields of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) during Batch Fermentation of Sugar Cane Juice by *Alcaligenes latus* and *Alcaligenes eutrophus*

method using a spectrophotometer at 600 nm. A 1-mL fermentation broth was centrifuged ($\times 10,000$ g, for 10 min) and the cell pellet then was washed for twice with distilled water. The cell was dried at 90°C until a constant DCM was obtained.

2.5.2 Total Sugar Concentration

Sugar cane juice was measured an initial concentration in term of total sugar using Phenol-Sulfuric method [19] and the juice was also characterized type of sugar contained by HPLC method. In addition, total soluble solid and pH value of the juice were measured by hand refractometer and pH meter.

2.5.3 PHAs Content

After fermentation, the biomass was recovered and enriched using sequencing steps of cell disruption, centrifugation, extraction and evaporation. Finally, PHAs powder was obtained. The powder was dissolved in a conc. sulphuric to determine PHAs content in form of polyhydroxybutyrate (PHB) by measuring the optical density at 235 nm [20].

3. Results and Discussion

3.1 Growth of *A. latus* and *A. eutrophus*

Two bacterial strains of *A. latus* and *A. eutrophus* were cultivated in modified minimal medium with 20 g·L⁻¹ initial total sugar concentration in form of the

sugar cane juice. Fig. 1 shows the time course of both biomass measured in term of optical density (OD) value. *A. eutrophus* can be obviously grown better than *A. latus* and reached a maximum biomass at 36 h. Previous study reported that *A. latus* can be grown in maple sap which was rich of sucrose [15]. However, in this study, the juice contained of sucrose and glucose in similar amount. It was believed that *A. latus* preferred to use glucose as a primary carbon source instead of sucrose. Then, only *A. eutrophus* was selected to produce PHAs in fermentor.

3.2 Characteristics of Sugar Cane Juice

The juice was measured for its composition. The characterizations of the juice are shown in Table 1.

3.3 Optimal Condition for PHAs Production in Flasks

Initial total sugar concentrations of sugar cane juice were varied at 20, 30, 40 and 50 g·L⁻¹ and considered the optimal culture condition Fig. 2 shows the accumulation of PHAs as functions of time. The optimal total sugar concentration of 50 g·L⁻¹ was obtained and gave maximum DCM and PHAs at 6.013 g·L⁻¹ and 1.84 g·L⁻¹ after 60 h. Fig. 3 reveals the time courses of the biomass, the PHA and residual total sugar. When the nitrogen source was exhausted

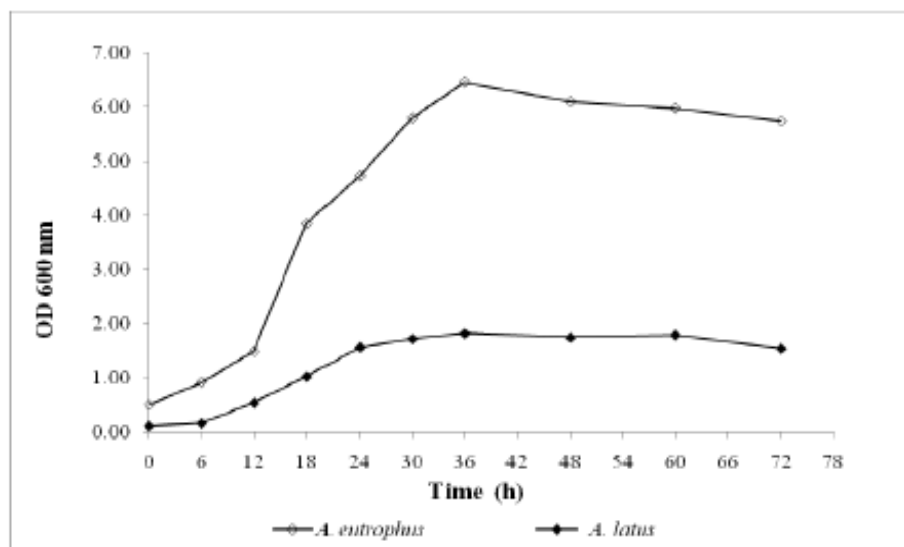


Fig. 1 Growth cultures of *A. latus* TISTR 1403 and *A. eutrophus* TISTR 1095 in modified minimal medium.

Yields of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) during Batch Fermentation of Sugar Cane Juice
by *Alcaligenes latus* and *Alcaligenes eutrophus*

961

Table 1 Properties of sugar cane juice (pH 3.4).

Properties	g·L ⁻¹
Total sugar	105.5
Sucrose	36.6
Glucose	21.8
Fructose	26.0
Others	21.1
Total soluble solid (Brix)	11.6

completely at $t = 60$ h, the PHAs were 1.848 g·L^{-1} and the DCM reached a maximum (6.013 g·L^{-1}). The batch fermentation system reached a steady state when $t = 72$ h. This implied that the start of PHAs accumulation coincides with the exhaustion of nitrogen. As total sugar was increased, the higher content of PHAs was reached. The results obtained were similar to previous studies [3, 6, 13, 21, 22]. However, the total sugar was

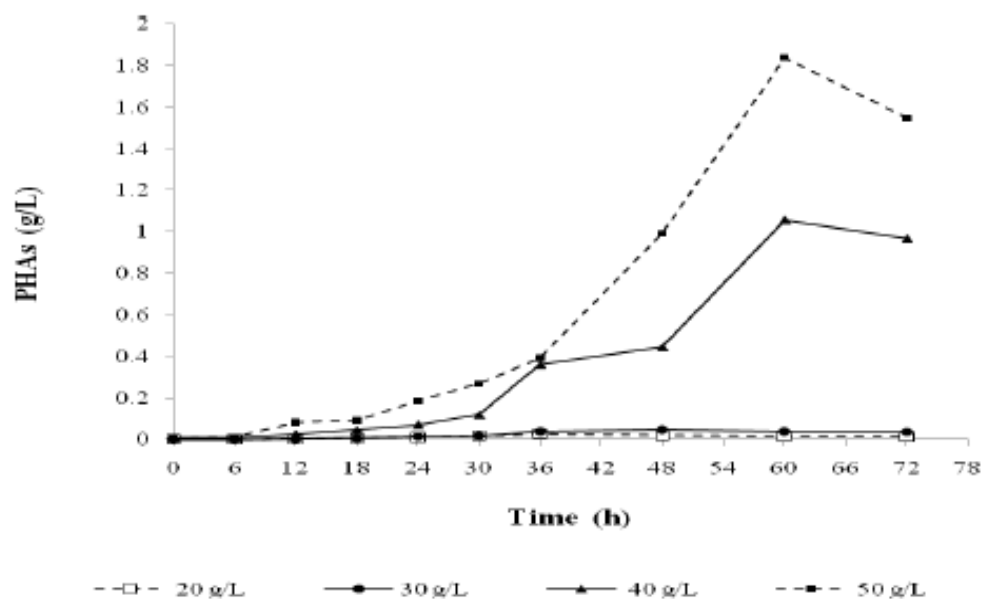


Fig. 2 PHAs content as function of time under variation of total sugar at 20, 30, 40 and 50 g·L^{-1} in shake flask.

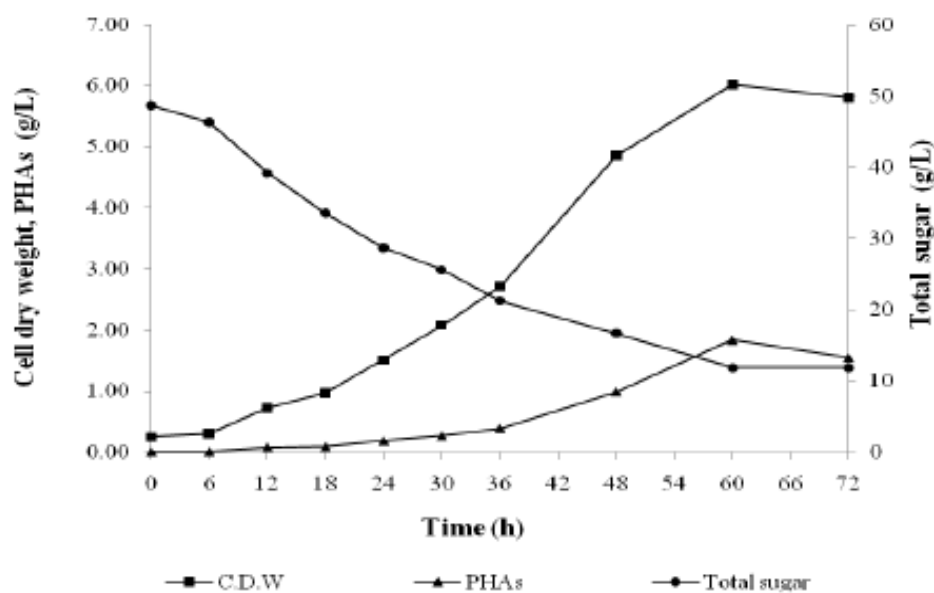


Fig. 3 Profiles of cell dry weight, PHAs and total sugar as functions of time in shake flask.

still remained. Since, it might be the heat during sterilization of the juice caused browning reaction and produced as other compounds and inhibited the growth of bacteria and accumulation of PHAs. In addition, all data were also calculated and represented in terms of biomass yield ($Y_{x/s}$), product yield ($Y_{p/s}$), specific product yield ($Y_{p/x}$) and productivity that were obtained at 0.163, 0.05, 0.306 and 0.031 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively. The optimal condition was obtained at 50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ total sugar, 30°C, 200 rpm and pH 6.5-7.0. The results are summarized in Table 2.

3.4 Production of PHAs in Fermentor

To increase the production of PHAs production, 5-L fermentor with 2-L working volume was considered using the optimal condition obtained from the flask scale. The DCM and the PHAs, and the residue sugar concentration as functions of time are shown in Fig. 4. The batch system reached a steady state with the DCM ($5.881 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and the maximum PHAs $1.281 \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1})$ at

$= 60 \text{ h}$ which were calculated to values of $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, $Y_{p/x}$ and productivity at about 0.190, 0.041, 0.218 and $0.0213 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively (Table 3). It seems that the system reached a steady state after 72 h. While the residue total sugar concentration was still remained at about $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, it seems that the sugar cane juice might contain other composition that was inhibited for the growth of microorganism, although these results were agreed with previous studies [3, 6, 13, 21, 22]. However, all of them used pure primary carbon sources such as glucose, sucrose and secondary carbon source such as propionate etc. On the other hand, in the present study, we have used mixed sugars naturally found in the sugar cane juice. An attempt has undertaken in another juice obtained from agricultural product of sweet sorghum [6]. However, the PHAs yield and their productivity were still low. This may implies that the time for fermentation, an efficient fermentation process and/or recombinant microbial strain needs to improve the production of PHAs.

Table 2 Biomass and PHAs production in different total sugar concentrations.

Total sugar concentrations ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Biomass ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	PHAs ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Biomass yield, $Y_{x/s}$	Product yield, $Y_{p/s}$	Specific product yield, $Y_{p/x}$	Productivity ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
20	1.8994	0.0273	0.1241	0.0018	0.0145	0.0008
30	2.1611	0.0480	0.1073	0.0024	0.0224	0.0010
40	3.9988	0.9681	0.1238	0.0230	0.1858	0.0134
50	6.0129	1.8377	0.1634	0.0499	0.3056	0.0306

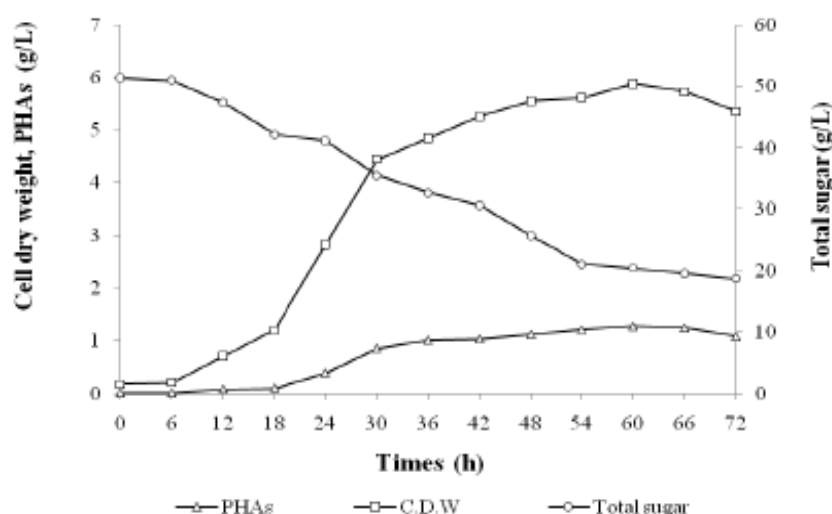


Fig. 4 Profiles of cell dry weight, PHAs, and total sugar as functions of time in fermentor.

Yields of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) during Batch Fermentation of Sugar Cane Juice by *Alcaligenes latus* and *Alcaligenes eutrophus*

965

Table 3 The production of PHAs in various carbon sources.

Parameters	Bacterial strains				
	<i>A. eutrophus</i>	<i>A. latus</i>	<i>A. eutrophus</i>	<i>A. eutrophus</i>	<i>A. eutrophus</i>
Carbon source	Glucose	Sucrose	Sweet sorghum juice	Sugar cane juice	Sugar cane juice
Culture time	50	28.45	48	60	60
Cell concentration (g·L ⁻¹)	164	143	13.40	5.88	6.01
PHB concentration, (g·L ⁻¹)	121	71.4	6.87	1.28	1.84
Biomass yield (Y _{x/h})	-	-	0.53	0.197	0.163
PHB yield (Y _{ph})	0.3	0.17	0.27	0.04	0.05
PHB/dry cell weight (%)	76	50	51.3	21.8	30.6
PHB productivity (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	2.42	2.5	0.143	0.021	0.031
References	[21]	[23]	[6]	Current study (fermentor)	Current study (flask)

4. Conclusions

The present study shows that *A. eutrophus* can be grown in the medium containing mixed sugars mostly with sucrose from sugarcane juice. The optimal 50 g·L⁻¹ total sugar concentration in the juice for PHAs production was obtained in both flask and fermentor and gave the maximum PHAs, Y_{x/s}, Y_{p/s} and Y_{p/x}. The results obtained clearly showed that agricultural based sugar raw material of sugar cane syrup has a potential use as a cheap carbon source for the production of PHAs in a large scale. For further, response surface methodology (RSM) will be completed for process optimization of the production PHAs via batch fermentation.

Acknowledgments

This work is mainly supported by co-funding of Khon Kaen University (FY 2010 for Samart Moonamart) and Thailand Research Fund (TRF) (FY 2010 Contract no. DBG 5380013 for Pakawadee Kaewkanetra). In addition, W. Suwannasing also would like to thank National Research Council of Thailand (NRCT), Fermentation Research Centre for valuable added agricultural product (FerVAAP) and Graduate School of Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand for postgraduate funds and abroad travel award.

References

- [1] A.J. Anderson, E.A. Dawes, Occurrence, metabolism,

metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxy-alkanoates, Microbiology Reserve 54 (1990) 450-472.

- [2] S.Y. Lee, Bacterial polyhydroxyalkanoates, Biotechnology Bioengineering 49 (1996) 1-14.
- [3] S.T. Yu, C.C. Lin, J.R. Too, PHBV production by *Ralstonia eutropha* in a continuous stirred tank reactor, Process Biochemistry 40 (2005) 2729-2734.
- [4] Z. Alias, I. Tan, Isolation of palm oil utilizing, polyhydroxyalkanoates (PHA)-bacteria by an enrichment technique, Bioresource Technology 96 (2005) 2729-2734.
- [5] T. Keshavarz, I. Roy, Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda, Current Opinion Microbiology 13 (2010) 321-326.
- [6] P. Kaewkanetra, P. Tanonkeo, V. Tanamool, T. Imai, Biorefinery of squeeze sweet sorghum juice into value added product of biopolymer, Journal of Biotechnology 136 (2008) S412.
- [7] C. Kasemsap, C. Wantawin, Batch production of polyhydroxyalkanoate by low-polyphosphate-content activated sludge at varying pH, Bioresource Technology 98 (2007) 1020-1027.
- [8] A.G. Ostle, J.G. Holt, Nile blue as stain for poly-β-hydroxybutyrate, Apply Environment Microbiology 44 (1982) 238-241.
- [9] C.S. Ha, W.J. Cho, Miscibility, properties, and biodegradability of microbial polyester containing blends, Progress Polymer Science 27 (2002) 759-809.
- [10] J.M. Luengo, B. García, G. Sandoval, G. Naharro, E.R. Olivera, Bioplastics from microorganisms. Current Opinion Microbiology 6 (2003) 251-260.
- [11] E. Grothe, M. Moo-Young, Y. Chisti, Fermentation optimization for the production of poly (β-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic, Enzyme Microbiology Technology 25 (1999) 132-141.
- [12] T. Tsuge, M. Shimoda, A. Ishizaki, Optimization of L-lactic acid feeding for the production of poly-D-3-hydroxy-butyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in fed-batch culture, Journal of Bioscience Bioengineering

966 Yields of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) during Batch Fermentation of Sugar Cane Juice by *Alcaligenes latus* and *Alcaligenes eutrophus*

- 8 (1999) 404-409.
- [13] T. Yamane, Yield of poly-D-(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study, *Biotechnology Bioengineering* 41 (1996) 165-170.
- [14] M.F. Morselli, M.L. Whalen, Maple chemistry and quality, in: M.R. Koelling, R.B. Heiligmann (Eds.), *North American Maple Syrup Producers Manual*, The Ohio State University, Columbus, 1996, pp. 162-171.
- [15] A. Yezza, A. Halasz, W. Levadoux, J. Hawari, Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap, *Appl Microbiol Biotechnol* 77 (2007) 269-274.
- [16] R.G.E. Murray, R.D. Doetsch, C.F. Robinow, Determinative and cytological light microscopy, in *Manual of Methods for General Bacteriology*, ASM, Washington DC, Vol. 10, 1994, pp. 21-41.
- [17] K. Mizuno, A. Ohta, M. Hyakutake, Y. Ichinomiya, T. Tsuge, Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4, *Polymer Degradation Stabilization* 95 (2010) 1335-1339.
- [18] R.M. Atlas, *Handbook of Microbiological Media*, 3rd ed., CRC Press, 2006, p. 2051.
- [19] M. Mecozzi, Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol-sulphuric acid method assisted by multivariate calibration, *Chemo-static Intelligent Laboratory System* 79 (2005) 84-90.
- [20] J.H. Law, R.A. Slepecky, Assay of poly-β-hydroxybutyric acid, *Bacteriology* 82 (1961) 33-36.
- [21] B.S. Kim, S.C. Lee, S.Y. Lee, H.N. Chang, Y.K. Chang, S.I. Woo, Production of polyhydroxybutyrate by fed batch with glucose concentration control in *Ralstonia eutropha*, *Biotechnology Bioengineering* 42 (1994) 892-898.
- [22] H. Shi, M. Shiraishi, K. Shimizu, Metabolic flux analysis for biosynthesis of poly (β-hydroxybutyric acid) in *Alcaligenes eutrophus* from various carbon sources, *Journal of Fermentation Bioengineering* 84 (1997) 579-587.
- [23] Y. Yamane, M. Fukunaga, Y.W. Lee, Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associate PHB producer, *Biotechnology Bioengineering* 50 (1996) 197-202.

