



การผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตจากผักตบชวาไฮโดรไลเซต



โดย

นางสาวนภัสสรณ์ วิทิตสุวรรณกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร





การผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตจากผักตบชวาไฮโดรไลเซท



โดย
นางสาวนภััสสรณ์ วิทิตสุวรรณกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

PRODUCTION OF POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) FROM WATER HYACINTH
(*EICHHORNIA CRASSIPES* (MART.) SOLMS) HYDROLYSATE



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)
Department of BIOTECHNOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2020
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรตจากผักตบชวาไฮโดรไลเซท
โดย	นภัสสรณ์ วิทิตสุวรรณกุล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพีริย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา วัฒนการุณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ชนก จตุรพีริย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สินธุ์วัฒน์ ฤทธิธรรม)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อดิศักดิ์ จตุรพีริย์)

59401203 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต, พลาสติกชีวภาพ, ผักตบชวา, ไฮโดรไลเซท

นางสาว นกัสนธรณ์ วิทิตสุวรรณกุล: การผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจากผักตบชวาไฮโดรไลเซท อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) เป็นพลาสติกชีวภาพที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้น แล้วเก็บสะสมภายในแกรนูล เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรอง PHB มีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเลียมชนิดพอลิโพรพิลีน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิต PHB โดยใช้ผักตบชวาไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพผักตบชวาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB จากผักตบชวาไฮโดรไลเซท (ทั้งชนิดของแหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน) ผลการศึกษาพบว่า การปรับสภาพผักตบชวาด้วยไฮเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เป็นสภาวะที่ดีที่สุด สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซิสได้ถึง 5.47 เท่า เมื่อประเมินหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB โดย *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 พบว่า yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผักตบชวาไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอน ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 20:4 และในการศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ได้ปริมาณ PHB สูงสุด 1.22 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 32 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ซึ่งได้ผลได้ของ PHB และอัตราการผลิตเชิงปริมาณ PHB เท่ากับ 0.366 กรัมต่อกรัม และ 0.038 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำ PHB ที่ผลิตได้ ไปตรวจสอบคุณสมบัติด้วยเทคนิค ^1H NMR, FTIR และ DSC พบว่า มีโครงสร้างทางเคมีเหมือนกับ PHB ในทางการค้า และมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 174.6 องศาเซลเซียส จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ผักตบชวาไฮโดรไลเซทสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพ เพื่อผลิต PHB ได้

59401203 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : Polyhydroxybutyrate, Bioplastic, Water hyacinth, Hydrolysate

MISS NAPASSORN WITITSUWANKUL : PRODUCTION OF POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) FROM WATER HYACINTH (*EICHHORNIA CRASSIPES* (MART.) SOLMS) HYDROLYSATE THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR PHIMCHANOK JATURAPIREE, Dr. nat. techn.

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a bioplastic which is synthesized from microorganisms and accumulated as storage granules for used as an energy reserve. PHB has properties comparable to petroleum-derived plastics, i.e. polypropylene. This research aimed to study PHB production using the water hyacinth hydrolysate as a potential renewable carbon source. This included the optimal pretreatment condition of water hyacinth to facilitate enzymatic saccharification, and optimization of culture conditions (nitrogen source and C/N ratio). Results indicated that the optimal pretreatment condition which had 2% (w/v) NaOH with autoclaving at 121°C and 15 psi for 30 min was increased the enzymatic hydrolysis efficiency up to 5.47-fold. The optimum conditions for PHB production by *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 were obtained using yeast extract as a nitrogen source with C/N ratio of 20:4. The PHB production in a bioreactor gave the maximum PHB concentration of 1.22 g/L after 32 h cultivation. The PHB yield and volumetric productivity was found to be 0.366 g/g and 0.038 g/L/h, respectively. The produced PHB was further characterized using ¹H NMR, FTIR and DSC analysis, and revealed that its chemical structure was similar to that of commercial PHB with the melting temperature of 174.6°C. This study shows that the water hyacinth hydrolysate is a potential carbon source for PHB production.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ซึ่งได้ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะ และความช่วยเหลือ พร้อมทั้งตรวจทานวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้ถูกต้องจนเสร็จสมบูรณ์ และประสบความสำเร็จไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา วัฒนการุณ ประธานกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สินธุ์วัฒน์ ฤทธิธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อดิศักดิ์ จตุรพิริย์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ เป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำแนะนำเพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ทุกท่านที่ได้ให้คำปรึกษา และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในครั้งนี้ตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชา และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาที่ได้อำนวยความสะดวก ให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี ตลอดจนความสะดวกในการดำเนินการด้านเอกสารต่างๆ จนกระทั่งงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และขอขอบคุณครอบครัว ที่เป็นกำลังใจสำคัญ และสนับสนุนในทุกด้านเสมอมา จึงทำให้การศึกษาวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ คำแนะนำที่ดี และเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปี 2561

นภัสสรณ์ วิทิตสุวรรณกุล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ของงานวิจัย.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 พอลิไฮดรอกซีอัลคานอยด์ (polyhydroxyalkanoates: PHAs).....	3
2.2 พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutyrate: PHB).....	4
2.3 การสังเคราะห์ PHB จากจุลินทรีย์.....	5
2.4 คุณสมบัติของ PHB.....	7
2.5 การประยุกต์ใช้ PHB ในด้านต่างๆ.....	7
2.5.1 ด้านบรรจุภัณฑ์.....	8
2.5.2 ด้านการแพทย์.....	8
2.6 การย่อยสลาย PHB.....	10
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิต PHB.....	11

2.7.1 แหล่งคาร์บอน	11
2.7.2 แหล่งไนโตรเจน	14
2.7.3 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน	16
2.8 การผลิต PHB โดยกระบวนการหมัก (Production of PHB by Fermentation Process) 20	
2.9 วัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic wastes)	22
2.9.1 องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลส	23
• เซลลูโลส (cellulose).....	23
• เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose).....	24
• ลิกนิน (lignin)	25
2.10 กระบวนการปรับสภาพ (pretreatment).....	25
2.10.1 การปรับสภาพทางกายภาพ (physical pretreatment).....	26
• การใช้แรงทางกล (mechanical communiton).....	26
• การแยกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis).....	26
2.10.2 การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี (physico-chemical pretreatment).....	26
• การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion : autohydrolysis).....	26
• การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion, AFEX)	27
• การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO ₂ explosion).....	28
• การปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave pretreatment).....	28
2.10.3 การปรับสภาพทางเคมี (chemical pretreatment).....	28
• การทำปฏิกิริยากับโอโซน (ozonolysis).....	28
• การปรับสภาพด้วยกรด (acid pretreatment)	29
• การปรับสภาพด้วยด่าง (alkaline pretreatment)	30
• การกำจัดลิกนินโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative delignification)	30

● การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organosolv process).....	31
2.10.4 การปรับสภาพทางชีวภาพ (biological pretreatment)	31
2.11 การไฮโดรไลซ์เซลลูโลสด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis of cellulose)	32
2.11.1 เซลลูเลส (cellulase).....	32
2.12 ผักตบชวา (water hyacinth).....	33
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	37
3.1 การเตรียมผักตบชวา.....	37
3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพผักตบชวา.....	37
3.2.1 การปรับสภาพด้วยต่างเจือจาง	37
3.2.2 การปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง.....	37
3.3 การไฮโดรไลซิสผักตบชวาด้วยเอนไซม์ (ดัดแปลงจาก Ruangmee (2012)).....	38
3.4 การเตรียมกล้าเชื้อ	38
3.5 การศึกษาสภาวะการผลิต PHB.....	38
3.5.1 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB.....	38
3.5.2 การศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อ การผลิต PHB.....	38
3.6 การศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ	39
3.7 การสกัดแยก PHB.....	39
3.8 การศึกษาคุณลักษณะของพอลิเมอร์.....	39
3.8.1 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer; NMR).....	39
3.8.2 การวิเคราะห์ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FTIR).....	40
3.8.3 การวิเคราะห์ด้วยดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential Scanning Calorimetry; DSC).....	40

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ	40
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	41
4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผักตบชวา.....	41
4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพผักตบชวา.....	42
4.3 การไฮโดรไลซิสผักตบชวากับด้วยเอนไซม์	46
4.4 การผลิต PHB จากผักตบชวาไฮโดรไลเซต	50
4.5 การศึกษาสภาวะการผลิต PHB.....	52
4.5.1 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB	52
4.5.2 ผลของอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการ ผลิต PHB.....	55
4.6 การศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ	57
4.7 การศึกษาคุณลักษณะของ PHB.....	59
4.7.1 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer; NMR)	59
4.7.2 การวิเคราะห์ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FTIR).....	61
4.7.3 การวิเคราะห์ด้วยดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential Scanning Calorimetry; DSC).....	63
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	64
รายการอ้างอิง	65
ภาคผนวก.....	76
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย	77
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานและการคำนวณ	80
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผักตบชวา.....	90
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์กิจกรรมเซลลูเลส	93

ภาคผนวก จ ข้อมูลผลการทดลอง 95

ประวัติผู้เขียน 116



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สมบัติของ PHB เทียบกับ PP.....	7
ตารางที่ 2 การผลิต PHB จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	18
ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของผักตบชวา.....	41
ตารางที่ 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยเซลลูเลสที่เวลา 24 ชั่วโมง.....	49
ตารางที่ 5 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน.....	55
ตารางที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงของความหนาแน่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร.....	80
ตารางที่ 7 น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ในอัตราส่วนเจือจางต่างๆ.....	81
ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคสมาตรฐาน ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร.....	82
ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงของ PHB มาตรฐาน ที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร.....	88
ตารางที่ 10 ส่วนประกอบในหลอดควบคุม (blank), หลอดควบคุมสารตั้งต้น (substrate blank, SB) และหลอดควบคุมเอนไซม์ (enzyme blank, EB) สำหรับหากิจกรรมเซลลูเลส.....	93
ตารางที่ 11 ปริมาตรเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ.....	82
ตารางที่ 12 ปริมาตรเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อน้ำความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที.....	83
ตารางที่ 13 ปริมาตรเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อน้ำความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที.....	84
ตารางที่ 14 ปริมาตรเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดย	

มวลต่อปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที.....	85
ตารางที่ 15 ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที.....	86
ตารางที่ 16 ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที	87
ตารางที่ 17 ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที	88
ตารางที่ 18 ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที	89
ตารางที่ 19 ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที	90
ตารางที่ 20 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยเซลลูเลส ที่ระยะเวลาต่างๆ	91
ตารางที่ 21 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเซลลูเลส ที่ระยะเวลาต่างๆ	93

- ตารางที่ 22 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสผักตบชวาด้วยเซลลูเลส ที่เวลา 24 ชั่วโมง..... 95
- ตารางที่ 23 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชนิดของแหล่งคาร์บอน จากการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 95
- ตารางที่ 24 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ จากการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 96
- ตารางที่ 25 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่างๆ จากการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 97
- ตารางที่ 26 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะจากการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 ± 4 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 44 ชั่วโมง 98
- ตารางที่ 27 ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และปริมาณ PHB สะสม (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ จากการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 ± 4 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 44 ชั่วโมง..... 100



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ PHAs.....	4
รูปที่ 2 ลักษณะของจุลินทรีย์ที่สะสม PHB ในแกรนูลของ (A) <i>Bacillus cereus</i> ND153, (B) <i>Bacillus cereus</i> ND97, (C) <i>Yangia pacifica</i> QN187 และ (D) <i>Yangia pacifica</i> QN271 ส่องโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	5
รูปที่ 3 วิธีการสังเคราะห์ PHB	6
รูปที่ 4 อุปกรณ์การแพทย์ที่ทำจาก PHB (A) เอ็นเย็บแผลผ่าตัดย่อยสลายทางชีวภาพ (B) สกรูย่อยสลายทางชีวภาพและแผ่นสำหรับยึดกระดูกอ่อนและกระดูก (C) เยื่อย่อยสลายทางชีวภาพสำหรับการรักษาโรคปริทันต์ และ (D) ตาข่ายผ่าตัด PHB แบบบริสุทธ์ (ซ้าย) ตาข่ายผ่าตัดแบบผสมกับยาต้านเกล็ดเลือด (dipyridamole) (ขวา).....	9
รูปที่ 5 ไมโครสเฟียร์ที่ทำจาก PHB สำหรับเพื่อการนำส่งยาต่อเนื่อง (A) ไมโครสเฟียร์ที่ทำจาก PHB ที่บรรจุ dipyridamole ปริมาณร้อยละ 10 โดยมวล โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 60 μm มวลโมเลกุลของ PHB 1,000 kDa และ (B) การนำส่งยา dipyridamole จาก ไมโครสเฟียร์ที่ทำจาก PHB ระยะเวลามากกว่า 1 เดือน	9
รูปที่ 6 การย่อยสลายขวดที่ผลิตจาก PHBV ในภาคตะกอนจุลินทรีย์ แบบแอโรบิก ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส กระบวนการย่อยสลายเกิดขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์ (เรียงจากซ้ายไปขวา)	10
รูปที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส	23
รูปที่ 8 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสแบบอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน	24
รูปที่ 9 โครงสร้างของ (a) coniferyl alcohol (b) sinapyl alcohol และ (c) <i>p</i> -coumaryl alcohol.....	25
รูปที่ 10 องค์ประกอบทางเคมีของลิกโนเซลลูโลส	26
รูปที่ 11 ลักษณะของต้นผักตบชวา และดอกผักตบชวา.....	34
รูปที่ 12 องค์ประกอบของผักตบชวาที่ถูกปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1, 1.5 และ 2 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อนิ่งความ	

ดินไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที.....	45
รูปที่ 13 องค์ประกอบของผักตบชวาที่ถูกปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1, 1.5 และ 2 โดยปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที.....	46
รูปที่ 14 ระยะเวลาการไฮโดรไลซิสผักตบชวาผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที และผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยเซลล์ลูเลสที่ความเข้มข้น 15 FPU ต่อกรัมของสารตั้งต้น	48
รูปที่ 15 โครมาโทรแกรมของไฮโดรไลเซทจากผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการไฮโดรไลซิสด้วยเซลล์ลูเลส	48
รูปที่ 16 โครมาโทรแกรมของไฮโดรไลเซทจากผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการไฮโดรไลซิสด้วยเซลล์ลูเลส.....	49
รูปที่ 17 ชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร), ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และ ปริมาณ PHB สะสม (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง) จากการเพาะเลี้ยง <i>R. eutropha</i> NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	51
รูปที่ 18 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณเซลล์ (A) ปริมาณ PHB (B) และปริมาณ PHB สะสม (C) จากการเพาะเลี้ยง <i>R. eutropha</i> NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....	53
รูปที่ 19 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณเซลล์ (A) ปริมาณ PHB (B) และปริมาณ PHB สะสม (C) จากการเพาะเลี้ยง <i>R. eutropha</i> NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	56
รูปที่ 20 ปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร), ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร), ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และปริมาณ PHB สะสม (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง) จากการเพาะเลี้ยง <i>R. eutropha</i> NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37±4 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm	58

รูปที่ 21	สเปกตรัม ^1H NMR ของ PHB ที่ผลิตโดย <i>R. eutropha</i> NCIMB 11599	60
รูปที่ 22	สเปกตรัม ^1H NMR ของสารมาตรฐาน PHB.....	60
รูปที่ 23	สเปกตรัม IR ของ PHB ที่ผลิตโดย <i>R. eutropha</i> NCIMB 11599	62
รูปที่ 24	สเปกตรัม IR ของสารมาตรฐาน PHB.....	62
รูปที่ 25	เทอร์โมแกรม DSC ของ PHB ที่ผลิตโดย <i>R. eutropha</i> NCIMB 11599	63
รูปที่ 26	กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight).....	81
รูปที่ 27	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS	83
รูปที่ 28	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกลูโคส ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร	84
รูปที่ 29	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยเครื่อง HPLC	85
รูปที่ 30	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานมอลโทส ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร.....	86
รูปที่ 31	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณมอลโทสด้วยเครื่อง HPLC.....	86
รูปที่ 32	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ PHB.....	89
รูปที่ 33	สีของสารละลายตัวอย่างก่อนไตเตรตกับสารละลายเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟต (ซ้าย) สีของสารละลายตัวอย่างหลังไตเตรตกับสารละลายเฟอร์ริสแอมโมเนียซัลเฟต โดยเปลี่ยนจากสีเหลืองอมส้มเป็นสีน้ำตาลอมม่วง (ขวา)	91

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์พลาสติกมีแนวโน้มการใช้งานเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิตเป็นเครื่องมือต่างๆ ได้ และด้วยคุณสมบัติที่คงทน แข็งแรง น้ำหนักเบา มีราคาถูก และสามารถขึ้นรูปได้ตามความต้องการ โดยพลาสติกเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี สามารถผลิตได้ปริมาณมากในระยะเวลาสั้น และมีต้นทุนที่ต่ำ (Anjum *et al.*, 2016) จึงทำให้พลาสติกเป็นที่ยอมรับและมีความต้องการใช้งานเพิ่มขึ้น แต่ความต้องการที่เพิ่มขึ้นนั้นส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยพลาสติกที่ใช้แล้วถูกทิ้งเป็นขยะพลาสติก ซึ่งยากต่อการกำจัด ต้องใช้เวลาในการย่อยสลาย (Porier *et al.*, 1995) พลาสติกชีวภาพจึงเป็นทางเลือกที่ได้รับความสนใจมากขึ้น ในฐานะพลาสติกเพื่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้เอง (Sudesh *et al.*, 2000) ไม่ทิ้งสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถใช้ผลิตผลทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเม็ดพลาสติกชีวภาพ พลาสติกชีวภาพสามารถผลิตขึ้นได้จากจุลินทรีย์ที่พบได้ตามธรรมชาติจากแหล่งวัตถุดิบทางธรรมชาติ และพลาสติกชีวภาพกำลังได้รับความสนใจอย่างมาก เช่น พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid: PLA), พอลิคาโพรแลคโตน (polycaprolactone: PCL) และพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates: PHAs) โดยทั่วไปมักพบ PHAs ชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutyrate: PHB) ที่สามารถสังเคราะห์จากจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด และสะสม PHB ไว้ภายในเซลล์ PHB มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน (Schlegel *et al.*, 1961) และเป็นชนิดที่พบมากที่สุด ในธรรมชาติ ซึ่งจัดเป็นพลาสติกชีวภาพประเภทพอลิเอสเตอร์ (polyester) ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเลียมชนิดพอลิโพรพิลีน (polypropylene : PP) (Yousuf and Winterburn, 2016) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก สามารถนำมาทำเป็นฟิล์ม เส้นใย หรือนำมาหลอมรวมเป็นภาชนะต่างๆ อย่างไรก็ตาม การผลิต PHB ยังคงประสบปัญหาในเรื่องของต้นทุนการผลิตที่สูง (Du *et al.*, 2012; Lenz and Marchessault, 2005) โดยต้นทุนการผลิต PHB อยู่ระหว่าง 3.1- 4.4 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ในขณะที่ต้นทุนการผลิต PP น้อยกว่า 1 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม (Naranjo *et al.*, 2013) ซึ่งร้อยละ 50 ของต้นทุนการผลิต PHB มาจากต้นทุนของสารตั้งต้น โดยประมาณร้อยละ 70-80 ของต้นทุนของสารตั้งต้นมาจากแหล่งคาร์บอน (Wang *et al.*, 2013) จึงยังคงเป็นอุปสรรคในการเติบโตของอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพในปัจจุบัน ดังนั้น จึงต้องหาวิธีการลดต้นทุนการผลิต โดยใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก (Annamalai *et al.*, 2014; Khanna and Srivastava, 2005)

โดยประเทศไทยนั้นมีวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสจำนวนมาก ลิกโนเซลลูโลสจึงเป็นทางเลือกในการนำมาเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตสารชีวภาพที่มีมูลค่าสูง เช่น เอทานอล (Wyman, 2001) โดยในการนำวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นสารตั้งต้นจำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบ (Yang and Wyman, 2008) เพื่อทำลายโครงสร้างที่แข็งของลิกโนเซลลูโลส ทำให้เอนไซม์สามารถเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ได้ (Borah *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2014) โดยในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีการปรับสภาพผักตบชวาที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการผลิต PHB โดยใช้ผักตบชวาไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอน รวมทั้งศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB สำหรับการศึกษการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และนำ PHB ที่ผลิตได้มาศึกษาคุณสมบัติ เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพของพลาสติกชีวภาพ และเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิต PHB ในภาคอุตสาหกรรม

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาการผลิต PHB จากจุลินทรีย์ โดยใช้ผักตบชวาไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอน และตรวจสอบคุณสมบัติของ PHB ที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. เปรียบเทียบวิธีการปรับสภาพผักตบชวด้วยวิธีทางเคมี ได้แก่ การใช้ต่างเจือจาง และกรดเจือจาง
2. ศึกษาการไฮโดรไลซ์ผักตบชวด้วยเซลลูเลส
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ แหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยใช้ผักตบชวาไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอน
4. ศึกษาการผลิต PHB จากผักตบชวาไฮโดรไลเซตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ
5. ตรวจสอบคุณสมบัติของ PHB ที่ผลิตได้ ได้แก่ การศึกษาโครงสร้างของพอลิเมอร์ และการศึกษาคุณสมบัติทางความร้อน เป็นต้น

1.4 ประโยชน์ของงานวิจัย

สามารถใช้วัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพลาสติกชีวภาพ และทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHB ของจุลินทรีย์ เพื่อเป็นแนวทางในการผลิต และลดต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพในภาคอุตสาหกรรม และยังช่วยลดผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อมด้วย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates: PHAs)

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates: PHAs) เป็นพอลิเอสเทอร์แบบกึ่งผลึก จัดเป็นเทอร์โมพลาสติก (thermoplastics) ชนิดหนึ่ง สามารถนำมาขึ้นรูปเป็นฟิล์ม เส้นใยได้ (Brandl *et al.*, 1990) โดย PHAs สามารถผลิตจากกระบวนการที่ใช้น้ำตาลจากวัสดุทางธรรมชาติ เป็นสารตั้งต้นสำหรับการเลี้ยงจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะควบคุม โดยจุลินทรีย์จะสังเคราะห์ PHAs และสะสมไว้ในเซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนในสภาวะเครียดต่อสิ่งแวดล้อม หรือสภาวะที่ขาดความสมดุลในการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ในสภาวะแวดล้อมที่มีไนโตรเจน ออกซิเจน หรือฟอสเฟตอยู่จำกัด (Anderson and Dawes, 1990; Lee, 1996) ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้ พบได้ในแบคทีเรียหลายชนิด ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยสารอาหารและจุลินทรีย์ที่ต่างกันสามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างทางเคมีต่างกัน เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) และพอลิไฮดรอกซีวาเลอเรต (PHV) โดย PHAs สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติโดยเอสเทอเรส (esterase) และดีพอลิเมอร์เรส (depolymerase) ในจุลินทรีย์ เมื่อผ่านกระบวนการย่อยสลายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ซึ่งไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และวิธีการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHAs ทำได้โดยใช้เทคนิคการย้อมด้วย Sudan Black B (Schlegel *et al.*, 1961) หรือ Nile Blue A (Ostle and Holt, 1982)

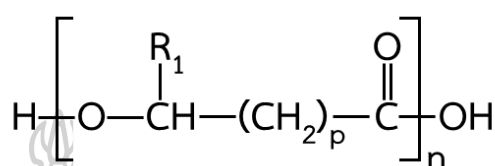
โครงสร้างของ PHAs เป็นพอลิเอสเทอร์สายตรง สูตรโครงสร้างของ PHAs จะมีโครงสร้างสายหลักเป็น 3-กรดไฮดรอกซีอัลคาโนอิก (3-hydroxyalkanoic acid) แต่จะมีหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกันตรงตำแหน่งปีต้าคาร์บอน (β -carbon) ทำให้เกิดเป็น PHAs ชนิดต่างๆ แสดงดังรูปที่ 1 ซึ่งในธรรมชาติจะพบ PHAs ในรูปของ PHB มากที่สุด โดย PHAs สามารถจำแนกตามความยาวของสายพอลิเมอร์ สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท (Kavitha *et al.*, 2018) ได้แก่

Short chain length PHAs (scl-PHAs) ประกอบด้วย PHAs ที่มีความยาวของคาร์บอน 3-5 อะตอม เช่น พอลิไฮดรอกซีโพรพิโอเนต (polyhydroxypropionate: PHP), พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) และพอลิไฮดรอกซีวาเลอเรต (polyhydroxyvalerate: PHV) โดยจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ scl-PHAs ได้ เช่น *Ralstonia eutropha* (*Cupriavidus necator*) และ *Alcaligenes latus* เป็นต้น

Medium chain length PHAs (mcl-PHAs) ประกอบด้วย PHAs ที่มีความยาวของคาร์บอน 6-14 อะตอม เช่น พอลิไฮดรอกซีเฮกซะโนเอต (polyhydroxyhexanoate: PHHx),

พอลิไฮดรอกซีออกตะโนเอต (polyhydroxyoctanoate: PHO) และพอลิไฮดรอกซีเดคะโนเอต (polyhydroxydecanoate: PHD) เป็นต้น โดยจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ mcl-PHAs ได้ เช่น *Pseudomonas putida* เป็นต้น

Long chain length PHAs (lcl-PHAs) ประกอบด้วย PHAs ที่มีความยาวของคาร์บอน 15 อะตอมขึ้นไป เช่น พอลิไฮดรอกซีเฮกซะเดคะโนเอต (polyhydroxyhexadecanoate: PHHD) และพอลิไฮดรอกซีออกตะเดคะโนเอต (polyhydroxyoctadecanoate: PHOD) เป็นต้น



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ PHAs

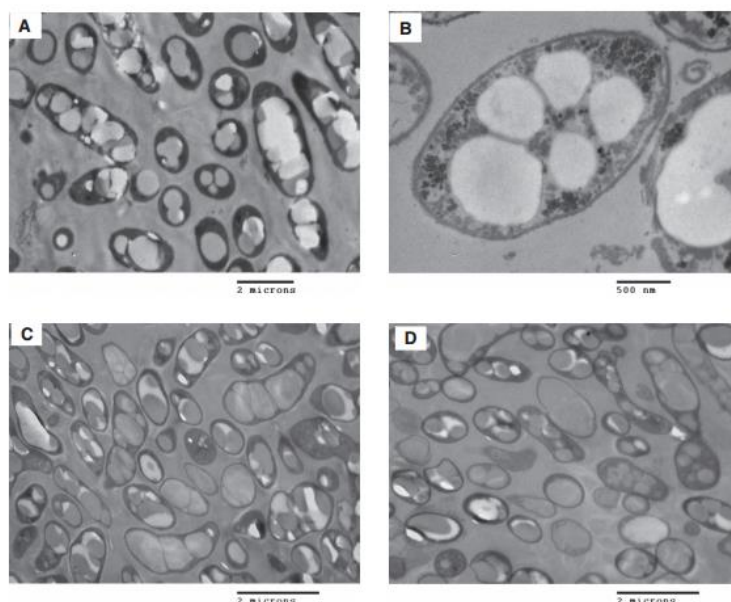
เมื่อ $p = 1$

R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ	PHP
R = เมทิล (CH ₃)	สารนี้คือ	PHB
R = เอทิล (C ₂ H ₅)	สารนี้คือ	PHV
R = โพรพิล (C ₃ H ₇)	สารนี้คือ	PHHx
R = เพนทิล (C ₅ H ₁₁)	สารนี้คือ	PHO
R = โนนิล (C ₉ H ₁₉)	สารนี้คือ	PHD

2.2 พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutyrate: PHB)

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutyrate: PHB) ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1926 ที่ได้จาก การสกัดจาก *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926) จัดเป็นอนุพันธ์ของ PHAs ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ประเภทอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyester) มีโครงสร้างเป็นสายยาวจากการศึกษาพบว่า PHB ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอน และเป็นแหล่งพลังงานให้แก่จุลินทรีย์ โดยเก็บสะสมไว้ในแกรนูลภายในเซลล์ เปรียบเสมือนไกลโคเจนที่สะสมอยู่ในสัตว์ชั้นสูง หรือแป้งที่สะสมอยู่ในพืช (Bloembergen *et al.*, 1986) PHB ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นก้อนกลมๆ คล้ายไขมัน ลอยอยู่ในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 2) คิดเป็นร้อยละ 90 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Schlegel *et al.*, 1961) หลังจากจุลินทรีย์ตาย เซลล์จะแตกและปลดปล่อย PHB ออกมา (Doi, 1995) จากการศึกษาที่ผ่านมา พบ

จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHB ได้หลายสายพันธุ์ เช่น *Ralstonia eutropha* (เดิมเรียกว่า *Alcaligenes eutrophus*, *Wautersia eutropha* หรือ *Cupriavidus necator*), *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Halomonas* sp., *Haloferax* sp., *Aeromonas* sp., *Methylobacterium* sp., *Thermus thermophilus*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Saccharophagus degradans*, *Comamonas* sp., *Alcaligenes latus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Zobellella denitrificans*, *Cyanobacteria*, *Chromobacterium* sp., *Erwinia* sp. และ recombinant *E. coli* sp. เป็นต้น (Anjum et al., 2016)



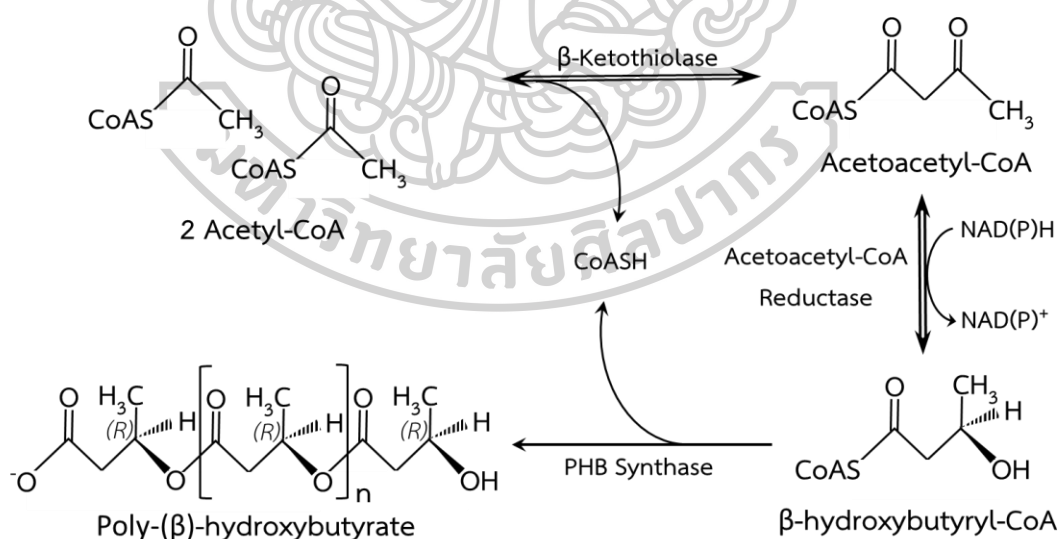
รูปที่ 2 ลักษณะของจุลินทรีย์ที่สะสม PHB ในแกรนูลของ (A) *Bacillus cereus* ND153, (B) *Bacillus cereus* ND97, (C) *Yangia pacifica* QN187 และ (D) *Yangia pacifica* QN271 ส่องโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

ที่มา : Van-Thuoc et al. (2012)

2.3 การสังเคราะห์ PHB จากจุลินทรีย์

การสังเคราะห์ PHB จะเกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์เจริญเติบโตผ่านเข้าสู่ระยะคงตัว (stationary phase) และอยู่ภายใต้สภาวะเครียดต่อสิ่งแวดล้อม หรือสภาวะที่ขาดแร่ธาตุที่สำคัญในการเจริญเติบโต เช่น ในสภาวะแวดล้อมที่มีไนโตรเจน ออกซิเจน หรือฟอสเฟตอยู่จำกัด หรือสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป (Lee, 1996) กลไกการสังเคราะห์ PHB ภายในเซลล์เกิดขึ้นโดยผ่านกระบวนการทางเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยจุลินทรีย์จะเปลี่ยนสารตั้งต้นที่เป็นแหล่ง

คาร์บอนต่างๆ เช่น กลูโคส, แลคโตส, กลีเซอรอล, หรือกรดไขมันต่างๆ ได้เป็นอะซิติลโคเอ (acetyl-CoA) ผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ในกรณีจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะปกติ ที่มีสารอาหารต่างๆ เพียงพอต่อการเจริญเติบโต อะซิติลโคเอจะเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid cycle: TCA cycle) เพื่อสลายสารอินทรีย์ให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และผลิตอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate: ATP) เพื่อเป็นพลังงานให้แก่จุลินทรีย์ แต่ในกรณีจุลินทรีย์อยู่ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณสารอาหารไม่สมดุล โดยมีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป หรือแหล่งไนโตรเจนมีจำกัด จุลินทรีย์จะเปลี่ยนกระบวนการไปเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ PHB แทน โดยบีต้าคีโตไทโอเลส (β -ketothiolase) จะไปเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของอะซิติลโคเอ 2 โมเลกุล ได้เป็นอะซิโตะอะซิติลโคเอ (acetoacetyl-CoA) จากนั้นอะซิโตะอะซิติลโคเอรีดักเตส (acetoacetyl-CoA reductase) จะเร่งปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) โดยมี NAD(P)H เป็นโคเอนไซม์ ซึ่งจะเปลี่ยนอะซิโตะอะซิติลโคเอ ไปเป็นไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอ (hydroxybutyryl-CoA) และ PHB ซินเทส (PHB synthase) จะเร่งปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอกับปลายด้านคาร์บอกซิลของไฮดรอกซีบิวทิริลโคเออีกโมเลกุลหนึ่ง ทำให้ได้พอลิเมอร์ยาวขึ้น (Anderson and Dawes, 1990; Lee, 1996) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 วิธีการสังเคราะห์ PHB

ที่มา : ดัดแปลงจาก Burns *et al.* (2007)

2.4 คุณสมบัติของ PHB

PHB เป็นเทอร์โมพลาสติกที่มีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกสังเคราะห์จากปิโตรเลียม ชนิดพอลิโพรพิลีน มีปริมาณผลึกสูงถึงร้อยละ 80 จุดหลอมเหลว 175 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิกลาสทรานสิชัน (glass transition temperature, T_g) ประมาณ -4 องศาเซลเซียส มีความทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ ทนทานต่อแสงอัลตราไวโอเล็ต ดังตารางที่ 1 สำหรับคุณสมบัติที่สำคัญของ PHB คือสามารถย่อยสลายเองได้ตามธรรมชาติ (Hrabak, 1992)

PHB ยังไม่เป็นที่นิยมนำมาใช้งานมากนัก เนื่องจากต้นทุนการผลิตมีราคาสูง และมีความซับซ้อนของกระบวนการปายน้ำ นอกจากนี้ PHB ยังมีข้อด้อย คือ มีความเปราะสูง ทำให้แตกหักได้ง่าย และเกิดการสลายได้ง่ายโดยอุณหภูมิ ทำให้สามารถขึ้นรูปเป็นเครื่องมือขึ้นรูปพลาสติกทั่วไปได้ยาก วิธีแก้ไขปัญหานั้นสามารถทำได้โดยการทำเป็นโคพอลิเมอร์กับพอลิเมอร์ตัวอื่น หรือนำไปผสมรวมกับพอลิเมอร์ตัวอื่น เพื่อให้เกิดความคงทนมากขึ้น

ตารางที่ 1 สมบัติของ PHB เทียบกับ PP

คุณสมบัติ	PHB	PP
T_m (°C)	175	176
ปริมาณผลึก (%)	80	70
น้ำหนักโมเลกุล (Da)	5×10^5	2×10^5
T_g (°C)	-4	-10
ความหนาแน่น (g/cm ³)	1.250	0.905
มอดุลัสของยัง (GPa)	3.5	1.7
ความสามารถในการต้านแรงดึง (MPa)	40	34.5
ความสามารถในการขยายตัว (%)	6	400
ความต้านทานต่อแสงอัลตราไวโอเล็ต	ดี	ไม่ดี
ความทนทานต่อตัวทำละลาย	ไม่ดี	ดี

ที่มา : ดัดแปลงจาก Ojumu *et al.* (2004)

2.5 การประยุกต์ใช้ PHB ในด้านต่างๆ

PHAs เป็นที่รู้จักกันว่ามีการใช้งานที่หลากหลายในด้านการบรรจุภัณฑ์ และการแพทย์ แต่ด้วยคุณสมบัติของ PHB ที่มีความเปราะสูง ทำให้แตกหักได้ง่าย จึงนิยมนำมาทำเป็นโคพอลิเมอร์ หรือนำไปผสมรวมกับพอลิเมอร์ตัวอื่น เพื่อให้เกิดความคงทนมากขึ้นและลดความเปราะของ PHB เช่น พอลิไฮดรอกซีวาลอเรต ได้เป็นพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-พอลิไฮดรอกซีวาลอเรต

[poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) : PHBV] ซึ่ง PHBV สามารถนำมาใช้สำหรับฟิล์มบรรจุภัณฑ์ ขวดบรรจุภัณฑ์ และใช้เคลือบกระดาษ นอกจากนี้ PHBV ยังนำมาประยุกต์ทางการแพทย์ ในด้านการทำศัลยกรรม เนื่องจากมีความสามารถในการย่อยสลายที่ใช้ระยะเวลา และการเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Khosravi-Darani and Bucci, 2015)

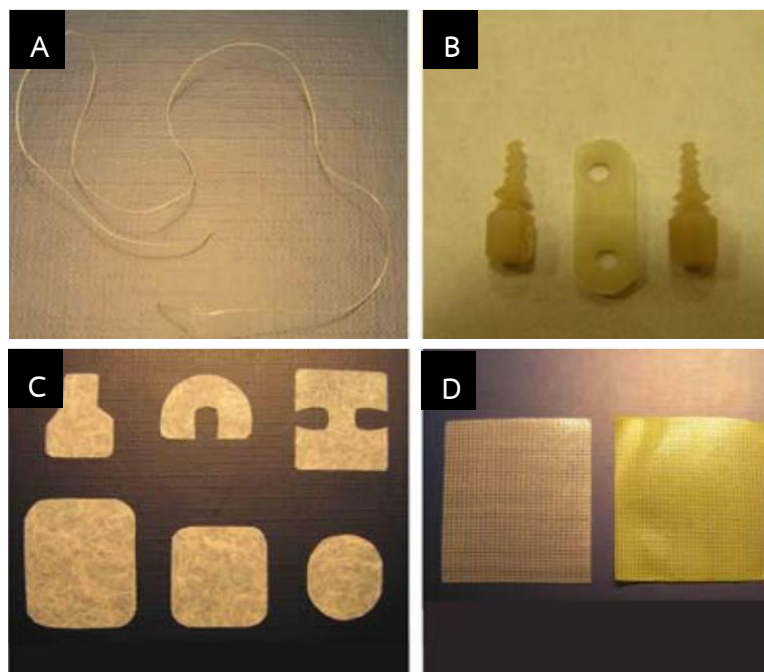
2.5.1 ด้านบรรจุภัณฑ์

- เนื่องจาก PHB มีคุณสมบัติคล้ายกับ PP จึงได้รับความสนใจในการนำ PHB ไปผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง ได้แก่ ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ถุงพลาสติก กล่องโฟม ฟิล์มสำหรับหีบห่อ เม็ดโฟมกันกระแทก ตัวเคลือบภาชนะกระดาษ เนื่องจากความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่สามารถย่อยสลายได้เองทางชีวภาพ ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และมีคุณสมบัติป้องกันไอน้ำได้ดี นอกจากนี้ PHB ยังสามารถทนต่อแสงและรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ดีกว่าพลาสติกชีวภาพอื่น เช่น PLA เป็นต้น (Khosravi-Darani and Bucci, 2015)

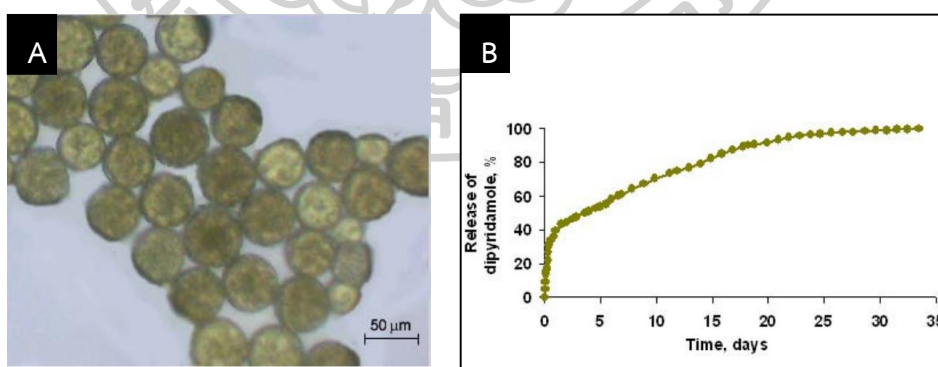
2.5.2 ด้านการแพทย์

- อุปกรณ์ทางการแพทย์ ในปัจจุบันมีการพัฒนาอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ทำมาจาก PHB ในการผ่าตัดทางทันตกรรม เช่น การเคลือบและฝังรากฟันเทียมแบบชั่วคราว เป็นต้น นำไปใช้ในการทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่น ศัลยกรรมกระดูกใบหน้า กระโหลกศีรษะ กระดูก ข้อ เอ็นการผ่าตัดผิวหนัง อุปกรณ์ซ่อมแซมและฟื้นฟูเนื้อเยื่อที่ถูกนำไปใช้ เซลล์ประสาทตา การปลูกถ่ายอวัยวะทดแทนกระดูก เตื่อย เป็นต้น และการรักษาหัวใจและหลอดเลือด เช่น อุปกรณ์ซ่อมแซมข้อบกพร่องผนังหัวใจห้องบน เป็นต้น นอกจากนี้ มีการพัฒนาวัสดุปิดแผลทางการแพทย์ที่ผ่านการรับรองทางพิษวิทยาของสถาบันเทคนิคการแพทย์ (กระทรวงสาธารณสุขรัสเซีย) สำหรับการใช้ตาข่ายผ่าตัดที่ทำจาก PHB และย่อยสลายทางชีวภาพสำหรับการรักษาโรคมะเร็ง (Bonartsev *et al.*, 2007; Kavitha *et al.*, 2018) (รูปที่ 4) โดยอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ทำจาก PHB นั้นจะสามารถย่อยสลายกลายเป็นไฮดรอกซีบิวทีเรต (hydroxybutyrate: HB) ซึ่งจะอยู่ในระบบหมุนเวียนโลหิตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยไม่เป็นอันตรายและไม่เป็นพิษต่อการปลูกถ่ายอวัยวะต่างๆ (Vroman and Tighzert, 2009)

- การประยุกต์ใช้ฟิล์ม ไมโครสเฟียร์ และไมโครแคปซูลที่ทำจาก PHB เพื่อนำส่งยา โดยมีการศึกษาและพัฒนาการปลดปล่อยตัวยาปฏิชีวนะ ยาแก้แสบ จากฟิล์ม PHB และไมโครสเฟียร์ และยาที่ละลายน้ำได้ โปรตีน เปปไทด์ และกรดนิวคลีอิก จากไมโครแคปซูล พบว่า สัมประสิทธิ์ของการแพร่กระจายของยาขึ้นอยู่กับความหนา ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง และอัตราส่วนของยาต่อวัสดุ PHB ทำให้สามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยของยาได้ (Bonartsev *et al.*, 2007) (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 อุปกรณ์การแพทย์ที่ทำจาก PHB (A) เอ็นเย็บแผลผ่าตัดย่อยสลายทางชีวภาพ (B) สกรูย่อยสลายทางชีวภาพและแผ่นสำหรับยึดกระดูกอ่อนและกระดูก (C) เยื่อย่อยสลายทางชีวภาพสำหรับการรักษาโรคปริทันต์ และ (D) ตาข่ายผ่าตัด PHB แบบปริสุทธิ (ซ้าย) ตาข่ายผ่าตัดแบบผสมกับยาต้านเกล็ดเลือด (dipyridamole) (ขวา)
ที่มา : Bonartsev *et al.* (2007)

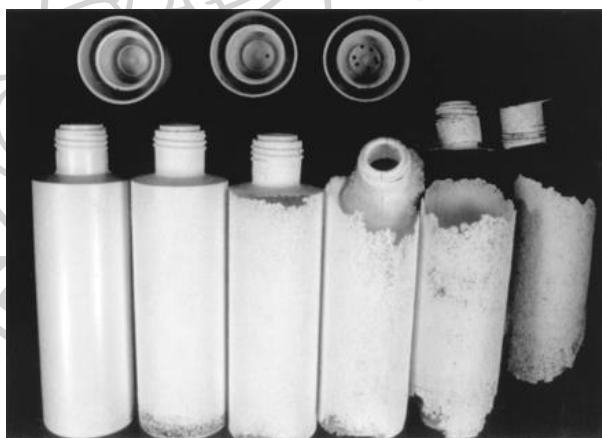


รูปที่ 5 ไมโครสเฟียร์ที่ทำจาก PHB สำหรับเพื่อการนำส่งยาต่อเนื่อง (A) ไมโครสเฟียร์ที่ทำจาก PHB ที่บรรจุ dipyridamole ปริมาณร้อยละ 10 โดยมวล โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 60 mkm มวลโมเลกุลของ PHB 1,000 kDa และ (B) การนำส่งยา dipyridamole จาก ไมโครสเฟียร์ที่ทำจาก PHB ระยะเวลามากกว่า 1 เดือน

ที่มา : Bonartsev *et al.* (2007)

2.6 การย่อยสลาย PHB

การย่อยสลาย PHB สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการย่อยสลาย ลักษณะพื้นผิวของผลิตภัณฑ์ สภาวะแวดล้อม ความชื้น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง (Boopathy, 2000) โดยจุลินทรีย์สามารถย่อยสลาย PHB ได้เอง โดย PHB จะถูกไฮโดรไลซ์ด้วย PHB ไฮโดรเลส (PHB hydrolase) จนได้สายพอลิเมอร์ที่สั้นลง เป็นไตรเมอร์ (trimer) หรือไดเมอร์ (dimer) และไดเมอร์ไฮโดรเลส (dimer hydrolase) จะไฮโดรไลซ์ไดเมอร์จนได้กลายเป็น HB ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ (monomer) ของ PHB จากนั้น HB จะถูกเร่งปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (dehydrogenation) โดยปีต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตดีไฮโดรจีเนส (β -hydroxybutyrate dehydrogenase) ได้เป็นอะซีโตอะซิเตท (acetoacetate) และอะซีโตอะซิetyl-CoA ไทไคเนส (acetoacetyl-CoA thiokinase) จะไปเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนอะซีโตอะซิเตทเป็นอะซีโตอะซิetyl-CoA และปีต้าไทไคเนส จะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนอะซีโตอะซิetyl-CoA เป็นอะซีetyl-CoA ซึ่งจุลินทรีย์จะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของตัวเอง (Pouton and Akhtar, 1996) โดยระยะเวลาของการย่อยสลาย PHB จะไม่แน่นอน สามารถย่อยสลายได้ภายในระยะเวลาไม่กี่เดือนจนถึงเป็นปี (Jendrossek *et al.*, 1996)



รูปที่ 6 การย่อยสลายขวดที่ผลิตจาก PHBV ในภาชนะกอนจุลินทรีย์ แบบแอโรบิก ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการย่อยสลายเกิดขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 สัปดาห์ (เรียงจากซ้ายไปขวา)

ที่มา : Madison and Huisman (1999)

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิต PHB

อาหาร และสภาวะสิ่งแวดล้อม เป็นปัจจัยสำคัญที่จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการผลิตสารต่างๆ โดยจุลินทรีย์จะผลิต PHB เมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดแร่ธาตุที่สำคัญในการเจริญเติบโต เช่น ในสภาวะแวดล้อมที่มีไนโตรเจน ออกซิเจน หรือฟอสเฟตอยู่จำกัด หรือสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป ดังนั้น การศึกษาสภาวะของอาหารให้เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิต PHB จึงเป็นปัจจัยสำคัญเพื่อกระตุ้นให้เกิดการผลิต PHB ที่สูงขึ้น

2.7.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์ พลังงาน และสารประกอบทางชีวภาพต่างๆ ในงานวิจัยที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB ทั้งจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนสภาวะต่างๆ ในการผลิต PHB และเนื่องจากการผลิต PHB ยังมีต้นทุนที่สูง จึงพยายามหาแนวทางการลดต้นทุนในการผลิต PHB โดยการหาแหล่งวัตถุดิบตั้งต้นที่มีราคาถูก เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร/อุตสาหกรรม หรือผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมต่างๆ มาเป็นวัตถุดิบในการผลิต (Khanna และ Srivastava, 2005; Annamalai และคณะ, 2014) ดังตารางที่ 2 เช่น งานวิจัยของ Chomchai and Chongcharoen (2012) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต PHB โดย *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ในอาหาร Basal mineral medium ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ 10 ชนิด ได้แก่ เด็กซ์โตรส, น้ำตาลทรายขาว, น้ำตาลทรายดิบ, น้ำตาลทรายแดง, มอลต์เด็กซ์ตริน, แป้งที่ละลายน้ำได้ (soluble starch), แป้งมันฝรั่ง, แป้งมันสำปะหลัง, กากน้ำตาล และกลีเซอรอล โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน 20:2 พบว่า เมื่อใช้เด็กซ์โตรสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิต PHB ได้ 2.25 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นน้ำตาลพื้นฐานที่ใช้ในการผลิต ซึ่งเมื่อใช้น้ำตาลทรายดิบ, น้ำตาลทรายแดง และแป้งที่ละลายน้ำได้ เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิต PHB ได้ถึง 2.09, 2.64 และ 2.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้ปริมาณ PHB ที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วัตถุดิบเหล่านี้แทนเด็กซ์โตรส เพื่อลดต้นทุนการผลิตได้

งานวิจัยของ Gouda *et al.* (2001) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิต PHB ได้แก่ ฟรุกโตส, กลูโคส, โซโลส, แลคโตส, ซูโครส, มอลโทส, โซเดียมกลูโคเนต และกากน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน (ร้อยละ 2 โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) โดยใช้ *Bacillus megaterium* ที่คัดแยกได้จากโรงงานบำบัดน้ำเสียของเมืองอเล็กซานเดรีย ประเทศอียิปต์ จากผลการทดลองพบว่า แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิต PHB คือ กลูโคส โดยสามารถผลิต PHB ได้สูงถึงร้อยละ 45.6 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมา คือ กากน้ำตาล โดยสามารถผลิต PHB ได้สูงถึง

ร้อยละ 44.6 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ผู้ทดลองจึงเลือกใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากมีราคาถูก และสามารถลดต้นทุนการผลิต PHB ได้ จากนั้นผู้วิจัยศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ตั้งแต่ร้อยละ 1-5 โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า การใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ผลผลิต PHA และ PHB สูงที่สุด คือ ร้อยละ 46.5 และ 46.3 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

งานวิจัยของ Jiang *et al.* (2008) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ A2a5 ที่คัดแยกจากดินอะแลสกา ในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส และสะสม PHB ขนาดใหญ่ไว้ภายในเซลล์ โดยศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ ขนาด 5 ลิตร โดยใช้ sugarcane liquor เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร และใช้ผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก และควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่า ได้น้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด (CDW) เป็น 32 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณ PHB เป็น 22 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง สูงถึงร้อยละ 70 และอัตราการผลิตเป็น 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ A2a5 สามารถผลิต PHB ได้ในสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป และสามารถใช้ sugarcane liquor เป็นสารตั้งต้นเพื่อลดต้นทุนการผลิต PHB ได้

งานวิจัยของ Naranjo *et al.* (2013) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Bacillus megaterium* โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมระหว่างกลีเซอรอลและกลูโคส สำหรับการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ ขนาด 3.7 ลิตร โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ประกอบด้วยกล้าเชื้อคิดเป็นร้อยละ 8 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB ได้แก่ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 10, 20 และ 50 กรัมต่อลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เป็นตัวควบคุม นอกจากนี้ ยังศึกษาอุณหภูมิในกระบวนการหมักที่ 30, 33 และ 35 องศาเซลเซียส ค่า pH ที่ 5.0, 7.0 และ 9.0 และค่าออกซิเจนละลายที่ร้อยละ 30, 60 และ 80 โดยควบคุมอัตราการกวนที่ความเร็วรอบ 200-300 รอบต่อนาที มีอัตราการให้อากาศ 12 ลิตรต่อนาที เลี้ยงเป็นระยะเวลา 42 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHB คือ กลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ค่า pH 7 และค่าออกซิเจนละลายร้อยละ 80 จะได้น้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด (CDW) เป็น 7.7 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ 4.8 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHB สะสมคิดเป็นร้อยละ 62.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมีค่ามากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ที่ได้น้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด (CDW) เพียง 7.1 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ 4.2

กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB สะสม ได้เพียงร้อยละ 59.1 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สามารถนำกลีเซอรอลมาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อลดต้นทุนในการผลิต PHB และได้ผลผลิต PHB สูงกว่าการใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น

งานวิจัยของ Srekanth *et al.* (2013) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต PHB ร่วมกับการผลิตแอลฟาอะไมเลส (α -amylase) จาก *Bacillus* sp. CFR 67 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ แป้งข้าวโพด, กลูโคส, ซูโครส, แป้งมันฝรั่ง, แป้งมันสำปะหลัง และแป้งที่ละลายน้ำได้ ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน คือ 20 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 3.2 กรัมต่อลิตร ในขณะที่แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิต PHB คือ ซูโครส ซึ่งได้ปริมาณ PHB 480 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB สะสมคิดเป็นร้อยละ 38.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีการผลิตแอลฟาอะไมเลส 40.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นศึกษาผลต่อการเติมสารอาหารเพิ่มเติม โดยเติมรำข้าวไฮโดรไลเซต รำข้าวสาลีไฮโดรไลเซต และรำข้าวไฮโดรไลเซตผสมกับรำข้าวสาลีไฮโดรไลเซตในอัตราส่วน 1:1 ที่ระดับความเข้มข้น 10, 25 และ 50 มิลลิตรต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเติมรำข้าวสาลีไฮโดรไลเซต ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิตรต่อลิตร ทำให้ได้ปริมาณ PHA เป็น 524 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณแอลฟาอะไมเลสสูงสุดถึง 73 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของการใช้วัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสที่สามารถลดต้นทุนการผลิตของพลาสติกชีวภาพ และช่วยลดมลพิษที่เกิดจากการใช้พลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้

งานวิจัยของ Zhang *et al.* (2013) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Bacillus megaterium* R11 ที่คัดแยกได้จากดินแหล่งต่างๆ ในประเทศสิงคโปร์ ที่สามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งกลูโคสและไซโลส โดยใช้ทะลายเปล่าน้ำมันปาล์ม (oil palm empty fruit bunch : OPEFB) เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งต้องผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยเซลลูเลส ไฮโดรไลเซตที่ได้นำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB โดยศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ใช้ไฮโดรไลเซตที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 60 กรัมต่อลิตร และใช้ tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจน ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน เป็น 15:3 จากการทดลองพบว่า ได้น้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด (CDW) เป็น 24.19 กรัมต่อลิตร มีการผลิต PHB 12.48 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB สะสมคิดเป็นร้อยละ 51.6 ของน้ำหนัก

เซลล์แห้ง แสดงให้เห็นว่า สามารถใช้ OPEFB ที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นในการผลิต PHB ที่สามารถลดต้นทุนการผลิตได้

2.7.2 แหล่งไนโตรเจน

นอกจากแหล่งคาร์บอนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการทางเมแทบอลิซึมต่างๆ ของจุลินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนยังถือได้ว่าเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิต PHB โดยจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความต้องการไนโตรเจนที่แตกต่างกัน จุลินทรีย์บางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต เป็นต้น และจุลินทรีย์บางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น yeast extract, beef extract, peptone และ tryptone เป็นต้น ทำให้มีการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิต PHB เช่น งานวิจัยของ Chomchai and Chongcharoen (2012) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PHB โดย *Alcaligenes latus* ATCC 29714 ในอาหาร Basal mineral medium ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรต, ยูเรีย, corn steep liquor, ผงชูรส และ yeast extract โดยศึกษาไปพร้อมกับการศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่ 20:2, 20:4, 20:6, 20:8 และ 20:10 ในแต่ละแหล่งไนโตรเจน และใช้เด็กซ์โตรสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองพบว่า ผงชูรสที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน 20:2 มีปริมาณ PHB สะสมสูงสุดถึงร้อยละ 80.6 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วน yeast extract ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน 20:4 แม้มีปริมาณ PHB สะสมเพียงร้อยละ 61.1 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงถึง 8.15 กรัมต่อลิตร

งานวิจัยของ Gouda *et al.* (2001) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิต PHB ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมฟอสเฟต, แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมโกลิบดีนัม, แอมโมเนียมอะซิเตท, แอมโมเนียมออกซาลेट, โซเดียมไนเตรต, yeast extract, malt extract, beef extract, peptone, tryptone, รำข้าวสาลี และ corn steep liquor ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน (เทียบเท่าร้อยละ 0.05 ของแอมโมเนียมคลอไรด์) และใช้กากน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ *Bacillus megaterium* จากผลการทดลองพบว่า corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิต PHB ให้ผลผลิต PHA และ PHB สูงที่สุด คือ ร้อยละ 33.02 และ 32.68 ต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้งตามลำดับ ในขณะที่แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมออกซาลेट และแอมโมเนียมฟอสเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากนั้นศึกษาผลของความเข้มข้น corn steep liquor ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนตั้งแต่ร้อยละ 0.5, 1, 3, 5 และ 7 โดย

ปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดลองพบว่า การใช้ corn steep liquor ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ปริมาณ PHB สะสมสูงสุดถึงร้อยละ 46.2 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

งานวิจัยของ Sreekanth *et al.* (2013) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PHB ร่วมกับการผลิตแอลฟาอะไมเลส (α -amylase) จาก *Bacillus sp.* CFR 67 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน จากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ ไกลซีน, peptone, beef extract, yeast extract, tryptone และยูเรีย และจากแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมไนเตรต, โพแทสเซียมไนเตรต, ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต, แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมอะซิเตต ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร และใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่า beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิต PHB ได้ถึง 592 มิลลิกรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตแอลฟาอะไมเลสได้สูงถึง 36.6 หน่วยต่อมิลลิกรัม

งานวิจัยของ Zhang *et al.* (2013) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Bacillus megaterium* R11 โดยใช้ทะลายเปล่าน้ำมันปาล์ม (oil palm empty fruit bunch : OPEFB) เป็นแหล่งคาร์บอน ในการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม สำหรับการผลิต PHB ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต, peptone, yeast extract และ tryptone โดยใช้กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และโซลอส 5 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด 6 กรัมต่อลิตร พบว่า peptone มีปริมาณ PHB สะสมสูงสุดถึงร้อยละ 45.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 72 ชั่วโมง แต่ tryptone ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.31 กรัมต่อลิตร สามารถผลิต PHB ได้มากที่สุดถึง 2.72 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ทำให้ผู้ทดลองจึงเลือกใช้ tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิต PHB จาก *Bacillus megaterium* R11 และนำไปศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่อไป

งานวิจัยของ Annamalai and Sivakumar (2016) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Ralsonia eutropha* โดยใช้รำข้าวสาลีที่ผ่านปรับสภาพวัตถุดิบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำมาไฮโดรไลซ์ด้วยเซลลูเลส และบีต้า-กลูโคซิเดส และใช้ส่วนของไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอน ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมซัลเฟต, yeast extract, beef extract, tryptone และ peptone โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด 2 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 6.14 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณ PHB สูงสุดเป็น 2.69

กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB สะสมเท่ากับร้อยละ 43 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ผู้ทดลองจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิต PHB จาก *Ralsonia eutropha* และนำไปศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่อไป