2.6) International Journal

Varavut Tanamool, Tsuyoshi Imai, Paiboon Danvirutai, **Pakawadee Kaewkannetra** (2011). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *hydrogenophaga* sp. isolated from soil environment during batch fermentation. Journal of Life Science, 5, 2011: 1003-1012. Print ISSN: 1934-7391 Online ISSN: 1934-7405.



Journal of Life Sciences 5 (2011) 1003-1012

Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Hydrogenophaga* sp. Isolated from Soil Environment during Batch Fermentation

Vararat Tanamool¹, Tsuyoshi Imai², Paiboon Damrongsri¹ and Pakwadee Jaruwatnamsri³

¹ Department of Biotechnology, Graduate School of Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Division of Environmental Science and Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Yamaguchi University, Tokurumi, Ube, Yamaguchi 755-8611, Japan

³ Fermentation Research Center for Value Added Agricultural Products (FerVACP), Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁴ Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Received: May 25, 2011 / Accepted: July 06, 2011 / Published: December 30, 2011

Abstract: In this work, microorganisms utilizing microbes from soil were screened to evaluate their ability for accumulation of biopolymer of polyhydroxyalkanoate (PHA). Among 72 isolates were transferred to minimal salt medium (MSM), 33 strains can be grown on minimal agar medium. However, only one strain showed a strong black color for Sudan Black and gave positive result for Mito blue. A identification by 16S rDNA nucleotide sequence homology of the isolate showed very closely to *Hydrogenophaga* sp. (99% identity). To consider PHA production, the isolate was grown in the medium containing sucrose as a sole carbon under controlled conditions of 35 °C and pH 7. Maximum dry cell weight (DCW) and PHA production were obtained at 3.6 g/L and 2.4 g/L after 36 and 42 h batch fermentation. Sucrose uptake measured in term of total organic carbon (TOC) showed at 14.73 g within 48 h. The highest PHA was 0.13% (gwt/gwt) giving maximum PHA yield (Y_{ph}) of 0.17 (gwt/gwt) and productivity of 0.037 gwt/L/h. This highlights the potential of microbial resources in soil environment and may be an applicable application for the industrial production of PHA.

Key words: Polyhydroxyalkanoate (PHA), sucrose, fermenting, *Hydrogenophaga* sp.

1. Introduction

Synthesized plastic from petroleum industry has been widely used in daily. Because of non-degradable and accumulating for long time in environment, it causes the problem of air pollution, solid waste disposal and even global warming when it is destroyed by burning and the increasing demands of polymeric materials for our use. In addition, reserves of petroleum stock are limited and running out. The price of petroleum products are also increasing. Due to these

results, many researchers have paid attention to investigating other materials to replace for synthesized plastic.

Polyhydroxyalkanoate (PHA), a main kinds of biodegradable plastic and classified as polyester, was the first biopolymer discovered in *Bacillus pasteurianus* and characterized in 1925 by the French microbiologist [1]. The polyester may contain proportions of 3-hydroxyacids [2]. The general formulae of the monomer unit is $[-O-CH(R)-CH_2-CO-]$. According to the size of the alkyl substituent (R) mechanical properties of PHA differ [3]. Typically, PHAs can be divided into three groups by number of carbon atoms in their side chain-short chain length (sc) PHAs are

Corresponding author: Pakwadee Jaruwatnamsri, Ph.D., assistant professor, research fields: biomass and biorenew technology, biopolymer production and chemical engineering. E-mail: pakwadee@kku.ac.th

1004

Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Hydrogenophaga* sp. Isolated from Soil Environment during Batch Fermentation

composed of 3-5 carbon atoms, while medium chain length (*med*) PHAs consisted 6-15 carbon atoms and long chain length (*lef*) comprised 15 and above carbon atoms [4-6]. The structure of PHAs depends on carbon sources supplying and microbial types. The majority of biosynthesis of PHAs is performed using various microorganisms mostly bacteria. They can be produced PHAs from a number of substrates and accumulated in their cell as carbon source and energy reserve [5]. In addition, depending on PHAs accumulation behavior, microorganisms can be categorized into two groups. The first group requires the limitation of some nutrient such as nitrogen or phosphate. The member of this group belong *Cupriavidus necator* (formerly from *Ralstonia eutropha*) and *Pseudomonas oleovorans* etc. Secondly, they do not depend on nutritional limitation and they also can be accumulated PHAs during their growth such as *Alcaligenes latus* [7], *Azotobacter vinelandii*, *P. putida*, *P. aeruginosa* [8], *Bacillus mycoides* [9] and recombinant *Escherichia coli*. However, Wang and Lee in 1998 [10] reported that PHAs in term of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) can be produced with high productivity and high polymer content by *A. latus* via fed-batch fermentation.

Although, PHAs are interested and widely studied by many researcher for a long time but the PHAs production are limited by their production cost. A major problem to the commercialization of PHAs is their much higher production cost compared with petrochemical-based synthetic plastic materials or other biodegradable polymers [11]. Much attempt has been devoted to reduce the cost of PHA by the isolation of better bacterial strains to produce PHAs from a cheap carbon source such as sweet sorghum [12]. These bacteria can be isolated from various sources such as water and soil environments using a simple method that can monitor the accumulation of PHAs. For example the conditions for bacterial PHB production can be met in soil, due to its heterogeneous nature. Nitrogen availability in soil varies with microsites. It may become a limiting factor for

bacterial growth, especially in some nitrogen-poor (carbon-rich) sites [13]. According to these results, some PHA-producing strains such as *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, and *Acinetobacter* can be isolated from soil environments.

There are various simple methods for detecting intracellular PHA granules which are applied to the screening of PHA producers such as Sudan Black staining and Nile blue A staining [14] and etc. The positive result showed as a black color or fluorescent granules under microscope. Although they are feasible and easy methods, however they would take a rather time-consuming and labor intensive work to screen a large numbers of environmental isolates. Alternative staining methods have recently been developed for directly staining colonies or growing bacteria on plates containing Nile blue A or Nile red [15]. The dye can be directly diffused to microbial cytoplasm and resulting in fluorescent colonies that can be observed by UV illumination without the step of microscopic observation. Therefore, it would be stated that the colony-staining is a suitable method for screening large numbers of microbial strains.

Thailand is an agro-industry country, fruitful with very cheap sugar and starch based agricultural raw materials and it locates in the tropical area, thus there are accepted that, this area has appropriate environments and temperature for expansion of microorganisms. This study aims to isolate sucrose utilizing bacteria from agricultural crop plantation soil for production of PHAs via batch fermentation.

2. Material and Methods

2.1 Collection, Cultivation and Isolation of Soil Microbes

Soil samples were collected from sugarcane plantation area in the North-eastern of Thailand. The samples then were preserved at 4°C prior to use. Primary isolation of soil microbes was investigated by ten-fold serial dilution technique. A gram of soil

**Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Hydrogenophaga* sp.
Isolated from Soil Environment during Batch Fermentation**

1005

sample was transferred to sterile nutrient broth (NB) and incubated at 30°C for 24 h. Then, the culture was diluted in 0.9% normal saline with different dilutions (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7}) and spread on sterile nutrient agar (NA). The plates were incubated at 30°C for 24 h. Finally, the several single colonies of soil bacteria were picked and transferred to mineral salt agar. Screening for the soil bacteria PHA producers were carried out in mineral salt agar containing with 10 g/L sucrose as a sole carbon source. The culture flasks were incubated at 30°C for 48 h. The PHAs producing capabilities of the microbes were confirmed using 0.3% Sudan Black B (w/v) in 70% alcohol (v/v) and Nile blue staining methods as described by Wang et al. [12, 13]. The viable colonies were directly observed under ultraviolet light (312 nm) and exposing fluorescence to detect the accumulation of lipid compounds including PHAs [13].

2.2 Identification of PHA-Producing Microbes

Pure isolates containing lipophilic inclusions were observed by microscopic technique. Their morphology and biochemical characters of the microbe were observed. The PHA-producing strains were identified by sequencing partial sequences of their 16S rDNA. The chromosomal DNA of the pure isolates was isolated by routine methods as previously described by Slater et al. [16] and Chien et al [17], and used for further identification. The partial sequencing of their 16S rDNA was amplified with bacterial universal primers PA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and PH (5'-AAGGAG GTGATCCAG CCGCA-3') [18] and generated the product length of 1,519 bps. The PCR product was then subjected to ABI PRISM310 (PE Biosystems) according to manufacturer's instruction. The nucleotide sequences of partial 16S rDNA were compared with the 16S rDNA sequences available in the public nucleotide databases at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA, by using their World Wide Web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), and the BLAST (Basic

Local Alignment Search Tool) algorithm program and then deposited in the database under accession numbers AB3000163.

2.3 Batch Fermentation of PHA in Shake Flasks

The selected strain was maintained in nutrient broth and incubated in orbital shaking at 200 rpm, 35°C for 24 h prior use. Then, the 5% (v/v) inoculum of the pre-culture was used to inoculate in 250 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL sterilized mineral salt medium consist of (g/L): 20 g Sucrose, 1.5 g KH_2PO_4 , 3.57 g Na_2HPO_4 , 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g and 1 mL trace element solution prepared following the method described by Grothe et al. [19]. The results obtained after fermentation were reported in terms of percentage on dry cell weight: DCW (% w/w), PHA productivity (g/L-h), PHA yield (Y_{ph}) and biomass yield (Y_{xb}).

2.4 Sucrose Uptake

Sucrose uptake informs sucrose in culture medium was monitored in terms of Total organic carbon (TOC) using TOC analyzer (TOC-5000, Shimadzu Corporation, Japan, with ASI-5000 auto injector).

2.5 Biomass Measurement

Biomass concentration was measured off-line by optical density (OD) at 660 nm (1 OD 660 nm = 0.308 g of dry cell weight, DCW) on a Shimadzu UV-Visible spectrophotometer. Calculation has been made by plotting a calibration curve between the DCW and OD values.

2.6 Biomass Recovery, Extraction and Determination of PHA

After fermentation, biomass was collected by centrifugation ($\sim 8,000$, 10 min). Then, supernatant was discarded; the pellet was washed for twice with distilled water and dried in hot air oven at 60°C until constant weight. Intracellular PHA in biomass was measured using a modified method [4]. In brief, a

commercial bleach of sodium hypochlorite (NaClO , contained 6% active chlorine) was added to the wet biomass pellet and was mixed vigorously using vortex mixer. Then, the mixture was incubated at 37°C for 1 h until non-PHA biomass dissolved and white flocculants lipid was precipitated. Hereafter, the PHA recovery was conducted. The mixture was re-centrifuged and washed with distilled water twice to remove the bleach solution which was contained of dissolved cell debris. The cells were washed with acetone for twice to remove a low-molecular-weight lipid [5]. The white cell pellet was re-suspended with ethanol solution and then was re-centrifuged. The obtained white pellet was dried in hot air oven at 60°C until reached a constant weight. All measurements were weighed in triplication. It should be noted that in a large proportion of PHAs was extracted in Soxhlet apparatus and extraction with an excess of chloroform at 100°C for 3 h. The mixture was filtered to remove cell debris and precipitates in cold methanol or casted onto cleaning glass Petri disk. The PHA product was dried in hot air oven at 60°C over night. The PHA was characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) analysis to confirm the structure of PHA meanwhile thermal properties were measured by differential scanning calorimetry (DSC) and thermal degradation of PHA using thermal gravimetric analysis (TGA).

2.7 Thermal Properties of Extracted PHA

The extracted PHA was analyzed in both differential scanning calorimetry (DSC) and thermal gravimetric analysis (TGA) compared to the standard of biopolymer in term of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) (Sigma-Aldrich, USA). It was also remarked that the PHB is mostly found in PHAs. The DSC was performed using 10 mg samples under N_2 atmosphere, using the following temperature program: heating temp (-20 to 200°C) ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$), cooling temp (200 to 20°C) ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) and a second heating (-20 to 200°C) ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) [20]. The phase transition temperatures were reported as glass transition temperature (T_g) and melting temperature (T_m). Thermal gravimetric

analysis (TGA) was performed using a TGA instrument (Mettler-Toledo, TGA/SDTA 851, USA) calibrated with indium. The temperature was ramped at a heating rate of $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ under nitrogen, to a temperature well above the degradation temperature of the polymers [21].

3. Results and Discussion

3.1 Isolation of Soil Microbes and PHAs Observation

Accumulation of PHA granules in the microbial cells was preliminary analyzed by Sudan black method. Among 72 isolates, 33 isolates can be grown on sucrose agar medium and were further observed PHA accumulated in their cells under microscopic technique. In this case the pure bacterial strain of *Alicyclobacillus* *autrophus* TISTR 1095 has been used as a reference positive strain for PHAs accumulation. In Fig. 1, the results revealed that, only 3 isolated strains coded as the strains V22, V29 and V33 showed positive results after staining by Sudan black B and small black color represented PHAs granules in microbial cell. The isolate strain V33 clearly showed in strong black color than others. Hence, only the strain V33 was further used. Then, the PHAs producing microbes was confirmed by staining method using Nile blue A. The results are shown in Fig. 2, when the $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ Nile blue A was directly added into mineral salt medium and incubated for 3 day. The culture plate contained of the isolated V33 and two reference strains (PHA-positive strain of *A. autrophus* TISTR 1095 and PHA-negative strain of *E. coli*) were observed PHA intact in bacterial colony under UV light at 312 nm. Colonies from the portion plate of *A. autrophus* TISTR 1095 and the isolate V33 clearly exhibited a very strong fluorescence caused by the presence of the PHAs in their cell which can be blinded by Nile blue A. In addition, the isolate V33 was defined as Gram negative bacteria having rod-shaped cell and yellow pigment (see Fig. 2 right). This observation is on agreement with previous studies; Orde and Holt, 1982 [14] reported that Nile blue A could diffuse to only PHA

Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Hydrogenophaga* sp. Isolated from Soil Environment during Batch Fermentation

1007



Fig. 1 Micrographs of bacteria containing PHA inclusions.

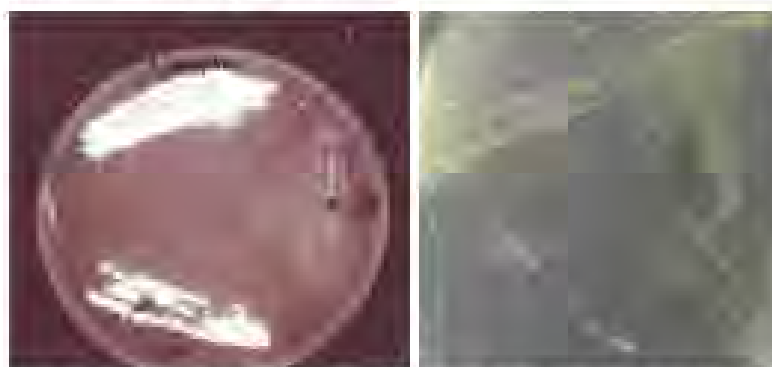


Fig. 2 (Left) *A. aerophila*, the strain V33 33 and *E. coli*; (right) a yellow bright colony of the isolate V33.

granules while other inclusion bodies (such as glycogen and polyphosphate) do not stained with this dye. However, under the same agar plate, *E. coli* showed in a weak for fluorescence light because this microorganism, which originally had no PHA accumulation capability [22].

3.2 Identification of the Isolated Strain

The isolated V33 was identified using the sequences of partial 16S rDNA technique and compared to those available in the public databases. It was found that it was closely related to those bacterial strain of *Hydrogenophaga* sp. (99% identify). The phylogeny based on these partial 16S rDNA sequences and related *Hydrogenophaga* sp. is shown in Fig. 3. Previous studies have reported that *Hydrogenophaga* sp. was isolated from soil, sand, and water by enrichment for

hydrogen bacteria. The strain was gram-negative, rod-shaped cell and yellow pigmented H_2 -oxidizing bacteria [23]. They can grow and produce PHAs from various substrates such as glucose, galactose, xylose, arabinose [24] whey lactose [25], fructose [26] and recently in sucrose.

3.3 Batch Fermentation of Sucrose Medium

The *Hydrogenophaga* sp. was cultured in sucrose medium and its growth was monitored. In Fig. 4, it was found that the exponential phase appeared after 6 h until 36 h then the cell reached to stationary phase. The PHA were produced and accumulated in its granules after 30 h and maximum PHA production was obtained at 2.41 g/L within 42 h of batch fermentation. However, PHA concentration was decreased after 48 h because this strain had an intracellular depolymerase enzyme

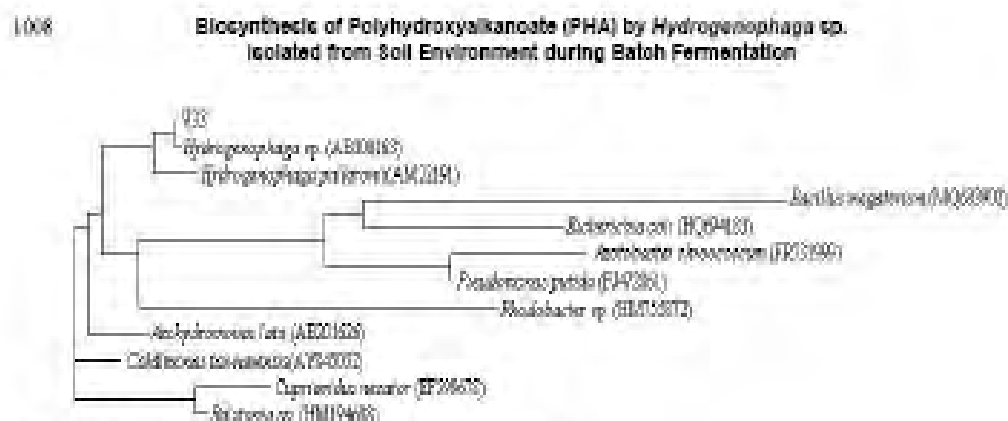


Fig. 3 Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence the isolate V33.