2.7.3 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้น จุลินทรีย์จะผลิต PHB เมื่ออยู่ในสภาวะที่ขาดแร่ธาตุที่สำคัญในการเจริญเติบโต เช่น ในสภาวะแวดล้อมที่มีไนโตรเจนอยู่จำกัด หรือสภาวะที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินไป ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการผลิต PHB แทนการเข้าสู่วัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกเพื่อสะสมเป็นแหล่งพลังงาน ดังนั้น อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดกระบวนการของจุลินทรีย์ เช่น งานวิจัยของ Zhang *et al.* (2013) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Bacillus megaterium* R11 โดยใช้ทะลายเปล่าน้ำมันปาล์ม (oil palm empty fruit bunch : OPEFB) เป็นแหล่งคาร์บอน ในการศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในช่วง 15:1, 15:2, 15:3, 15:4 และ 15:6 โดยใช้อัตราส่วนของกลูโคสต่อไซโลสเป็น 2:1 และใช้ tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า ที่อัตราส่วน 15:3 ใช้ระยะเวลาในกระบวนการหมัก 48 ชั่วโมง ได้น้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด (CDW) เป็น 5.33 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณ PHB 2.74 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB สะสมคิดเป็นร้อยละ 51.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำผลการทดลองไปศึกษาในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยใช้ไฮโดรไลซ์ความเข้มข้น 45 กรัมต่อลิตร และใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน เป็น 15:3 ได้น้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด (CDW) เป็น 15.93 กรัมต่อลิตร มีการผลิต PHB 9.32 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB สะสมคิดเป็นร้อยละ 58.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

งานวิจัยของ Annamalai and Sivakumar (2016) ได้ศึกษาการผลิต PHB จาก *Ralsonia eutropha* จากการใช้รำข้าวสาลีไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอน ในศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของกลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟต ที่อัตราส่วน 20:1, 20:2, 20:3, 20:4 และ 20:5 จากการทดลองพบว่า ที่อัตราส่วน 20:5 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 6.23 กรัมต่อลิตร ที่ 36 ชั่วโมง และได้ปริมาณ PHB สะสมต่ำสุดร้อยละ 46.6 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ 48 ชั่วโมง และอัตราส่วน 20:1 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่ำสุด 3.63 กรัมต่อลิตร ที่ 36 ชั่วโมง แต่ได้ปริมาณ PHB สะสมสูงสุตร้อยละ 62.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำผลการทดลองไปศึกษาการใช้รำข้าวสาลีไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยใช้ไฮโดรไลเซตที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 48 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน เป็น 20:1 พบว่า ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 24.43 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของ PHB 14.82 กรัมต่อลิตร ที่

60 ชั่วโมง และได้ปริมาณ PHB สะสมร้อยละ 62.55 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ 72 ชั่วโมง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสมาเป็นแหล่งวัตถุดิบ เพื่อลดต้นทุนในการผลิต PHB ได้



ตารางที่ 2 การผลิต PHB จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Microorganism	Carbon source	% PHA content	References
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Gluconate	46-85	Liebergesell <i>et al.</i> (1994)
	Propionate	26-36	
	Octanoate	38-45	
<i>Ralstonia eutropha</i>	Wheat bran hydrolysate	62.55	Annamalai and Sivakumar (2016)
<i>Alcaligenes latus</i> (ATCC 29714)	Sugarbeet juice	38.66	Wang <i>et al.</i> (2013)
<i>Alcaligenes latus</i> (ATCC 29714)	Dextrose	80.6	Chomchai and Chongcharoen (2012)
<i>Azohydromonas australica</i> DSM 1124	Sucrose	76.24	Gahlawat and Srivastava (2013)
<i>Bacillus megaterium</i>	Glucose	59.1	Naranjo <i>et al.</i> (2013)
	Glycerol	62.4	
<i>Bacillus megaterium</i> QMB1551	Glucose	20	Mirtha <i>et al.</i> (1995)
<i>Bacillus megaterium</i> R11	Oil palm empty fruit bunch	58.5	Zhang <i>et al.</i> (2013)
<i>Klebsiella aerogenes</i> recombinants	Molasses	65	Zhang <i>et al.</i> (1994)
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> MB 1267	Fructose/methanol	30	Ackermann and Babel (1997)
<i>M. extorquens</i> (ATCC 55366)	Methanol	40-46	Borque <i>et al.</i> (1995)
<i>Methylobacterium sp.</i> ZP24	Whey	64	Khanna and Srivastava (2005)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Euphorbia and castor oil	20-30	Eggink <i>et al.</i> (1995)

ตารางที่ 2 การผลิต PHB จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (ต่อ)

Microorganism	Carbon source	% PHA content	References
<i>P. oleovorans</i>	Glucanoate	1.1-5.0	Liebergesell <i>et al.</i> (1994)
	Octanoate	50-68	
<i>P. putida</i>	Palm kernel oil	37	Tan <i>et al.</i> (1997)
	Lauric acid	25	
	Myristic acid	28	
	Oleic acid	19	
<i>Sphaerotilus natans</i>	Glucose	40	Takeda <i>et al.</i> (1995)
	Glucose	49	
<i>Escherichia coli</i> JM109	Crude glycerol	28.8	Ganesh <i>et al.</i> (2015)
	Pre-treated glycerol	54.5	

2.8 การผลิต PHB โดยกระบวนการหมัก (Production of PHB by Fermentation Process)

มีการศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการนำไปใช้ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม โดยกระบวนการหมักมีหลายวิธี เช่น กระบวนการหมักแบบกะ (Batch fermentation) และกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation) เช่น งานวิจัยของ Huang *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทจาก *Haloferax mediterranei* โดยใช้รำข้าวอัด (extruded rice bran : ERB) และแป้งข้าวโพดอัด (extruded cornstarch : ECS) เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อลดต้นทุนการผลิต PHA โดยศึกษาการผลิต PHA ในกระบวนการหมักแบบ repeated fed-batch fermentation ในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้ ECS ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว และใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งกำหนดสภาวะในกระบวนการหมัก โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 800 รอบต่อนาที และค่า pH ที่ 6.9-7.1 และมีการป้อนไฮโดรไลเซต และ yeast extract ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และ 85 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ด้วยอัตราเร็ว 0.7 มิลลิลิตรต่อวินาที จนกระทั่งมีปริมาตรรวม 4.5 ลิตร จึงป้อนน้ำหมักออกปริมาตร 2 ลิตร และป้อนไฮโดรไลเซตและ yeast extract อีกครั้ง โดยควบคุมค่าการละลายของออกซิเจนไว้ที่ร้อยละ 20 และควบคุมค่าการนำไฟฟ้าที่ 3-4 ซีเมนส์ต่อเมตร จากการทดลองพบว่า ได้ปริมาณเซลล์ 62.6 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHA 24.2 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHA สะสมร้อยละ 38.7 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ ERB ต่อ ECS ในอัตราส่วน 1:8 (กรัมต่อกรัม) เป็นแหล่งคาร์บอน จากการทดลองพบว่า ได้ปริมาณเซลล์ 140 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHA 77.8 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHA สะสมคิดเป็นร้อยละ 55.6 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งได้ปริมาณของ PHA มากกว่าการใช้ ECS เพียงอย่างเดียว

งานวิจัยของ Pandian *et al.* (2010) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHB โดยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ จากของเสียในอุตสาหกรรมนมและน้ำทะเลมาเป็นแหล่งสารอาหารสำหรับเลี้ยง *Bacillus megaterium* SRKP-3 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์แรกๆ ที่แยกได้จากน้ำกร่อยที่สามารถผลิต PHB ได้ โดยนำมาศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ได้แก่ ของเสียจากอุตสาหกรรมนม (150-550 มิลลิลิตร), รำข้าว (20-60 กรัมต่อลิตร) และน้ำทะเล (150-550 มิลลิลิตรต่อลิตร) นอกจากนี้ ยังศึกษาเวลาและ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมในช่วง pH 6-11 ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของของเสียจากอุตสาหกรรมนม, รำข้าว และน้ำทะเลเป็น 350 มิลลิลิตรต่อลิตร, 40 กรัมต่อลิตร และ 350 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ โดยระยะเวลา 36 ชั่วโมง pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 9 ให้ปริมาณ PHB สูงที่สุด คือ 6.38 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมมาศึกษากระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 3 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ควบคุม pH เป็น 9 และค่าออกซิเจนละลายเริ่มต้นเป็นร้อยละ 100 โดยเฉพาะเลี้ยงแบบกะ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น 12 ชั่วโมง ป้อนของเสียจากอุตสาหกรรมนม ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และอีก 12 ชั่วโมง ป้อนของเสียจากอุตสาหกรรมนม ปริมาตร 200 มิลลิลิตร พบว่า ปริมาณการผลิต PHB สูงสุด 11.32 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง

งานวิจัยของ Gahlawat and Srivastava (2013) ศึกษาการผลิต PHB โดย *Azohydromonas australica* DSM 1124 ในกระบวนการหมักแบบกะ เพื่อศึกษาข้อมูล จลนพลศาสตร์การผลิตของ PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7 ลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 33 องศาเซลเซียส pH 7 ค่าออกซิเจนละลายร้อยละ 30 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ใช้ซูโครส และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร และ 0.6 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า ในช่วง 3 ชั่วโมงแรก *Azohydromonas australica* DSM 1124 มีการเจริญเติบโตในช่วงของ lag phase และจะเข้าสู่ log phase ซึ่งพบว่า มีการผลิต PHB ควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตของ *Azohydromonas australica* เมื่อครบเวลา 36 ชั่วโมง ได้ปริมาณเซลล์เป็น 8.71 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHB เป็น 6.24 กรัมต่อลิตร (ปริมาณ PHB สะสมร้อยละ 72 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง) อัตราการผลิต PHB เป็น 0.75 กรัมต่อชั่วโมง จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้ไปใช้ในกระบวนการแบบกึ่งกะ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7 ลิตร ความเข้มข้นเริ่มต้นของซูโครสเป็น 25 กรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงแบบกะเป็น เวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นป้อนซูโครส และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 125 และ 2.8 กรัมต่อ ลิตร ตามลำดับ ที่อัตราการไหลไม่คงที่ เริ่มจาก 40 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แล้วลดอัตราการไหลลงเป็น 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนครบเวลา 36 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และเปรียบเทียบกับ การป้อนซูโครส และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 125 และ 2.8 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการไหลคงที่ 100 มิลลิลิตร ต่อชั่วโมง หยุดการป้อนเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงต่อในกระบวนการหมักแบบ กะจนครบ 38 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง จากการทดลองพบว่า กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ที่มีการ ป้อนสารอาหารอัตราการไหลไม่คงที่ ให้ปริมาณเซลล์ 19.14 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB เป็น 14.74 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิต PHB เป็น 1.06 กรัมต่อชั่วโมง ในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ที่มีการ ป้อนสารอาหารอัตราการไหลคงที่ ให้ปริมาณเซลล์ 29.71 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB เป็น 22.65 กรัม ต่อลิตร และอัตราการผลิต PHB เป็น 2.13 กรัมต่อชั่วโมง ซึ่งให้ปริมาณ PHB ได้สูงกว่ากระบวนการ หมักแบบกะ และกระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่มีการป้อนสารอาหารอัตราการไหลไม่คงที่

งานวิจัยของ Ganesh *et al.* (2015) ศึกษาการผลิต PHB จาก *Escherichia coli* JM109 โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ กลูโคส, กลีเซอรอลหยาบ และกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับสภาพ และใช้เคซีนไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งไนโตรเจน ในกระบวนการหมักแบบกะ ขนาด 7.5 ลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน 27.5 กรัมต่อลิตร และเคซีนไฮโดรไลเซต 5.25 กรัมต่อลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุม pH ที่ 7 และค่าออกซิเจนละลายร้อยละ 20 อัตราการไหลของอากาศ 3.6 ลิตรต่อนาที และเพิ่มความเร็วรอบจาก 200 เป็น 1,500 รอบต่อนาที เลี้ยงเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณ PHB ที่ผลิตได้จากกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับสภาพ ได้ ปริมาณ PHB สะสมได้มากที่สุดคือ ร้อยละ 54.5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามมาด้วยกลูโคสและกลีเซอรอลหยาบ ที่ผลิตได้ร้อยละ 49 และ 28.8 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

งานวิจัยของ Moreno *et al.* (2015) ศึกษาการผลิต PHB จากกลีเซอรอลดิบที่ได้จากโรงงานไบโอดีเซลในประเทศโคลอมเบีย โดยใช้ *Bacillus* sp. ที่คัดเลือกจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ดินในสวน น้ำในลำน้ำธรรมชาติ เปลือกทะเล กากตะกอนน้ำเสีย และกลีเซอรอลดิบ พบว่า มี 3 สายพันธุ์จาก 15 สายพันธุ์ที่สามารถผลิต PHB ได้มาก คือ *Bacillus megaterium* B1, B2 และ B8 จากนั้นนำมาศึกษาการผลิต PHB ในระดับฟลาสก์ โดยใช้กลีเซอรอล และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 28 ชั่วโมง พบว่า *Bacillus megaterium* B2 สามารถผลิต PHB ได้ดีที่สุด (0.0210 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) จากนั้นนำไปศึกษากระบวนการแบบกะ ในถังปฏิกรณ์ขนาด 7.5 ลิตร ควบคุมอัตราการให้อากาศ 4 ลิตรต่อนาที ความเร็วรอบของใบพัด 400 รอบต่อนาที pH ที่ 7 พบว่า สามารถผลิต PHB ได้สูงสุด 1.2 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 11 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับการศึกษาในระดับฟลาสก์ที่ได้เพียง 0.43 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 14 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์สามารถเพิ่มผลผลิตจากในระดับฟลาสก์ถึงร้อยละ 179

2.9 วัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic wastes)

วัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic wastes) เป็นวัตถุดิบที่และชีวมวลทดแทนที่มีมากที่สุดในธรรมชาติ (Saratale *et al.*, 2014) โดยทั่วไปจะเป็นวัสดุที่เหลือทิ้งหลังการเก็บเกี่ยวในไร่ต่างๆ เช่น ฟางข้าว, เปลือกข้าว, แกลบ, รำข้าว, ชานอ้อย, เปลือกข้าวโพด, ชังข้าวโพด และเส้นใยข้าวโพด เป็นต้น วัสดุที่เหลือจากอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น กากน้ำตาล, ทะลายปาล์มเปล่า, เปลือกถั่ว, เปลือกมะพร้าว, เศษกระดาษ เป็นต้น หรือเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากไม้ เช่น ไม้เลื้อยจากทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง เป็นต้น รวมถึงวัชพืชน้ำ เช่น ผักตบชวา, จอก และแหน

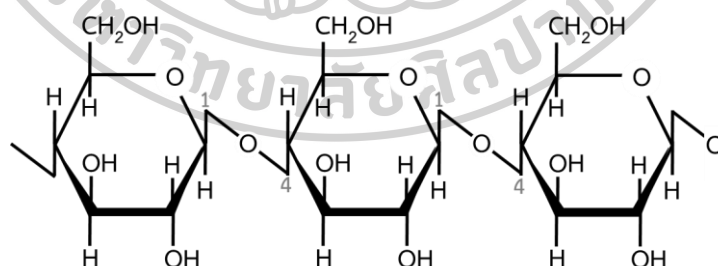
เป็นต้น โดยวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน ที่เป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างของผนังเซลล์ (Lee, 2008)

2.9.1 องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลส

ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน โดยจะ ขึ้นอยู่กับประเภทของลิกโนเซลลูโลส โดยทั่วไปพบเซลลูโลสร้อยละ 40-60 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 20-30 และลิกนินร้อยละ 15-30 (Lee, 2008)

- เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลส $[C_6H_{10}O_5]_n$ เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบมากที่สุดที่สุดในผนังเซลล์พืช ซึ่งเป็นโพลิเมอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีกิ่งก้าน เกิดจากกลูโคส (D-glucose) เชื่อมต่อดัวยพันธะปีต้า 1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic bond) ต่อกันเป็นสายยาวถึง 2,000-10,000 หน่วยกลูโคส ดังรูปที่ 7 โดยแต่ละสายของเซลลูโลสจะสร้างพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และพันธะแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals bond) เชื่อมต่อระหว่างสายประมาณ 20-300 สาย เกิดเป็นไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งล้อมรอบด้วยเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน โดยทั่วไปในธรรมชาติพบเซลลูโลส 2 แบบ คือ crystalline cellulose และ amorphous cellulose ส่วนของ crystalline cellulose จะมีโครงสร้างเป็นผลึก ซึ่งจะมีความแข็งแรงมากกว่า amorphous cellulose ที่มีโครงสร้างไม่แน่นอน จึงทำให้ crystalline cellulose ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ยากกว่า amorphous cellulose (Laureano-Perez *et al.*, 2005)

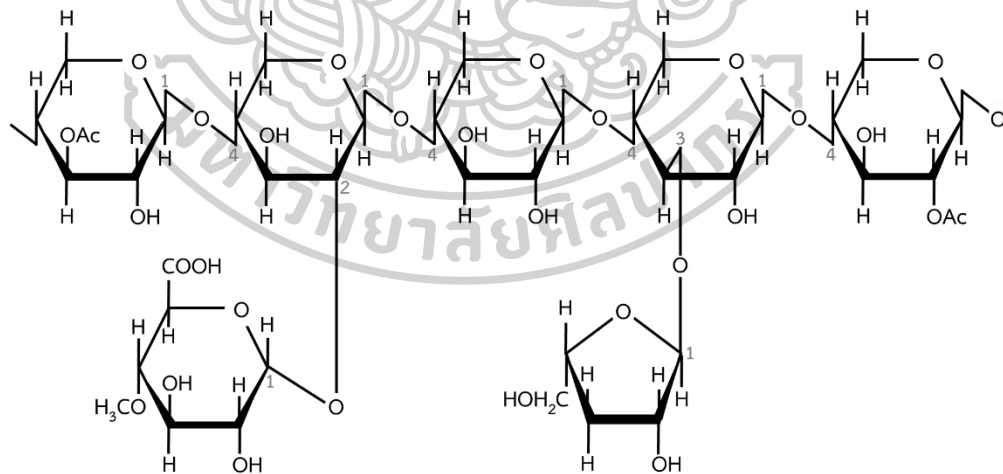


รูปที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

ที่มา : ดัดแปลงจาก Ghaemi *et al.* (2019)

- *เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)*

เฮมิเซลลูโลส $[C_5H_8O_4]_n$ หรือ $[C_6H_{10}O_5]_n$ เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบรองลงมาจากเซลลูโลสมีโครงสร้างซับซ้อน โครงสร้างเป็นสายกิ่งมาก ทำให้เฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างเป็นแบบ amorphous hemicellulose เฮมิเซลลูโลสจัดเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจากมีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลหลายชนิด เช่น ไซโลส (D-xylose), อะราบินอส (L-arabinose), กาแลคโตส (D-galactose), และแมนโนส (D-mannose) ซึ่งเฮมิเซลลูโลสสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทจากสายโซ่หลัก ได้แก่ ไซแลน (xylan), กาแลกแตน (galactan), และแมนแนน (mannan) (Holtzapfle, 2003) เช่น กลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) ซึ่งเป็นเฮมิเซลลูโลสหลักในไม้เนื้อแข็ง กาแลคโตกลูโคแมนแนน (galactoglucomannan) และอะราบินอกลูคูโรโนไซแลน (arabinoglucuronoxylan) เป็นเฮมิเซลลูโลสหลักในไม้เนื้ออ่อน เป็นต้น (Pu *et al.*, 2008) โดยสายโซ่หลักเกิดจากมอนอเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า 1,4-ไกลโคซิดิก เช่น อะราบินอกลูคูโรโนไซแลนเกิดจากไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า 1,4-ไกลโคซิดิก เกิดเป็นไซแลนที่เป็นสายโซ่สาย มีกรดกลูคูโรนิก และน้ำตาลอะราบินอส เชื่อมต่อกันจากสายโซ่หลักด้วยพันธะแอลฟา 1,2-ไกลโคซิดิก (α -1,2-glycosidic bond) และแอลฟา 1,3-ไกลโคซิดิก (α -1,3-glycosidic bond) ตามลำดับ (Bastawde, 1992) ดังรูปที่ 8

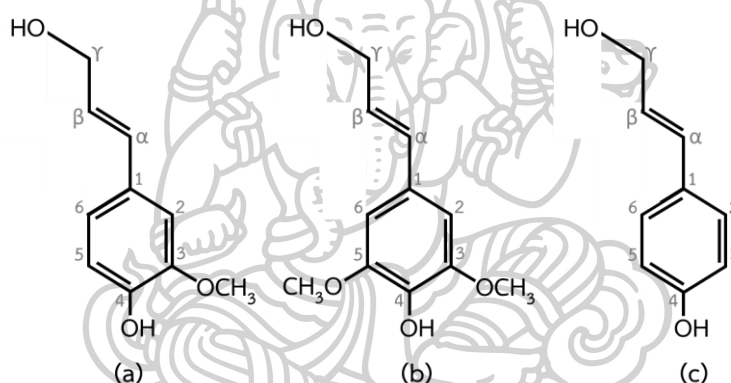


รูปที่ 8 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสแบบอะราบินอกลูคูโรโนไซแลน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Bastawde (1992)

- ลิกนิน (*lignin*)

ลิกนิน $[C_{10}H_{12}O_4]_n$ เป็นสารประกอบอะโรมาติก ที่สังเคราะห์จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรซ์ เซชัน ของอนุพันธ์ฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) 3 ชนิด คือ coniferyl alcohol, sinapyl alcohol และ *p*-coumaryl alcohol (Pu *et al.*, 2008) ดังรูปที่ 9 ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างเป็น 3 มิติ ไม่มีรูปผลึก โดยจะพบลิกนินในผนังเซลล์พืชที่อยู่ร่วมกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โดยลิกนินมีหน้าที่ในการยึดเกาะเส้นใยเข้าด้วยกัน นอกจากนี้ ยังป้องกันการทำลายผนังเซลล์พืช และป้องกันไม่ให้เซลลูโลสถูกทำลายจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์ โดยปริมาณลิกนินเป็นตัวกำหนดความแข็งแรงโครงสร้างลิกโนเซลลูโลส และในลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิดจะมีปริมาณลิกนินแตกต่างกัน เช่น ไม้เนื้ออ่อนมีปริมาณลิกนินสูงกว่าลิกโนเซลลูโลสอื่น ทำให้แยกเซลลูโลสออกจากโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสได้ยาก (Ghaemi *et al.*, 2019)

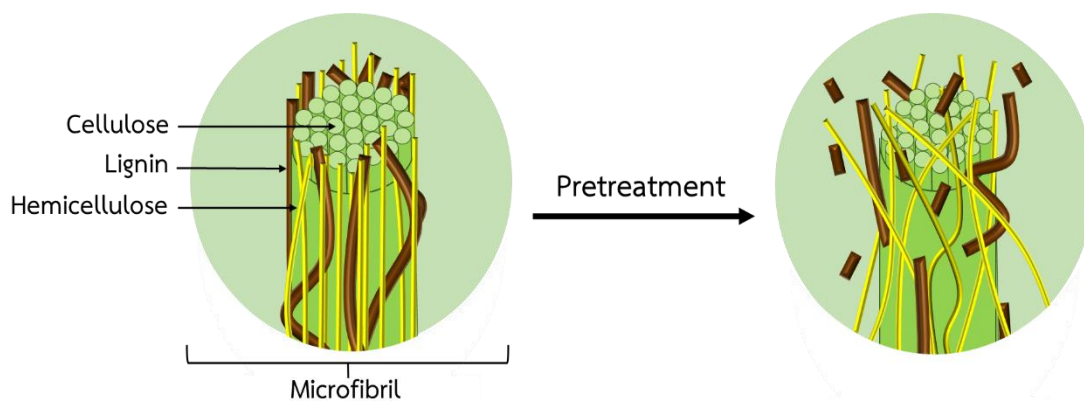


รูปที่ 9 โครงสร้างของ (a) coniferyl alcohol (b) sinapyl alcohol และ (c) *p*-coumaryl alcohol

ที่มา : ดัดแปลงจาก Pu *et al.* (2008)

2.10 กระบวนการปรับสภาพ (pretreatment)

กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบเป็นการกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางด้านกายภาพ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดลิกนิน ที่เคลือบโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส และช่วยเพิ่มขนาดรูพรุนของตัววัตถุดิบ ลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ง่ายขึ้น (Sun and Cheng, 2002) ดังแสดงในรูปที่ 10 โดยกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบสามารถแบ่งออกเป็น 4 ประเภท ได้แก่ การปรับสภาพทางกายภาพ การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี การปรับสภาพทางเคมี และการปรับสภาพทางชีวภาพ



รูปที่ 10 องค์ประกอบทางเคมีของลิกโนเซลลูโลส

2.10.1 การปรับสภาพทางกายภาพ (physical pretreatment)

- การใช้แรงทางกล (mechanical comminution)

เป็นวิธีการลดขนาดของลิกโนเซลลูโลสให้มีขนาดเล็กลงโดยทางกล ซึ่งสามารถลดผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) และเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น เช่น การบด การฉีก การเขย่าวัตถุดิบ เป็นต้น วัตถุดิบที่ผ่านการบดหยาบจะมีขนาด 10-30 มิลลิเมตร และวัตถุดิบที่ผ่านการบดละเอียดจะมีขนาด 0.2-2 มิลลิเมตร (Sun and Cheng, 2002)

- การแยกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis)

เป็นวิธีการอบที่ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 300 องศาเซลเซียส เซลลูโลสจะเกิดการไฮโดรไลซ์อย่างรวดเร็ว กลายเป็นผลผลิตในสภาพของแก๊สและส่วนที่เหลือเป็นถ่าน (Kilzer and Broido, 1965; Shafizadeh and Bradbury, 1979) แต่ข้อเสียของวิธีนี้ คือ เมื่อใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 300 องศาเซลเซียส การแยกสลายจะเกิดได้ช้า การแยกสลายด้วยความร้อน โดยใช้กรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลรีดิวิซได้ถึงร้อยละ 80-85 และโดยได้กลูโคสมากกว่าร้อยละ 50 (Fan et al., 1987)

2.10.2 การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี (physico-chemical pretreatment)

- การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion : autohydrolysis)

เป็นวิธีการที่นำวัตถุดิบที่ผ่านการลดขนาดแล้วมาให้ความร้อนด้วยไอน้ำอึมตัวที่ความดันสูง และลดความดันลงอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์พืชระเบิดออกมา และเกิดการแยกตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกจากกัน การระเบิดด้วยไอน้ำจะทำที่อุณหภูมิ 160-260 องศาเซลเซียส

ความดัน 0.69-4.83 เมกะปาสคาล วัตถุประสงค์จะผสมกับไอน้ำอิ่มตัวแล้วระเบิดออกมา ทำให้เฮมิเซลลูโลสสลายตัว และลิกนินเกิดการเปลี่ยนรูปที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้การไฮโดรไลซ์เซลลูโลสได้ดีขึ้น โดยในงานวิจัยของ Grous *et al.* (1986) พบว่า เศษไม้ที่ปรับสภาพด้วยวิธีนี้ สามารถไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ในเวลา 24 ชั่วโมง ได้ประสิทธิภาพถึงร้อยละ 90 ในขณะที่เศษไม้ที่ไม่ได้ปรับสภาพ สามารถไฮโดรไลซ์ได้เพียงร้อยละ 15 เท่านั้น โดยปัจจัยที่มีผลต่อวิธีการนี้ คือ เวลาที่ใช้ อุณหภูมิ ขนาดของ วัตถุประสงค์ และปริมาณความชื้น (Duff and Murray, 1996) ข้อดีของวิธีนี้ คือ ใช้พลังงานต่ำ เมื่อเทียบกับวิธีการลดขนาดทางกล ซึ่งใช้พลังงานถึงร้อยละ 70 แต่ให้ผลที่ใกล้เคียงกัน (Holtzaple *et al.*, 1989) วิธีการนี้จะไม่มีการใช้ของเหลือทิ้ง และลดค่าใช้จ่ายในด้านสิ่งแวดล้อม เหมาะกับการปรับสภาพไม้เนื้อแข็งและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมากกว่าไม้เนื้ออ่อน (Clark and Mackie, 1987) แต่มีข้อจำกัดคือ วิธีนี้จะทำลายโครงสร้างของไซแลน และทำลายโครงสร้างของลิกนินไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดสารประกอบที่ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ และกระบวนการหมักได้ (Mackie *et al.*, 1985) ซึ่งจะต้องมีการกำจัดสารยับยั้งโดยการล้างน้ำ แต่อาจทำให้น้ำตาลที่ละลายน้ำได้ถูกกำจัดออกไปด้วย (McMillan, 1994)

- การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (*ammonia fiber explosion, AFEX*)

เป็นวิธีการใช้แอมโมเนียเหลวภายใต้อุณหภูมิและความดันสูงเป็นเวลาระยะหนึ่ง และลดความดันอย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปจะใช้แอมโมเนียเหลว 1-2 กิโลกรัมต่อน้ำหนักแห้งของชีวมวล ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วิธีนี้ไม่มีผลต่อปริมาณของเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสไม่สามารถละลายในวิธีการระเบิดด้วยแอมโมเนีย ซึ่งจะส่งผลให้กระบวนการแซ็กคาริฟิเคชัน (Saccharification) เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสดีขึ้น เช่น หญ้าเบอร์มูดา (มีลิกนินร้อยละ 5) และชานอ้อย (มีลิกนินร้อยละ 15) ที่ปรับสภาพด้วย AFEX เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซ์มากกว่าร้อยละ 90 (Holtzaple *et al.*, 1991) ข้อดีของวิธีนี้ คือ แอมโมเนียสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ สามารถลดต้นทุนการผลิต ไม่เกิดเป็นของเสีย รักษาสิ่งแวดล้อม วิธีนี้ไม่เกิดสารประกอบยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ จึงไม่ต้องมีขั้นตอนการล้างน้ำ และไม่ต้องลดขนาดของวัตถุประสงค์ก่อน แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสมกับพืชที่มีลิกนินอยู่มาก เช่น หนังสือพิมพ์ (มีลิกนินร้อยละ 18-30) และเศษไม้ (มีลิกนินร้อยละ 25) เป็นต้น โดยเกิดการไฮโดรไลซิสหนังสือพิมพ์ และเศษไม้ที่ปรับสภาพด้วย AFEX ได้เพียงร้อยละ 40 และ 50 ตามลำดับ (McMillan, 1994)