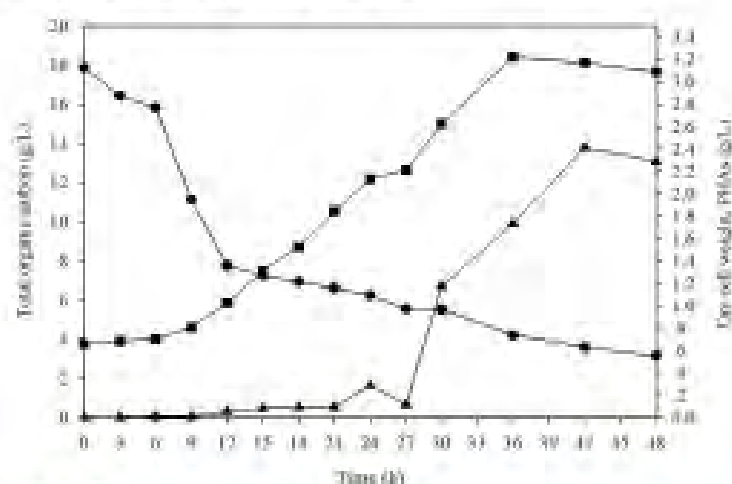


Fig. 4 Profile of TOC, DCW and PHA as functions of time during batch fermentation.

(○) Total organic carbon (TOC), (●) Dry cell weight (DCW), (■) PHA.



Fig. 5 PHA inclusions in *Hydrogenophaga* sp. cell after staining with Sudan black B under different culture times.

a: Log phase, 24 h; b: Stationary phase, 36 h; c: Stationary phase, 42 h.

and can be utilized PHA for its growth [27]. According to the results obtained, we could observe PHA accumulated by the *Hydrogenophaga* sp. by using Sudan black B staining during different fermentation times (see Fig. 5). The results indicated that, PHA was accumulated during mid-log phase (30 h) to stationary

phase (48 h) due to carbon and nitrogen appeared to imbalance condition in fermentation media. However, microbial cell containing PHA showed a strong black color at 42 h of fermentation. In case of the sucrose uptake in culture medium showed at 14.73 g within 48 h. The highest PHA inclusions in microbial cell was

Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Hydrogenophaga* sp. Isolated from Soil Environment during Batch Fermentation

1000

68.13% (g_{PHA}/g_{DHW}) giving a maximum PHA yield (Y_{PHU}) of 0.17 ($g_{PHA}/g_{substrate}$) and a volumetric productivity for PHA amounted to 0.037 $g_{PHA}/L \cdot h$.

3.4 Characterization of PHA

One gram of PHA produced from *Hydrogenophaga* sp. was extracted by hot chloroform and then was coated on clean Petri disk and oven-dried in circulating air at 30°C for 2 h [28] and finally a thin PHA film was obtained and illustrated in Fig. 6. The PHA film was further characterized using 1H -NMR and ^{13}C -NMR techniques. The spectrum of 1H -NMR obtained was as shown in Fig. 7a. Three groups of signals peak at 1.21, 2.52 and 3.23 ppm were found and corresponding to CH_3 , CH_2 and CH , respectively. Meanwhile, the ^{13}C -NMR of PHA showed the chemical shifts of 19.72 (CH_3), 40.73 (CH_2), 67.58 (CH), and 168.10 (CO), respectively (see Fig. 7b). The results obtained in both techniques are in good agreement with previous works [27-29] and identified the PHA extracted from *Hydrogenophaga* sp. as polyhydroxybutyrate (PHB) or polyhydroxybutyric acid.

For the DSC and TGA results of the T_m (173.31°C) and the enthalpy of PHA fusion (87.73 J/g) are shown in Fig. 8. They showed in similarity matched with the data obtained both from standard PHB (176.29°C and 86.49 J/g) and from other works [7, 28]. All data were summarized in Table 1. However, it seems that the T_m

of PHA was slightly lower than the value from the standard PHB. It may improve a wider PHA processing window and make the process become easier. In case of the T_g values, they were closely matched between the standard PHB and the PHA. High melting enthalpy was obtained from both cases. This can be explained that because of a high crystalline structure calculated to be 59.24% and 60.08% found in the standard PHB and PHA. Properties of a high T_m and a high crystalline nature indicate in a high degree of



Fig. 6 A pressed-film PHA obtained from *Hydrogenophaga* sp.

Table 1 Summarized data from differential scanning calorimeter (DSC) analysis of PHA samples.

Sample	T_g , °C	T_m , °C	ΔH , J/g	Crystallinity, %
Standard PHB	2.81	176.29	86.49	59.24
PHA*	2.42	173.31	87.73	60.08

* PHA from *Hydrogenophaga* sp.



Fig. 7 a: 1H -NMR spectrum; b: ^{13}C -NMR spectrum of the extracted PHA.

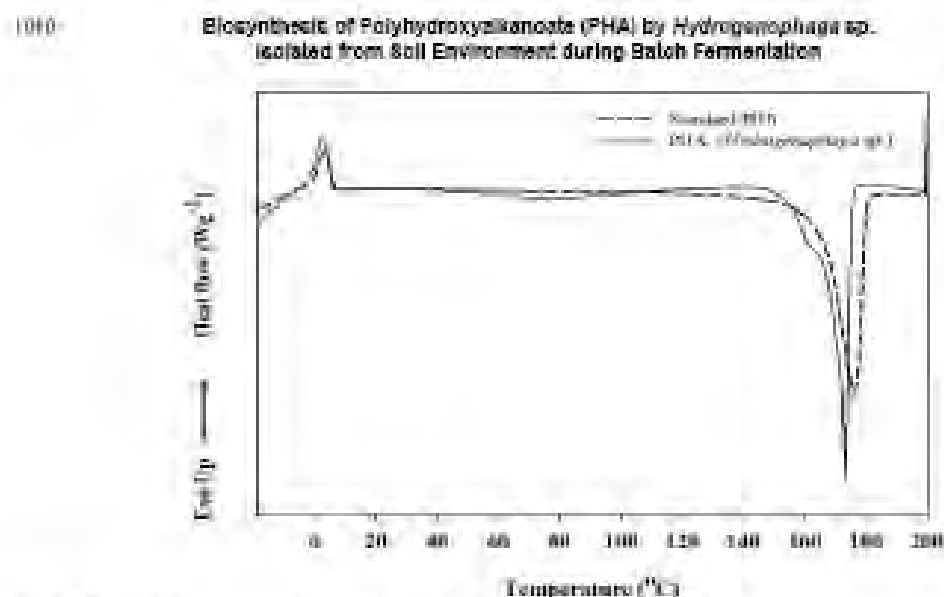


Fig. 8 The DSC thermogram of the standard PHE and PHA from *Hydrogenophaga* sp..

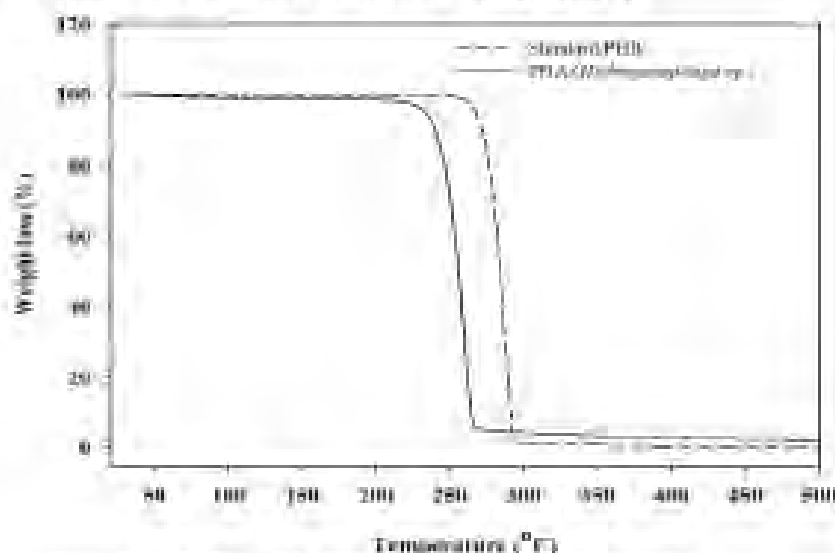


Fig. 9 Thermogravimetric analysis of the standard PHE and PHA from *Hydrogenophaga* sp..

polymerization. Hence, the PHE could be suitable for commercial utilization [11, 29-30]. For thermogravimetric analyses of the PHA produced by *Hydrogenophaga* sp. compared to the standard PHE are shown in Fig. 9. The PHA gave a rapid thermal degradation between 210 and 280°C while the standard PHE represented at between 255 and 293°C. It is indicated that biopolymeric material obtained can possibly be further used in a large scale processing of bioplastic [11].

4. Conclusions

An isolated soil bacteria and then identified as *Hydrogenophaga* sp showed successfully for utilizing several refined sugar especially sucrose. It has proven in its potential to produce PHAs in a high content (68.13% w/w) when sucrose medium was used as a sole carbon source and giving maximum PHA yield (Y_{PHA}) of 0.17 (g_{PHA}/g_{sucrose}) and a productivity of 0.057 g_{PHA}/L.h. Further study will be fulfilled on the possibility

Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Hydrogenophaga* sp. Isolated from Soil Environment during Batch Fermentation

1081

of *Hydrogenophaga* sp. to use directly mixed sugars obtained from agricultural crops such as sugar cane and sweet sorghum as sole carbon sources for production of PHAs by using media optimization technique via other fermentations of fed-batch, repeated batch, and repeated fed batch processes.

Acknowledgments

The authors would like to gratefully acknowledge Khon Kaen University and Thailand Research Fund (TRF) for matching fund (Contract no. DBG5380013 for P. Kaswamnetra) and JSPS-NRCT under Asian Core Program (ACP) for scientist exchange and collaborative research. In addition, V. Tananool also would like to thanks, National Research Council of Thailand (NRCT), Fermentation Research Center for Value Added Agricultural Products (FerVAAP), Faculty of Technology, Khon Kaen University and Graduate School of Khon Kaen University, Thailand, for the innovation potential research for high social impact scholarship, facilities and travel bursary.

References

- [1] M. Lemoigne, Products of dehydration and polymerization of the acid-oxylbutyric, Bulletin Society Chemistry Biology 8 (1926).
- [2] G. Brunegg, G. Lefebvre, K.L. Gossel, Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects, Journal Biotechnology 65 (1998) 127-161.
- [3] I. Vocman, L. Tighzert, Review: Biodegradation polymer, Materials 2 (2) (2009) 307-344.
- [4] K.M. Lee, D.F. Gilmore, Formulation and process modeling of biopolymer (polyhydroxyalkanoates: PHAs) production from industrial wastes by novel crossed experimental design, Process Biochemistry 40 (2005) 226-249.
- [5] A.J. Anderson, E.A. Dawes, Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, Microbiology Research 54 (1990) 450-472.
- [6] A. Steinbüchel, H.E. Valentin, Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids, FEMS Microbiology Letter 128 (1995) 219-228.
- [7] A. Yezza, A. Halaiz, W. Levedoux, J. Hawari, Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes* later

- from maple sap, Apply Microbiology Biotechnology 77 (2007) 269-274.
- [8] D. Fernandez, E. Rodriguez, M. Banaa, M. Vinas, Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Parasporomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions, Biochemistry Engineering Journal 26 (2005) 159-167.
- [9] P. Thakur, B. Borah, S. Baruah, J. Nigam, Growth-associated production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus mycoides*, Folia Microbiology 46 (2001) 488-494.
- [10] F. Wang, S.Y. Lee, Poly (3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes* later under nitrogen limitation, Apply Environment Microbiology 63 (1997) 3703-3706.
- [11] J.M. Luengo, B. Garcia, A. Sandoval, G. Naharro, E.R. Olivera, Bioplastics from microorganisms, Current Opinion Microbiology 6 (2003) 251-260.
- [12] P. Kaswamnetra, P. Tanonkeo, V. Tananool, T. Imai, Biorefinery of squeeze sweet sorghum juice into value added product of biopolymer, Journal of Biotechnology 136 (2008) 8412.
- [13] J.G. Wang, L.R. Bakken, Screening of soil bacteria for poly-β-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation, Microbiology Ecology 35 (1998) 94-100.
- [14] A. Ostle, J.G. Holt, Nile blue A as a fluorescent stain for poly-β-hydroxybutyrate, Apply Environment Microbiology 44 (1982) 238-241.
- [15] P. Spöckermann, B.H. Rehm, R. Kalschauer, D. Baumeister, A. Steinbüchel, A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds, Archaeology Microbiology 171 (1999) 73-80.
- [16] S.C. Slater, W.H. Voigt, D.E. Demnis, Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes* eutrophus H16 poly-3-hydroxybutyrate biosynthetic pathway, Bacteriology 170 (1988) 4431-4436.
- [17] C.C. Chien, C.C. Chen, M.H. Chai, S.S. Kung, Y.H. Wei, Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment, Journal Biotechnology 132 (2007) 259-263.
- [18] U. Edwards, T. Rogall, H. Bocker, M. Emde, E. Böttger, Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: Characterization of a gene coding for 16S ribosomal DNA, Nucleic Acids Research 17 (1989) 7843-7853.
- [19] E. Groth, M. Moo-Young, Y. Chisti, Fermentation optimization for the production of (poly-β-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic, Enzyme Microbiology Technology 25 (1999) 132-141.

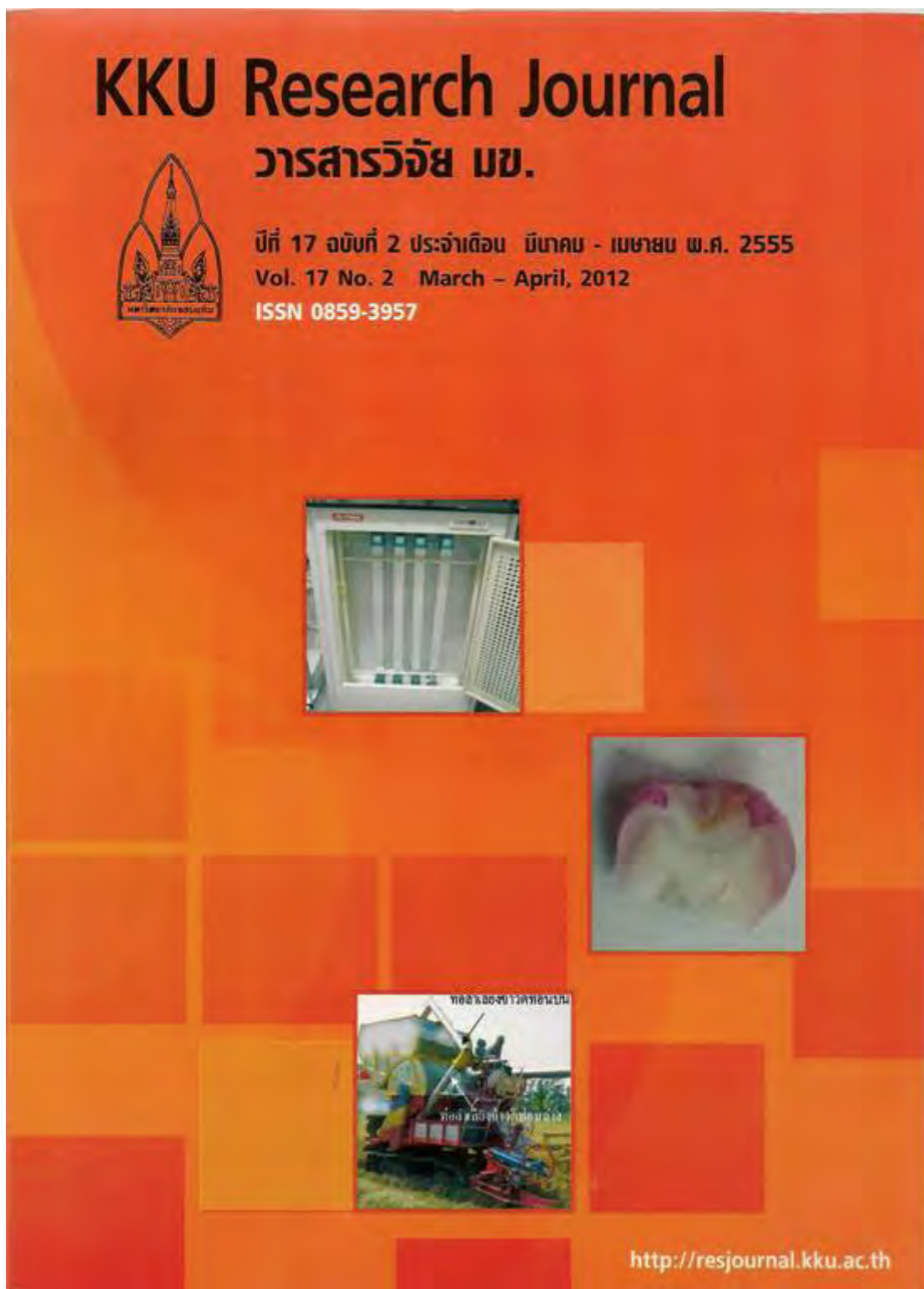
1012

Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Hydrogenophaga* sp. Isolated from Soil Environment during Batch Fermentation

- [20] S. Xu, R. Luo, L. Wu, K. Xu, G.O. Chen, Blending and characterizations of microbial poly (3-hydroxybutyrate) with dendrimers, *Journal Apply Polymer Science* 102 (2006) 3782-3790.
- [21] S. Modi, K. Koelling, Y. Vodovotz, Assessment of PHB with varying hydroxyvalerate content for potential packaging applications, *European Polymer Journal* 47 (2011) 179-186.
- [22] M. Miyake, C. Miyamoto, J. Schnackenberg, R. Kurano, Y. Asada, Phosphotransacetylase as a key factor in biological production of polyhydroxybutyrate, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86 (2000), 1039-1044.
- [23] A. Willem, J. Bruza, M. Goor, B. Pot, E. Fahn, E. Janssen, et al., *Hydrogenophaga*, a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov. (formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava* and *Pseudomonas carboxydiflava*), and *Hydrogenophaga tarentinensis* (formerly *Pseudomonas tarentinensis*), *System Bacteriology* 39 (1989) 319-333.
- [24] M.H. Choi, J.I. Soag, S.C. Yoon, Biosynthesis of copolyester by *Hydrogenophaga pseudoflava* from various lactones, *Canadian Journal Microbiology* 41 (1995) 60-67.
- [25] M. Koller, R. Bora, E. Chieffini, E.G. Fernandes, P. Horvat, C. Kutschera, et al., Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*, *Bioresource Technology* 99 (2008) 4834-4863.
- [26] M. Mahmoudi, M. Sharifzadeh-Basi, G.D. Najafpour, F. Taherdah, H. Ehsanideh, Kinetic model for polyhydroxy butyrate (PHB) production by *Hydrogenophaga pseudoflava* and verification of growth conditions, *African Journal Biotechnology* 9 (2010) 3151-3157.
- [27] S.C. Yoon, M.H. Choi, Local sequence dependence of polyhydroxyalkanoic acid degradation in *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Biology Chemistry* 274 (1999) 37800-37808.
- [28] W.M. Pachkowski, J.A.M. Agnelli, L.P. Balem, Thermal, mechanical and morphological properties of poly (hydroxybutyrate) and polypropylene blends after processing, *Material Research* 12 (2009) 159-164.
- [29] S. Jan, C. Roblot, J. Courtois, B. Courtois, ¹H NMR spectroscopic determination of poly-3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass, *Enzyme Microbiology Technology* 18 (1996) 195-201.
- [30] G. Redwan, S.N. Gan, I.K.P. Tan, Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from an integrated-farming pond and palm-oil mill effluent ponds, *World Journal Microbiology Biotechnology* 13 (1997) 707-709.