- *การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ explosion)*

เป็นวิธีการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิต่ำ เมื่อละลายในน้ำ แก๊สจะเกิดเป็นกรดคาร์บอนิก (carbonic acid) ขึ้น และเข้าทำปฏิกิริยาย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มอัตราปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเซลลูโลส โดยในงานวิจัยของ Dale and Moreira (1982) ใช้วิธีการระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ในการปรับสภาพต้นอัลฟัลฟา (Alfalfa) โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 4 กิโลกรัมต่อเส้นใย 1 กิโลกรัม ที่ความดัน 5.62 เมกะปาสคาล ทำให้ได้กลูโคสร้อยละ 75 จากการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งผลผลิตที่ต่ำกว่าการปรับสภาพด้วยวิธีการการระเบิดด้วยไอน้ำ และวิธีการระเบิดด้วยแอมโมเนีย แต่ได้ผลผลิตสูงกว่าการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์โดยไม่ต้องปรับสภาพ และในงานวิจัยของ Zheng *et al.* (1998) ได้เปรียบเทียบการปรับสภาพกระดาษรีไซเคิล ชานอ้อย และของเสียจากกระดาษรีไซเคิล ด้วยวิธีการระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ และวิธีการระเบิดด้วยแอมโมเนีย พบว่า การปรับสภาพด้วยวิธีการระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ลดค่าใช้จ่ายได้มากกว่าวิธีการการระเบิดด้วยแอมโมเนีย และไม่เกิดสารประกอบยับยั้งเหมือนกับที่พบในวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ

- *การปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave pretreatment)*

เป็นวิธีการที่ใช้ความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟในการปรับสภาพวัตถุดิบ และมีการใช้สารเคมีเจือจางร่วมด้วยในการแช่วัตถุดิบในขณะที่ให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Radhakrishin, 2009) คลื่นไมโครเวฟเป็นวิธีการทำความร้อนซึ่งใช้สนามแม่เหล็กไฟฟ้าโดยตรงกับโครงสร้างโมเลกุลของวัตถุดิบที่ให้ความร้อน ซึ่งก่อให้เกิดปฏิกิริยาทางฟิสิกส์ เคมี หรือชีวภาพ จึงได้นำมาประยุกต์ใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบซึ่งจะทำให้วัตถุดิบบวมและแตกออก เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวจำเพาะ ลดการเกิดพอลิเมอร์ ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และทำลายโครงสร้างลิกนิน ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ (Peng *et al.*, 2014) เป็นวิธีที่ง่ายต่อการควบคุม สามารถลดขนาดของเครื่องมือในกระบวนการได้ และลดของเหลือทิ้ง โดยในงานวิจัยของ Zhu *et al.* (2006) พบว่า การใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่างมีประสิทธิภาพในการปรับสภาพมากกว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายกรด

2.10.3 การปรับสภาพทางเคมี (chemical pretreatment)

- *การทำปฏิกิริยากับโอโซน (ozonolysis)*

โอโซนสามารถทำลายโครงสร้างของลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสได้ ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อเซลลูโลสในโครงสร้างวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย เปลือกถั่ว เป็นต้น จากงานวิจัยของ Vidal and Molinier (1988) เมื่อใช้โอโซนในการปรับสภาพฟางข้าวสาธิต สามารถ

กำจัดลิกนินได้ถึงร้อยละ 60 และเพิ่มอัตราการเกิดไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ได้ 5 เท่า และในการปรับสภาพซีลื้อของต้นพอลาร์ด้วยโอโซน สามารถเพิ่มผลผลิตจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์จากร้อยละ 0 เป็นร้อยละ 57 และลดปริมาณลิกนินจากร้อยละ 29 เป็นร้อยละ 8 ซึ่งข้อดีของการใช้โอโซนในการปรับสภาพวัตถุดิบ คือ สามารถกำจัดลิกนินได้ ไม่ทำให้เกิดสารพิษตกค้างในกระบวนการปลายน้ำ และสามารถทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและความดันห้องได้ แต่มีข้อเสีย คือ ความต้องการใช้ปริมาณโอโซนที่มาก ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง (Sun and Cheng, 2002)

- *การปรับสภาพด้วยกรด (acid pretreatment)*

ชนิดของกรดที่นำมาใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบมีหลายชนิด ได้แก่ กรดซัลฟิวริก ไฮโดรคลอริก ไนตริก และฟอสฟอริก ซึ่งการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดมี 2 วิธี คือ การไฮโดรไลซ์กรดเจือจาง และการไฮโดรไลซ์กรดเข้มข้น

- *การปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง*

เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความสะดวกศึกษากันอย่างมากและแพร่หลายที่สุด (Mussatto *et al.*, 2005) การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางสามารถเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาและมีการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสได้สูง (Esteghlalian *et al.*, 1997) โดยการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางที่อุณหภูมิต่ำกว่า 160 องศาเซลเซียส สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเฮมิเซลลูโลส โดยเปลี่ยนไซแลนเป็นไซโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ และในการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางที่อุณหภูมิสูงกว่า 160 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสได้มาก ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูง และมีการสลายตัวของลิกนิน (McMillan, 1994) แม้ว่าการปรับสภาพกรดแบบเจือจางจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสได้ แต่ในการปรับสภาพ ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ และอุณหภูมิที่ใช้ปรับสภาพ อาจจะมีผลทำให้เกิดสารพิษ หรือสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ ซึ่งจำเป็นต้องกำจัดออกก่อนนำวัตถุดิบไปไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ และต้องทำให้วัตถุดิบมีค่าเป็นกลางก่อน นอกจากนี้ ค่าใช้จ่ายในการปรับสภาพที่สูงกว่ากระบวนการปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมีบางอย่าง เช่น การระเบิดด้วยไอน้ำ หรือ AFEX (Sun and Cheng, 2002)

- *การปรับสภาพด้วยกรดเข้มข้น*

กรดเข้มข้นที่นิยมใช้ในการปรับสภาพ คือ กรดซัลฟิวริก และไฮโดรคลอริก ได้ถูกนำมาใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสได้สูง แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ กรดเข้มข้นเป็นมีความเป็นพิษ สามารถกัดกร่อน และเป็นอันตรายอย่างมาก ซึ่งต้องใช้เครื่องปฏิกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน นอกจากนี้ กรดเข้มข้นที่ใช้ในการปรับสภาพ

จะต้องถูกนำมาใช้ใหม่หลังการไฮโดรไลซิส เพื่อให้การใช้กระบวนการนี้มีความเป็นไปได้ในทางเศรษฐกิจ (Sivers and Zacchi, 1995)

- *การปรับสภาพด้วยด่าง (alkaline pretreatment)*

เป็นวิธีการที่สามารถไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสและลดปริมาณลิกนินได้ ทำให้เซลลูโลสถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ได้ง่าย โดยกลไกของการไฮโดรไลซ์ด้วยด่างเกิดจากปฏิกิริยาซาพอนนิฟิเคชัน (saponification) ของพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมโยงภายในโมเลกุลของไซแลน หรือระหว่างโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสกับลิกนิน ทำให้เกิดช่องว่างในวัตถุดิบมากขึ้น (Tarkow and Feist, 1969) โดยประสิทธิภาพของการปรับสภาพด้วยด่าง ขึ้นอยู่กับปริมาณลิกนินในวัตถุดิบ (Fan *et al.*, 1987) ซึ่งสารเคมีที่ใช้ปรับสภาพ เป็นสารที่ไม่เป็นพิษและไม่กัดกร่อน เช่น แอมโมเนีย, โซเดียมไฮดรอกไซด์, โซเดียมคาร์บอเนต และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Kim *et al.*, 2016)

การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส จะทำให้เกิดการบวมของโครงสร้างลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวภายในโมเลกุล ลดระดับของการเกิดพอลิเมอร์ ลดความเป็นผลึก การแยกโครงสร้างที่เชื่อมต่อระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต และทำลายโครงสร้างของลิกนิน (Fan *et al.*, 1987) จากงานวิจัยของ Millet *et al.* (1976) ได้ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางในการปรับสภาพไม้เนื้อแข็ง พบว่า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์จากร้อยละ 14 เป็นร้อยละ 55 และลดปริมาณของลิกนินจากร้อยละ 24-55 เหลือเพียงร้อยละ 20 แต่พบว่า การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ไม่มีผลกับไม้เนื้ออ่อนที่มีปริมาณของลิกนินมากกว่าร้อยละ 26

- *การกำจัดลิกนินโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative delignification)*

เป็นวิธีการย่อยสลายของลิกนินด้วยเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในงานวิจัยของ Azzam (1989) ศึกษาการปรับสภาพขานอ้อยด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยนำวัตถุดิบที่มีปริมาณของลิกนินร้อยละ 50 และปริมาณเฮมิเซลลูโลสที่มาก มาละลายในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใน 8 ชั่วโมง และนำมาไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลสเป็นร้อยละ 95 และในงานวิจัยของ Bjerre *et al.* (1996) ใช้วิธีการย่อยเปียก (wet oxidation) และการปรับสภาพด้วยด่างในการปรับสภาพฟางข้าวสาลี โดยใช้ฟางข้าวสาลี 20 กรัม/ลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที พบว่า ประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลสเป็นร้อยละ 85

- การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (*organosolv process*)

เป็นวิธีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการปรับสภาพวัตถุดิบ จะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมกับตัวเร่งปฏิกิริยากรดอินทรีย์และกรดอินทรีย์ เพื่อทำลายพันธะภายในของลิกนินและเฮมิเซลลูโลส โดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการปรับสภาพ ได้แก่ เมทานอล, เอทานอล, อะซิโตน, เอธิลีนไกลคอล และไตรเอธิลีนไกลคอล เป็นต้น (Thring *et al.*, 1990) กรดอินทรีย์และกรดอินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น กรดซัลฟิวริก, กรดไฮโดรคลอริก, กรดออกซาลิก, กรดแอสिटิลซาลิไซลิก และกรดซาลิไซลิก เป็นต้น ซึ่งเมื่อเติมกรดลงในกระบวนการจะทำให้ได้ปริมาณไซโลสสูง แต่เมื่อทำปฏิกิริยาอุณหภูมิสูงกว่า 185 องศาเซลเซียส ไม่จำเป็นที่จะต้องเติมตัวเร่งปฏิกิริยาในการกำจัดลิกนิน (Sarkanen, 1980) ซึ่งในการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์จะมีข้อจำกัด คือตัวทำละลายที่ใช้ในกระบวนการนี้จำเป็นต้องระบายออกจากเครื่องปฏิกรณ์โดยการระเหย และนำกลับมาใช้ใหม่เพื่อลดต้นทุน การกำจัดตัวทำละลายออกจากกระบวนการเป็นสิ่งจำเป็นเนื่องจากตัวทำละลายสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การไฮโดรไลซ์ของเอนไซม์ และกระบวนการหมักได้ (Sun and Cheng, 2002)

2.10.4 การปรับสภาพทางชีวภาพ (*biological pretreatment*)

จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในไฮโดรไลซ์วัตถุดิบด้วยเอนไซม์ โดยจุลินทรีย์จะย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลสจะถูกย่อยสลายได้น้อยมาก เนื่องจากเซลลูโลสมีโครงสร้างที่แข็งแรง จึงสามารถย่อยได้ยากกว่าโครงสร้างอื่น มีการใช้จุลินทรีย์ชนิดราฟุสีน้ำตาล (*brown-rot fungi*), ราฟุสีขาว (*white-rot fungi*) และราฟุอ่อน (*soft-rot fungi*) ในการปรับสภาพวัตถุดิบ โดยราฟุสีน้ำตาล จะทำลายโครงสร้างของเซลลูโลสเป็นหลัก แต่ราฟุสีขาวและราฟุอ่อน จะทำลายทั้งโครงสร้างเซลลูโลสและลิกนิน (Sun and Cheng, 2002) ซึ่งราฟุสีขาวเป็นราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการปรับสภาพทางชีวภาพของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (Fan *et al.*, 1987)

จุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในการปรับสภาพ เช่น *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoreus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* และ *Pleurotus ostreatus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการปรับสภาพวัตถุดิบทางชีวภาพ (Sreenath *et al.*, 2001) ในงานวิจัยของ Akin *et al.* (1995) ศึกษาการย่อยสลายทางชีวภาพของหญ้าแพรงโดยใช้ *Ceriporiopsis subvermispora* และ *Cyathus stercoreus* พบว่า หลังจาก 6 สัปดาห์ มีการย่อยสลายทางชีวภาพ คิดเป็นร้อยละ 29-32 และร้อยละ 63-77

ตามลำดับ ข้อดีของการปรับสภาพทางชีวภาพ คือ ใช้พลังงานต่ำ และสภาวะแวดล้อมที่ไม่รุนแรง แต่มีอัตราการย่อยสลายในการปรับสภาพทางชีวภาพน้อยมาก (Sun and Cheng, 2002)

2.11 การไฮโดรไลซ์เซลลูโลสด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis of cellulose)

การไฮโดรไลซ์เซลลูโลสด้วยเซลลูเลส (cellulase) จะได้ผลิตภัณฑ์ของการไฮโดรไลซิสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) คือ กลูโคส โดยต้นทุนการใช้เอนไซม์ในการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสจะต่ำกว่าการใช้กรดหรือด่าง เนื่องจากการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์มักเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่รุนแรง (pH 4.8 และอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส) และไม่มีปัญหาเรื่องการกัดกร่อน (Duff and Murray, 1996) ซึ่งในธรรมชาติพบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเซลลูเลสสำหรับการไฮโดรไลซ์วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ ทั้งในจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน (aerobic), จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic), จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) และจุลินทรีย์ที่ทนร้อนได้ (thermophilic) ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูเลสสำหรับการไฮโดรไลซ์วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ ได้แก่ *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* และ *Streptomyces* เป็นต้น (Bisaria, 1991) โดย *Clostridium thermocellum* และ *Bacteroides cellulosolvens* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนที่สามารถผลิตเซลลูเลสที่มีกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) สูง แต่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ปริมาณน้อย เนื่องจากแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนมีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำ และต้องการสภาวะการเจริญเติบโตแบบไม่ใช้ออกซิเจน การวิจัยส่วนใหญ่สำหรับการผลิตเซลลูเลสในเชิงพาณิชย์จึงมุ่งเน้นไปที่รา (Duff and Murray, 1996) และราที่ผลิตเซลลูเลสได้แก่ *Sclerotium rolfsii*, *P. chrysosporium*, สปีชีส์ของ *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* และ *Penicillium* เป็นต้น ซึ่งราในสปีชีส์ของ *Trichoderma* ถูกนำมาใช้ในการผลิตเซลลูเลสมากที่สุด (Sternberg, 1976) โดยต้นทุนการใช้เอนไซม์ในการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสจะต่ำกว่าการใช้กรดหรือด่าง เนื่องจากการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์มักเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่รุนแรง (pH 4.8 และอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส) และไม่มีปัญหาเรื่องการกัดกร่อน (Duff and Murray, 1996)

2.11.1 เซลลูเลส (cellulase)

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์โมเลกุลของเซลลูโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า 1,4-ไกลโคซิดิก ให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเซลลูเลสมักจะมีส่วนผสมของเอนไซม์หลายชนิด โดยมีเอนไซม์เชิงซ้อน 3 ชนิดที่สำคัญของเซลลูเลสที่มีส่วนร่วมในกระบวนการไฮโดรไลซิส ได้แก่

(1) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase, EC 3.2.1.4) มีหน้าที่ย่อยสลายพันธะบีต้า 1,4-ไกลโคซิดิกภายในสายเซลลูโลสแบบสุ่มที่เป็นโครงสร้างผลึกให้เป็นเซลลูโลสสายโซ่

(2) เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase, EC 3.2.1.91) หรือที่เรียกว่าเซลโลไบโอไฮโดรเลส (cellobiohydrolase) มีหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสสายโซ่ออกจากปลายสายโซ่ ได้เป็นเซลโลไบโอส (cellobiose) ซึ่งเซลโลไบโอสเป็นไดแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 2 หน่วย

(3) บีต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase, EC 3.2.1.21) มีหน้าที่ย่อยสลายพันธะบีต้า 1,4-ไกลโคซิดิกของเซลโลไบโอส ได้เป็นกลูโคส (Sun and Cheng, 2002)

นอกจากเซลลูเลส 3 ชนิดที่สำคัญนี้ ยังมีเอนไซม์อื่นๆ ที่ไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลส ในระหว่างการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสด้วยเซลลูเลส เช่น กลูคูโรนิเดส (glucuronidase), อะเซทิลเอสเตอเรส (acetylsterase), ไซลานเนส (xylanase), บีต้าไซโลซิเดส (β -xylosidase), กาแลคโตแมนแนนเนส (galactomannanase) และกลูโคแมนแนนเนส (glucomannanase) (Duff and Murray, 1996)

การไฮโดรไลซ์เซลลูโลสด้วยเซลลูเลสประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ (1) การดูดซับเซลลูเลสบนผิวเซลลูโลส (2) การสลายตัวทางชีวภาพของเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลรีดิซ และ (3) การปลดปล่อยเซลลูเลส ซึ่งกิจกรรมเซลลูเลสจะลดลงในระหว่างการไฮโดรไลซิส เป็นผลมาจากการดูดซับเซลลูเลสบนเซลลูโลสที่ไม่สามารถกลับคืนรูปได้ ทำให้เซลลูเลสเสียดสภาพไป (Converse *et al.*, 1988) จึงมีการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ระหว่างการไฮโดรไลซิส เพื่อปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของผิวเซลลูโลส และช่วยให้เซลลูเลสมีความเสถียรมากขึ้น สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในกระบวนการไฮโดรไลซิส ได้แก่ ทวิน 20 (Tween 20), ทวิน 80 (Tween 80) และพอลิเอทริลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) เป็นต้น (Sun and Cheng, 2002)

2.12 ผักตบชวา (water hyacinth)

ผักตบชวา (water hyacinth) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms จัดอยู่ในวงศ์ผักตบ (Pontederiaceae) มีถิ่นกำเนิดที่ทวีปอเมริกาใต้ ประเทศบราซิล (Hill and Coetzee, 2008) เป็นพืชที่เจริญอยู่บนผิวน้ำ จัดเป็นประเภทลอยน้ำ (floating plant) สามารถลอยน้ำได้โดยไม่ต้องมีที่ยึดเกาะ (Xia *et al.*, 2013) ลำต้นมีลักษณะสั้นแตกใบเป็นกอ ใบเป็นใบเดี่ยวคล้ายรูปหัวใจหรือเกือบกลม เป็นมันหนา ก้านใบกลมอวบน้ำ ตรงกลางพองออกภายใน เป็นช่องอากาศช่วยให้พืชสามารถลอยน้ำได้ รากจะแตกออกจากลำต้นตรงบริเวณข้อ รากมีสีม่วงดำ ออกดอกเป็นช่ออยู่กลางกอ ไม่มีก้านดอก เกิดเป็นช่อที่ปลายยอดมีดอกย่อย 3-25 ดอก สีม่วงอ่อน มีกลีบ

ดอก 6 กลีบ กลีบบนสุดจะมีขนาดใหญ่กว่ากลีบอื่นๆ และจะมีจุดหรือแต้มสีเหลืองที่กลางกลีบ (รูปที่ 11) สามารถแพร่พันธุ์ได้รวดเร็วมาก (Dersseh *et al.*, 2019)



รูปที่ 11 ลักษณะของต้นผักตบชวา และดอกผักตบชวา

ผักตบชวาสามารถเจริญเติบโตได้ทุกสภาวะแวดล้อม ทั้งในน้ำสกปรกและน้ำสะอาด และเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว จึงถือเป็นวัชพืชน้ำที่ส่งผลกระทบต่อหลายด้าน เช่น ด้านการชลประทาน เนื่องจากผักตบชวาไปกีดขวางการไหลของน้ำ ทำให้อัตราการไหลของน้ำลดลง ก่อให้เกิดการระบายน้ำไม่ทัน ด้านการประมง เนื่องจากผักตบชวาที่ขึ้นอย่างหนาแน่น จะเป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโตของปลาและสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ และยังทำให้แสงส่องลงในแหล่งน้ำได้ลดลง เป็นผลทำให้พืชที่อาศัยอยู่ในน้ำและแพลงตอนซึ่งเป็นอาหารปลามีปริมาณลดลง ด้านการคมนาคมทางน้ำ ผักตบชวาเป็นอุปสรรคที่กีดขวางการสัญจรทางน้ำ ทำให้การสัญจรทางเรือเป็นไปได้ยาก (Dersseh *et al.*, 2019)

การเจริญเติบโตของผักตบชวานั้น ไม่ได้เป็นปัญหาแค่ในประเทศไทยเท่านั้น แต่ยังเป็นปัญหาให้กับหลายประเทศทั่วโลกอีกด้วย จึงได้มีความคิดที่จะนำผักตบชวามาทำให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การทำหัตถกรรมเป็นเครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ นำมาทำเป็นอาหารสัตว์ และปุ๋ยหมัก รวมถึงนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักเพื่อผลิตสารที่มีมูลค่า เนื่องจากผักตบชวานั้นถือว่าเป็นวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นทรัพยากรที่สามารถนำกลับมาใช้และสร้างใหม่ได้ จึงเป็นทางเลือกในการใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต เพื่อลดต้นทุนการผลิตในภาคอุตสาหกรรมได้ (Annamalai *et al.*, 2014; Khanna and Srivastava, 2005) เช่น ในงานวิจัยของ Pawongrat (2011) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไฮโดรไลเสทผักตบชวาโดยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง เพื่อผลิตเอทานอล โดยนำผักตบชวาจากส่วนลำต้นและใบมาวิเคราะห์องค์ประกอบเส้นใยของวัตถุดิบประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน คิดเป็นร้อยละ 44.71, 14.85 และ 3.06 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ จากนั้นนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้วิธีทาง

กายภาพร่วมกับทางเคมี 3 วิธี คือ (1) นำผักตบชวาไปแช่น้ำเปล่า (2) นำผักตบชวาไปแช่สารละลายกรด และ (3) นำผักตบชวาไปแช่สารละลายต่าง ที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 6 ชั่วโมง แล้วแยกส่วนที่เป็นของเหลวออกก่อนนำไปย่อยด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและสารประกอบอนุพันธ์ที่เป็นพิษ และวิเคราะห์โครงสร้างวัตถุบหลังการปรับสภาพ พบว่า การปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ร่วมกับหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง เป็นวิธีการปรับสภาพผักตบชวาที่ดีที่สุด ทำให้ได้เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส สูงถึงร้อยละ 47.38 และ 23.16 โดยน้ำหนักตามลำดับ และมีปริมาณลิกนินอยู่เพียงร้อยละ 3.71 โดยน้ำหนัก และยังให้ลักษณะโครงสร้างทางกายภาพเหมาะสำหรับการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

งานวิจัยของ Suntonchaiboon and Pawongrat (2012) เปรียบเทียบการปรับสภาพผักตบชวาและจอก 3 วิธี คือ (1) การปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก (2) การปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก และ (3) ไม่ปรับสภาพ (ชุดควบคุม) พบว่า ผักตบชวาและจอกที่ไม่ผ่านการปรับสภาพมีปริมาณเซลลูโลสสูงที่สุด คือร้อยละ 75.25 โดยน้ำหนัก จึงเลือกใช้ผักตบชวาและจอกที่ไม่ผ่านการปรับสภาพไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 1000 ยูนิตต่อ 1 กรัมของสารตั้งต้น ใน 4 สภาวะ คือ (1) ใช้เซลลูโลส 10 มิลลิลิตร (2) ใช้ไซลาเนส 10 มิลลิลิตร (3) ใช้เซลลูโลส 5 มิลลิลิตร และไซลาเนส 5 มิลลิลิตร และ (4) ใช้ไซลาเนส 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วเติมเซลลูโลส 5 มิลลิลิตร พบว่า เมื่อใช้เซลลูโลส 10 มิลลิลิตร สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ปริมาณมากที่สุดคือร้อยละ 47.63 โดยน้ำหนัก และให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.24 กรัมต่อ 1 กรัมของสารตั้งต้น

งานวิจัยของ Xia *et al.* (2013) ศึกษาการปรับสภาพผักตบชวาด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับกรดซัลฟิวริกเจือจาง โดยศึกษาผลของกำลังไฟไมโครเวฟ (100 - 1000 วัตต์) อุณหภูมิไมโครเวฟ (0 - 300 องศาเซลเซียส) เวลาทำปฏิกิริยา (5 - 45 นาที) ปริมาณของวัตถุดิบ (0.2 - 0.6 กรัม) และความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก (ร้อยละ 0 - 2 โดยปริมาตร) ต่อองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และการไฮโดรไลซิสผักตบชวาด้วยเอนไซม์ จากการทดลองพบว่า จากการปรับสภาพ เฮมิเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซ์ให้เป็นโมโนแซคคาไรด์ และเซลลูโลสจำนวนมากถูกปลดปล่อยออกมาจากโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส ส่งผลให้เซลลูโลสสามารถเข้าไปยังพื้นผิวของเซลลูโลสได้ง่าย เป็นผลให้กระบวนการแซ็กคาริฟิเคชันด้วยเอนไซม์ของผักตบชวาดีขึ้น และปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้น หลังจากการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ เมื่อปรับสภาพผักตบชวาที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ด้วยคลื่นไมโครเวฟ ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น

ร้อยละ 1 โดยปริมาตร พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการไฮโดรไลซิสคือ 48.3 กรัมต่อ 100 กรัม ผักตบชวา ซึ่งเป็นร้อยละ 94.6 ของน้ำตาลรีดิวซ์

งานวิจัยของ Pradhan *et al.* (2017) ศึกษาการสังเคราะห์ PHB จากวัชพืชสองชนิด ได้แก่ *P. hysterophorus* และ *E. crassipes* ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งนำมาทำการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางร่วมกับหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง โดยใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร และกำจัดสารประกอบที่เป็นพิษและลิกนินออก จากนั้นนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยเซลลูเลสและเซลลูไบเอส เพื่อใช้เป็นแหล่งน้ำตาลเพนโตส และเฮกโทนในกระบวนการหมัก สำหรับการเพาะเลี้ยง *Ralstonia eutropha* MTCC 8320 จากการทดลองพบว่า น้ำตาลเฮกโทนจาก *E. crassipes* สามารถผลิต PHB ได้สูงสุด 0.96 กรัมต่อลิตร ผลผลิต PHB เท่ากับ 36.41×10^{-3} กรัม PHB ต่อกรัมของสารตั้งต้น



บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียมผักตบชวา

เก็บผักตบชวาในส่วนใบและลำต้น นำมาล้างทำความสะอาด แล้วตัดผักตบชวาให้ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งผักตบชวาแห้งสนิท แล้วนำไปบดให้มีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร ด้วยเครื่อง hammer mill (Retsch, type SR 200, Haan, Germany)

3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพผักตบชวา

3.2.1 การปรับสภาพด้วยด่างเจือจาง

นำผักตบชวาจากขั้นตอนที่ 3.1 มาปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ในอัตราส่วนผักตบชวาต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1:10 โดยมวลต่อปริมาตร นำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อน้ำความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที จากนั้นกรองผักตบชวาด้วยผ้าขาวบาง ล้างผักตบชวาด้วยน้ำกลั่นให้ pH เป็นกลาง และนำผักตบชวาไปอบในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งผักตบชวาแห้งสนิท แล้วนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเพื่อหาปริมาณเส้นใยภายในโครงสร้าง ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ด้วยวิธี TAPPI 203 om-88 (ภาคผนวก ค)

3.2.2 การปรับสภาพด้วยกรดเจือจาง

นำผักตบชวาจากขั้นตอนที่ 3.1 มาปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 โดยปริมาตร ในอัตราส่วนผักตบชวาต่อกรดซัลฟิวริก 1:10 โดยมวลต่อปริมาตร นำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อน้ำความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที จากนั้นกรองผักตบชวาด้วยผ้าขาวบาง ล้างผักตบชวาด้วยน้ำกลั่นให้ pH เป็นกลาง และนำผักตบชวาไปอบในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งผักตบชวาแห้งสนิท แล้วนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเพื่อหาปริมาณเส้นใยภายในโครงสร้าง ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ด้วยวิธี TAPPI 203 om-88 (ภาคผนวก ค)

3.3 การไฮโดรไลซิสผักตบชวาด้วยเอนไซม์ (ดัดแปลงจาก Ruangmee (2012))

เติมซีเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 4.8) ลงในผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพจากการศึกษาในข้อ 3.2 ในอัตราส่วนผักตบชวาต่อซีเตรตบัฟเฟอร์ 1:40 โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นเติมเซลลูเลส (Jinan Tiantianxiang Co., Ltd., China) 15 FPU ต่อกรัมสารตั้งต้น แล้วนำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข) จนกระทั่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงที่

3.4 การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายโคโลนี *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 ลงในอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร NB ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5 การศึกษาสภาวะการผลิต PHB

3.5.1 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB

นำกล้าเชื้อมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางเชื้อตั้งต้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.70 - 0.75 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อตั้งต้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร mineral salt medium (MSM) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่เสริมน้ำตาลรีดิวซ์ 10 กรัมต่อลิตร จากผักตบชวาไฮโดรไลเซท และแหล่งไนโตรเจน 2 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ ปริมาณ PHB และปริมาณ PHB สะสม (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง) (ภาคผนวก ข)

แต่ละชุดการทดลอง จะเปลี่ยนชนิดของแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโนเนียมคลอไรด์, tryptone, peptone, yeast extract และยูเรีย

3.5.2 การศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB

นำกล้าเชื้อมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางเชื้อตั้งต้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.70 - 0.75 ถ่ายเชื้อตั้งต้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MSM ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่เสริมน้ำตาลรีดิวซ์ 10 กรัมต่อลิตร จากผักตบชวาไฮโดรไลเซท และใช้แหล่ง

ไนโตรเจนที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 3.5.1 ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน เท่ากับ 20:1, 20:2, 20:3, 20:4 และ 20:5 จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ ปริมาณ PHB และปริมาณ PHB สะสม (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง)

3.6 การศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ

นำกล้าเชื้อมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางเชื้อตั้งต้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.70 - 0.75 ถ่ายเชื้อตั้งต้น ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร ที่มีอาหาร MSM ปริมาตร 1.35 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาข้อ 3.5 และควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ± 4 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm โดยเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณ PHB และปริมาณ PHB สะสม (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง)

3.7 การสกัดแยก PHB

ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปสกัด PHB ด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 30 วินาที ดูดสารละลายในชั้นของคลอโรฟอร์มใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว และเติมคลอโรฟอร์มจนปริมาตรรวมเป็น 10 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณ PHB ต่อไป (ภาคผนวก ข)

3.8 การศึกษาคุณลักษณะของพอลิเมอร์

3.8.1 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer; NMR)

นำพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 น้ำหนักประมาณ 5 มิลลิกรัม ละลายใน $CDCl_3$ ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอด NMR แล้วนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรมิเตอร์ รุ่น BRUKER 300 MHz ผลิตโดยบริษัท Bruker

3.8.2 การวิเคราะห์ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FTIR)

นำแผ่นพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 วางบนแท่นวางตัวอย่างของเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์รุ่น NICOLET iS5 ผลิตโดยบริษัท Thermo Scientific โดยตั้งค่าช่วงวิเคราะห์ที่เลขคลื่น (scan range) $4,000-400\text{ cm}^{-1}$

3.8.3 การวิเคราะห์ด้วยดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential Scanning Calorimetry; DSC)

นำพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 น้ำหนัก 2 มิลลิกรัม ใส่ลงในภาชนะที่ใช้สำหรับใส่สารตัวอย่าง (sample pan) แล้วนำไปวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลว (melting point) ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC) รุ่น pyris ผลิตโดยบริษัท Perkin Elmer ซึ่งใช้สภาวะการวิเคราะห์ดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น	30.0	องศาเซลเซียส
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	10.0	องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิสุดท้าย	200.0	องศาเซลเซียส
อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน	50.0	มิลลิลิตรต่อนาที

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และประเมินทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) กำหนดระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 21.0 สำหรับ Windows

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผักตบชวา

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผักตบชวา ที่เก็บมาจากบริเวณคลองน้ำเสีย ตำบลสระกะเทียม อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม ที่ผ่านการอบให้แห้ง แล้วนำไปบดให้มีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร และนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเพื่อหาปริมาณเส้นใยภายในโครงสร้าง ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ด้วยวิธี TAPPI 203 om-88 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 พบว่า ผักตบชวาที่นำมาวิเคราะห์มีปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด ถึงร้อยละ 86.44 ± 0.77 ของน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน คิดเป็นร้อยละ 8.32 ± 0.92 และ 5.24 ± 0.15 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Suntonchaiboon and Pawongrat (2012) พบว่า ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของผักตบชวาที่มีปริมาณมากที่สุด คือ เซลลูโลส รองลงมาคือ เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน คิดเป็นร้อยละ 75.25, 20.05 และ 3.70 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Pradhan *et al.* (2017) พบปริมาณโฮโลเซลลูโลส (holocellulose) ที่ประกอบด้วยปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ถึงร้อยละ 82.20 ของน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณลิกนิน ร้อยละ 4.10 ของน้ำหนักแห้ง โดยจากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี แสดงให้เห็นว่า ผักตบชวาที่เก็บมาจากบริเวณคลองน้ำเสีย ตำบลสระกะเทียม อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิต PHB แต่เนื่องจากในโครงสร้างของผักตบชวานั้น มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ ทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ยาก จึงต้องมีการปรับสภาพผักตบชวา เพื่อกำจัดลิกนินออกจากโครงสร้าง เพื่อให้โครงสร้างของเซลลูโลสอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของผักตบชวา

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละของน้ำหนักแห้ง
เซลลูโลส	86.44 ± 0.77
เฮมิเซลลูโลส	8.32 ± 0.92
ลิกนิน	5.24 ± 0.15

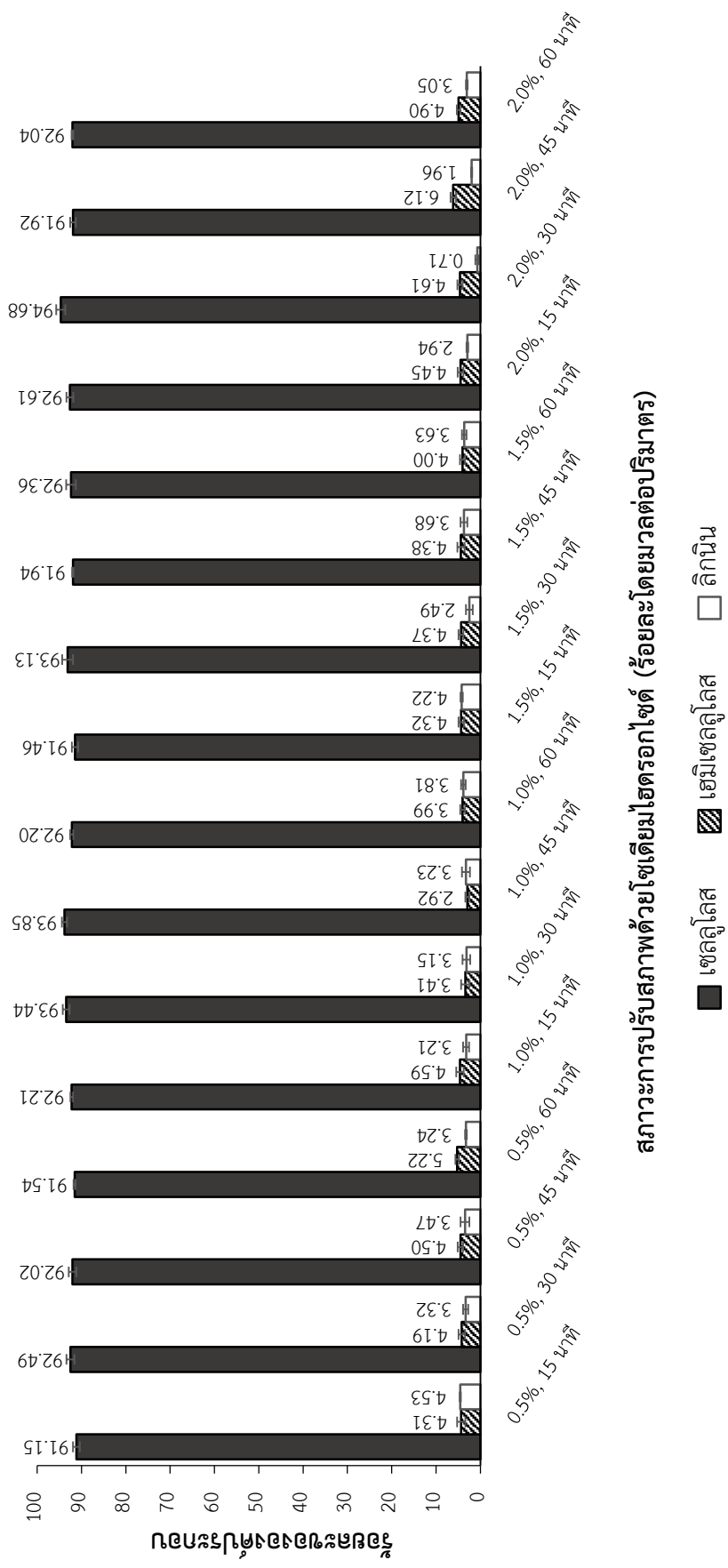
4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพผักตบชวา

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพผักตบชวาในการกำจัดลิกนินออกจากโครงสร้างของผักตบชวา ด้วยวิธีการทางกายภาพร่วมกับเคมี โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1, 1.5 และ 2 โดยมวลต่อปริมาตร และกรดซัลฟิวริก ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1, 1.5 และ 2 โดยปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อหนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที นำผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพไปวิเคราะห์หาร้อยละปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ด้วยวิธี TAPPI 203 om-88 จากผลการทดลองการปรับสภาพผักตบชวาด้วยวิธีต่างเจือจางร่วมกับการให้ความร้อน พบว่าวิธีการปรับสภาพผักตบชวาด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อหนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพผักตบชวาด้วยวิธีต่างเจือจางร่วมกับการให้ความร้อน เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณของเซลลูโลสเมื่อเทียบกับผักตบชวาก่อนปรับสภาพ ได้ถึงร้อยละ 8.24 ของน้ำหนักแห้ง (จากร้อยละ 86.44 ± 0.77 เป็น 94.68 ± 0.62 ของน้ำหนักแห้ง) และในขณะเดียวกัน สามารถลดปริมาณเฮมิเซลลูโลส และปริมาณลิกนินได้ร้อยละ 3.71 (จากร้อยละ 8.32 ± 0.92 เหลือ 4.61 ± 0.60 ของน้ำหนักแห้ง) และร้อยละ 4.53 ของน้ำหนักแห้ง (จากร้อยละ 5.24 ± 0.15 เหลือ 0.71 ± 0.14 ของน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (รูปที่ 12) และจากผลการทดลองการปรับสภาพผักตบชวาด้วยวิธีกรดเจือจางร่วมกับการให้ความร้อน ที่แสดงดังรูปที่ 13 พบว่า วิธีการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อหนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพผักตบชวาด้วยวิธีกรดเจือจางร่วมกับการให้ความร้อน เนื่องจากสามารถลดปริมาณลิกนินเมื่อเทียบกับผักตบชวาก่อนปรับสภาพ ได้ร้อยละ 3.48 (จากร้อยละ 5.24 ± 0.15 เหลือ 1.76 ± 0.12 ของน้ำหนักแห้ง)

เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 2 สภาวะ พบว่า วิธีการปรับสภาพผักตบชวาด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถกำจัดลิกนินออกจากโครงสร้างของผักตบชวาได้มากกว่าวิธีการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 1.05 ของน้ำหนักแห้ง และยังสามารถเพิ่มปริมาณของเซลลูโลสได้มากกว่าวิธีการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 8.38 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า วิธีการปรับสภาพผักตบชวาด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อหนึ่งความดันไอน้ำ สามารถแยกเซลลูโลสออกจากเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้ดีกว่าวิธีการปรับสภาพ

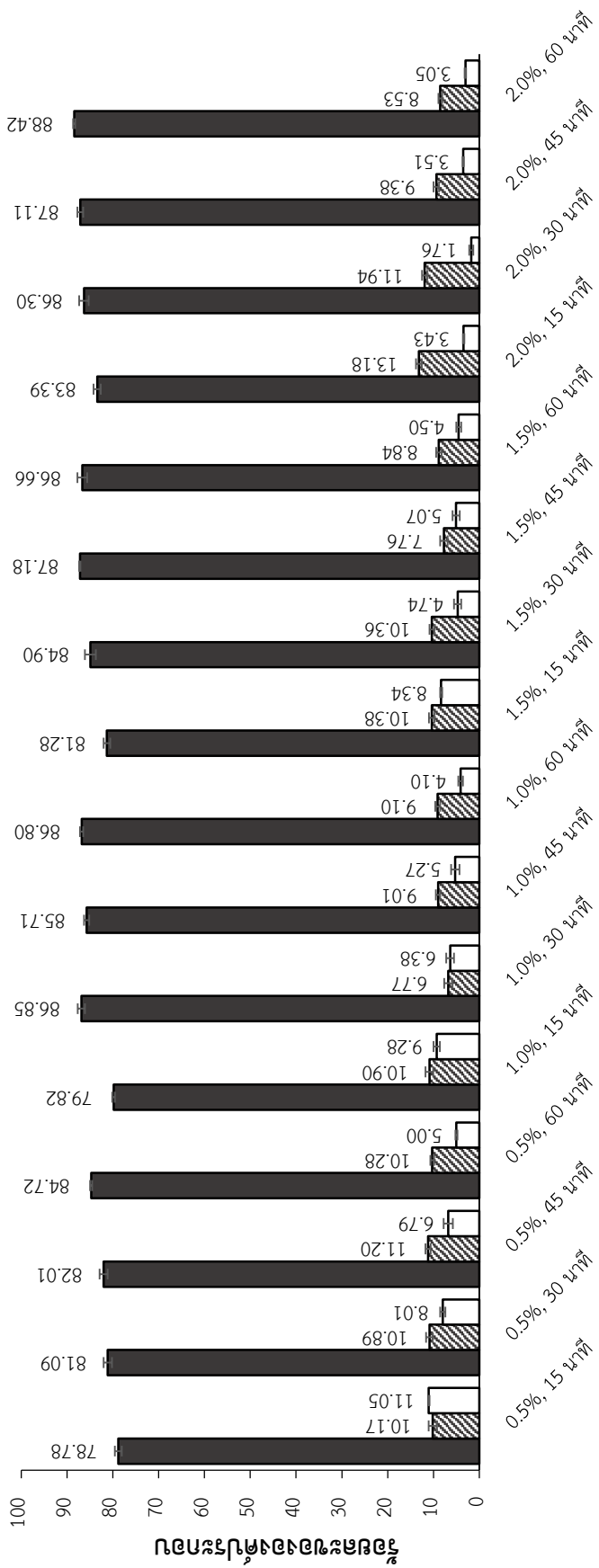
ผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Qing *et al.* (2017) ที่ศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพเปลือกกล้วยเหลืองและฟางกล้วยเหลืองเพื่อผลิตน้ำตาลสำหรับการหมัก โดยเปรียบเทียบวิธีการปรับสภาพด้วยต่างและวิธีการปรับสภาพด้วยกรด ที่ความดัน และอุณหภูมิสูง จากการทดลองพบว่า เปลือกกล้วยเหลืองที่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่าง และเปลือกกล้วยเหลืองที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เมื่อผ่านการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสด้วยเอนไซม์ จะได้ผลผลิตน้ำตาลรวมสูงสุดคือ ร้อยละ 86.9 และร้อยละ 75.6 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การปรับสภาพด้วยต่างมีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนิน และการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสด้วยเอนไซม์มากกว่าการปรับสภาพด้วยกรด และงานวิจัยของ Yuan *et al.* (2019) ที่ศึกษาการปรับสภาพก้านยาสูบ สำหรับการผลิตไบโอเอทานอล โดยเปรียบเทียบวิธีการปรับสภาพด้วยต่าง และวิธีการระเหิดด้วยไอน้ำ โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (acid-catalyzed steam pretreatment) พบว่า วิธีการปรับสภาพด้วยต่างสามารถกำจัดลิกนินได้ดีกว่าวิธีการระเหิดด้วยไอน้ำ โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้น จึงเลือกใช้วิธีการปรับสภาพผักตบชวาด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมีมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ในการศึกษาการไฮโดรไลซิสผักตบชวาด้วยเอนไซม์ต่อไป





สถานะการปรับสภาพด้วยไฮดรอกไซด์ (ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร)

รูปที่ 12 องค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคปรับสภาพด้วยสารละลายไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1, 1.5 และ 2 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที รายงานผลการทดลองเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



สภาวะการปรับสภาพตัวกรซัลฟิวริก (ร้อยละโดยปริมาตร)

■ เซลล์โกลด์ ▨ เฮมิเซลล์โกลด์ □ ดิทินิน

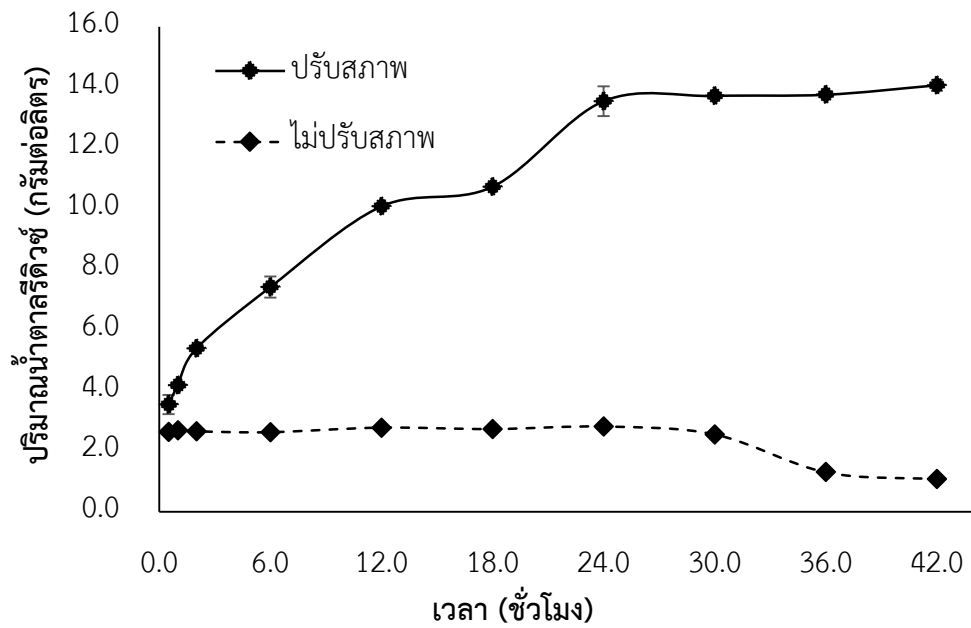
รูปที่ 13 องค์ประกอบของผักตบชวาที่ถูกปรับสภาพด้วยสารละลายลาวยกรซัลฟิวริก ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1, 1.5 และ 2 โดยปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อน โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที รายงานผลการทดลองเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.3 การไฮโดรไลซิสผักตบชวาด้วยเอนไซม์

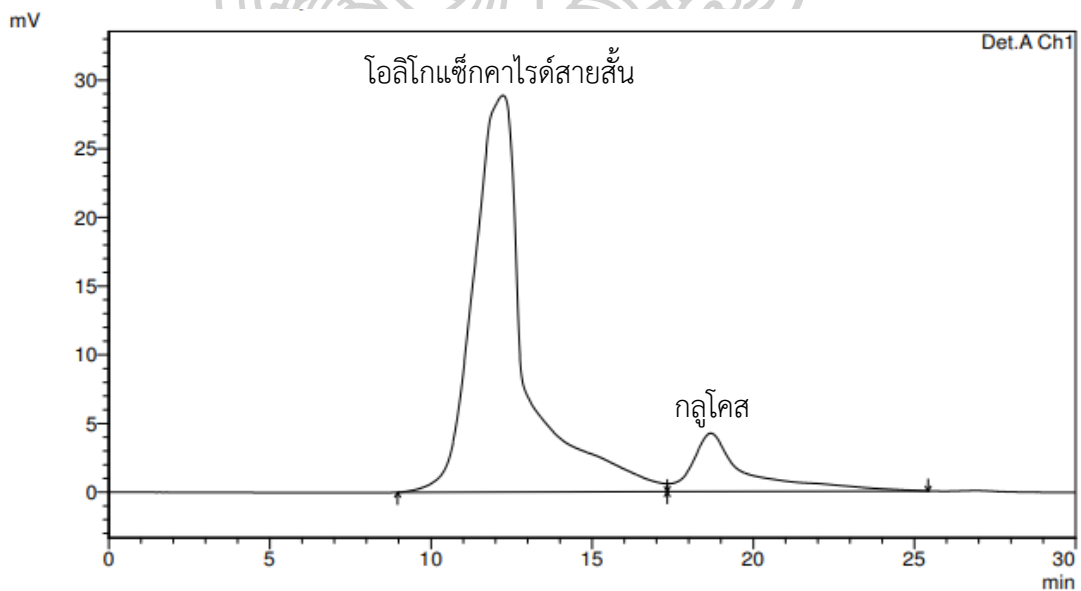
จากการศึกษาการไฮโดรไลซิสผักตบชวาคด้วยเอนไซม์ โดยไฮโดรไลซ์ผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเซลล์ูลาส ความเข้มข้น 15 FPU ต่อกรัมสารตั้งต้น ในซีเตรตบัฟเฟอร์ (pH 4.8) ในอัตราส่วนผักตบชวาต่อซีเตรตบัฟเฟอร์ 1:40 โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำผักตบชวาไฮโดรไลเซท (ส่วนใส) ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี dinitrosalicylic acid จนกระทั่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งที่ โดยเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้กับผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ผลการทดลองการไฮโดรไลซิสผักตบชวาคด้วยเซลล์ูลาส พบว่า เวลาที่เหมาะสมสำหรับการไฮโดรไลซิสของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที คือ 24 ชั่วโมง ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถึง 13.54 ± 0.87 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพถูกไฮโดรไลซ์ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพียง 2.81 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 14 และเมื่อนำไฮโดรไลเซทของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพ และผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพที่เวลา 24 ชั่วโมง ไปวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าโครมาโทแกรมของผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ปรากฏพีค 2 พีค คือ พีคของโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น และพีคของกลูโคส โดยมี retention time ที่ 12.232 และ 18.681 นาที ตามลำดับ ดังรูปที่ 15 โครมาโทแกรมของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ปรากฏพีค 3 พีค คือ พีคของโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น และพีคของมอลโทส และพีคของกลูโคส โดยมี retention time ที่ 11.866, 15.087 และ 18.682 นาที ตามลำดับ ดังรูปที่ 16 เมื่อพิจารณาจากค่า %area ของพีคโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น พบว่า มี %area ลดลงจากร้อยละ 87.039 เป็นร้อยละ 50.720 ในขณะที่ %area ของพีคกลูโคสเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 12.961 เป็นร้อยละ 36.053 และเกิด %area ของพีคมอลโทส เพิ่มขึ้นมาร้อยละ 12.777 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์โอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นให้กลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีขึ้น โดยผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที มีปริมาณกลูโคสและมอลโทส เป็น 11.92 ± 2.09 และ 4.06 ± 0.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด 15.98 ± 2.69 กรัมต่อลิตร (639.2 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัมสารตั้งต้น) แต่ผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพมีเพียงกลูโคส 2.92 ± 0.20 กรัมต่อลิตร (116.81 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัมสารตั้งต้น) ดังตารางที่ 4 ซึ่งพบว่าการปรับสภาพผักตบชวาคด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซิสได้ถึง 5.47 เท่า

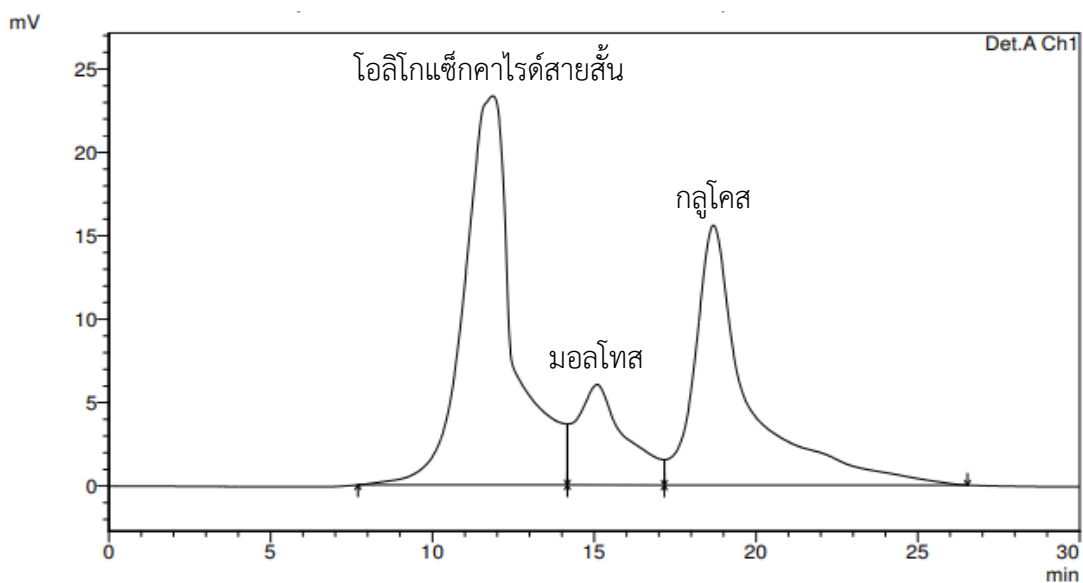
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพผักตบชวาก่อนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เป็นสิ่งจำเป็นในการทำลายและกำจัดโครงสร้างลิกนินที่ล้อมรอบเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสอยู่ ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์สำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิต PHB ได้ง่ายขึ้น (Sun and Cheng, 2002; Yang and Wyman, 2008) ซึ่งจากผลการทดลองนี้ ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าในงานวิจัยของ Su *et al.* (2010) ที่ศึกษากระบวนการปรับสภาพผักตบชวาคด้วยวิธีการใช้ความร้อนด้วยไอน้ำ (steam heating) และวิธีการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยเซลลูเลส เพื่อนำไปผลิตแก๊สไฮโดรเจน จากการทดลองพบว่า ผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเซลลูเลส ได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 30.57 กรัมต่อ 100 กรัมผักตบชวา (305.7 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวา) งานวิจัยของ Xia *et al.* (2013) ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพผักตบชวาคด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับกรดซัลฟิวริก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ จากการทดลองพบว่า ผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ร่วมกับคลื่นไมโครเวฟ ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเซลลูเลส ได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 48.3 กรัมต่อ 100 กรัมผักตบชวา (483 มิลลิกรัมต่อกรัมผักตบชวา) และงานวิจัยของ Pradhan *et al.* (2017) ที่ศึกษาการสังเคราะห์ PHB จาก *P. hysterothorus* และ *E. crassipes* ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที และไฮโดรไลซ์ด้วยเซลลูเลส และเซลโลบิเอส ความเข้มข้น 135 และ 75 FPU ต่อกรัมสารตั้งต้น ตามลำดับ พบว่าสามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสของ *P. hysterothorus* และ *E. crassipes* ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 293.2 และ 379.3 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล ตามลำดับ



รูปที่ 14 ระยะเวลาการไฮโดรไลซิสผักตบชวาผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที และผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยเซลล์เลสเลสที่ความเข้มข้น 15 FPU ต่อกรัมของสารตั้งต้น รายงานผลการทดลองเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 15 โครมาโทแกรมของไฮโดรไลเซตจากผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการไฮโดรไลซิสด้วยเซลล์เลส



รูปที่ 16 โครมาโทแกรมของไฮโดรไลเซทจากผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการไฮโดรไลซิสด้วยเซลล์ูลอส

ตารางที่ 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยเซลล์ูลอสที่เวลา 24 ชั่วโมง

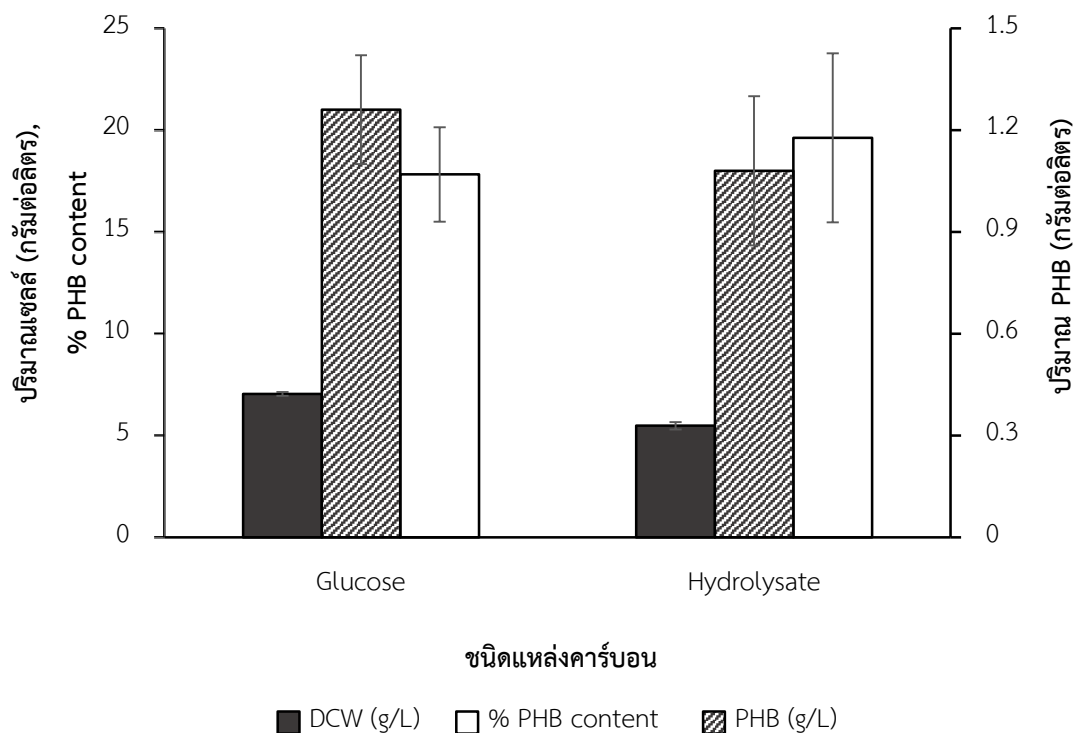
วิธีการปรับสภาพ	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)			ผลผลิตน้ำตาล (มิลลิกรัมต่อกรัมสารตั้งต้น)
	กลูโคส	มอลโทส	รวม	
ไม่ปรับสภาพ	2.92 ± 0.20	NA	2.92 ± 0.20	116.81 ± 0.01
2% (w/v) NaOH, 30 นาที	11.92 ± 2.09	4.06 ± 0.60	15.98 ± 2.69	639.29 ± 0.11

หมายเหตุ NA = ตรวจไม่พบ

4.4 การผลิต PHB จากผักตบชวาไฮโดรไลเซท

จากการศึกษาการผลิต PHB จากผักตบชวาไฮโดรไลเซท โดยนำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.725 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหาร MSM โดยเสริมผักตบชวาไฮโดรไลเซท ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 10 กรัมต่อลิตร และ yeast extract 2 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบการผลิต PHB จากผักตบชวาไฮโดรไลเซทกับการผลิต PHB จากกลูโคส พบว่า *R. eutropha* สามารถเจริญเติบโต และผลิต PHB ในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงกว่าอาหารที่ใช้ผักตบชวาไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอน ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 7.05 ± 0.09 และ 5.49 ± 0.18 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHB เท่ากับ 1.26 ± 0.16 และ 1.08 ± 0.22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 17) เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่จุลินทรีย์สามารถนำไปเข้าสู่กระบวนการทางเมแทบอลิซึมต่างๆ ได้ทันที เป็นผลให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโต และผลิต PHB ได้ดี จึงทำให้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพื้นฐานที่นิยมใช้ในการผลิต PHB (Sen *et al.*, 2019) ในขณะที่อาหารที่ใช้ผักตบชวาไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 10 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาล 2 ชนิดเป็นองค์ประกอบ คือ กลูโคส และมอลโทส จึงทำให้ *R. eutropha* สามารถเจริญเติบโต และผลิต PHB ในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่า แต่เนื่องจากการใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น ทำให้มีต้นทุนการผลิต PHB ที่สูง (Wang *et al.*, 2013) การใช้น้ำตาลจากลิกโนเซลลูโลสจึงเป็นทางเลือกในนำมาเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิต PHB เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก (Du *et al.*, 2012; Khanna and Srivastava, 2005) และเมื่อพิจารณาจากผลการทดลอง พบว่า การใช้ผักตบชวาไฮโดรไลเซทสามารถผลิต PHB ได้ใกล้เคียงกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงให้เห็นว่า ผักตบชวาไฮโดรไลเซทสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Annamalai and Sivakumar (2016) ที่ศึกษาการผลิต PHB โดยใช้รำข้าวสาลีไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอนจาก *Ralsonia eutropha* NCIMB 11599 ในอาหารเหลว MSM โดยเสริมรำข้าวสาลีไฮโดรไลเซท ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 48 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 4.8 กรัมต่อลิตร พบว่า *R. eutropha* สามารถเจริญเติบโต ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 24.43 กรัมต่อลิตร และผลิต PHB ได้ 14.82 กรัมต่อลิตร และในงานวิจัยของ Yustinah *et al.* (2019) ที่ศึกษาการผลิต PHB โดยใช้ทะเลาเปล่า น้ำมันปาล์มไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งคาร์บอน จาก *Bacillus cereus suaeda* B-001 โดยเสริมทะเลาเปล่าไฮโดรไลเซทที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3