2.7) National Journal

สามารถ มูลอามาตย์, ผกาวดี แก้วกันเนตร, วรัญญา สุวรรณสิงห์. การหมักน้ำอ้อยแบบกะเพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิดพีเอชเอ. วารสารวิจัย มข. 17 (2): 227-235.





วารสารวิจัย มช.
ISSN 0859-3957

ปีที่ 17 ฉบับที่ 2 มีนาคม - เมษายน พ.ศ. 2555

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Synthesis and Cytotoxic Activities of Azanaphthoquinone Annelated Pyrrole Hydrazone Derivatives	195-202
Nipawan Pongprom and Pornpan Pungpo	
Influence of Annealing on the Giant Dielectric Properties of CuO Ceramics Prepared by a Simple PVA Sol-Gel	203-210
Thanin Putjuso and Peerasak Sangarun	
Effects of Sulfate Fertilizer on Rice Yield cv. Sakol Nakhon and Global Warming Potential	211-216
Jamnong Tragoolram and Patcharee Saenjan	
A Study on a Combined Light Pipe and Solar-heated Ventilation Stack	217-226
Thanyalak Taengchum Surapong Chirarattananon and Robert H. B. Exell	
การหมักน้ำอ้อยแบบกะเพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิดพีเอชเอ	227-235
สามารถ มูลอำมาตย์ ผกาวัฑฒ์ แก้วกันเนตร และวรัญญา สุวรรณสิงห์	
การกำจัดกลิ่นทรีในอากาศของเครื่องฟอกอากาศที่ใช้หลักการทำงานต่างกัน	236-244
บุพรัตน์ หลิมมงคล ชุติวัฑฒ์ ธัญญศิรินนท์ รจฤดี โชติกาวิฑฒ์ พิพัฒน์ ศรีเบญจลัฑฒ์ และ ภารดี ช่วยบำรุง	
อนุกรมวิธานของคั้งหวดขาวอ้อย <i>Dorysthenes</i> spp. ในภาคเหนือและ	245-256
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	
ดวงรัตน์ ธงภักดี และ ชลลดา หาญเลิศฤทธิ์	
ผลของการใช้เปลือกมันสำปะหลังหมักเป็นแหล่งพลังงานและเชื้อในสูตรอาหาร	257-266
ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และคุณภาพซากของแกะขุนในเขตร้อน	
วัชรวิฑฒ์ มีหนองใหญ่ ภาณุวัฒน์ กัมภีราวัฒน์ สุภรินทร์ มหาสวัสดิ์ และวัชร เมื่อนาค	
การแยกเส้นใยธรรมชาติระดับนาโนเมตรจากฟางข้าวด้วยระบบอแกโนโซลว์-	267-277
ไฮโมจิโนเซชันแรงเฉือนสูง	
ศิริธร นาคชำนาญ และ จุฬารัตน์ ครอบแถว	

KKU Res. J. 2012; 17(2)

227



KKU Res. J. 2012; 17(2):227-235

<http://resjournal.kku.ac.th>

การหมักน้ำอ้อยแบบกะเพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิดพีเอชเอ Batch fermentation of sugar cane juice for producing biopolymer of PHAs

สามารถ มุลอามาตย์ (Samart Moonamart)¹, ผกาวิดี แก้วกันเนตร (Pakawadee Kaewkannetra)^{1*},

วรัญญา สุวรรณสิงห์ (Waranya Suwannasing)²

¹ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

²บัณฑิตศึกษา (ปริญญาโท) บัณฑิตมหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

*Correspondent author : paknar@kku.ac.th.

Received August 17,2010

Accepted March 20,2012

บทคัดย่อ

การประเมินศักยภาพการผลิตไบโอพอลิเมอร์ชนิดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHAs) จากน้ำอ้อยคั้น โดยผ่านการหมักแบบกะด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ จากการศึกษาพบว่า ในน้ำอ้อยมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด จากการนำจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์คือ *Alcaligenes latus* TISTR 1043 และ *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 มาเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมในน้ำอ้อย 20 กรัมต่อลิตร พบว่า *A. latus* มีอัตราการเจริญก่อนข้างค้ำเมื่อเทียบกับการเจริญของ *A. eutrophus* ดังนั้นจึงได้เลือก *A. eutrophus* เพื่อใช้ในการผลิต PHAs จากน้ำอ้อย โดยแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรวม 4 ระดับที่ 20, 30, 40, 50 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ที่มีอาหาร 100 มิลลิลิตร ควบคุมการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่า pH 6.5-7 ปริมาณกลีเซอรอล 10% พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้ได้เซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดเท่ากับ 6.013 และ 1.838 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาในการหมัก 60 ชั่วโมง คิดเป็นผลได้มวลเซลล์ (Biomass yield, $Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.163 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลรวมที่ถูกใช้ คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ (Product yield, $Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.050 กรัม PHAs ต่อกรัมน้ำตาลรวมที่ถูกใช้ คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Specific product yield, $Y_{p/x}$) เท่ากับ 0.306 กรัม PHAs ต่อกรัมเซลล์แห้ง และคิดเป็นอัตราการผลิต (Productivity) เท่ากับ 0.031 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อขยายการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรทำงาน 2 ลิตร โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงจากระดับฟลาสก์ พบว่าที่เวลาหมัก 60 ชั่วโมงได้ปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณ PHAs สูงสุดเท่ากับ 5.881 และ 1.281 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้มวลเซลล์ ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.19 ผลได้ผลิตภัณฑ์ ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.041 ผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ ($Y_{p/x}$) เท่ากับ 0.218 และอัตราการผลิตเท่ากับ 0.021 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยที่ค่าผลได้ผลิตภัณฑ์และผลิตภัณฑ์จำเพาะ ($Y_{p/s}$, $Y_{p/x}$) ในฟลาสก์และถังหมัก ประมาณ 5%, 4% และ 31 %, 22% ตามลำดับ

Abstract

Potential of sugar cane juice for producing biopolymer of polyhydroxyalkanoates (PHAs) via batch fermentation by two pure bacterial strains of *Alcaligenes latus* TISTR 1403 and *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 is evaluated. The results revealed that sugar cane juice composed of several kinds of sugars. Then, the *A. latus* and the *A. eutrophus* were separately cultivated in the 100 mL medium containing 20 gL⁻¹ total sugar under

controlled conditions of 30°C, 200 rpm, pH 6.5-7 and with 10% inoculums size. It was found that the *A. eutrophus* grown better than the *A. latus*. Thus, the *A. eutrophus* was further cultivated in different initial total sugar concentrations (20, 30, 40 and 50 gL⁻¹) under controlled conditions (200 rpm, 30°C, pH 6.5-7 and 10% inoculums size). The optimal total sugar concentration of 50gL⁻¹ was reached. The dry cell mass (DCM) and maximum PHAs were obtained at 6.013 gL⁻¹ and 1.84 gL⁻¹ after 60 hr fermentation converted to biomass yield ($Y_{x/s}$) and product yield ($Y_{p/s}$) of 0.163 and 0.050 gL⁻¹h⁻¹. Meanwhile, specific product yield ($Y_{p/x}$) and productivity were 0.306 and 0.031 gL⁻¹h⁻¹. To increase the PHAs production, 5 L fermentor (2 L working volume) was considered using the condition obtained from the flask scale. The DCM and the maximum PHAs were 5.881 gL⁻¹ and 1.281 gL⁻¹ calculated to values of $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, $Y_{p/x}$ and productivity at about 0.19, 0.041, 0.218 and 0.028 gL⁻¹h⁻¹, respectively.

คำสำคัญ : การหมักแบบกะ, น้ำอ้อยคั้น, ไบโอฟอลิเมอร์

Keywords: Batch fermentation, Sugar cane juice, biopolymer

1. บทนำ

ปัจจุบันปัญหาการสะสมของขยะพลาสติกสังเคราะห์ซึ่งย่อยสลายได้ยากในสิ่งแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น จึงมีการหาแนวทางเพื่อจัดการกับขยะพลาสติกเหล่านั้น เช่น การเรียกคืนบรรจุภัณฑ์ การแปรรูปและการใช้ซ้ำ รวมถึงการกระตุ้นให้ประชาชนได้รับรู้ปัญหาทางสิ่งแวดล้อม จึงทำให้เกิดการศึกษาวิจัยเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม (1) ซึ่งพลาสติกชีวภาพหลายชนิด เช่น กลุ่มพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates: PHAs) และกลุ่มพอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid: PLA) เป็นต้น ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์

ไบโอฟอลิเมอร์ PHAs จัดเป็นพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ในระยะเวลาดสั้น (6-12 เดือน) และมีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์พอลิโพรพิลีน (Polypropylene: PP) (2) จุลินทรีย์หลายชนิดในธรรมชาติสามารถสร้างและสะสม PHAs ไว้ภายในเซลล์ ในสภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนมากเกินไป แต่ขณะเดียวกันปริมาณสารชนิดอื่นมีอยู่อย่างจำกัด เช่น ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส เป็นต้น (3) ซึ่งในปัจจุบันการผลิต PHAs ในทางการค้ายังมีข้อจำกัดเนื่องจากต้นทุนการผลิตสูงจากราคาของวัตถุดิบที่นำมาผลิต การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก เช่น กากน้ำตาลหรือกากมันสำปะหลัง (4) อาจมีปัจจัยบางประการที่มี

ผลทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตภายใต้แหล่งอาหารนั้นๆ ได้หรือได้ผลผลิตน้อย เมื่อพิจารณาถึงแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกเพื่อเป็นแนวทางการผลิต PHAs ในระดับอุตสาหกรรม ปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยในการใช้น้ำอ้อยเพื่อผลิตเอทานอล นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงปริมาณน้ำตาลและแ่งของราคามีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำอ้อยมาใช้ในการศึกษาเพื่อผลิต PHAs เนื่องจากในน้ำอ้อยมีปริมาณน้ำตาลเพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครส (Sucrose) ซึ่งพบในปริมาณมากที่สุด (5) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาศักยภาพในการนำน้ำอ้อยมาหมักโดยใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้นนอกเหนือไปจากน้ำตาลและเอทานอล ซึ่งอาจจะนำไปสู่การขยายผลเพื่อการผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

2. วัตถุประสงค์และวิธีการทดลอง

2.1 วัตถุดิบและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

น้ำอ้อยคั้นสดที่ผ่านการหีบด้วยเครื่องบีบอัดจากกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากโรงงานน้ำตาลมิตรผล อำเภอภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ และจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์ 2 สายพันธุ์ได้แก่ แบคทีเรีย *Alcaligenes latus* TISTR 1403 และ *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095 สั่งซื้อมาจากศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

KKU Res. J. 2012; 17(2)

229

(วว.) กรุงเทพมหานคร

2.2 การศึกษาองค์ประกอบในน้ำอ้อย

น้ำอ้อยคั้นจะนำมาเก็บรักษาไว้ที่ตู้แช่แข็งที่ควบคุมอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาคุณภาพต่างๆของน้ำอ้อยไม่ให้เปลี่ยนแปลง เมื่อนำมาทดสอบต้องละลายน้ำแข็งก่อนโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 2 รอบ ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกกากตะกอนที่มีขนาดใหญ่ออกจากนั้นนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆในน้ำอ้อยตามวิธีมาตรฐานซึ่งได้แก่ ปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Phenol-sulfuric acid) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Soluble solid: Brix) โดยใช้แฮนด์เรแฟกโตมิเตอร์ (Hand refractometer) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) โดยใช้ pH meter ค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี TKN (Total Kjeldahl Nitrogen) และชนิดของน้ำตาลต่างๆ ในน้ำอ้อยโดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำอ้อยคั้นในขวดเขย่า

2.3.1 การเตรียมกล้ำจุลินทรีย์บริสุทธิ์

โดยการนำกล้ำเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. latus* และ *A. eutrophus* มาเพาะเลี้ยงในอาหารสมบูรณ์ (Nutrient broth: NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในตูบ่มเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นนำเชื้อ 10 มิลลิลิตรใส่ในอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงให้ในตูบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเท่าเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้ำเชื้อต่อไป (6)

2.3.2 การศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ *A. latus* และ *A. eutrophus* ในน้ำอ้อย

นำปริมาณกล้ำเชื้อ *A. latus* และ *A. eutrophus* มาอย่างละ 10 มิลลิลิตร (Inoculum size 10%) ถ่ายลงในอาหารสูตรเกลือแร่หรืออาหารหลัก ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร เลี้ยงให้เจริญในตูบ่มเชื้อแบบเขย่า โดยควบคุมความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2-3 วัน (6)

2.4 การศึกษาปริมาณน้ำตาลรวมที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์เพื่อผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs

โดยการแปรผันปริมาณน้ำตาลรวมในน้ำอ้อยออกเป็น 4 ระดับตามที่ออกแบบการทดลองไว้ที่ 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เพื่อผสมในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ในฟลาสก์ที่มีอาหาร 100 มิลลิลิตร ที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.5-7 ปริมาณกล้ำเชื้อ 10% เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงจากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมด การเจริญและน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ การเก็บเกี่ยวและการวัดปริมาณ PHAs

2.5 การผลิตไบโอพอลิเมอร์ PHAs จากการหมักน้ำอ้อยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

โดยนำสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในฟลาสก์เขย่ามาใช้ผลิต PHAs ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (ที่มีปริมาตรทำงาน 2 ลิตร) อัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ค่า pH 6.5-7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2 vvm เพื่อควบคุมค่าความเข้มข้นออกซิเจนในน้ำหมักให้คงที่ที่ 30 %

2.6 การเก็บเกี่ยวไบโอพอลิเมอร์ PHAs ที่สร้างและสะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์

จะใช้วิธีการสกัดใน Soxhlet โดยการนำเซลล์แห้งของ *A. eutrophus* ที่ได้หลังการหมัก มาเติมด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์อัตราส่วน 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเซลล์จุลินทรีย์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และนำเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้ไปสกัดโดยคลอโรฟอร์มใน Soxhlet ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปตกตะกอนในเมทานอลเย็นและนำไประเหยใน Vacuum ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ผงสีขาวของ PHAs แล้วทิ้งไว้ให้น้ำหนักคงที่ใน Desiccators (7, 8) แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไบโอพอลิเมอร์ PHAs โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร ตามวิธีของ Hahn และคณะ (9)

3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

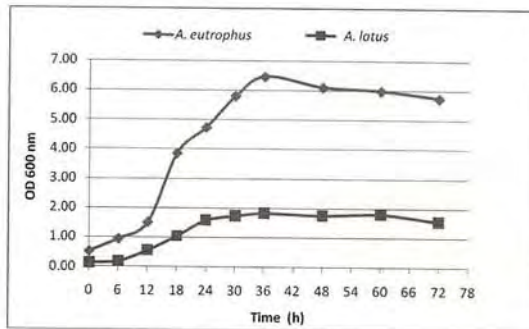
3.1 องค์ประกอบต่างๆ ในน้ำอ้อย

พบว่าในน้ำอ้อยประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ 87.34% ของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ 11.6% ที่เหลือเป็นเชื้อ 1.06% โดยที่ปริมาณของแข็งที่ละลายได้นั้นเป็นการประมาณค่าของน้ำตาลที่ละลายได้ เนื่องจากในน้ำอ้อยมีองค์ประกอบของน้ำตาลละลายอยู่เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งพบว่าในน้ำอ้อยมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ เท่ากับ 11.6 บริกซ์ หรือ 116 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 105.5 กรัมต่อลิตร หรือ 90.9% ที่เหลือเป็นไนโตรเจน 1.2% และสารอื่นๆที่ไม่ใช่น้ำตาลอีก 7.9% และค่า pH ประมาณ 3.4 ซึ่งมีความเป็นกรดสูงไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *A. latus* เนื่องจากจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีในสูตรอาหารที่มีช่วงของค่า pH 6.5-7 (4,5) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องปรับค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการหมัก

3.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำอ้อยแบบกะในขวดเขย่า

3.2.1 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้จุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ในน้ำอ้อย

จากการติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (รูปที่ 1) พบว่า อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดโดยจุลินทรีย์ *A. latus* มีอัตราการเจริญค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับการเจริญของจุลินทรีย์ *A. eutrophus* ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้จุลินทรีย์ *A. eutrophus* ในการหมักน้ำอ้อยเพื่อผลิต PHAs ต่อไป



รูปที่ 1 เปรียบเทียบการเจริญโดยวิธีวัดค่าความขุ่น (OD 600) ของจุลินทรีย์ *A. latus* TISTR 1043 และ *A. eutrophus* TISTR 1095 ในน้ำอ้อย 20 กรัมต่อลิตร

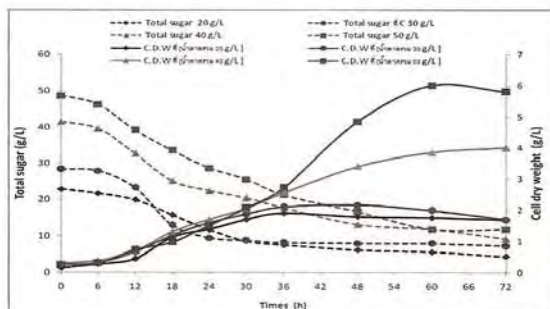
3.2.2 ผลการแปรผันปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดในน้ำอ้อยเพื่อผลิต PHAs ในขวดเขย่า

จากรูปที่ 2 เมื่อมีการแปรผันปริมาณน้ำตาลรวมของน้ำอ้อยเป็น 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าที่เวลา 0-36 ชั่วโมง การเจริญของจุลินทรีย์จะใกล้เคียงกันในทุกๆความเข้มข้นของน้ำตาลรวม หลังจาก 36 ชั่วโมง จึงพบความแตกต่างของการเจริญของจุลินทรีย์ โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร มีการเจริญสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.899 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นค่าจึงเริ่มคงที่จนถึงเวลาการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรวม 30 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญของจุลินทรีย์มีลักษณะใกล้เคียงกับที่สภาวะน้ำตาลรวม 20 กรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลรวมที่ 40 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญของจุลินทรีย์มีค่าสูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง และมีความมากกว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลรวมที่ 20 และ 30 กรัมต่อลิตร อย่างเห็นได้ชัด โดยได้ปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้งสูงสุดคือ 3.999 กรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้นน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเป็นสภาวะที่ดีที่สุดต่อการเพาะเลี้ยง โดยพบว่าหลังจาก 36 ชั่วโมง อัตราการเจริญจะเร็วมากและมีค่าสูงสุดที่เวลา 60 ชั่วโมง และคงที่ไปจนกระทั่ง 72 ชั่วโมง ปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้งมีค่าเท่ากับ 6.013 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ พบว่ามีความสอดคล้องกับอัตราการเจริญ สังเกตได้จากความชันของกราฟในช่วงเวลา 0-36 ชั่วโมง อัตราการลด

KKU Res. J. 2012; 17(2)

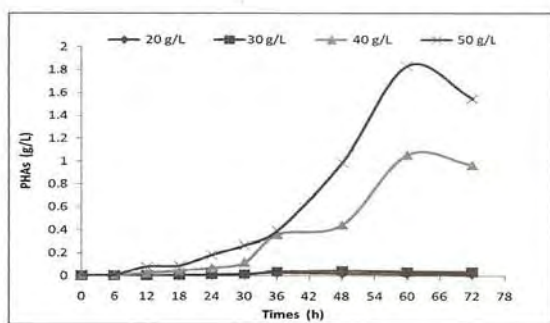
231

ลงของน้ำตาลมีค่าใกล้เคียงกันทุกๆ ความเข้มข้น แต่หลัง ชั่วโมงที่ 36 การลดลงของน้ำตาลที่ความเข้มข้นของ น้ำตาลเริ่มต้น 40 และ 50 กรัมต่อลิตรมีค่ามากขึ้นตามลำดับ โดยพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรวมที่เวลาสุดท้ายของ การเพาะเลี้ยงมีค่า 4.39, 7.28, 9.19 และ 11.86 กรัมต่อ ลิตร ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตรตามลำดับ



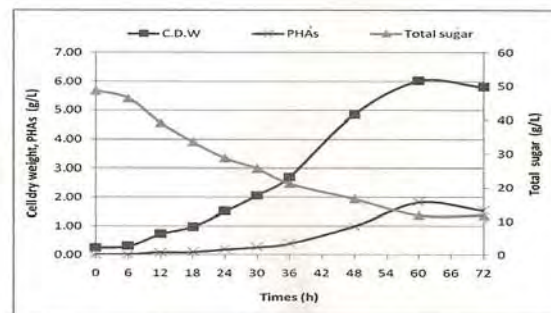
รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรวมทั้งหมดและ น้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์ระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่การเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.2.3 ปริมาณไบโอพอลิเมอร์ (PHAs)



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงการผลิตไบโอพอลิเมอร์ ระหว่าง การเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้น ของน้ำตาลรวมแตกต่างกัน ที่การเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ในรูปที่ 3 พบว่าปริมาณ PHAs ซึ่งสะสม อยู่ภายในเซลล์ ภายหลังจากสิ้นสุดเวลาการหมักแบบกะที่ 72 ชั่วโมง สอดคล้องกับการเจริญ (ดังรูปที่ 2) เนื่องจาก ความเข้มข้นของเซลล์ก่อนข้างต่ำที่ความเข้มข้นน้ำตาล 20, 30 กรัมต่อลิตร ดังนั้นค่า PHAs ที่ได้จึงค่อนข้างต่ำ คือ 0.027 และ 0.048 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น น้ำตาล 40, 50 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHAs มีค่าสูงขึ้น อย่างชัดเจน โดยมีค่า 1.058 และ 1.838 กรัมต่อลิตร ตาม ลำดับ ส่วนในรูปที่ 4 เป็นกราฟความสัมพันธ์การเจริญ การผลิต PHAs ของจุลินทรีย์ และการลดลงของน้ำตาล สำหรับการเพาะเลี้ยงที่สถานะน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อ ลิตร ซึ่งเป็นสถานะที่ดีที่สุด จะเห็นได้ว่าการเจริญและ การผลิต PHAs ของจุลินทรีย์มีลักษณะไปด้วยกันและ สอดคล้องกับการลดลงของน้ำตาล



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงการเจริญและการผลิตไบโอ พอลิเมอร์ PHAs ระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ที่ สถานะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อ ผลิต PHAs ที่สถานะความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่าง ๆ กันสามารถสรุปประสิทธิภาพการผลิตในแง่ของผลได้ (yield) และอัตราการผลิต (productivity) ได้ดังตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าที่เวลาการเพาะเลี้ยง 60 ชั่วโมง ความเข้มข้น น้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร มีค่าผลได้และอัตราการ ผลิตสูงสุดไม่ว่าจะพิจารณาในแง่ผลได้ชีวมวล (biomass yield: $Y_{x/s}$) ผลได้ PHAs (product yield: $Y_{p/s}$) หรือผลได้ PHAs จำเพาะ (specific product yield: $Y_{p/x}$)

ตารางที่ 2 ปริมาณผลได้และผลผลิตที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลรวมแตกต่าง

ความเข้มข้นของ น้ำตาลรวมทั้งหมด (g/L)	Biomass (g/L)	PHAs (g/L)	Biomass yield, $Y_{x/s}$	Product yield, $Y_{p/s}$	Specific product yield, $Y_{p/x}$	Productivity (g/Lh)
20	1.899	0.027	0.124	0.002	0.015	0.001
30	2.161	0.048	0.107	0.002	0.022	0.001
40	3.999	0.968	0.124	0.023	0.186	0.013
50	6.013	1.838	0.163	0.050	0.306	0.031

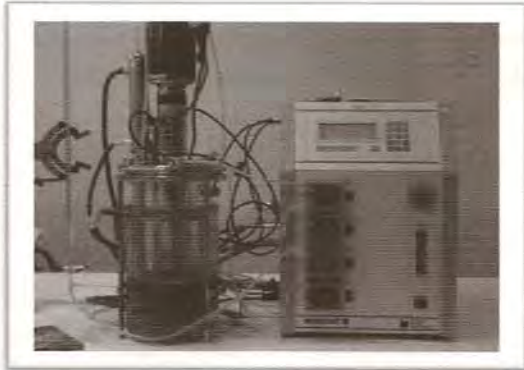
ตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการผลิต 50 กรัมต่อลิตร โดยคิดเปรียบเทียบที่เวลาการเพาะเลี้ยง
ในแง่ผลได้และอัตราการผลิตที่ความเข้มข้นน้ำตาล ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงที่เวลาสุดท้ายคือ 72 ชั่วโมง ผลการ
เริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร โดยคิดเฉพาะที่ 60 ชั่วโมงเท่านั้น เปรียบเทียบสรุปได้ในตารางที่ 4 ซึ่งที่เวลา 60 ชั่วโมง
เพื่อให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้นจึงวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าผลได้ ให้ค่าผลได้และอัตราการผลิตสูงสุดเทียบกับที่เวลาอื่นๆ
และอัตราการผลิตสำหรับที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น

ตารางที่ 3 ปริมาณผลได้ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยของความเข้มข้นน้ำตาลรวม 50 g/L ที่เวลาต่างๆ

เวลา hr	C.D.W (g/L)	PHAs (g/L)	Total sugar (g/L)	Biomass yield, $Y_{x/s}$	Product yield, $Y_{p/s}$	Specific product yield, $Y_{p/x}$	Productivity (g/Lh)
0	0.253	0.009	48.66	-	-	-	-
6	0.304	0.012	46.28	0.128	0.005	0.038	0.002
12	0.723	0.083	39.16	0.076	0.009	0.115	0.007
18	0.970	0.092	33.55	0.064	0.006	0.095	0.005
24	1.514	0.185	28.68	0.076	0.009	0.122	0.008
30	2.073	0.269	25.57	0.090	0.012	0.130	0.009
36	2.715	0.393	21.24	0.099	0.014	0.145	0.011
48	4.852	0.991	16.67	0.152	0.031	0.204	0.021
60	6.013	1.838	11.86	0.163	0.050	0.306	0.031
72	5.807	1.548	11.86	0.158	0.042	0.267	0.022

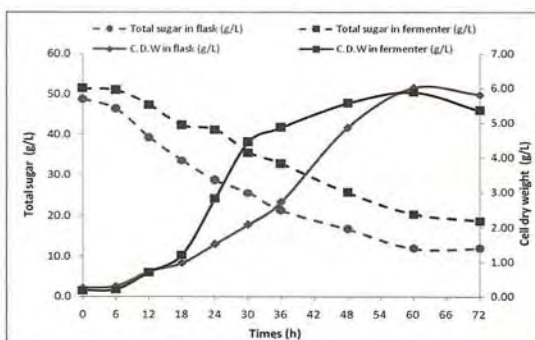
3.3 ผลการศึกษาการผลิต PHAs ในถังปฏิกรณ์

ชีวภาพ



รูปที่ 5 กระบวนการหมักน้ำอ้อยโดย *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมด 50 กรัม/ลิตร

จากสถานะที่เหมาะสมการผลิต PHAs ในระดับขวดแช่ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ได้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุด จึงใช้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลนี้ เพื่อขยายการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (ปริมาตรอาหารในถังหมัก 2 ลิตร) ดังรูปที่ 5 โดยควบคุมอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH 6.5-7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2 vvm โดยปรับให้เครื่องทำงานอัตโนมัติ เพื่อควบคุมค่าความเข้มข้นออกซิเจน (pO_2) ในน้ำหมักให้มีค่าคงที่ที่ 30 % ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล และน้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ ในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* TISTR 1095 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมด $50 gL^{-1}$ ในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพและในขวดแช่

รูปที่ 6 เป็นการเปรียบเทียบผลจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักและในขวดแช่ พบว่า การลดลงของน้ำตาลมีลักษณะคล้ายกัน แต่ในขวดแช่มีการใช้น้ำตาลไปมากกว่า เนื่องจากความเข้มข้นน้ำตาลที่เหลือมีค่าต่ำกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับผลการเพาะเลี้ยงถึงหมัก ในขณะที่ความเข้มข้นเซลล์สุดท้ายที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน (ที่เวลา 60-72 ชั่วโมง) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาที่เวลา 18-60 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วง growth phase จะเห็นว่าอัตราการเจริญของเซลล์ในถังหมักมีค่ามากกว่าในขวดแช่ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสภาวะแวดล้อมในถังหมักเอื้อต่อการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ได้มากกว่า เพราะในถังหมักมีการใช้ใบกวนทำให้สารมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) ได้ดีและเกิดลักษณะการเคลื่อนที่ของของไหลแบบปั่นป่วน (turbulent flow) ส่งผลดีในแง่การถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) ไม่ว่าจะเป็นสารอาหารหรือออกซิเจน และในช่วงท้าย (60 -72 ชั่วโมง) ที่อัตราการเจริญในถังหมักไม่ได้แตกต่างไปจากในขวดแช่นั้น อาจเป็นเพราะเป็นช่วงที่ความเข้มข้นน้ำตาลเหลือน้อย ซึ่งไม่ส่งผลเท่าที่ควรต่อปัจจัยที่เกี่ยวกับการถ่ายเทมวลสาร นอกจากนี้ช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่เซลล์ปรับสภาพเข้าสู่สภาวะคงที่แล้ว (Stationary phase) ดังนั้นเมตาบอลิซึมภายในเซลล์จึงไม่แตกต่างกันมากนัก และตารางที่ 4 เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต PHAs ในแง่ของผลได้และอัตราการผลิต PHAs ที่เวลาการเพาะเลี้ยงต่างๆ ซึ่งพบว่าผลได้ชีวมวลและอัตราการผลิต PHAs ในช่วงเวลา 48-60 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกัน โดยที่ 60 ชั่วโมงมีค่าสูงสุด

KKU Res. J. 2012; 17(2)

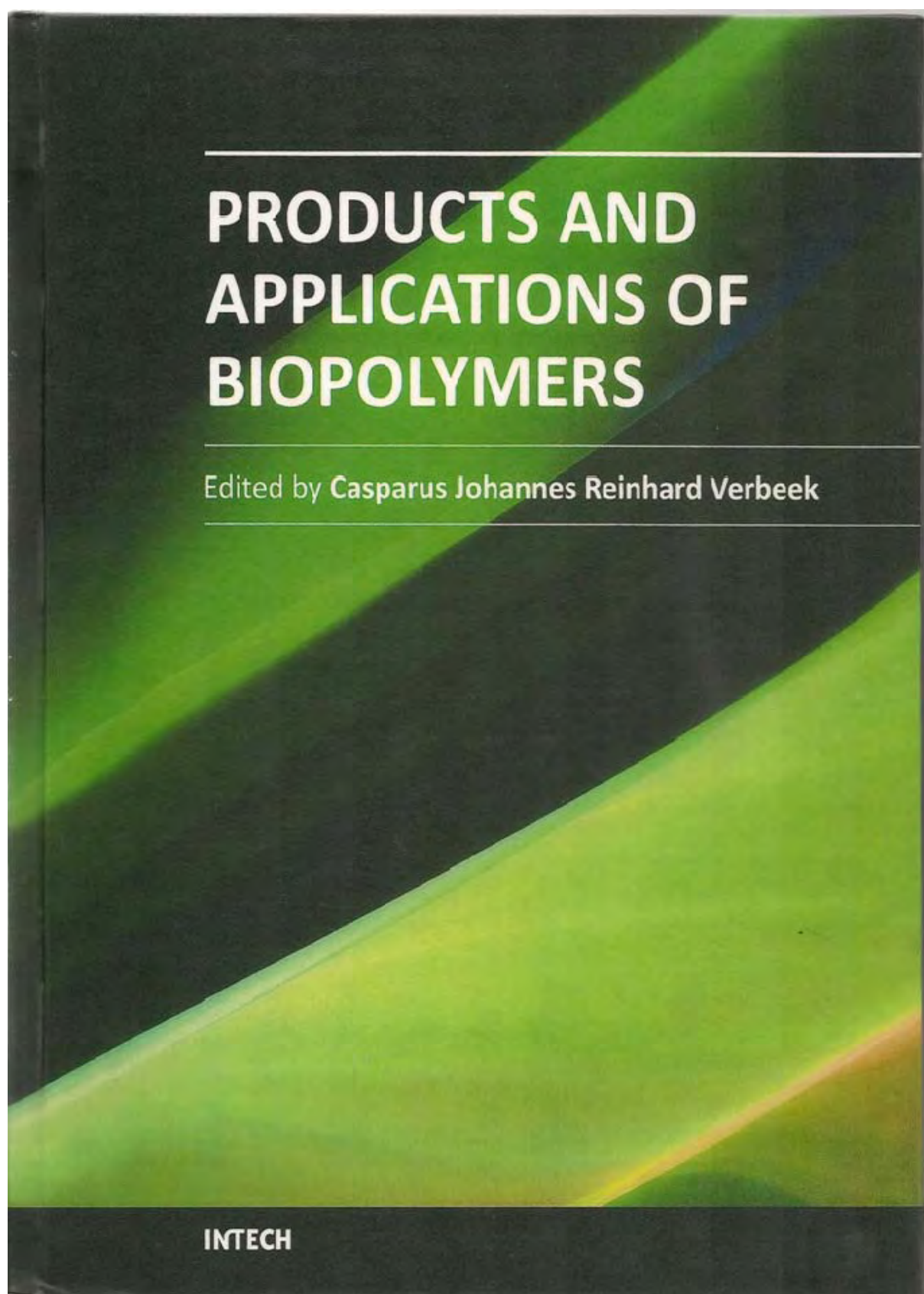
235

6. เอกสารอ้างอิง

- (1) Slepecky R. A., Law J. H. (1960). **Synthesis and degradation of poly- β -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*.** J Bacteriol: 82:37-42
- (2) Anderson, A.J., Dawes, E.A., (1990). **Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacteria polyhydroxyalkanoates.** Microbiol. Rev. 54, 450 - 472. Steinbuchel A, Valentin HE. FEMS Microbiol Lett 1995; 128:219-28.
- (3) Byrom, D. (1987) **Polymer synthesis by micro-organism: Technology and economics trend.** , Biotechno. vol.5, pp. 246-250.
- (4) Khanna, S., Srivastava, A. K. (2005). **Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*.** Process Biochem. 40: 2173-2182.
- (5) Grothe, E., Moo-Young, M., Chisti, Y. (1999). **Fermentation optimization for the production of poly (-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic.** Enz. and Microb. Technol. 25:132-141.
- (6) Kaewkannetra, P., Tanonkeo, P., Tanamool, V. and Imai, T. (2008) **Biorefinery of squeeze sorghum juice into value added product of biopolymer.** J. Biotechnol.136:S402.
- (7) Ramsay, J. A., Berger, E. Ramsay, B. A., Chavarie, C. (1987). **Recovery of poly- β -hydroxybutyric acid granules by hypochlorite treatment.** Biotechnol. Tech. 4:221-226.
- (8) Berger, E. Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., Chavarie, C., Braunegg, G. (1989). **PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass.** Biotechnol Tech. 3:227-232.
- (9) Hahn, S.K., Chang, Y.K., Lee, S.Y. (1995). **Recovery and characterization of poly (3- β hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and *Escherichia coli*.** Applied and envi.microb. 60: 34-39.

3.1 ตำราต่างประเทศ

Pakawadee Kaewkannetra (2012) Fermentation of sweet sorghum into added value product of biopolymer. Book chapter in “Biopolymer Production and Applications”



Contents

Preface IX

Part 1 Biopolymer Products 1

- Chapter 1 **Gum Arabic: More Than an Edible Emulsifier** 3
Mariana A. Montenegro, María L. Boiero,
Lorena Valle and Claudio D. Borsarelli
- Chapter 2 **Poly(Lactic Acid) as a Biopolymer-Based Nano-Composite** 27
Emad A. Jaffar Al-Mulla and Nor Azowa Bt Ibrahim
- Chapter 3 **Fermentation of Sweet Sorghum into Added Value
Biopolymer of Polyhydroxyalkanoates (PHAs)** 41
Pakawadee Kaewkannetra
- Chapter 4 **Xylan, a Promising Hemicellulose for Pharmaceutical Use** 61
Acarilia Eduardo da Silva, Henrique Rodrigues Marcelino,
Monique Christine Salgado Gomes, Elquio Elearnen Oliveira,
Toshiyuki Nagashima Jr and Eryvaldo Sócrates Tabosa Egito
- Chapter 5 **Hydrodynamic Properties of Gelatin –
Studies from Intrinsic Viscosity Measurements** 85
Martin Alberto Masuelli and Maria Gabriela Sansone

Part 2 Applications of Biopolymers 117

- Chapter 6 **Role of Biopolymers in Green Nanotechnology** 119
Sonal I. Thakore
- Chapter 7 **Stable Isotope Applications in Bone Collagen
with Emphasis on Deuterium/Hydrogen Ratios** 141
Katarina Topalov, Arndt Schimmelmann,
P. David Polly and Peter E. Sauer
- Chapter 8 **A Facile One-Pot Synthesis of MSe (M = Cd or Zn)
Nanoparticles Using Biopolymer as Passivating Agent** 163
Oluwatobi S. Oluwafemi and Sandile P. Songca

3

Fermentation of Sweet Sorghum into Added Value Biopolymer of Polyhydroxyalkanoates (PHAs)

Pakawadee Kaewkannetra

Department of Biotechnology, Faculty of Technology

Khon Kaen University, Khon Kaen

Thailand

1. Introduction

The world today cannot deny the prospect of 'peak oil', higher prices and depletion of petrochemical feed stocks. At the same time, there is an environmental concern of the widely used synthesized plastic from petroleum industry because of its non-degradable nature. Plastics, solid wastes, and pollutants of all kinds not only accumulate as carbon footprint, but also pose a threat to the global warming issues. If they are disposed by open air burning. The United Nation's International Center for Science and High Technology (ICS) thus launched a program focusing on the development of degradable biopolymeric materials and plastic waste disposal in developing countries. Recycling, reuse, incineration, composting, and new technology for development of environmental friendly degradable plastics are making a highly efficient contribution to the mitigation of environmental problems. In addition, concerned researchers and the industrial sector have seen the importance of producing bio-based plastics and biopolymers from agricultural crops based on locally available biomass resources.

2. Polyhydroxyalkanoates (PHAs)

2.1 Definition

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) or polyhydroxyalkanoic acid, the main kind of biodegradable and biocompatible biopolymer, are classified as linear polyesters. Typically, PHAs can be produced in nature by several microorganisms such as yeast, fungi and mostly by various bacterial strains. The bacteria could accumulate as intracellular carbon and energy storage under imbalanced growth conditions such as excess in carbon sources but limiting in nutrients of nitrogen, phosphorous and potassium etc (Yu et al., 2005). In addition, fermentation processes from renewable resources such as sugar, starch and even lipid based materials are also affected on the production of PHAs (Kaewkannetra et al, 2008).

2.2 Classification

Since 1925, PHAs were the first biomaterial, discovered by the French microbiologist, M. Lemoigne, accumulated as intracellular substance in a bacterial strain of *Bacillus*

magnetarum (Lemoigne, 1926; Anderson & Dawes, 1990; Jacquel et al., 2008). Nowadays, biopolymers have been synthesised or are formed in nature during the growth curves of all microorganisms. Depending on the evolution of the synthesis process, different classifications of the different biopolymers have been proposed. In this case, they are classified into the following 4 categories. However, it should be noted that only 3 categories (from 2.2.1 to 2.2.3) are obtained from renewable resources and the remainder is obtained by chemical synthesis.

- Biopolymers derived from biomass such as from agro-resources (e.g., starch, lingo-cellulosic materials, protein and lipids)
- Biopolymers obtained by microbial production as the PHAs
- Biopolymers conventionally and chemically synthesised and the monomers are obtained from agro-resources, e.g., the poly-lactic acids or PLAs
- Biopolymers whose monomers and polymers are obtained conventionally by chemical synthesis such as aliphatic and aromatic hydrocarbon.

2.3 PHAs structures

PHAs are produced by the bacteria to store carbon and energy reserves (Keshavarz, Roy, 2010). Previous works stated that an intracellular accumulation of PHAs improves the survival of general bacteria under environmental stress conditions (Kadouri et al., 2005; Zhao et al., 2007). Various microorganisms are produced in different properties of biopolymer depending on the types of microorganisms and carbon sources used. More than 150 different monomers can be combined within this family to give materials with extremely different properties (Chen & Wu, 2005).

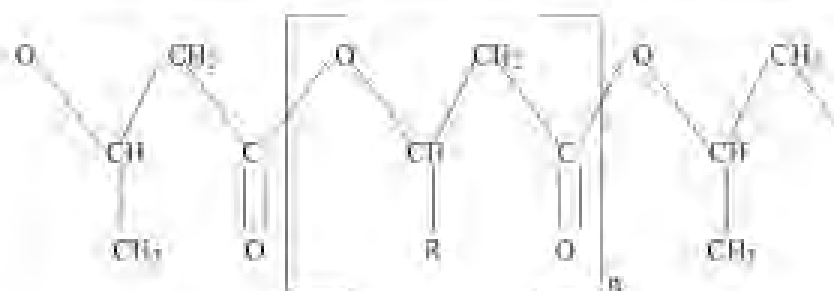
PHAs structure is composed of a monomer of 3-hydroxyalkanoic (HA) acid. The general formulae of the monomer unit is $[-O-CH(R)-CH_2-CO-]$ as seen in Fig.1 (Lee, 1995). The (R)-3HA monomer units are all in the R configuration due to stereospecificity of polymerizing enzyme PHAs synthase. According to the size of the alkyl substituent (R), the mechanical properties of PHAs can typically be divided into three groups by number of carbon atoms in their side chain. Short chain length (scl) PHAs are composed of 3-5 carbon atoms, while medium chain length (mcl) PHAs consist of 6-15 carbon atoms and long chain length (lcl) ones comprise 15 and above carbon atoms. The structure of PHAs depends on supplying carbon sources and microbial types. The composition of PHAs depends on the microorganisms and nature of the carbon sources allowing the formulation of new polymers with different physicochemical properties, i.e., short or mid-chain and long-chain fatty acids.

The most common PHAs' forms found in microorganism cells are polyhydroxybutyrate (PHB) and polyhydroxyvalerate (PHV). However, the majority of the published research on PHAs rather than PHB has concentrated on two bacterial strains, i.e., *Alcaligenes eutrophus* and *A. latus* (Slater, et al, 1988; Kim, et al, 1994; Yamane, et al, 1996; Shi, et al, 1997; Wang & Lee, 1997; Tsuge, et al, 1999; Yu, et al, 2005; Yezza, et al, 2007).

These monomers are biodegradeable and used for the production of bioplastics. PHAs produced from the process are usually composed of 100-30,000 monomers and exist in a short chain. Naturally, the properties of PHAs are similar to thermoplastics that are obtained from petrochemical industry such as polypropylene (PP) and polyethylene (PE) as shown in Table 1 (Evan and Sikdar, 1990).

Fermentation of Sweet Sorghum Into Added Value Biopolymer of Polyhydroxyalkanoates (PHAs)

43



n varies from 600 to 35000

R=hydrogen	Poly(3-hydroxypropionate)
R=methyl	Poly(3-hydroxybutyrate)
R=ethyl	Poly(3-hydroxyvalerate)
R=propyl	Poly(3-hydroxyhexanoate)
R=pentyl	Poly(3-hydroxyoctanoate)
R=nonyl	Poly(3-hydroxydodecanoate)

Fig. 1. PHAs structure (Lee, 1995)

Property	PHB	Polypropylene
Melting point (T_m), °C	175	176
Crystallinity, %	80	70
Molecular weight, Daltons	5×10^5	20×10^5
Glass transition (T_g), °C	15	-10
Density, g/cm ³	1.25	0.905
Tensile strength, Mpa	40	38

(Evan and Sikder, 1990)

Table 1. Properties of polyhydroxybutyrate (PHB) and polypropylene (PP)

They can be either thermoplastic or elastomeric materials with melting points ranging from 40 to 180°C and the percentage of crystallinity (up to 70-80) is similar (Blumh & Owen, 1995). Thus, they can tolerate organic solvents and even lipid and oil. The mechanical and biocompatibility of PHAs can also be easily changed by blending, forming, modifying the surface or combining PHAs with other polymers, enzymes and inorganic materials, making it possible for a wider range of applications such as bottles, bags and wrap films and even in pharmaceutical and medical areas such as drug coating and drug delivery (Steimbuchel & Fichtenbusch, 1996, Jacquet, et al., 2006).

3. Sweet sorghum

Sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) is a 3 annual crop and a 4 carbons (C4) containing plant with high biomass productivity. As a high photosynthetic efficient crop, it does not only produce grains, but also yields large amount of sugars in the stems. Typically, it mainly consists of sucrose (up to 55% of dry weight biomass), fructose and

glucose which are ideal for preparing fermentation media (Kaewkannetra et al., 2008; Laopaiboon et al., 2009; Gao et al., 2010).



Fig. 2. Sweet sorghum (strain Khon Kean University 40 : KKU 40) from agricultural plantation area of Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

In the age of petroleum crisis, sweet sorghum (see Fig. 2), especially grains and stems, has already proven advantages over other crops such as sugar cane, cassava, palma, in terms of residue or agricultural wastewater. These crops are feedstock for producing bio-fuels by squeezing the juice and then fermenting into bio-ethanol (Laopaiboon et al (2009), bio-hydrogen (Antonopoulou, et al., 2008). They have recently been used as carbon sources for algae during bio-diesel production (Gao et al., 2010) owing to their sustainability, processing efficiency and superior byproducts, such as bagasse, which serves as high-quality cattle feed. The crops can be cultivated under dry, non-arable land, or warm conditions and are inexpensive to grow. Thus, they are more typically grown for forage, silage, and sugar production than many other crops. The crops are also competitive on the cost aspect of ethanol production.

Presently, the cost of PHAs production is a main limiting factor for extensive production in an industrial scale. The carbon source contributes most significantly (up to 50%) to the overall cost in PHAs production. An attempt to produce PHAs by applying cheap carbon sources could reduce the total cost of the production. Previously, production of PHAs by using cheap carbon sources such as molasses, maple sap and cassava were studied (Grothe et al 1999; Yezza, et al., 2007; Koller et al., 2008). However, sweet sorghum had not been explored so far as a carbon source for PHAs production until in 2008 (Kaewkannetra, et al., 2008). Currently, it is planted in more than 90 countries around the world including Thailand, which is one of the agro-industrial countries in the Southeast Asia with plentiful cheap carbon sources. A number of crops such as cassava, sugar cane, corn, potato, can be extensively used as raw materials to produce degradable polymer and biomaterials via fermentation process by microorganisms. Sweet sorghum, among all the crops mentioned, is of high potentiality to help mitigate environment problems if it can be produced as biodegradable plastics.

3.1 Classification

Sorghum can be classified into 5 categories: grain, grass, broom, pop and sorgo or sweet sorghum. Typically, it is used for animal feed and as sweeteners, primarily in the form of sweet sorghum syrup similar to sugar cane. Recently researchers found rich sugar content in the stem of sweet sorghum, commonly expressed with juice brix degree, but the relation between sugar content and brix degree has not been very clear due to different varieties during their growth. The results revealed a scientific basis for the arrangement in their sowing dates.

3.2 Characterization

Since the duration of sweet sorghum for maturation is approximately 3-5 months, 2-3 crops could be harvested annually in Thailand. Therefore, the production yields of sugar would be double or triple. We can see the possibility of reducing the world energy crisis if sweet sorghum can be converted to energy efficiently. Typically, after harvest, the leaves of the fresh crop are stripped and the stems are squeezed in a roller mill (Fig.3) to obtain sweet sorghum juice. It should be noted that the stems are stored at 4° C while the juice is kept at -20° C prior to use.



Fig. 3. Stems of sweet sorghum are squeezed by a roller mill for preparing sweet sorghum juice (SSJ)

Table 1 shows variations of types and sugar content in sweet sorghum collected from several areas, which depend on the strain, planting seasons, areal conditions, etc. For examples, the total sugar, analyzed by phenol-sulfuric method, was 207.43 g/l. Analysis by means of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) has proved contents of 175.97 g/l sucrose, 12.32 g/l glucose, 5.75 g/l fructose in sweet sorghum juice. Normally, the initial sugar concentration of 30-40 g/l is suitable and sufficient for using as carbon source for microbial growth. Therefore, the juice for 1 liter can be diluted as fermentation medium for 4-5 liters (Kaewkannetra et al., 2003).

cultivation area	Harvest month	Sugar types (g/l)			Total Sugar (g/l)	Sources
		sucrose	glucose	fructose		
Thailand	July	175.97	12.32	5.75	194.04	Kaewkannetra et al (2006)
Thailand	*	124.1	20.9	16.8	161.8	Laopaiboon et al (2009)
USA	October	143.3	39.3	61.0	242.6	Liang et al (2010)
Hungary	September	75.1	25.0	18.1	118.2	Sápos et al (2009)
Greece	November	211.9	20.1	-	232.0	Mamma et al (1995)

*Not specific

Table 1. Type and sugar contents in sweet sorghum collected from several areas

4. Fermentation

4.1 Definition

Fermentation implies an intracellular biochemistry process. It is believed to have been the primary means of energy production in earlier organisms before oxygen was at high concentration in the atmosphere. Therefore, it would generate Adenosine Triphosphate (ATP) of the energy molecule of cells even in the presence of oxygen and is synthesized mainly in mitochondria and chloroplasts. In other words, it means the anaerobic enzymatic conversion of organic compounds to simple compounds producing energy in the form of ATP.



Fig. 4. Fermentation of sweet sorghum in fermentor (Kaewkannetra et al., 2008)

Fermentation occurs naturally in various microorganisms such as bacteria, yeasts, fungi and in mammalian muscle. Yeasts were discovered to have connection with fermentation as observed by Louis Pasteur and originally defined as *respiration without air*. However, it does not have to always occur in anaerobic condition. For example, starch when fermented under

Fermentation of Sweet Sorghum Into Added Value Biopolymer of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) 47

anaerobic conditions gives alcohols or acids. Yeasts, in ethanol fermentation, use an anaerobic respiration primarily when oxygen is not present in sufficient quantity for normal cellular respiration. However, in large-scale fermentation, the breakdown and re-assembly of biochemicals for industry often carry on in aerobic growth conditions.

4.2 Types of fermentation

Normally, fermentation processes can be classified depending on the objective of study. For example, in terms of products fermentation is divided into 4 types, namely, microbial cell, microbial enzyme, microbial metabolite and transformation process. If considering due to its contaminating conditions, it will be classified into 3 types: septic, semi-septic and aseptic fermentation. However, in general, the fermentation processes are classified into 3 types as follows.

4.2.1 Batch fermentation

Batch fermentation means the cultivation of microorganisms, where the sterile growth medium in desired volume is inoculated with the microorganisms into the bioreactor and no additional growth medium is added during the fermentation. The product will be harvested at the end of the process. Typically, PHA's production is performed using batch fermentation because of low cost for investment and no special control. In addition, sterilization of the feed stock is easier than other fermentation processes, and operation is flexible.

Previous studies have investigated batch fermentation of both carbon sources and microorganisms. The microorganisms will accumulate PHAs after the cell reached the maximum growth coupled with the depletion of nitrogen or phosphorus (Braunegg et al 1998; Wang & Balcken, 1998; Chien et al, 2007).