กรัมต่อลิตร พบว่า *Bacillus cereus suaeda* B-001 สามารถเจริญเติบโต ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 5.94 กรัมต่อลิตร และสามารถสะสมปริมาณ PHB ร้อยละ 55.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง



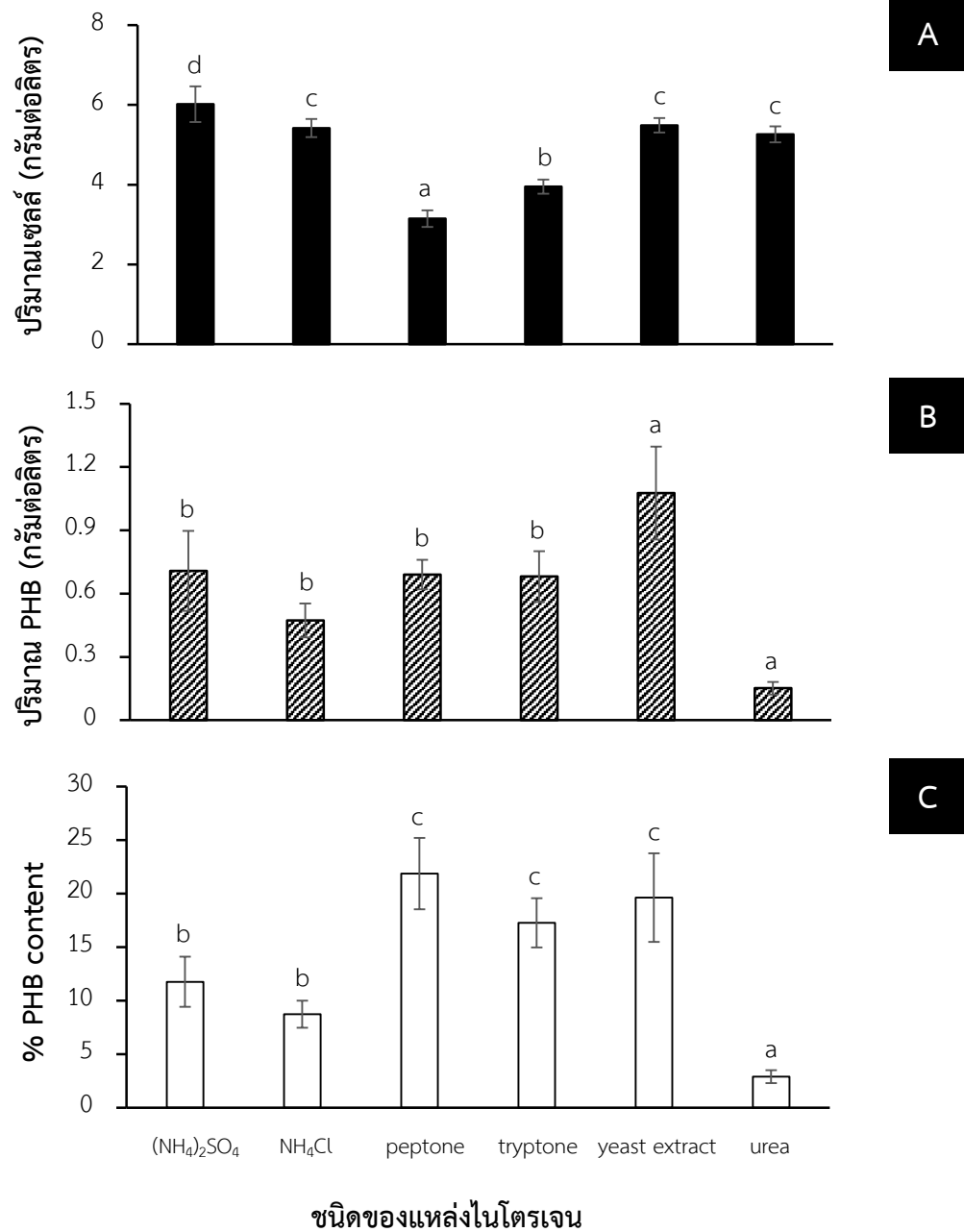
รูปที่ 17 ชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร), ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และ ปริมาณ PHB สะสม (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง) จากการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รายงานผลการทดลองเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.5 การศึกษาสภาวะการผลิต PHB

4.5.1 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB

จากการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ tryptone peptone yeast extract และยูเรีย โดยการนำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.725 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลว MSM โดยเสริมผักตบชวาไฮโดรไลเซต ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 10 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน 2 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *R. eutropha* สามารถเจริญเติบโตได้ในแหล่งไนโตรเจนทุกชนิด แต่เจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 6.02 ± 0.45 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ yeast extract แอมโมเนียมคลอไรด์ ยูเรีย tryptone และ peptone ที่ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 5.49 ± 0.18 , 5.42 ± 0.23 , 5.26 ± 0.20 , 3.95 ± 0.18 และ 3.15 ± 0.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 18A

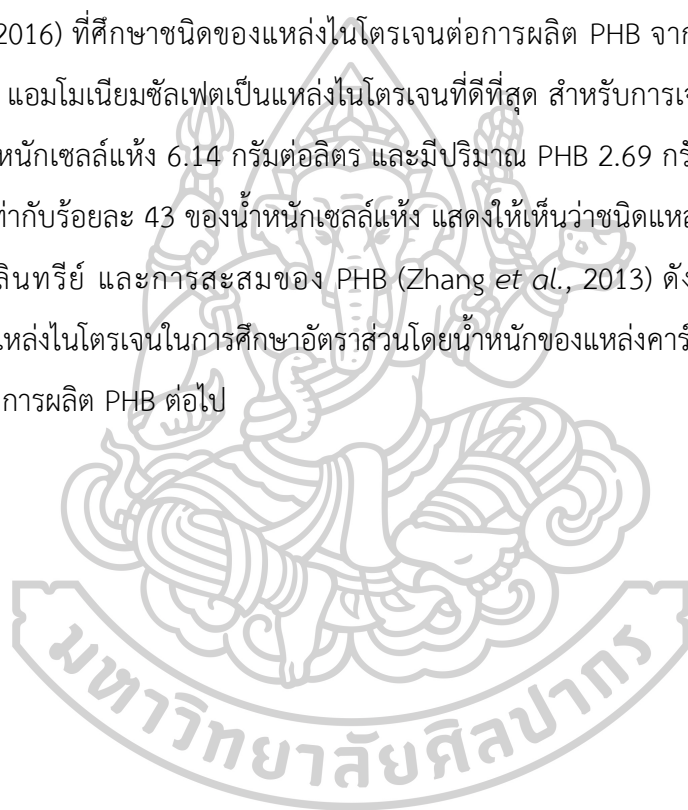
เมื่อพิจารณาปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ พบว่า *R. eutropha* สามารถผลิตปริมาณ PHB สูงสุด เมื่อใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้ถึง 1.08 ± 0.22 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณ PHB สสะสมเท่ากับ ร้อยละ 19.62 ± 4.15 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมาคือ แอมโมเนียมซัลเฟต peptone tryptone แอมโมเนียมคลอไรด์ และยูเรีย ที่ผลิต PHB ได้ 0.708 ± 0.19 , 0.690 ± 0.07 , 0.681 ± 0.12 , 0.473 ± 0.08 และ 0.152 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีปริมาณ PHB สสะสม เท่ากับร้อยละ 11.76 ± 2.35 , 21.86 ± 3.34 , 17.27 ± 2.3 , 8.73 ± 1.27 และ 2.89 ± 0.60 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 18B และรูปที่ 18C



รูปที่ 18 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณเซลล์ (A) ปริมาณ PHB (B) และปริมาณ PHB สะสม (C) จากการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

รายงานผลการทดลองเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

จากผลการทดลอง พบว่า yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต PHB จาก *R. eutropha* ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Srekanth *et al.* (2013) ที่ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PHB จาก *Bacillus* sp. CFR 67 พบว่า beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิต PHB (592 มิลลิกรัมต่อลิตร) งานวิจัยของ Zhang *et al.* (2013) ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PHB จาก *B. megaterium* R11 พบว่า tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด สำหรับการเจริญเติบโตและการผลิต PHB ซึ่งได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.31 กรัมต่อลิตร สามารถผลิต PHB ได้มากที่สุด 2.72 กรัมต่อลิตร และจากงานวิจัยของ Annamalai and Sivakumar (2016) ที่ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต PHB จาก *R. eutropha* NCIMB 11599 พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด สำหรับการเจริญเติบโตและการผลิต PHB ซึ่งได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.14 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณ PHB 2.69 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณ PHB สะสม เท่ากับร้อยละ 43 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แสดงให้เห็นว่าชนิดแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ และการสะสมของ PHB (Zhang *et al.*, 2013) ดังนั้น จึงเลือกใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนในการศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ต่อไป



4.5.2 ผลของอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต

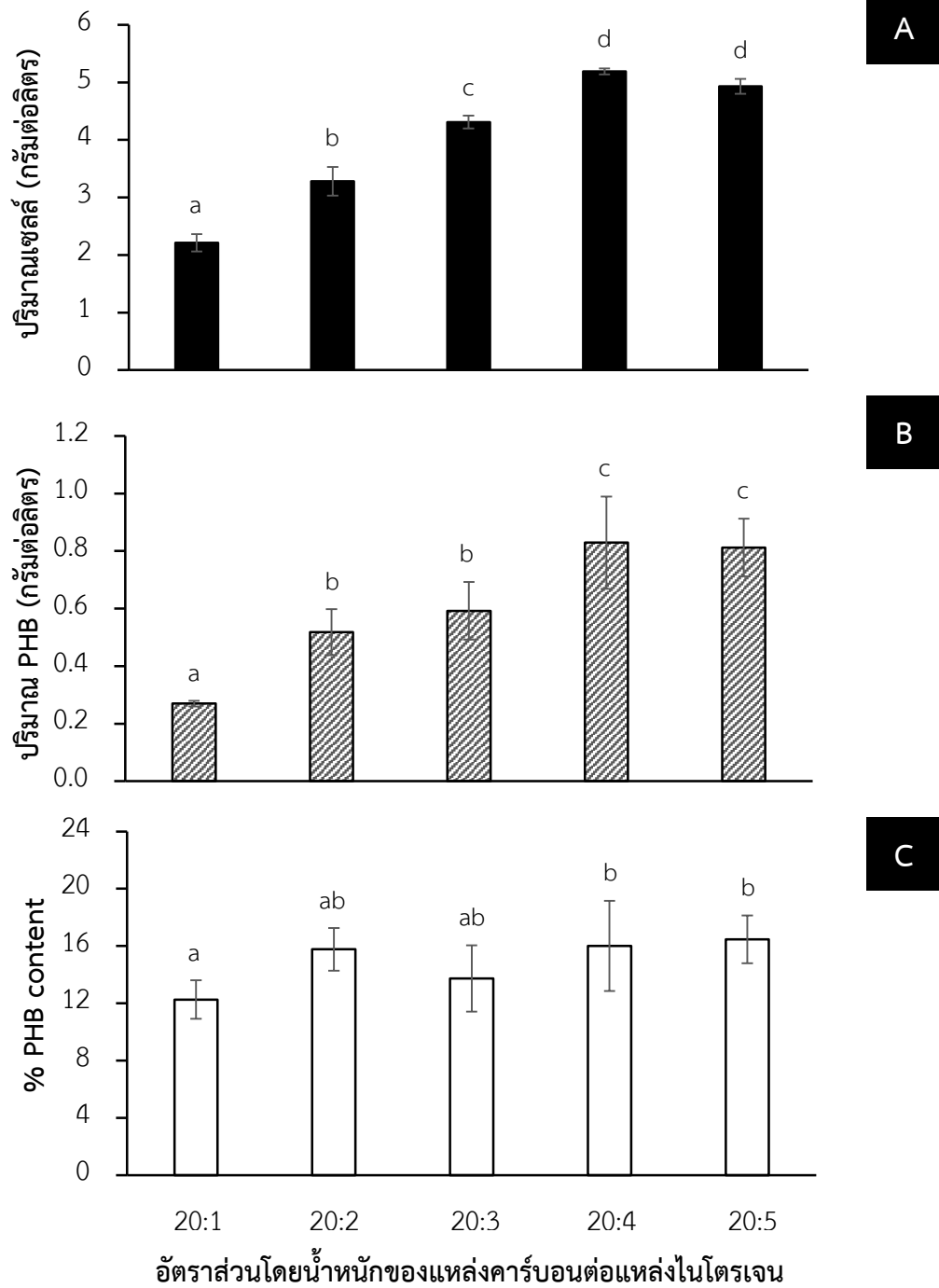
PHB

จากการศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ศึกษาแสดงดังตารางที่ 5 โดยการนำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.719 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลว MSM โดยเสริมผักตบชวาไฮโดรไลเซท และ yeast extract ปริมาตร 45 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB จาก *R. eutropha* คือ 20:4 ซึ่งได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.19 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB เท่ากับ 0.829 ± 0.16 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณ PHB สะสมเท่ากับร้อยละ 16.01 ± 3.15 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แสดงดังรูปที่ 19

จากผลการทดลอง พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณ PHB ของ *R. eutropha* เพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนลดลง แสดงให้เห็นว่า *R. eutropha* ไม่จำเป็นต้องจำกัดไนโตรเจน (nitrogen limitation) เพื่อการสะสม PHB เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Zhang *et al.* (2013) ที่ศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในช่วง 15:1, 15:2, 15:3, 15:4 และ 15:6 สำหรับการผลิต PHB จาก *Bacillus megaterium* R11 โดยใช้ทะเลสาบเปลี่ยนน้ำมันปาล์ม พบว่าที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน เท่ากับ 15:3 ได้น้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด (CDW) เท่ากับ 5.33 กรัมต่อลิตร ปริมาณ PHB เท่ากับ 2.74 กรัมต่อลิตร และปริมาณ PHB สะสมคิดเป็นร้อยละ 51.4 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ 5 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน

น้ำตาลรีดิวซ์จากไฮโดรไลเซท (กรัมต่อลิตร)	yeast extract (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่ง คาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน
10	0.5	20:1
10	1.0	20:2
10	1.5	20:3
10	2.0	20:4
10	2.5	20:5

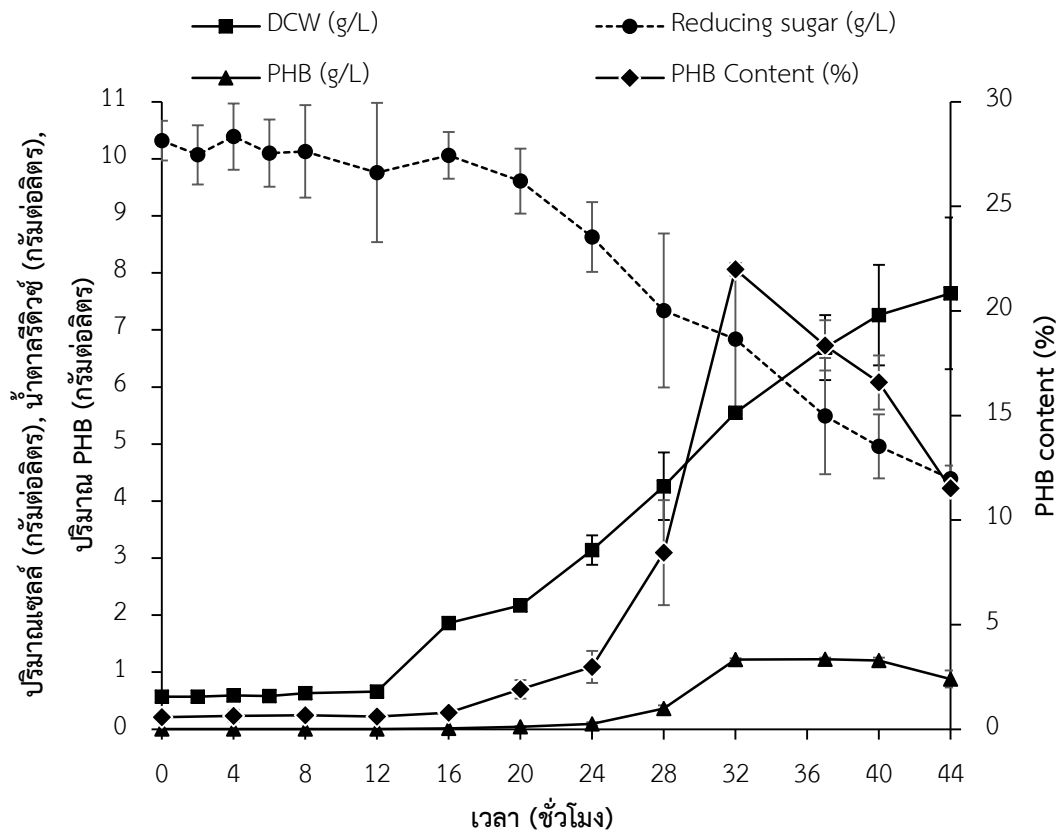


รูปที่ 19 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณเซลล์ (A) ปริมาณ PHB (B) และปริมาณ PHB สะสม (C) จากการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รายงานผลการทดลองเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

4.6 การศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ

จากการศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ โดยการนำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่มีค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.735 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ถ่ายลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร ที่มีอาหารเหลว MSM เสริมด้วยผักตบชวาไฮโดรไลเซทที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 10 กรัมต่อลิตร และ yeast extract 2 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1,350 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ± 4 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm โดยเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง พบว่า ที่เวลา 32 ชั่วโมง *R. eutropha* สามารถผลิต PHB และมีปริมาณ PHB สูงสุด เท่ากับ 1.22 ± 0.02 กรัมต่อลิตร และร้อยละ 21.99 ± 0.03 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ และหลังจากชั่วโมงที่ 32 ปริมาณ PHB สะสมมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ขณะที่ *R. eutropha* ยังคงมีการเจริญเติบโต อาจเนื่องมาจากดีโพลีเมอร์เรสตูทกระตุ้นให้ย่อยสลาย PHB ที่อยู่ในเซลล์มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทน (Annamalai and Sivakumar, 2016) แสดงดังรูปที่ 20

เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาค่าจลนพลศาสตร์ของการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ พบว่า ผลได้ของเซลล์จากสารตั้งต้น ($Y_{X/S}$), ผลได้ของ PHB จากสารตั้งต้น ($Y_{P/S}$), ผลได้ของ PHB จากเซลล์ ($Y_{P/X}$) และอัตราการผลิตเชิงปริมาณ PHB (Q_p) มีค่าเท่ากับ 1.492 ± 0.409 กรัมต่อกรัม, 0.366 ± 0.110 กรัมต่อกรัม, 0.244 ± 0.007 กรัมต่อกรัม และ 0.038 ± 0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Marudkla *et al.* (2018) ที่ศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของการผลิต PHB จาก *Cupriavidus necator* DSM 545 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่า $Y_{X/S}$, ค่า $Y_{P/S}$, ค่า $Y_{P/X}$ และค่า Q_p มีค่าเท่ากับ 0.537 ± 0.082 กรัมต่อกรัม, 0.128 ± 0.006 กรัมต่อกรัม, 0.229 ± 0.030 กรัมต่อลิตร และ 0.031 ± 0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งได้ค่าจลนพลศาสตร์ต่ำกว่าในงานวิจัยนี้ทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าผักตบชวาไฮโดรไลเซทสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต้นทุนต่ำได้ แต่เมื่อพิจารณาจากค่า $Y_{X/S}$ และค่า $Y_{P/S}$ จะพบว่าค่า $Y_{X/S}$ มีค่าสูง ในขณะที่ค่า $Y_{P/S}$ มีค่าต่ำ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารตั้งต้นถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่านำไปสังเคราะห์ PHB ดังนั้น จึงมีความจำเป็นในการพัฒนากระบวนการหมักที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น สำหรับการผลิต PHB จากผักตบชวาไฮโดรไลเซท เช่น ใช้ความเข้มข้นของกลูโคสในผักตบชวาไฮโดรไลเซทเริ่มต้นสำหรับกระบวนการหมักที่เพิ่มขึ้น หรือการกำจัดสารยับยั้งที่อาจเกิดจากการปรับสภาพผักตบชวา ก่อนนำมาใช้ในกระบวนการหมัก เช่น furfural, hydroxymethylfurfural, กรดอะซิติก, สารประกอบฟีนอลิก และลิกนินที่ละลายน้ำได้ เป็นต้น (Annamalai and Sivakumar, 2016)

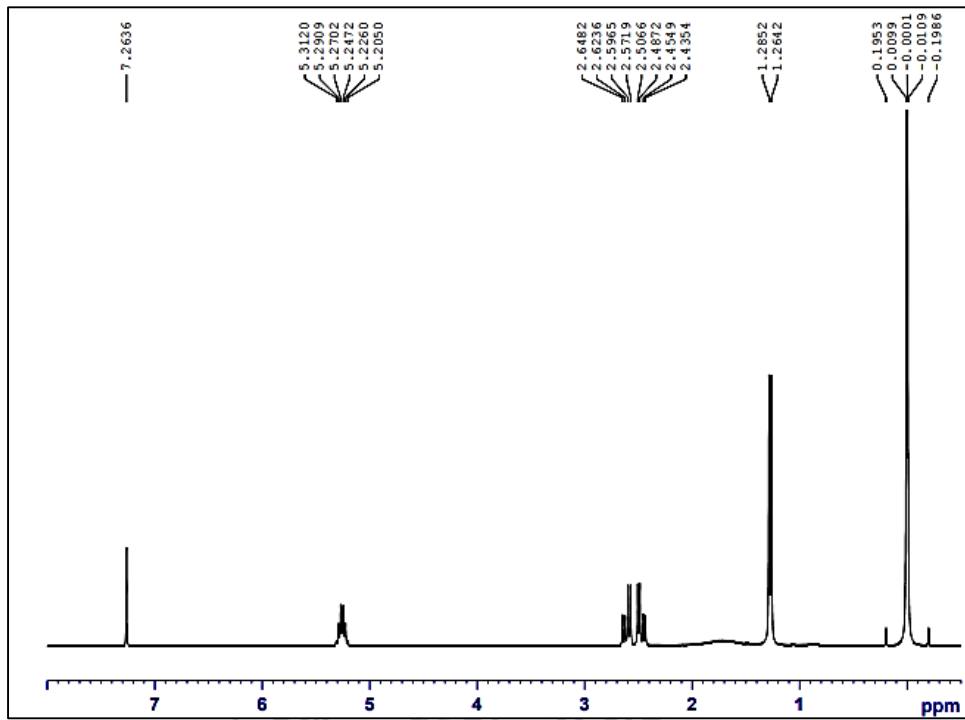


รูปที่ 20 ปริมาณเซลล์ (กรัมต่อลิตร), ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร), ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และปริมาณ PHB สะสม (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง) จากการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 ± 4 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm รายงานผลการทดลองเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

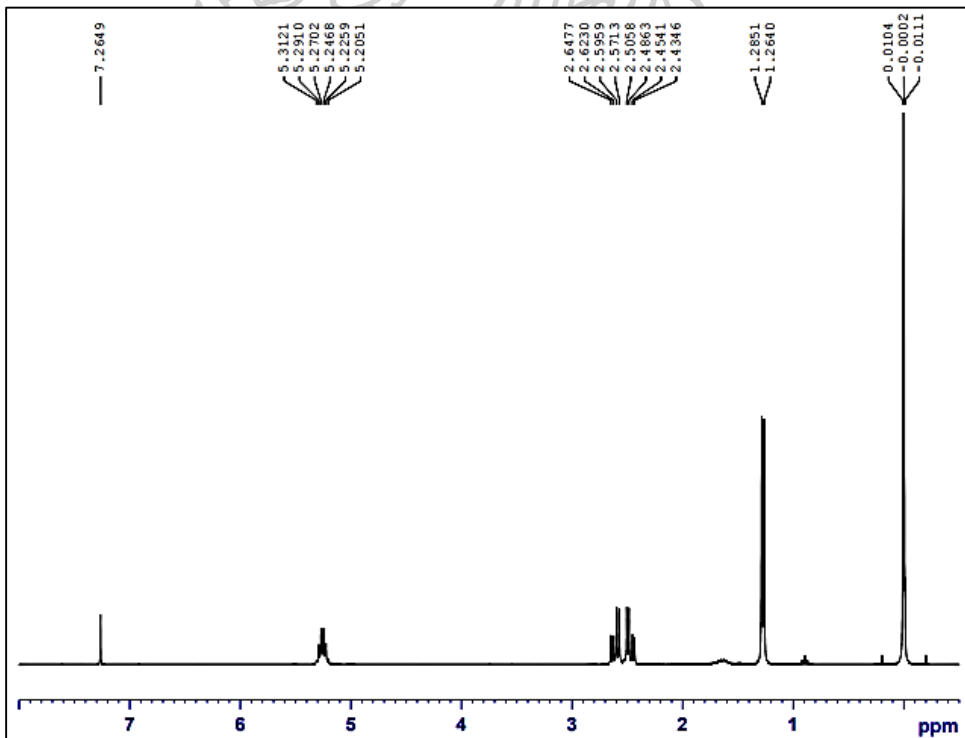
4.7 การศึกษาคุณลักษณะของ PHB

4.7.1 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer; NMR)

นำพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 น้ำหนักประมาณ 5 มิลลิกรัม ละลายใน CDCl_3 ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H NMR แสดงดังรูปที่ 21 พบว่า พอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 มีค่า chemical shift ที่ตำแหน่ง 1.26-1.28 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของเมทิลโปรตอน (methyl protons; $-\text{CH}_3$) นอกจากนี้ ยังพบค่า chemical shift ในช่วงตำแหน่ง 2.43-2.64 ppm และ 5.20-5.31 ppm ที่เป็นสัญญาณของเมทิลีนโปรตอน (methylene protons; $-\text{CH}_2$) และสัญญาณของเมไธน์ (methine proton; $-\text{CH}$) ตามลำดับ ที่เป็นหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างของ PHB ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัม ^1H NMR ของพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 กับสเปกตรัม ^1H NMR ของสารมาตรฐาน PHB (รูปที่ 22) พบว่ามีค่า chemical shift ที่ใกล้เคียงกันทุกตำแหน่ง จึงสรุปได้ว่าพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 นั้น คือ PHB ซึ่งมีโครงสร้างเหมือนกับ PHB ในงานวิจัยของ Pradhan *et al.* (2017) ที่ศึกษาการผลิต PHB โดย *Ralstonia eutropha* MTCC 8320 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผักตบชวาไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาพบว่าสเปกตรัม ^1H NMR ของ PHB ที่ผลิตโดย *R. eutropha* MTCC 8320 มีค่า chemical shift ที่ตำแหน่ง 1.15-1.36, 2.16-2.61 และ 5.24 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ตรงกับสเปกตรัม ^1H NMR ของ PHB ที่ผลิตจาก *R. eutropha* NCIMB 11599 ในการศึกษาครั้งนี้ และนอกจากนี้ PHB ที่ผลิตได้ยังเหมือน PHB ในงานวิจัยของ Sabarinathan *et al.* (2018) ที่ศึกษาการผลิต PHB โดย *Pseudomonas plecoglossicida* ซึ่งมีค่า chemical shift ที่ตำแหน่ง 1.26-1.28, 2.44-2.63 และ 5.21-5.29 ppm



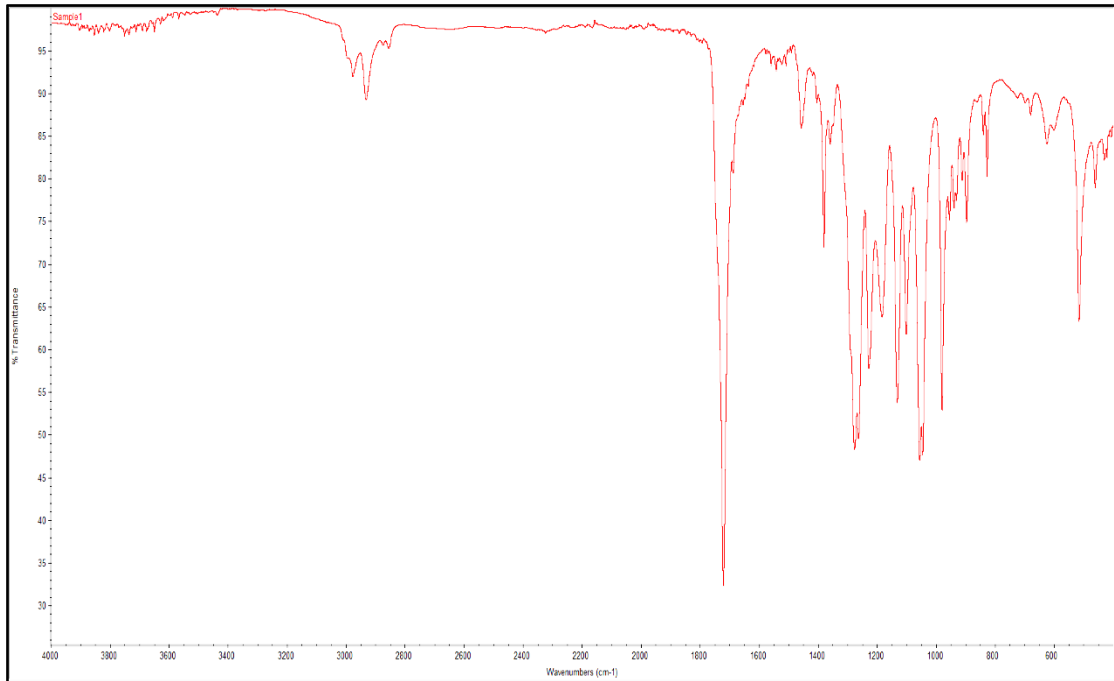
รูปที่ 21 สเปกตรัม ^1H NMR ของ PHB ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599