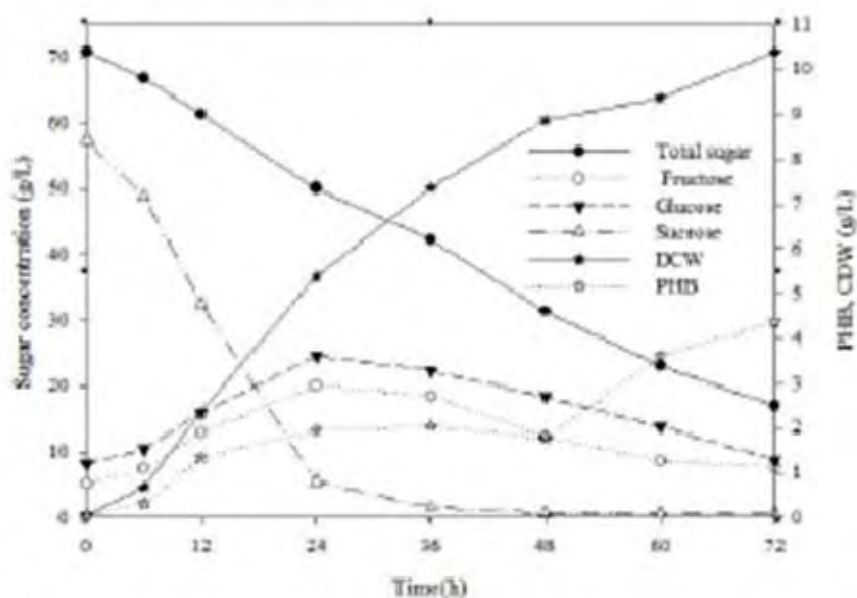


Fig. 5. Growth curve and PHAs production during batch fermentation of sweet sorghum by *Bacillus aryabhattai* in 3 L fermentor (Tanamool et al., 2011)

Fig. 5 shows batch fermentation of sweet sorghum juice (SSJ) by *Bacillus aryabhattai* in 3 L fermentor under cultivating condition with agitation rate at 200 rpm, air rate at 1.5 l/min and temperature at 30° C. Growth monitoring and PHAs production were investigated including total sugar, dry cell weight (DCW) and variations of fructose, glucose and sucrose as functions of time. It was found that the maximum cell and PHAs product reached at about 10.36 g/l and 4.36 g/l. Both slightly increased after 72 hr. The sugar trend then changed. Sucrose was almost depleted within 36 hr while glucose and fructose were slightly increased at the beginning and reached maximum at 24 hr. Then the cells started to use both types of sugar (Tanamool et al., 2011).

Bacterium	PHAs	carbon source	Culture time (h)	Cell conc. (g/l)	PHAs conc. (g/l)	PHAs content (%)	Productivity (g/l·h)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB)	Glucose	50	164	121	76	2.42
<i>A. eutrophus</i>	P(3HB)	CO ₂	40	91.3	61.9	67.8	1.55
<i>A. eutrophus</i>	P(3HB)	Tapioca hydrolysate	59	106	61.9	57.5	1.03
<i>A. eutrophus</i>	P(3HB-co-3HV)	Glucose+ propionic acid	46	158	117	74	2.55
<i>A. latus</i>	P(3HB)	Sucrose	18	143	71.4	50	3.97
<i>Azotobacter vinelandii</i>	P(3HB)	Glucose	47	40.1	32	79.8	0.68
<i>Chromobacterium violaceum</i>	P(3HV)	Valeric acid	-	39.5	24.5	62	-
<i>Methylobacterium organophilum</i>	P(3HB)	Methanol	70	250	130	52	1.68
<i>Protomonas extoquens</i>	P(3HB)	Methanol	170	233	149	64	0.88
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	P(3HB-co-3HO)	n-octane	D=0.2h ⁻³	11.6	2.9	25	0.58
<i>P. oleovorans</i>	P(3HB-co-3HO)	n-octane	38	37.1	12.1	33	0.32
Recombinant <i>Escherichia coli</i>	P(3HB)	Glucose	39	101.4	81.2	80.1	2.08
Rec. <i>Klebsiella aerogenes</i>	P(3HB)	Molasses	32	37	24	65	0.75

Table 2. Production of PHAs by various bacteria and carbon sources (Yamane, 1996)

In Table 2, different carbon sources were evaluated and it was found that each strain produced different amounts of PHAs. For example, *Alcaligenes eutrophus* or *Rastonia eutrophus* prefers to use fructose (Kharana & Srivastava, 2005). *A. latus* is in favour of sucrose (Grothe

Fermentation of Sweet Sorghum into Added Value Biopolymer of Polyhydroxyalkanoates (PHAs)

49

et al., 1999) while *Acetobacter nelsonii* can use glucose (Lin & Sadoff, 1968). Currently, genetic engineering techniques can modify strains such as rec. *E. coli* and rec. *Klebsiella aerogenes* are used to produce PHAs in cheap carbon sources, such as molasses (Slater et al., 1988; Ramachander et al., 2002).

4.2.2 Fed-batch fermentation

Fed-batch fermentation process is a production technique between batch and continuous fermentation. A proper medium feed rate is required to add sequentially into the fermentor during the process and the product is harvested at the end of fermentation just like a batch type.

Fed-batch contains many advantages compared to other cultures. It can be easily concluded that under controllable conditions and with the required knowledge of the microorganism involved in the process, the feed of the required components for growth and/or other substrates are also important due to catabolic repression. The product will never be depleted, the nutritional environment can be maintained approximately constant and the extension of the operating time, high cell concentrations can be achieved and thereby, improve productivity. This is greatly favored in the production of growth-associated products.

Fig. 6 shows a fed batch fermentation of sweet sorghum juice (SSJ) by *Bacillus aryabhattai* in 3-L fermentor under cultivating condition with agitation rate at 200 rpm, air rate of 1.5 l/min, at 30° C and feeding time at 18 and 24 hr during log phase of the culture. It was found that the cell could continuously produce both biomass and PHAs. Maximum cells were obtained at about 14.20 g/l at 54 hr when PHAs content reached 4.84 g/l after 66 hr (Tansamol et al., 2011). In addition, in Table 2 fed batch fermentation by *A. latus* was used for the production of PHAs (Namane et al., 1996; Wang & Lee, 1997). It could yield high productivity with the use of cheap carbon sources.

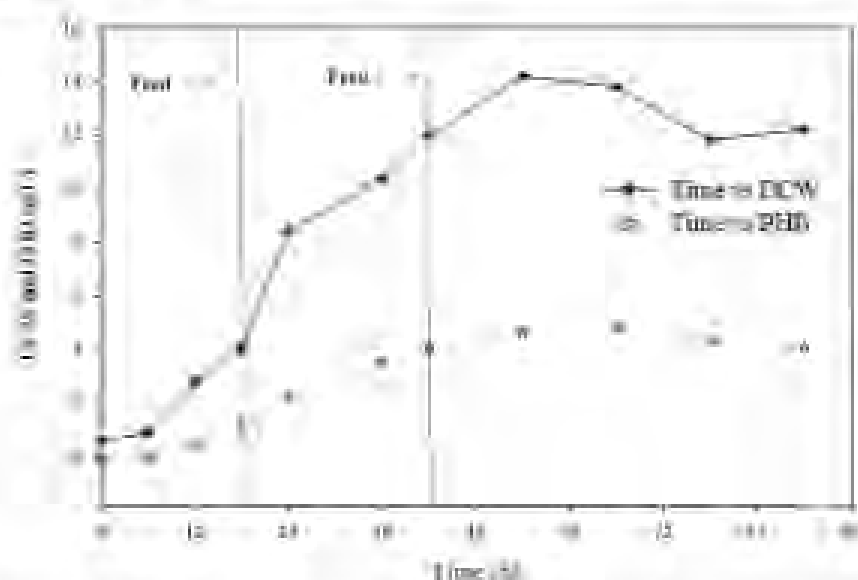


Fig. 6/ Growth monitoring and PHAs production during fed-batch fermentation of sweet sorghum by *Bacillus aryabhattai* in 3 L fermentor (Tansamol et al., 2011)

4.2.3 Continuous fermentation

Continuous fermentation is process in which feeds, containing substrate, culture medium and other requirements, are pumped continuously into the agitated bioreactor where the microorganisms are active. Final product is withdrawn from the upper part of the tank. Typically the process is performed by eliminating the inherent down time for cleaning and sterilization and the long lags before the organisms enter a brief period of high productivity.

However, it should be noted that there is a small percentage of the total time in which productivity rate is near its maximum. It is sometimes possible to maintain very high rates of products for a long time with continuous fermentation. Although it can get much more productivity from the fermentor, enhancement over batch fermentation in terms of the total volume of fermentor is not high because equipment needs to be sterilized to support the continuous tank.

Previously, Yu et al (2005) studied the increase of a co-biopolymer of PHBV by *Ralstonia eutropha* in a continuous stirred tank reactor. It was found that the productivity rate increased when sodium propionate was used as the carbon source. Later, Yezza et al (2007) investigated the use of maple sap as a carbon for PHB production by *A. latus*. The productivity of PHB reached $2.6 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

5. Microorganisms

The majority of PHAs biosynthesis is performed by various microorganisms, especially bacteria. They can produce PHAs from a number of substrates and accumulate in their cells as carbon source and energy reserve under imbalanced growth conditions such as nutrient limitation. Fig.7 shows PHA accumulated in their cells that are characterized by transmission electron microscopic (TEM) technique.

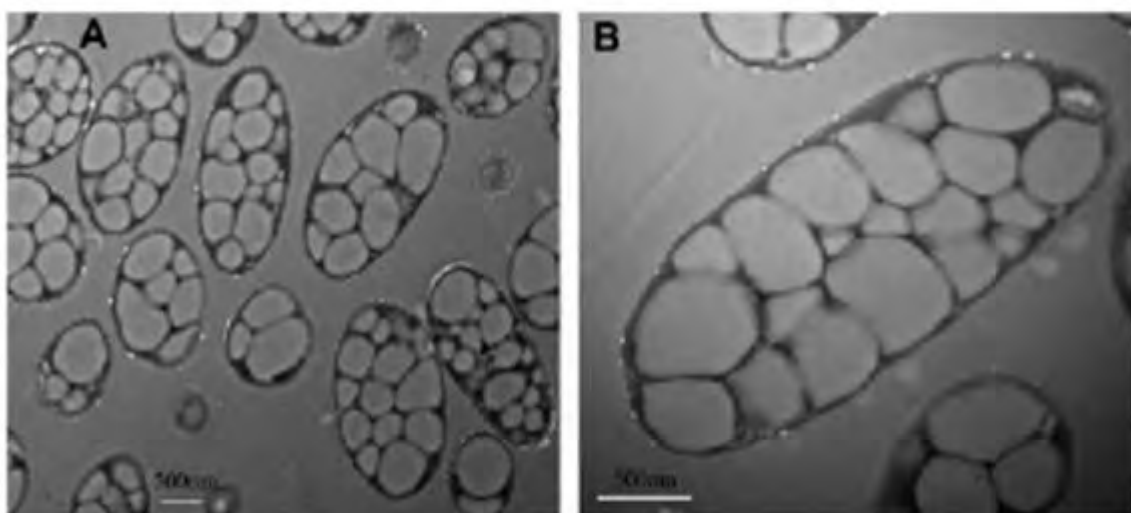


Fig. 7. (A and B) Images of PHAs accumulated in bacteria *Halomonas* TD01 based on transmission electron microscope (TEM) (Tan et al., 2011)

Depending on PHAs accumulation behaviour, microorganisms can be categorized into two groups. The first group requires limitation of some nutrients such as nitrogen or phosphate while there is an excess in carbon. The members of this group belong to *Alcaligenes eutrophus*, (Kaewkannetra et al, 2008), *Cupisavidus necator* (formerly known as *Ralstonia eutropha*) (Kim et al, 1994; Yu et al, 2005) and *Hydrogenophaga* sp. (Yoon & Choi, 1999; Mahmoudi et al, 2010). The second group does not depend on nutritional limitation but can accumulate PHAs during the growth. Examples are *Alcaligenes latus* (Yamane et al, 1996; Yezza, et al, 2007), *Azotobacter vinelandii*, *P. aeruginosa*, (Fernandez et al, 2005), *Bacillus mycoides* (Thakur et al, 2001) and *Escherichia coli*, etc.

5.1 Screening, isolation and identification

Although PHAs obtain interest and are widely studied by many researchers, PHAs production is limited by production cost. A major problem to the commercialization of PHAs is much higher production cost than petrochemical-based synthetic plastic (Luengo, 2003).

Many attempts have been devoted to investigate for reducing the cost of PHAs by the isolation of better bacterial strains from various sources such as sludge from wastewater (Kasemsap & Wantawin, 2007) or marine (Chien et al, 2007) and soil environment (Tanamool et al, 2011) using a simple method that can monitor the accumulation of PHAs. For example, efficient conditions for bacterial PHB production can be found in soil due to its heterogeneous nature. Nitrogen availability in soil varies with microsites. It may become a limiting factor for bacterial growth, especially in some nitrogen-poor (carbon-rich) sites (Thakur, 2001). Accordingly, some PHAs-producing bacterial strains such as *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, and *Acinetobacter*, etc. can be isolated from soil environments.

Several simple methods used for detecting intracellular PHAs granules are applied to the screening of PHA producers such as Sudan Black staining (Anderson & Dawes, 1990) and Nile blue A staining (Wang & Bakken, 1998). The positive result shows a black color or fluorescent granules under microscope. Although these methods are feasible and easy, they are rather time- and labor-consuming due to requirement of environmental isolation. Alternative staining method has recently been developed for directly staining colonies or growing bacteria on plates containing Nile blue A or Nile red (Ostle & Holt, 1982). The dye can be directly diffused into microbial cytoplasm, resulting in fluorescent colonies that can be observed under UV illumination without microscopic observation. It is believed that the colony-staining is a suitable method for screening a large number of microbial strains.

After the samples have been collected from the environment, they are preserved at 4°C to protect against contamination prior to isolation. Recently, Tanamool et al, 2011 explained the primary isolation of soil microbes by serial dilution technique. In short, the soil sample was transferred to nutrient broth (NB) and incubated. Then the culture was diluted in normal saline and spread on nutrient agar (NA). Finally, several single colonies were picked and transferred to mineral salt agar. After incubation, PHAs producing capabilities of the microbes were confirmed by Sudan Black B and Nile blue A staining methods as described by Ostle & Holt, 1982; Wang & Bakken, 1998. Viable colonies were directly observed under UV light and fluorescence to detect the accumulation of PHAs (Spiekermann et al, 1999).

The morphology and biochemical characteristics of the isolate then are observed. The PHAs-producing strains can be identified by sequencing partial sequences of their 16S rDNA as described by Edwards et al. (1989). Fig. 8 shows phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence of the isolate V 33. It was closely related to bacterial strain of *Hydrogenophaga* sp. (99% identity) (Tanamool et al. 2011). Previous studies have reported that *Hydrogenophaga* sp. can be isolated from soil, mud, and water. The strains were gram-negative, rod-shaped cell and yellow pigmented hydrogen-oxidizing bacteria (Willem et al. 1989). They can grow and produce PHAs from various substrates such as glucose, galactose, xylose, arabinose (Choi et al. 1995) whey lactose (Koller et al. 2008) and in fructose (Mahmudi et al. 2010).



Fig. 8. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence of the isolate V 33 (Tanamool et al. 2011)

6. Factors affecting fermentation process

6.1 Microbial strain

Tim & Steinbuchel (1990) studied the mechanisms of *Alcaligenes* spp. and *Rhodospirillum rubrum* for PHB synthesis by using butyric acid. Later, Steinbuchel (1991) confirmed the results for the potential of PHAs production and the compositions of PHAs. Under various microbial strains used, different contents of PHAs were obtained.

Table 3 shows PHAs contents in different weights compared to dry cell mass accumulated in various microorganisms. It was found that *Alcaligenes* spp. contains a maximum of 96% PHAs in its cell.

Microbial strain	Weight/ dry cell mass (%)
<i>Ralstonia eutropha</i> (reclassified <i>Alcaligenes eutrophus</i>)	96
<i>Azospirillum</i>	75
<i>Azotobacter</i>	73
<i>Bagginton</i>	57
<i>Leptothrix</i>	67
<i>Methylocystis</i>	70
<i>Pseudomonas</i>	67
<i>Rhizobium</i>	57
<i>Rhodobacter</i>	80

(Available from [www: http://members.rediff.com/jogam/bp6.htm](http://members.rediff.com/jogam/bp6.htm))

Table 3. Variations of PHAs contents in various microbial strains

Fermentation of Sweet Sorghum Into Added Value Biopolymer of Polyhydroxyalkanoates (PHAs)

53

6.2 Nitrogen sources

Nitrogen sources are a nutrient effect on structure and the accumulation of PHAs in microbial cells. Nitrogen sources compose one limiting factor for microorganisms during cultivation. In 1982, Rhee et al studied the production of PHAs from *A. autrophus*. Variation of nitrogen sources was also studied and the results were summarized in Table 4. Although the microorganisms can be used in the same carbon source, the cell growth and their PHAs products are different when nitrogen sources vary.

Carbon source	Nitrogen source	Cell dry Weight (g/l)	PHAs content (wt%)	PHAs	
				3HB	3HV
Glucose	Yeast extract	3.2	45.2	98.4	1.6
	Urea	1.4	14.8	85.6	14.4
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.8	29.3	93.3	6.7
Sucrose	Yeast extract	1.5	18.9	98.3	1.7
	Urea	1.3	4.0	93.5	6.5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.2	15.1	92.0	8.0
Sorbitol	Yeast extract	3.1	44.8	93.4	6.9
	Urea	1.8	37.2	85.7	14.3
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.7	28.1	93.5	6.5
Mannitol	Yeast extract	3.4	58.7	94.1	5.9
	Urea	2.2	18.2	92.5	7.5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.8	29.0	93.3	6.7
Na-glucuronate	Yeast extract	2.3	34.5	91.9	8.1
	Urea	1.6	5.3	78.1	21.9
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.7	41.1	66.7	13.3

Table 4. Effect of nitrogen sources on PHAs production (Rhee et al, 1992)

6.3 Fermentation time

Timm & Steinbuchel (1990) revealed the production of PHAs by *Pseudomonas aeruginosa*. It was found that when the cell reached to stationary phase, the intracellular PHAs were decreased. Lageveen et al (1998) produced PHAs from n-octane by *Pseudomonas oleovorans*.

It was found that the microorganism has a specific duration for PHAs recovery. However, only some strains can accumulate PHAs along their growth or growth-associated strain.

6.4 Mineral substances

Mineral substances such as phosphorus, sulphur, magnesium, etc. could affect microbial growths in several functions. Phosphorous is assimilated only in form of orthophosphate (H_2PO_4) and it is essential for all microorganisms. Sulphur is incorporated into S-containing amino acid in protein and magnesium functions as a cofactor or effectors for many enzymes in microbial metabolism. Each microbial strain needs nutrients and minerals in different contents due to suitable limitation of nutrients for PHAs-producing microorganism.

6.5 Temperature and pH

Normally, the production of PHAs usually carries on under moderate temperature range of 30-35°C and at pH 6.5-7.0. This condition may be suitable for most PHA3s-producing microbes.

7. PHAs recovery and their properties

After fermentation, subsequent midstream to downstream processes such as cell disruption, centrifugation, extraction and drying will be carried on for product recovery. Fig. 9 shows a white sheet of PHB obtained from fermentation of sweet sorghum juice (SSJ) by *Bacillus aryabhattai*.



Fig. 9. Biopolymer of PHB obtained from *Bacillus aryabhattai*

In Fig. 10 the sheet was then characterized for the properties such as thermal properties of glass temperature (T_g) and melting temperature (T_m) analyzed by Differential Scanning Calorimetric (DSC) analysis. The T_g and T_m of the PHB sheet reached 1.11°C and 167.3°C when compared to the standard PHB (99.5%) where T_g and T_m are at 2.81°C and 176.29°C. Thermal properties of PHB sheet obtained were lower than the standard values of PHB. This implies that the PHB sheet can be easily further used to blend and form with other cheap biopolymers or raw materials by heat treatment during bioplastic production process. In Fig.11 shows the degrading temperatures analyzed by Thermo gravimetric analysis (TGA) in both standard PHB and the PHB sheet. The degradation will be completed at temperature of 450°C for the standard PHB, while the PHB sheet is completely degraded at 300°C. It means that the PHB sheet obtained containing of improved quality that was better than the standard PHB.

In addition, physico-chemical characterization, blending and forming steps need to be fulfilled to get novel biomaterials for replacing conventional plastic in a wide range of further applications. These include packing containers, bottles, wrappings, bags, thin films and disposable items (diapers or feminine hygiene products).

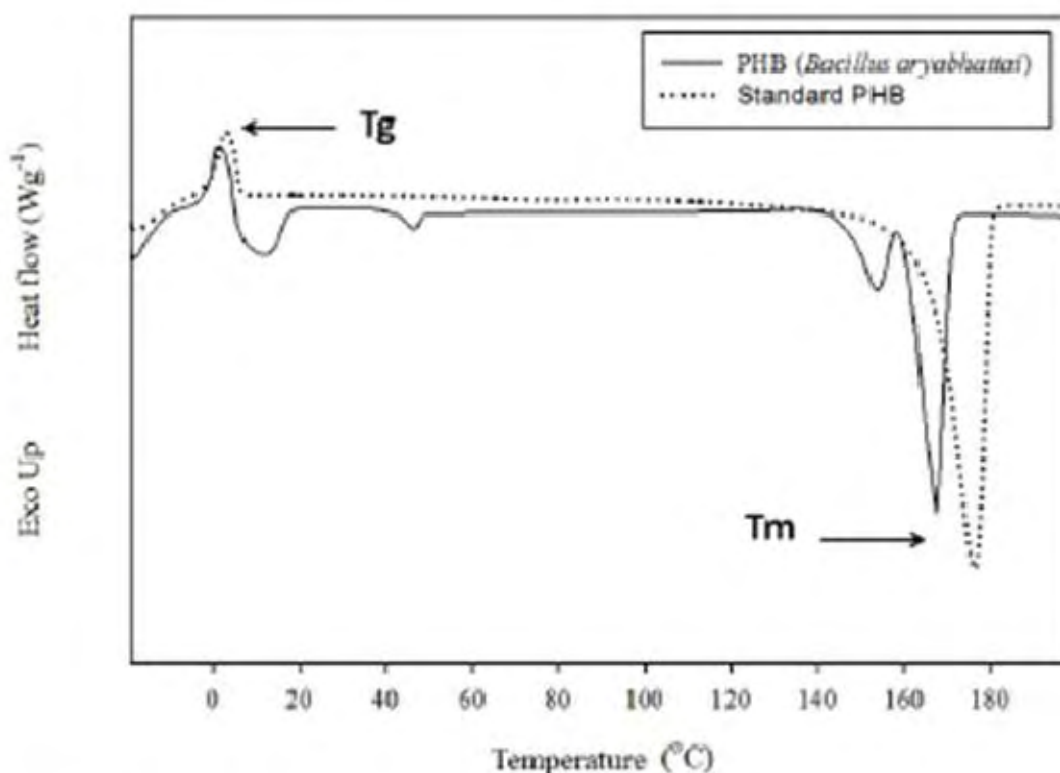


Fig. 10. T_g and T_m of standard PHB and PHB obtained from *Bacillus aryabhattai*

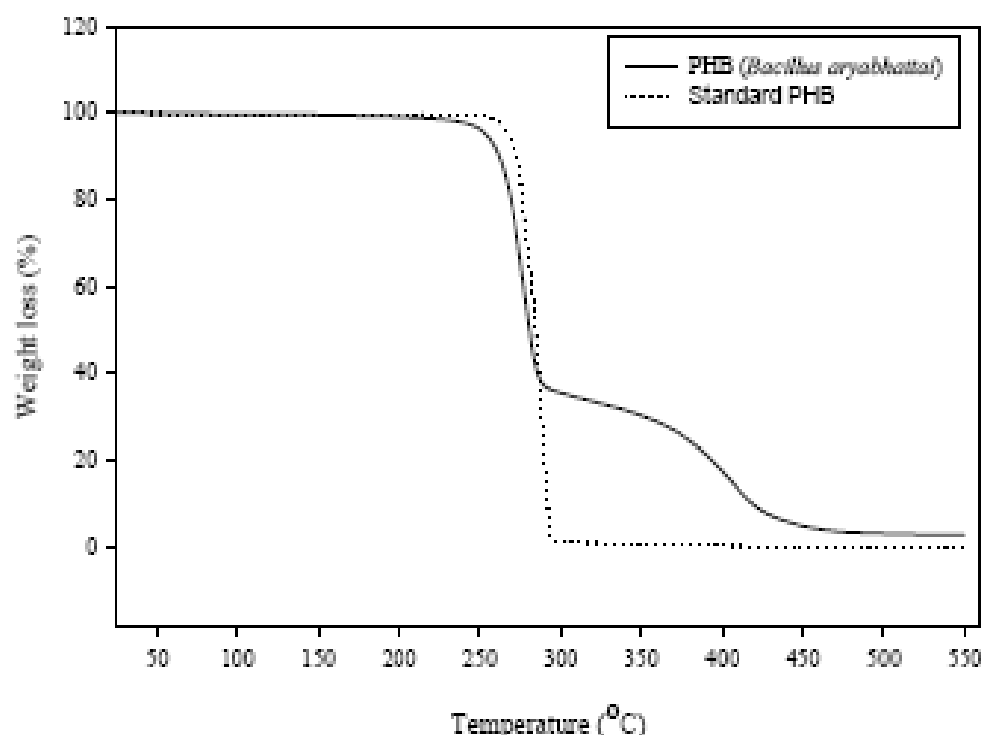


Fig. 11. Thermal degradation temperature of standard PHB and PHB obtained from *Bacillus aryabhattai* by Thermo-gravimetric analysis (TGA)

8. Summary

Although PHAs are being interested and broadly studied by many researchers for a long time, the most important obstacle to commercial application of PHAs is their price. PHAs' production cost is roughly 10 times or more compared to petrochemical-based synthetic plastic materials such as PE and PP. Much attempt has been devoted to reduce the production cost of PHAs in different ways, for example, use of isolated bacterial strains, development of improving strains by genetic techniques such as recombinant DNA of *E. coli* and *Streptomyces aureofaciens* NRRL, controlling a culture condition via various fermentation processes such as batch, fed-batch, repeated-batch/repeated fed-batch, enhancing production via optimization of fermentation process using response surface methodology (RSM), more economical recovery process, and most importantly, the use of cheaper carbon sources.

A novel non-petroleum based biodegradable plastic produced from sugar based agricultural raw materials as sweet sorghum, sugarcane and molasses, having potential properties comparable with conventional or synthetic plastics, is under development and could lower the contribution of plastic wastes to municipal landfills at about 20% of the total waste by volume and 10% by weight and can achieve a satisfactory for the environmental imperative.

Fermentation of Sweet Sorghum Into Added Value Biopolymer of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) 57

The gradual transition towards the biobased economy brings opportunities for 'developing' countries to leapfrog beyond the petroleum era and into a cleaner, greener and more renewable future based on biotechnology knowledge.

9. References

- [1] Alias, Z., Tan, I., 2005. Isolation of palm oil utilizing, polyhydroxyalkanoates (PHA)-bacteria by an enrichment technique. *Bioresour. Technol.* 96, 2729-2734.
- [2] Anderson, A.J., Dawes, E.A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54, 450-472.
- [3] Antonopoulou, G., Gavala, N.H., Skiadas, V.I., Angelopoulos, K., Lyberatos, G., 2008. Biofuel generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Biores. Technol.* 99 (1), 110-119.
- [4] Atlas, R.M., 2006. *Handbook of microbiological media*. 3rd Ed. CRC Press, 2051.
- [5] Blumm, E., Owen, A. J., 1995. Miscibility, crystallization and melting of poly (3-hydroxy butyrate) / poly (L-lactide) blends. *Polymer*. 36, 4077-4081.
- [6] Brauneegg, G., Lefebvre, G., Genser, K. L., 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physio-engineering aspects. *J. Biotechnol.* 65, 127-161.
- [7] Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends Biotechnol.* 5, 246-250.
- [8] Chien, C. C., Chen, C. C., Choi, M. H., Kung, S. S., Wei, Y. H., 2007. Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment. *J. Biotechnol.* 132, 259-263.
- [9] Chen, G.Q. and Wu, Q. 2005. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*. 26: 6565-6578.
- [10] Choi, M. H., Song, J. J., Yoon, S. C., 1995. Biosynthesis of copolyesters by *Hydrogenophaga pseudoflava* from various lactones. *Can. J. Microbiol.* 41, 60-67.
- [11] Edwards, U., Rogall, T., Bocker, H., Emde, M., Bottger, E., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* 17:7843-53. DOI: 10.1093/nat/17.19.7843.
- [12] Evan, J.D., Sikdar, S.K., 1990. Biodegradable plastic; An idea whose time has come. *Chemtech*. 38-42.
- [13] Fernandez, D., Rodriguez, E., Bassas, M., Vinas, M., 2005. Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochem. Eng. J.* 26, 159-167.
- [14] Gao, C., Zhai, Y., Ding, Y., Wu, Q., 2010. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chloralla protothacoides*. *App. Ener.* 87, 756-761.
- [15] Grothe, E., Moo-Young, M., Chisti, Y., 1999. Fermentation optimization for the production of PHB microbial thermoplastic. *Enz. Microb. Tech.* 25, 132-141.
- [16] Ha, C.S., Cho, W.J., 2002. Miscibility, properties, and biodegradability of microbial polyester containing blends. *Prog. Polym. Sci.* 27, 759-809.
- [17] Jacquel, N., Lo, C.-W. (2008) Isolation and purification of bacterial poly (3-hydroxy alkanoates) *Biochemical Engineering Journal*. 39 (1),15-27.

- [18] Kadouri, A., Derenne, S., Largeau, C., Casadevall, E., Berkloff, E., 1998. Resistant biopolymer in the outer walls of *Botryococcus braunii*, Bracc. *Phytochemistry*, 27(2): 551-557.
- [19] Kaewkannetra, P., Tanonkeo, P., Tanamool, V., Imai, I., 2008. Biorefinery of sweet sorghum juice into value added product of biopolymer, *J. Biotechnol.* 136, 8412.
- [20] Kasemsap, C., Wantawin, C., 2007. Batch production of PHA by low-poly phosphate-content activated sludge at varying pH. *Biores. Technol.* 98, 1020-1027.
- [21] Keshavara, T., Roy, I., 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 321-326.
- [22] Khanna, S., Srivastava, A. K. 2005. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*. 40, 2173-2182.
- [23] Kim, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, H.N., Chang, Y.K and Woo, S.L., 1994. Production of polyhydroxybutyrate by fed batch with glucose concentration control in *Ralstonia eutropha*. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 892-898.
- [24] Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Fernandes, E.G., Horvat, P., Kutschera, C., Hesse, P., Braunnegg, G., 2008. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogencora*. *Bioresour. Technol.* 99, 4854-4863.
- [25] Laopaiboon, L., Nuanpeng, S., Srinophakun, P., Klanrit, P., Laopaiboon, P., 2009. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. *Biores. Technol.* 100(18), 4176-4182.
- [26] Law, J.H., Slepecky, R.A., 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *Bacteriol.* 82, 33-36.
- [27] Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., Witholt, B. 1998. Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. *Applied Environmental and Microbiology*, 64, 2924-2932.
- [28] Lemoigne, M., 1926. Produits de dehydration et de polymerization de l'acide -oxybutyric. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 8, 770-782.
- [29] Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., Yesuf, J., Trushenski, J., Blackburn, J.W., 2010. Use of sweet sorghum juice for lipid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Bioresource Technology*, 101, 3623-3627.
- [30] Lin, L.P., Sadoff, H.L. 1968. Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of beta-hydroxybutyrate. *J. Bacterio.* 95 (6), 2336-2343.
- [31] Lee, S.Y., 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 1-14.
- [32] Luengo, J.M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G., Olivera, E.R., 2003. Bioplastics from microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 251-260.
- [33] Mahmoudi, M., Sharifzadeh-Baei, M., Najafpour, G. D., Tabandeh, F., Eisazadeh, H., 2010. Kinetic model for polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Hydrogenophaga pseudoflava* and verification of growth conditions. *Afr. J. Biot.* 9, 3151-3157.
- [34] Mamma, D., Christakopoulos, P., Koullas, D., Kekos, D., Macris, B.J., Koukios, E., 1995. An alternative approach to the bioconversion of sweet sorghum carbohydrates to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 8, 99-103.

Fermentation of Sweet Sorghum Into Added Value Biopolymer of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) 59

- [35] Mizuno, K., Ohta, A., Hyakutake, M., Ichinomiya, Y., Tsuge, T., 2010. Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. *Polym. Degrad. Stab.* 95, 1335-1339.
- [36] Ostle, A., Holt, J.G., 1982. Nile blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Appl. Envi. Microb.* 44, 238-241.
- [37] Ramachander, T.V.N., Rohini, D., Belhekar, A., Rawal, S.K. 2002. Synthesis of PHB by recombinant *E. coli* harboring an approximately 5 kb genomic DNA fragment from *Streptomyces auriofaciens* NRRL 2209. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31 (1-3): 63-69.
- [38] Rhee Y.H., Jang J.H., Roger P.L., 1992. Biopolymer production by an *Alcaligenes* sp. for biodegradation plastics. *Austral. Biotechnol.* 2, 230-232.
- [39] Shi, H., Shiraishi, M. and Shimizu, K., 1997. Metabolic flux analysis for biosynthesis of poly (β -hydroxybutyric acid) in *Alcaligenes eutrophus* from various carbon sources. *J Ferment. Bioeng.* 84, 579-587.
- [40] Sipos, B., Reczey, J., Somorai, Z., Kadar, Z., Dienes, D., Reczey, K., 2009. Sweet Sorghum as Feedstock for Ethanol Production: Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153, 151-162.
- [41] Steinbuchel, A., 1991. Polyhydroxyalkanoic acids. In *Biomaterials*. Edited by D. Byrom. Macmillan Publishers Ltd., Basingstoke. 123-213.
- [42] Slater S. C., Voige W. H., Dennis D. E., 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic Pathway. *Bact.* 170, 4431-4436.
- [43] Spiekermann, P., Rehm, B.H., Kalscheuer, R., Baumeister, D., Stein buchel, A., 1999. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch. Microbiol.* 171, 73-80.
- [44] Steinbuchel, A., Fuchtenbusch, B., 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnology*, 16, 419-27.
- [45] Tanamool, V., Imai, T., Danvirutai, P., Kaewkannetra, P. 2011. Biosynthesis of poly hydroxylalkanoate (PHA) by *Hydrogenophaga* sp. isolated from soil environments during batch fermentation. *J. Life Science. In press.*
- [46] Thakur, P., Borah, B., Baruah, S., Nigam, J., 2001. Growth-associated production of poly- β hydroxybutyrate by *Bacillus mycoides*. *Folia Microbiol.* 46, 488-494.
- [47] Timm, A., Steinbuchel, A. 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length β -hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Applied Environmental Microbiology*, 56, 3360-3367.
- [48] Tsuge, T., Shimoda, M., Ishizaki, A., 1999. Optimization of L-Lactic acid feeding for the production of poly-D- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in fed-batch culture. *J Biosci. Bioeng.* 8, 404-409.
- [49] Wang, F., Lee, S. Y., 1997. Poly (β -Hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *App. Envi. Microb.* 63, 3703-3706.
- [50] Wang, J. G., Bakken, L. R., 1998. Screening of soil bacteria for PHB production and its role in the survival of starvation. *Microb. Eco.* 35, 94-101.

- [51] Willem, A., Busse, J., Goor, M., Pot, B., Falsen, E., Janzent, E., Hoste, B., Gillis, M., Kersters, K., Auling, G., De-Ley, J., 1989. *Hydrogenophaga*, a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *H. flava* comb. nov. (formerly *Pseudomonas flava*), *H. palleronii* (formerly *Pseudomonas palleronii*), *H. pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava* and *P. carboxydoflava*), *H. taeniospiralis* (formerly *P. taeniospiralis*). *Sys. Bacteriol.* 39, 319-333.
- [52] Yamane, T., 1996. Yield of poly-D-(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. *Biotechnol Bioeng.* 41, 165-170.
- [53] Yamane, Y., Fukunaga, M. and Lee, Y.W., 1996. Increased PHB productivity by high-cell- density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associate PHB producer. *Biotechnol. Bioeng.* 50, 197-202.
- [54] Yezza, A., Halasz, A., Levadoux, W., Hawari, J., 2007. Production of PHB by *Alcaligenes latus* from maple sap. *Appl. Microb. Biot.* 77, 269-274.
- [55] Yoon, S. C., Choi, M. H., 1999. Local sequence dependence of polyhydroxyalkanoic acid degradation in *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Bio. Chem.* 274, 37800-37808.
- [56] Yu, S.T., Lin, C.C., Too, J.R., 2005. PHBV production by *Ralstonia eutropha* in a continuous stirred tank reactor. *Proc. Biochem.* 40, 2729-2734.
- [57] Zhao Y.H., Li H.M., Qin L.F., Wang H.H., Chen G.Q., 2007. Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiology Letters.* 276(1): 34-41.