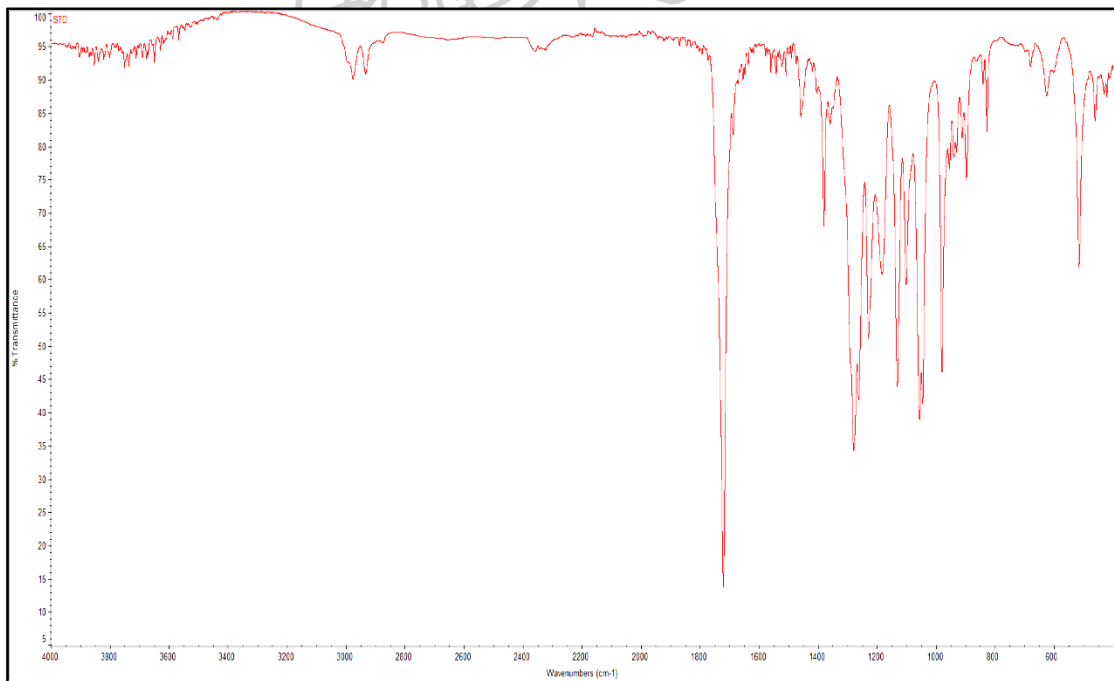
รูปที่ 22 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารมาตรฐาน PHB

4.7.2 การวิเคราะห์ด้วยฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FTIR)

นำพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 ไปวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน ด้วยเทคนิค FTIR โดยวิเคราะห์เลขคลื่นในช่วง $4,000-400\text{ cm}^{-1}$ แสดงดังรูปที่ 23 พบพีกการดูดกลืนที่บริเวณเลขคลื่น (wave number) 1719 cm^{-1} ที่เกิดจากการยึดตัวของคาร์บอนิล (C=O) ในหมู่เอสเทอร์ (ester) แถบการดูดกลืนในช่วงเลขคลื่นประมาณ $1,000-1,500\text{ cm}^{-1}$ เกิดจากการยึดตัวของหมู่เมทิล ($-\text{CH}_3$) หมู่เมทิลีน ($-\text{CH}_2$) และการยึดตัวของพันธะ C-O โดยที่ตำแหน่งเลขคลื่นประมาณ 1380 cm^{-1} เกิดจากการยึดตัวของหมู่เมทิล ($-\text{CH}_3$ group) และในตำแหน่งเลขคลื่นประมาณ $1,460\text{ cm}^{-1}$ เกิดจากการสั่นแบบไม่สมมาตร (asymmetrical stretching) ของหมู่เมทิล แถบการดูดกลืนที่ตำแหน่งเลขคลื่นประมาณ $1,280\text{ cm}^{-1}$ เกิดจากการยึดตัวของพันธะ C-O-C แถบที่ตำแหน่งเลขคลื่น $1,040\text{ cm}^{-1}$ เกิดจากการยึดตัวของพันธะ C-O ของหมู่เอสเทอร์ และการดูดกลืนเล็กน้อยในช่วงเลขคลื่น $3,000-2,800\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันของ, $-\text{CH}$ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า พอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 พบแถบการดูดกลืนที่ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน PHB (รูปที่ 24) จึงสรุปได้ว่าพอลิเมอร์ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 นั้น คือ PHB และจากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของ PHB ที่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Radhika and Murugesan (2012) พบว่า PHB ที่ผลิตโดย *C. necator* MTCC-1472 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผักตบชวาไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอน คาร์บอน พบแถบการดูดกลืนสำคัญที่ตำแหน่งเลขคลื่นประมาณ $1,276, 1,720,$ และ $3010-2,960\text{ cm}^{-1}$ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Pradhan *et al.* (2017) พบว่า PHB ที่ผลิตโดย *R. eutropha* MTCC 8320 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผักตบชวาไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอน พบแถบการดูดกลืนสำคัญที่ตำแหน่งเลขคลื่นประมาณ $1,058, 1,289, 1,726, 2,933$ และ $2,975\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งพบว่ามีแถบการดูดกลืนที่สำคัญในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับแถบเลขคลื่นของ PHB ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 ในการศึกษานี้



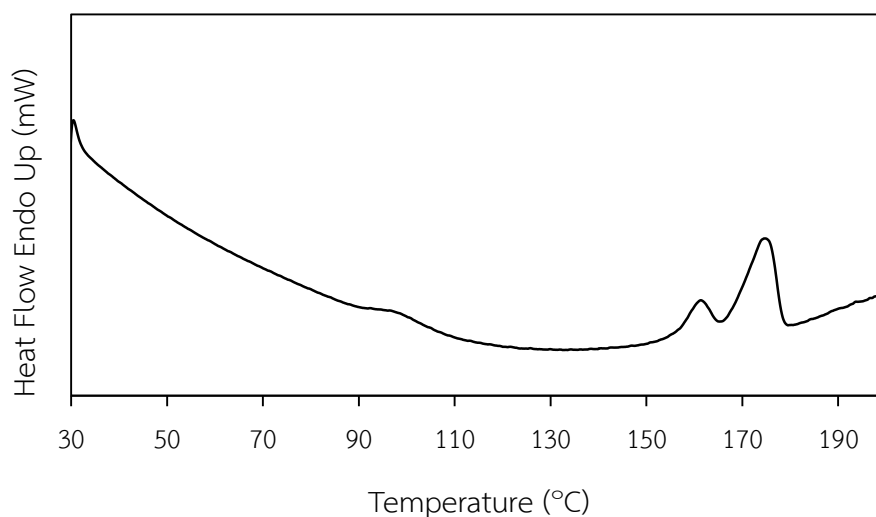
รูปที่ 23 สเปกตรัม IR ของ PHB ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599



รูปที่ 24 สเปกตรัม IR ของสารมาตรฐาน PHB

4.7.3 การวิเคราะห์ด้วยดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential Scanning Calorimetry; DSC)

ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (DSC) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์วัสดุโดยการวัดค่าพลังงานความร้อนและอุณหภูมิของตัวอย่าง เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้วิเคราะห์หาจุดหลอมเหลว (melting point) อุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (glass transition temperature) ความเสถียรต่ออุณหภูมิ (thermal stability) และสภาพเป็นผลึก (Crystallinity) และความบริสุทธิ์ของวัสดุ (purity) เป็นต้น โดยในงานวิจัยนี้ ใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่ง แคลอริมิเตอร์เพื่อหาจุดหลอมเหลวของ PHB ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 เพราะจุดหลอมเหลวนั้นเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของพอลิเมอร์ สำหรับควบคุมคุณสมบัติเชิงกลของวัสดุ (Radhika and Murugesan, 2012) จากการศึกษาพบว่า PHB ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่ใช้ผักตบชวาไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งคาร์บอน มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 174.6 องศาเซลเซียส แสดงดังรูปที่ 25 ซึ่งมีจุดหลอมเหลวใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลวของพอลิโพรพิลีน และมีจุดหลอมเหลวใกล้เคียงกับ PHB ในงานวิจัยของ Saratale and Oh (2015) ที่ผลิต PHB โดย *R. eutropha* ATCC 17699 จากฟางข้าว พบว่า PHB ที่ผลิตได้มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 172.27 องศาเซลเซียส และงานวิจัยของ Pradhan *et al.* (2017) ที่ผลิต PHB โดย *R. eutropha* MTCC 8320 จากผักตบชวาไฮโดรไลเซต พบว่า PHB ที่ผลิตได้มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 175 องศาเซลเซียส



รูปที่ 25 เทอร์โมแกรม DSC ของ PHB ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับวิธีการปรับสภาพผักตบชวาที่เหมาะสม เพื่อจะนำผักตบชวาไฮโดรไลเซทไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHB รวมทั้งศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนและอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB สำหรับการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ และนำ PHB ที่ผลิตได้มาศึกษาคุณสมบัติ ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพผักตบชวา คือ การปรับสภาพผักตบชวาด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที สามารถเพิ่มปริมาณของเซลลูโลสเมื่อเทียบกับผักตบชวาก่อนปรับสภาพ ได้ถึงร้อยละ 8.24 ของน้ำหนักแห้ง และในขณะเดียวกัน สามารถลดปริมาณเฮมิเซลลูโลส และปริมาณลิกนินได้ร้อยละ 3.71 และ 4.53 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และยังสามารเพิ่มประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซิสได้ถึง 5.47 เท่า เมื่อเทียบกับผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ yeast extract และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเท่ากับ 20:4 จากการศึกษาการผลิต PHB ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ เพื่อประเมินค่าจลนพลศาสตร์ของการผลิต PHB พบว่า ค่า $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, และ $Y_{P/X}$ เท่ากับ 1.492, 0.366, 0.244 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ และ Q_p เท่ากับ 0.038 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และจากการศึกษาคุณลักษณะของ PHB ที่ผลิตโดย *R. eutropha* NCIMB 11599 ด้วยเทคนิค ^1H NMR, FTIR และ DSC พบว่า มีโครงสร้างทางเคมีเหมือนกับ PHB ทางการค้า และมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 174.6 องศาเซลเซียส จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ผักตบชวาไฮโดรไลเซทสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต้นทุนต่ำแทนกลูโคสเพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพของพลาสติกชีวภาพ และเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิต PHB

รายการอ้างอิง

- Ackermann, J. U. and Babel, W. (1997). Growth-associated synthesis of poly(hydroxybutyric acid) in *Methylobacterium rhodesianum* as an expression of an internal bottleneck. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 144-149.
- Akin, D. E., Rigsby, L. L., Sethuraman, A., Morrison, W. H.-I., Gamble, G. R. and Eriksson, K. E. L. (1995). Alterations in structure, chemistry, and biodegradability of grass lignocellulose treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1591-1598.
- Anderson, A. J. and Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Review*, 54(4), 450-472.
- Anjum, A., Zuber, M., Zi, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N. and Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161-174.
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V. and Balasubramanian, T. (2014). Enzymatic saccharification of pretreated rice straw by cellulase produced from *Bacillus carboniphilus* CAS 3 utilizing lignocellulosic wastes through statistical optimization. *Biomass and Bioenergy*, 68, 151-160.
- Annamalai, N. and Sivakumar, N. (2016). Production of polyhydroxybutyrate from wheat bran hydrolysate using *Ralstonia eutropha* through microbial fermentation. *Journal of Biotechnology*, 237, 13-17.
- Azzam, A. M. (1989). Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 24(4), 421-433.
- Bastawde, K. B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 353-368.
- Bisaria, V. S. (1991). Bioprocessing of agro-residues to glucose and chemicals. In A. M. Martin (Ed.), *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products* (pp. 187-

- 223). London: Elsevier Science Publishers Ltd.
- Bjerre, A. B., Olesen, A. B., Fernqvist, T., Plöger, A. and Schmidt, A. S. (1996). Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(5), 568-577.
- Bloembergen, S., Holden, D. A., Hamer, G. K., Bluhm, T. L. and Marchessault, R. H. (1986). Studies of composition and crystallinity of bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). *Macromolecules*, 19(11), 2865-2871.
- Bonartsev, A. P., Myshkina, V. L., Nikolaeva, D. A., Furina, E. K., Makhina, T. A., Livshits, V. A., Boskhomdzhiyev, A. P., Ivanov, E. A., Iordanskii, A. L. and Bonartseva, G. A. (2007). Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (pp. 295-307). Badajoz: Formatex Research Center.
- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74(1), 63-67.
- Borah, A. J., Agarwal, M., Poudyal, M., Goyal, A. and Moholkar, V. S. (2016). Mechanistic investigation in ultrasound induced enhancement of enzymatic hydrolysis of invasive biomass species. *Bioresource Technology*, 213, 342-349.
- Borque, D., Pomerleau, Y. and Groleau, D. (1995). High-cell-density production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 367-376.
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W. and Fuller, R. C. (1990). Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 41, 77-93.
- Burns, K. L., Oldham, C. D., Thompson, J. R., Lubarsky, M. and May, S. W. (2007). Analysis of the *in vitro* biocatalytic production of poly-(β)-hydroxybutyric acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(5), 591-599.

- Chomchai, S. and Chongcharoen, R. (2012). Effect of carbon and nitrogen sources on growth and polyhydroxybutyrate production by *Alcaligenes latus* ATCC 29714 *Proceedings of 50th Kasetsart University Annual Conference: Science, Natural Resources and Environment*, 32-39.
- Clark, T. A. and Mackie, K. L. (1987). Steam explosion of the soft-wood *Pinus radiata* with sulphur dioxide addition. I. Process optimization. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 7(3), 373-403.
- Converse, A. O., Matsuno, R., Tanaka, M. and Taniguchi, M. (1988). A model of enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme. *Biotechnology and Bioengineering*, 32(1), 38-45.
- Dale, B. E. and Moreira, M. J. (1982). A freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 12, 31-43.
- Dersseh, M. G., Melesse, A. M., Tilahun, S. A., Abate, M. and Dagnew, D. C. (2019). Water hyacinth: review of its impacts on hydrology and ecosystem services—Lessons for management of Lake Tana. In A. Melesse, W. Abtew, & G. Senay (Eds.), *Extreme Hydrology and Climate Variability* (1st Edition ed., pp. 237-251). United States: Elsevier Science Publishing Co Inc.
- Doi, Y. (1995). Microbial synthesis, physical properties, and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. *Macromolecular Symposia*, 98(1), 585-599.
- Du, C., Sabirova, J., Soetaert, W. and Lin, S. K. C. (2012). Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials. *Current Chemical Biology*, 6(1), 14-25.
- Duff, S. J. B. and Murray, W. D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 55(1), 1-33.
- Eggink, G., de Waard, P. and Huijberts, G. N. (1995). Formation of novel poly(hydroxyalkanoates) from long-chain fatty acids. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 14-21.
- Esteghlalian, A., Hashimoto, A. G., Fenske, J. J. and Penner, M. H. (1997). Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresource Technology*, 59(2-3), 129-136.
- Fan, L. T., Gharapuray, M. M. and Lee, Y. H. (1987). *Cellulose Hydrolysis Biotechnology*

Monographs. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Gahlawat, G. and Srivastava, A. K. (2013). Development of a mathematical model for the growth associated Polyhydroxybutyrate fermentation by *Azohydromonas australica* and its use for the design of fed-batch cultivation strategies. *Bioresource Technology*, 137, 98-105.
- Ganesh, M., Senthamarai, A., Shanmughapriya, S. and Natarajaseenivasan, K. (2015). Effective production of low crystallinity Poly(3-hydroxybutyrate) by recombinant *E. coli* strain JM109 using crude glycerol as sole carbon source. *Bioresource Technology*, 192, 677-681.
- Ghaemi, F., Abdullah, L. C. and Ariffin, H. (2019). Lignocellulose structure and the effect on nanocellulose production. In H. Ariffin, S. M. Sapuan, & M. A. Hassan (Eds.), *Lignocellulose for Future Bioeconomy* (1st ed., pp. 17-30). Amsterdam: Elsevier Science Publishing Co Inc.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59, 257-268.
- Gouda, M. K., Swellam, A. E. and Omar, S. H. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 156(3), 201-207.
- Grous, W. R., Converse, A. O. and Grethlein, H. E. (1986). Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(5), 274-280.
- Hill, M. and Coetzee, J. (2008). Integrated control of water hyacinth in Africa. *EPPO Bulletin*, 38(3), 452-457.
- Holtzapple, M. T. (2003). Hemicelluloses. In B. Caballero, P. Finglas, & F. Toldra (Eds.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2nd ed., pp. 3060-3071). San Diego: Elsevier Science Publishing Co Inc.
- Holtzapple, M. T., Humphrey, A. E. and Taylor, J. D. (1989). Energy requirements for the size reduction of poplar and aspen wood. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(2), 207-210.
- Holtzapple, M. T., Jun, J.-H., Ashok, G., Patibandla, S. L. and Dale, B. E. (1991). The ammonia freeze explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose

- pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28, 59-74.
- Hrabak, O. (1992). Industrial production of Poly- β -hydroxybutyrate. *FEMS Microbiology Letters*, 103(2-4), 251-255.
- Huang, T. Y., Duan, K. J., Huang, S. Y. and Chen, C. W. (2006). Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(8), 701-706.
- Jendrossek, D., Schirmer, A. and Schlegel, H. G. (1996). Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(5-6), 451-463.
- Jiang, Y., Song, X., Gong, L., Li, P., Dai, C. and Shao, W. (2008). High poly(β -hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2 a5 from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(2), 167-172.
- Kavitha, G., Rengasamy, R. and Inbakandan, D. (2018). Polyhydroxybutyrate production from marine source and its application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 102-108.
- Khanna, S. and Srivastava, A. K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, 40(6), 2173-2182.
- Khosravi-Darani, K. and Bucci, D. Z. (2015). Application of Poly(hydroxyalkanoate) In Food Packaging: Improvements by Nanotechnology. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 29(2), 275-285.
- Kilzer, F. J. and Broido, A. (1965). Speculations on the nature of cellulose pyrolysis. *Pyrolysis*, 2, 151-163.
- Kim, J. S., Lee, Y. Y. and Kim, T. H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 199, 42-48.
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H. and Dale, B. E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124, 1081-1099.
- Lee, S. Y. (1996). Review: bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and*

Bioengineering, 49(1), 1-14.

- Lemoigne, M. (1926). Produits de dehydration et de polymerisation de l'acide β -oxobutyrique. *Bulletin de la Societe de chimie biologique*, 8, 770-782.
- Lenz, R. W. and Marchessault, R. H. (2005). Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, 6(1), 1-8.
- Liebergesell, M., Sonomoto, K., Madkour, M., Mayer, F. and Steinbüchel, A. (1994). Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) synthase from *Chromatium vinosum* and localization of the enzyme at the surface of poly(hydroxyalkanoic acid) granules. *European Journal of Biochemistry*, 226(1), 74-80.
- Mackie, K. L., Brownell, H. H., West, K. L. and Saddler, J. N. (1985). Effect of sulphur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 5(3), 405-425.
- Madison, L. L. and Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21-53.
- Marudkla, J., Patjawit, A., Chuensangjun, C. and Sirisansaneeyakul, S. (2018). Optimization of poly(3-hydroxybutyrate) extraction from *Cupriavidus necator* DSM 545 using sodium dodecyl sulfate and sodium hypochlorite. *Agriculture and Natural Resources*, 52(3), 266-273.
- McMillan, J. D. (1994). Pretreatment of lignocellulosic biomass. In M. E. Himmel, J. O. Baker, & R. P. Overend (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production* (Vol. 566, pp. 292-324). Washington, DC: American Chemical Society.
- Millet, M. A., Baker, A. J. and Scatter, L. D. (1976). Physical and chemical pretreatments for enhancing cellulose saccharification. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6, 125-153.
- Mirtha, E. F., López, N. I., Méndez, B. S., Fürst, U. P. and Steinbüchel, A. (1995). Isolation and partial characterization of *Bacillus megaterium* mutants deficient in poly(3-hydroxybutyrate) synthesis. *Canadian Journal of Microbiology*, 41 (13), 77-79.
- Moreno, P., Yanez, C., Cardozo, N. S. M., Escalante, H., Combariza, M. Y. and Guzman, C. (2015). Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB

- production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnology*, 32(6), 682-689.
- Mussatto, S. I., Dragone, G. and Roberto, I. C. (2005). Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. *Process Biochemistry*, 40(12), 3801–3806.
- Naranjo, J. M., Posada, J. A., Higuera, J. C. and Cardona, C. A. (2013). Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, 133, 38–44.
- Ojumu, T. V., Yu, J. and Soomon, B. O. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*, 3(1), 18-24.
- Ostle, A. G. and Holt, J. G. (1982). Nile blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), 238–241.
- Pandian, S. R., Deepak, V., Kalishwaralal, K., Rameshkumar, N., Jeyaraj, M. and Gurunathan, S. (2010). Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. *Bioresource Technology*, 101(2), 705-711.
- Pawongrat, R. (2011). The optimal condition for hydrolyses preparation from water hyacinth using autoclave for ethanol production. *Veridian E-Journal SU*, 4(1), 891-901.
- Peng, H., Chen, H., Qu, Y., Li, H. and Xu, J. (2014). Bioconversion of different sizes of microcrystalline cellulose pretreated by microwave irradiation with/without NaOH. *Applied Energy*, 117, 142-148. .
- Porier, Y., Nawarath, C. and Somerville, C. (1995). Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Biotechnology*, 13(2), 142-150.
- Pouton, C. W. and Akhtar, S. (1996). Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18(2), 133-162.
- Pradhan, S., Borah, A. J., Poddar, M. K., Dikshit, P. K., Rohidas, L. and Moholkar, V. S. (2017). Microbial production, ultrasound-assisted extraction and characterization of biopolymer polyhydroxybutyrate (PHB) from terrestrial (*P. hysterothorus*) and

- aquatic (*E. crassipes*) invasive weeds. *Bioresource Technology*, 242, 304-310.
- Pu, Y., Zhang, D., Singh, P. M. and Ragausks, J. (2008). The new forestry biofuels sector. *Biofuels and Biorefining*, 2, 58-73.
- Qing, Q., Guo, Q., Zhou, L., Gao, X., Lu, X. and Zhang, Y. (2017). Comparison of alkaline and acid pretreatments for enzymatic hydrolysis of soybean hull and soybean straw to produce fermentable sugars. *Industrial Crops & Products*, 109, 391-397.
- Radhakrishin, K. D. (2009). *Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production*. (PhD), North Carolina State University, North Carolina.
- Radhika, D. and Murugesan, A. G. (2012). Bioproduction, statistical optimization and characterization of microbial plastic (poly 3-hydroxy butyrate) employing various hydrolysates of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) as sole carbon source. *Bioresource Technology*, 121, 83-92.
- Ruangmee, A., Sangwichien, C., (2012, May 14-15, 2012). *Evaluation of Enzymatic Saccharification of Lignocellulose from Narrow Leaves Cattail*. Paper presented at the The 10th International PSU Engineering Conference.
- Sabarinathan, D., Chandrika, S. P., Venkatraman, P., Easwaran, M., Sureka, C. S. and Preethi, K. (2018). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Pseudomonas plecoglossicida* and its application towards cancer detection. *Informatics in Medicine Unlocked*, 11, 61-67.
- Saratale, G. D., Kshirsagar, S. D., Sampange, V. T., Saratale, R. G., Oh, S. E., Govindwar, S. P. and Oh, M. K. (2014). Cellulolytic enzymes production by utilizing agricultural wastes under solid state fermentation and its application for biohydrogen production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(8), 2801-2817.
- Saratale, G. D. and Oh, M.-K. (2015). Characterization of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) produced from *Ralstonia eutropha* using an alkali-pretreated biomass feedstock. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 627-635.
- Sarkanen, K. V. (1980). Acid-catalyzed delignification of lignocellulosics in organic solvents. *Progress in Biomass Conversion*, 2, 127-144.
- Schlegel, H. G., Gottschalk, G. and Von Bartta, R. (1961). Formation and utilization of poly- β -hydroxybutyric acid by knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). *Nature*, 191, 463-465.

- Sen, K. Y., Hussin, M. H. and Baidurah, S. (2019). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 51-59.
- Shafizadeh, F. and Bradbury, A. G. W. (1979). Thermal degradation of cellulose in air and nitrogen at low temperatures. *Journal of Applied Polymer Science*, 23(5), 1431-1442.
- Singh, S., Dikshit, P. K., Moholkar, V. S. and Goyal, A. (2014). Purification and characterization of acidic cellulase from *Bacillus amyloliquefaciens* SS35 for hydrolyzing *Parthenium hysterophorus* biomass. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 34, 810-818.
- Sivers, M. V. and Zacchi, G. (1995). A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresource Technology*, 51(1), 43-52.
- Sreekanth, M. S., Vijayendra, S. V., Joshi, G. J. and Shamala, T. R. (2013). Effect of carbon and nitrogen sources on simultaneous production of α -amylase and green food packaging polymer by *Bacillus* sp. CFR 67. *Journal of Food Science and Technology*, 50(2), 404-408.
- Sreenath, H. K., Koegel, R. G., Moldes, A. B., Jeffries, T. W. and Straub, R. J. (2001). Ethanol production from alfalfa fiber fractions by saccharification and fermentation. *Process Biochemistry*, 36(12), 1199-1204.
- Sternberg, D. (1976). Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*(6), 35-53.
- Su, H., Cheng, J., Zhou, J., Song, W. and Cen, K. (2010). Hydrogen production from water hyacinth through dark- and photo-fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(17), 8929-8937.
- Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503-1555.
- Sun, Y. and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11.
- Suntonchaiboon, V. and Pawongrat, R. (2012). Microwave-assisted alkali pretreatment of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) and water lettuce (*Pistia*

- stratiotes* L.) and its enzymatic hydrolysis for reducing sugar production *sakon nakhon graduate studies journal*, 10(45), 173-184.
- Takeda, M., Matsuoka, H., Hamana, H. and Hikuma, M. (1995). Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate by *Sphaerotilus natans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 31-34.
- Tan, i. K. P., Kumar, K. S., Theanmalar, M., Gan, S. N. and Gordon III, B. (1997). Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1 . *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 207-211.
- Tarkow, H. and Feist, W. C. (1969). A Mechanism for Improving the Digestibility of Lignocellulosic Materials with Dilute Alkali and Liquid Ammonia. In G. J. Hajny & E. T. Reese (Eds.), *Cellulases and their applications* (Vol. 95, pp. 197-218). Washington, DC: American Chemical Society.
- Thring, R. W., Chornet, E. and Overend, R. P. (1990). Recovery of a solvolytic lignin: Effects of spent liquor/acid volume ratio, acid concentration and temperature. *Biomass*, 23(4), 289-305.
- Van-Thuoc, D., Huu-Phong, T., Thi-Binh, N., Thi-Tho, N., Minh-Lam, D. and Quillaguaman, J. (2012). Polyester production by halophilic and halotolerant bacterial strains obtained from mangrove soil samples located in Northern Vietnam. *MicrobiologyOpen*, 1(4), 395-406.
- Vidal, P. F. and Molinier, J. (1988). Ozonolysis of lignin – improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass*, 16(1), 1-17.
- Vroman, I. and Tighzert, L. (2009). Biodegradable Polymers *materials*, 2, 307-344.
- Wang, B., Sharma-Shivappa, R. R., Olson, J. W. and Khan, S. a. (2013). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice. *Industrial Crops and Products*, 43, 802-811.
- Wyman, C. (2001). Twenty years of trials, tribulations, and research progress in bioethanol technology: selected key events along the way. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91, 5-22.
- Xia, A., Cheng, J., Song, W., Yu, C., Zhou, J. and Cen, K. (2013). Enhancing enzymatic saccharification of water hyacinth through microwave heating with dilute acid

- pretreatment for biomass energy utilization. *Energy*, 61, 158-166.
- Yang, B. and Wyman, C. E. (2008). Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(2), 26-40.
- Yousuf, R. G. and Winterburn, J. B. (2016). Date seed characterisation, substrate extraction and process modelling for the production of polyhydroxybutyrate by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, 222, 242-251.
- Yuan, Z., Wei, W., Wen, Y. and Wang, R. (2019). Comparison of alkaline and acid-catalyzed steam pretreatments for ethanol production from tobacco stalk. *Industrial Crops & Products*, 142, 111864.
- Yustinah, Hidayat, N., Alamsyah, R., Roslan, A. M., Hermansyah, H. and Gozan, M. (2019). Production of polyhydroxybutyrate from oil palm empty fruit bunch (OPEFB) hydrolysates by *Bacillus cereus suaeda* B-001. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101019.
- Zhang, Y., Sun, W., Wang, H. and Geng, A. (2013). Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. *Bioresource Technology*, 147, 307-314.
- Zheng, Y. Z., Lin, H. M. and Tsao, G. T. (1998). Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnology Progress*, 14(6), 890-896.
- Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Wang, C., Yu, F., Jin, S., Ding, Y., Chi, R., Liao, J. and Zhang, Y. (2006). Comparison of three microwave/chemical pretreatment processes for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Biosystems Engineering* 93(3), 279-283.



ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mineral salts medium (MSM) for PHB production

Yeast extract	2	กรัม
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	2.4	กรัม
Anhydrous disodium phosphate (Na_2HPO_4)	2.5	กรัม
Magnesium sulfate (MgSO_4)	0.5	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.1	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในผักตบชวาไฮโดรไลเซต ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 10 กรัมต่อลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มัล และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายสำหรับการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมีของผักตบชวา (TAPPI 203 om-88)

1.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 โดยมวลต่อปริมาตร

ซิงโซเดียมไฮดรอกไซด์ 175 กรัมในน้ำกลั่น ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.2 สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล

ซิงโพแทสเซียมไดโครเมต $[K_2Cr_2O_7]$ 24.52 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐานความเข้มข้น 0.100 นอร์มัล

ซิงโพแทสเซียมไดโครเมต 0.4904 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.4 สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.100 นอร์มัล

ซิงเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต $[Fe(NH_4)(SO_4) \cdot 6H_2O]$ 40.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

หมายเหตุ ต้องหาความเข้มข้นที่แน่นอนทุกครั้งที่ใช้ โดยนำไปไตเตรทกับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐาน

วิธีหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอน : ปิเปิดสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตมาตรฐาน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 45 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ เติกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น หยดอินดิเคเตอร์ 2-4 หยด นำไปไตเตรทกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องการทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

วิธีการคำนวณ : จากสมการ $N_2V_2 = N_1V_1$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (นอร์มัล)

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มัล)

V_1 = ปริมาตรของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (มิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาตรของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิลิตร)

1.5 สารละลายอินดิเคเตอร์ (indicator)

ซัง 1,10 - ฟีนานโทโรลีน โมโนไฮเดรต $[C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O]$ 1.5 กรัม และเฟอร์รัสซัลเฟต $(FeSO_4 \cdot H_2O)$ 0.7 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.6 สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 นอร์มัล

ค่อยๆ เทกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 83.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2. สารละลายสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเซลล์เลส (Filter paper assay)

2.1 สารละลายซึเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8

Solution A: ซังกรดซิตริก $[C_6H_8O_7]$ 4.803 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร

Solution B: ซังไตรโซเดียมซึเตรต $[C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O]$ 14.706 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

ผสม Solution A 200 มิลลิลิตร และ Solution B 300 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน

2.2 สารละลาย 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS))

ซัง 3,5-Dinitrosalicylic acid 10 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยๆเติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต 403 กรัม เมื่อละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานและการคำนวณ

กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight)

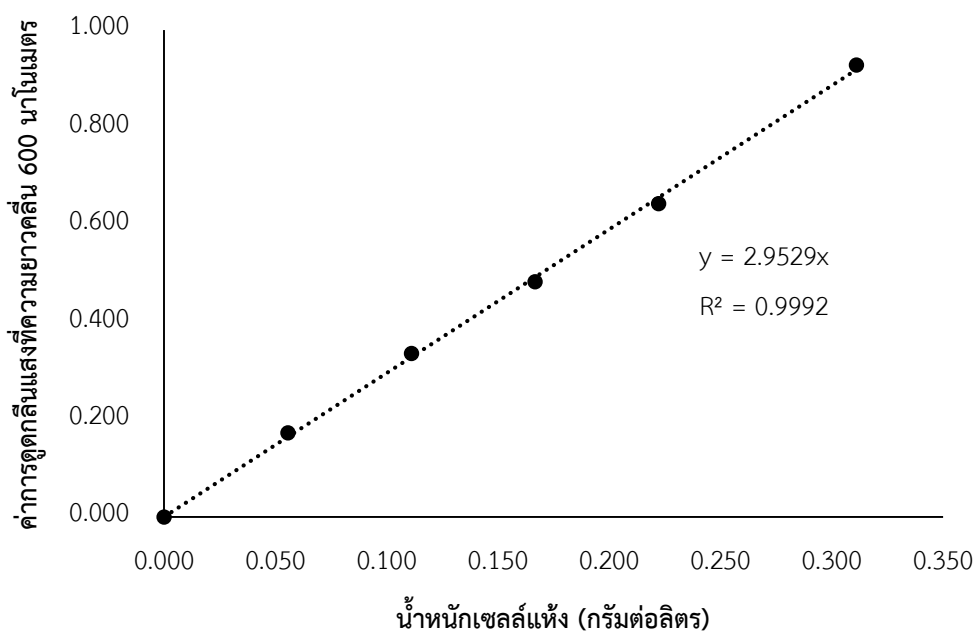
1. อบถัวยอะลูมิเนียมในตู้อบไฟฟ้าที่มีอุณหภูมิ 105 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น จนกระทั่งอุณหภูมิของถัวยอะลูมิเนียมเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วจึงชั่งน้ำหนักถัวยอะลูมิเนียมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
2. นำกล้าเชื้อเริ่มต้น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เป็นจำนวน 2 รอบ และกระจายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร
3. เจือจางตะกอนเซลล์ โดยทำเป็นลำดับ ลำดับละ 2 เท่า
4. ปิเปตสารตัวอย่างแต่ละลำดับ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในถัวยอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว จากนั้นนำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่มีอุณหภูมิ 105 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. ตัวอย่างที่เหลือในแต่ละลำดับนำไปวัดความหนาแน่นของเซลล์ ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จะได้ผลดังตารางที่ 6
6. เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่อบอยู่ในตู้อบไฟฟ้าออกมาใส่โถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักของถัวยอะลูมิเนียม จะได้ผลดังตารางที่ 7 แล้วนำไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ดังรูปที่ 26

ตารางที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงของความหนาแน่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

อัตราส่วนเจือจาง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
1:24	0.172	0.173	0.173	0.173
1:12	0.338	0.331	0.338	0.336
1:8	0.491	0.480	0.479	0.483
1:6	0.638	0.641	0.651	0.643
1:4	0.917	0.930	0.938	0.928

ตารางที่ 7 น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ในอัตราส่วนเจือจางต่างๆ

อัตราส่วนเจือจาง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (ใน 3 มิลลิตร)				น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
	1	2	3	เฉลี่ย	
1:24	0.0001	0.0002	0.0002	0.0002	0.056
1:12	0.0004	0.0003	0.0003	0.0003	0.111
1:8	0.0004	0.0005	0.0006	0.0005	0.167
1:6	0.0006	0.0008	0.0006	0.0007	0.222
1:4	0.0007	0.0009	0.0012	0.0009	0.311



รูปที่ 26 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight)

การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ได้สมการ $y = 2.9529x$

โดย y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

x คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

สามารถคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งได้ดังนี้

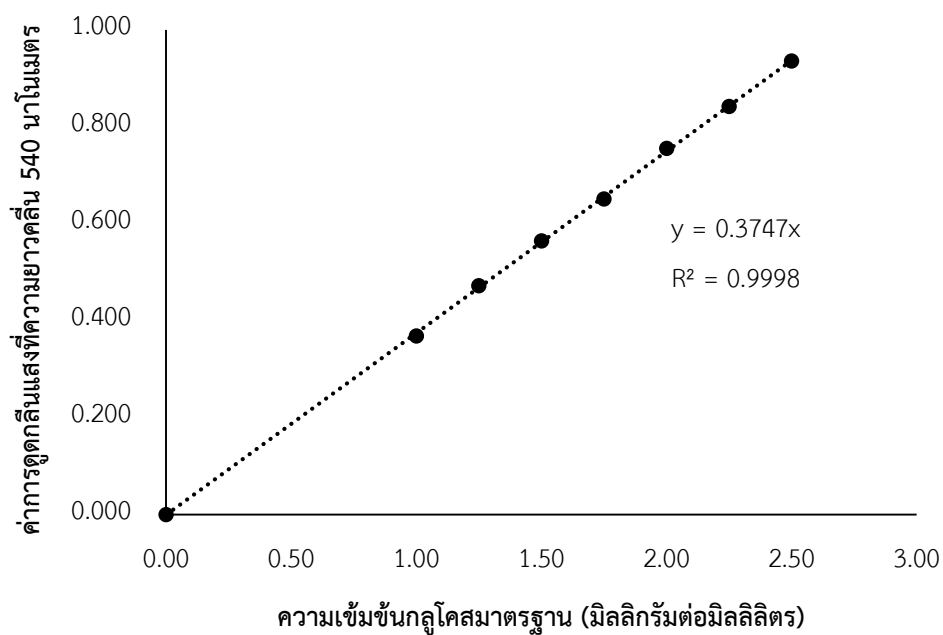
$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = (\text{OD}_{600} / 2.9529) \times \text{อัตราส่วนเจือจาง}$$

กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์

1. ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองให้ได้ความเข้มข้นของกลูโคส ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (หลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง)
2. ปิเปต DNS reagent ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ผสมให้เข้ากัน
3. ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
4. ปิเปตสารตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จะได้ผลดังตารางที่ 8 และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐาน กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ดังรูปที่ 27

ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคสมาตรฐาน ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ความเข้มข้นกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
0.00	0.000	0.000	0.000	0.000
1.00	0.373	0.366	0.366	0.368
1.25	0.472	0.472	0.473	0.472
1.50	0.575	0.550	0.568	0.564
1.75	0.657	0.647	0.650	0.651
2.00	0.757	0.758	0.752	0.756
2.25	0.850	0.847	0.828	0.842
2.50	0.943	0.934	0.930	0.936



รูปที่ 27 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

จากกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ได้สมการ $y = 0.3747x$

โดย y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

สามารถคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดังนี้

ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) = $(OD_{540} / 0.3747) \times$ อัตราส่วนเจือจาง

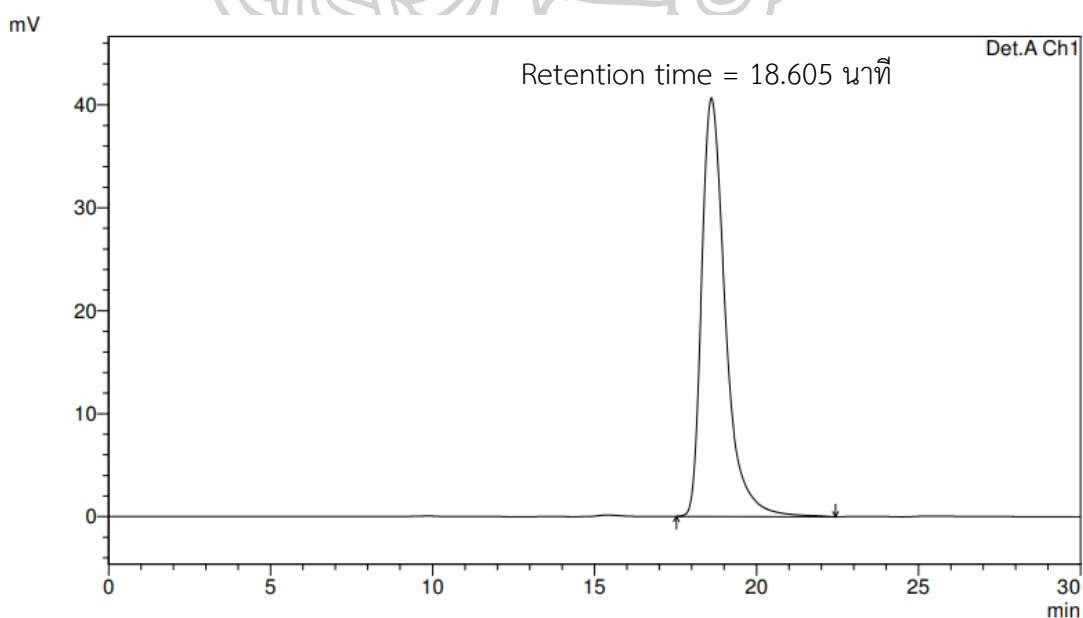
กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1. นำสารละลายมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาตร 1-1.5 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2-10 กรัมต่อลิตร ไปกรองด้วย nylon syringe filter มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร ใส่ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

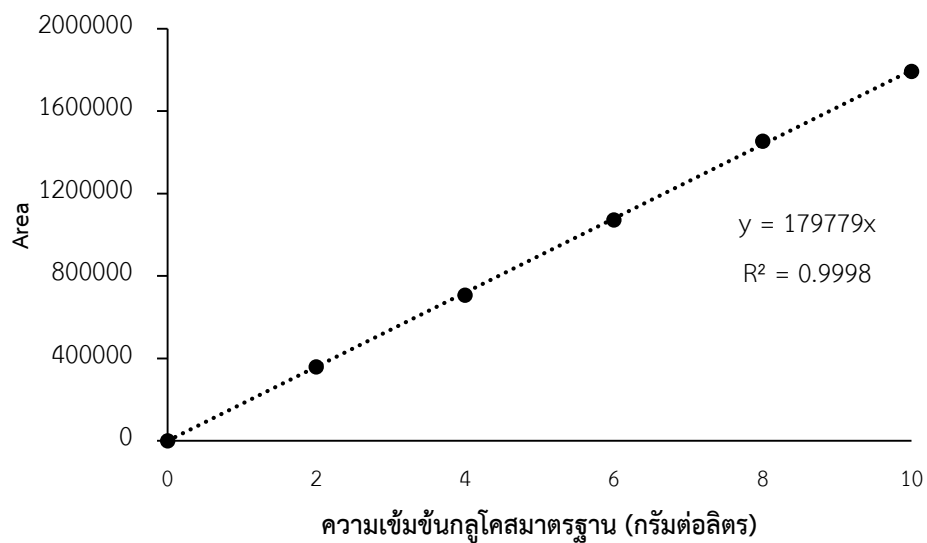
2. นำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้

Detector	Refractive index (RI) detector
Column	Rezek RNM carbohydrate Column
Mobile phase	น้ำปราศจากไอออน (deionized water)
Flow rate	0.4 มิลลิลิตรต่อนาที
Injection	10 ไมโครลิตร
Analysis time	30 นาที
Temperature	45 องศาเซลเซียส

1. สารมาตรฐานกลูโคส



รูปที่ 28 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกลูโคส ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 29 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยเครื่อง HPLC

การหาปริมาณกลูโคสด้วยเครื่อง HPLC

จากกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ได้สมการ $y = 179779x$

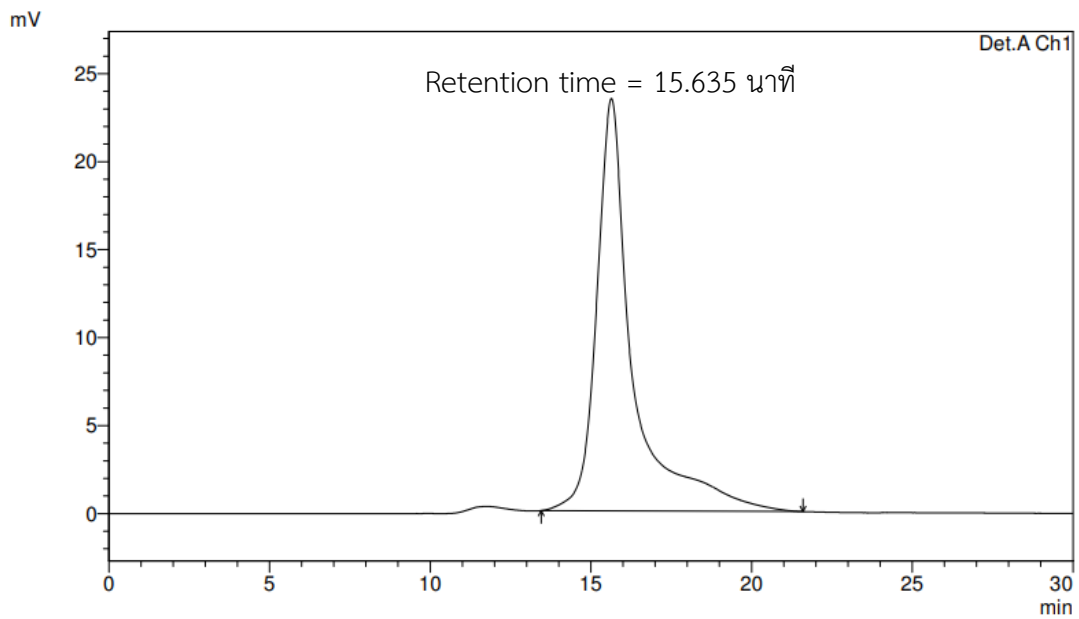
โดย y คือ ค่า area ของพีคกลูโคส

x คือ ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)

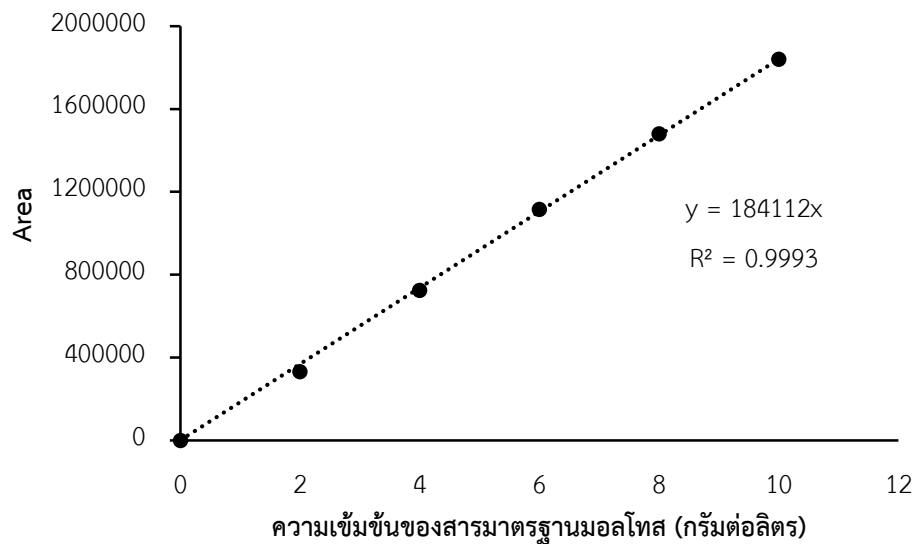
สามารถคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดังนี้

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร) = $(\text{area} / 179779) \times \text{อัตราส่วนเจือจาง}$

2. สารมาตรฐานมอลโทส



รูปที่ 30 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานมอลโทส ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 31 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณมอลโทสด้วยเครื่อง HPLC

การหาปริมาณโมลโทสด้วยเครื่อง HPLC

จากกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ได้สมการ $y = 184112x$

โดย y คือ ค่า area ของพีคโมลโทส

x คือ ความเข้มข้นโมลโทส (กรัมต่อลิตร)

สามารถคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดังนี้

ความเข้มข้นน้ำตาลโมลโทส (กรัมต่อลิตร) = $(\text{area} / 184112) \times \text{อัตราส่วนเจือจาง}$

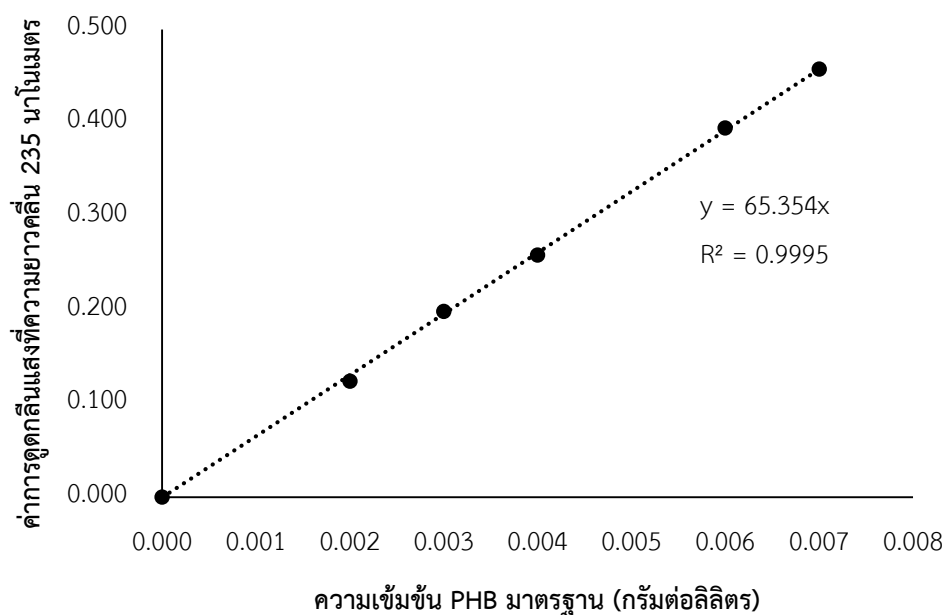


กราฟมาตรฐานของ PHB

1. ปิเปตสารละลาย PHB มาตรฐาน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองให้ได้ความเข้มข้นของ PHB ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.007 กรัมต่อลิตร (หลอดควบคุมใช้คลอโรฟอร์มแทนสารตัวอย่าง) ตั้งระเหยจนแห้ง
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
3. ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที และตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร จะได้ผลดังตารางที่ 9 และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ PHB กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร ดังรูปที่ 32

ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงของ PHB มาตรฐาน ที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร

ความเข้มข้น PHB มาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.002	0.106	0.141	0.125	0.124
0.003	0.173	0.218	0.205	0.199
0.004	0.272	0.259	0.245	0.259
0.006	0.399	0.405	0.380	0.395
0.007	0.442	0.465	0.466	0.458



รูปที่ 32 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ PHB

การหาปริมาณ PHB

จากกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณ PHB ได้สมการ $y = 65.354x$

โดย y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของ PHB (กรัมต่อลิตร)

สามารถคำนวณหาปริมาณ PHB ได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้น PHB (กรัมต่อลิตร)} = (\text{OD}_{235} / 65.354) \times \text{อัตราส่วนเจือจาง}$$

การวิเคราะห์ปริมาณ PHB สะสม (%PHB content)

การหาปริมาณ PHB สะสม (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ทำได้โดยการเทียบอัตราส่วนระหว่างปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ในหน่วยร้อยละ ดังสมการ

$$\% \text{PHB content} = \frac{\text{ความเข้มข้น PHB (กรัมต่อลิตร)}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)}} \times 100$$

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผักตบชวา

การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยวิธี TAPPI 203 om-88

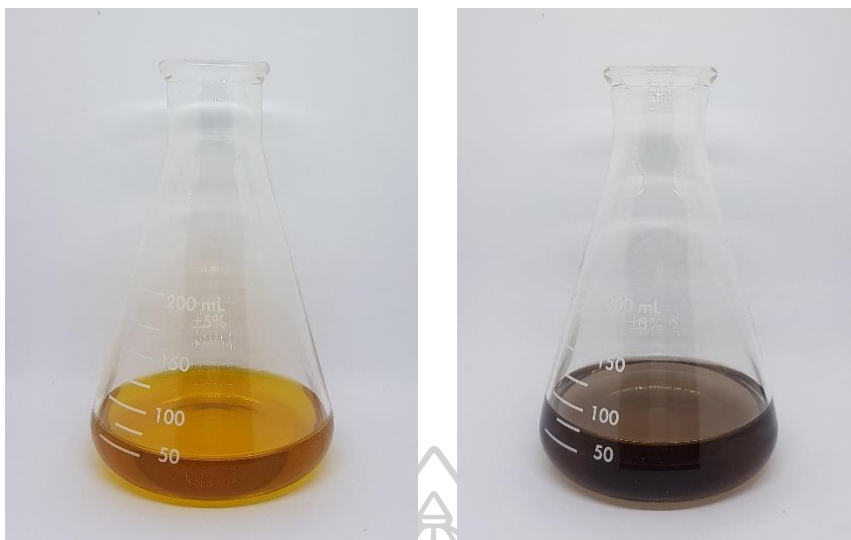
1. การเตรียมตัวอย่าง

- 1.1 ชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม น้ำหนักแห้ง และบันทึกน้ำหนักตัวอย่าง
- 1.2 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา จากนั้นนำไปกวนบนเครื่องกวนสาร 30 นาที โดยจับเวลาทันที หลังเติมสารละลาย
- 1.3 เมื่อครบเวลา เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ต่ออีก 30 นาที
- 1.4 กรองสารละลายตัวอย่าง โดยเก็บส่วนใส เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

2. การวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส (เซลลูโลส)

- 2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 2.2 ค่อยๆ เทกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงไป โดยเอียงขวดทำมุม 45 องศา กับพื้นเพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรงของสารละลาย และตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
- 2.3 หยดอินดิเคเตอร์ 2-4 หยด แล้วนำไปไตเตรตกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จนสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองอมส้มเป็นสีน้ำตาลอมม่วง ดังรูปที่ 33 บันทึกปริมาตรสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟต

หมายเหตุ สารละลายควบคุม (blank) เตรียมโดยปิเปตสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นบรรจุอยู่ 2.5 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง



รูปที่ 33 สีของสารละลายตัวอย่างก่อนไตเตรตกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (ซ้าย) สีของสารละลายตัวอย่างหลังไตเตรตกับสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเปลี่ยนจากสีเหลืองอมส้มเป็นสีน้ำตาลอมม่วง (ขวา)

การคำนวณหาปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส

$$\text{แอลฟา-เซลลูโลส (ร้อยละ)} = 100 - [(6.85 (V_2 - V_1) \times N \times 20) / AW]$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตกับสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตกับสารละลายควบคุม (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มัล)

A = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

6.85 = มิลลิกรัมสมมูลของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับเซลลูโลส

3. การวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-เซลลูโลส

- 3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟริกความเข้มข้น 3 นอร์มัล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- 3.2 ต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
- 3.3 กรองสารละลายตัวอย่าง โดยเก็บส่วนใสนำไปวิเคราะห์วิธีเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส

การคำนวณหาปริมาณแกมมา-เซลลูโลส

$$\text{แกมมา-เซลลูโลส} = [(6.85 (V_4 - V_3) \times N \times 20) / AW]$$

เมื่อ V_3 = ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตกับสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

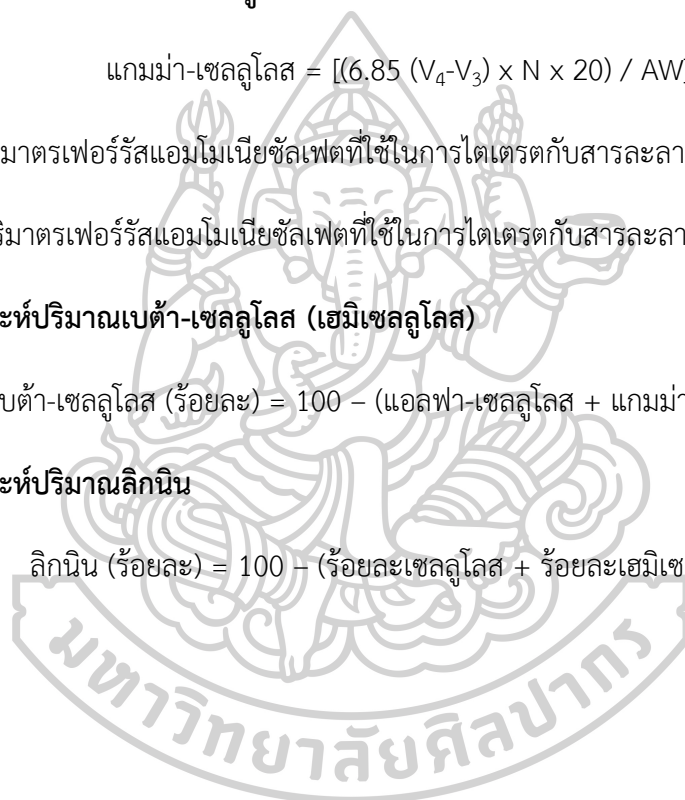
V_4 = ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตกับสารละลายควบคุม (มิลลิลิตร)

4. การวิเคราะห์ปริมาณเบต้า-เซลลูโลส (เฮมิเซลลูโลส)

$$\text{เบต้า-เซลลูโลส (ร้อยละ)} = 100 - (\text{แอลฟา-เซลลูโลส} + \text{แกมมา-เซลลูโลส})$$

5. การวิเคราะห์ปริมาณลิกนิน

$$\text{ลิกนิน (ร้อยละ)} = 100 - (\text{ร้อยละเซลลูโลส} + \text{ร้อยละเฮมิเซลลูโลส})$$



ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์กิจกรรมเซลลูเลส

วิธีวิเคราะห์

การหากิจกรรมเซลลูเลสในการย่อยกระดาษกรอง (filter paper assay) โดยดัดแปลงวิธีของ Ghose (1987) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. ใส่กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) ลงในหลอดทดลอง
2. ปิเปตสารละลายซเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายเซลลูเลส 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. อุณหภูมิควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
4. เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาโดยปิเปต DNS reagent ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปฏิกิริยา (reaction, RE)
5. ต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
6. ปิเปตสารละลายจากหลอดปฏิกิริยา ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

หมายเหตุ สำหรับหลอดควบคุม (blank), หลอดควบคุมสารตั้งต้น (substrate blank, SB) และหลอดควบคุมเอนไซม์ (enzyme blank, EB) ใช้ส่วนประกอบ ดังตารางที่ 10 สำหรับการทำปฏิกิริยา ตารางที่ 10 ส่วนประกอบในหลอดควบคุม (blank), หลอดควบคุมสารตั้งต้น (substrate blank, SB) และหลอดควบคุมเอนไซม์ (enzyme blank, EB) สำหรับหากิจกรรมเซลลูเลส

	blank	SB	EB
กระดาษกรอง เบอร์ 1 (กรัม)	-	50	-
สารละลายซเตรตบัฟเฟอร์ (มิลลิลิตร)	1.5	1.5	1.0
สารละลายเซลลูเลส (มิลลิลิตร)	-	-	0.5

การคำนวณกิจกรรมเซลล์

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเซลล์ (filter paper units, FPU) คือ ปริมาณเซลล์ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

$$\begin{aligned} \text{นั่นคือ 1 ยูนิตของเซลล์} &= 1 \text{ ไมโครโมลของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที} \\ &= 0.180 \text{ มิลลิกรัมของกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที} \end{aligned}$$

โดย กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม มีค่าเท่ากับ 1 ไมโครโมล

ถ้าเอนไซม์ย่อยสลายได้กลูโคส X มิลลิกรัม จะมีค่าเท่ากับ $\frac{X}{0.180}$ หรือ $5.556X$ ไมโครโมล

ในระยะเวลา 60 นาที กลูโคสถูกปล่อยออกมาเท่ากับ $5.556X$ ไมโครโมล

ระยะเวลา 1 นาที จะมีกลูโคสถูกปล่อยออกมาเท่ากับ $\frac{5.556X}{60}$ หรือ $0.0926X$ ไมโครโมล/นาที

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร จะมีกลูโคสเท่ากับ $0.0926X$ ไมโครโมล/นาที

ถ้าใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร จะมีกลูโคสเท่ากับ $\frac{0.0926X}{0.5}$ หรือ $0.185X$ ไมโครโมล/นาที/มิลลิลิตร

ซึ่งมีค่าเท่ากับ $0.185X$ ยูนิต/มิลลิลิตร (Filter paper units: FPU/ml)

หรือสามารถคำนวณหากิจกรรมเซลล์ได้จาก

$$\text{กิจกรรมเซลล์ (FPU/ml)} = \frac{OD_{540}}{0.3747} \times \frac{1000}{180} \times 1.5 \times \frac{1}{60} \times \frac{1}{0.5}$$

โดย $OD_{540} = OD_{RE} - (OD_{SB} + OD_{EB})$

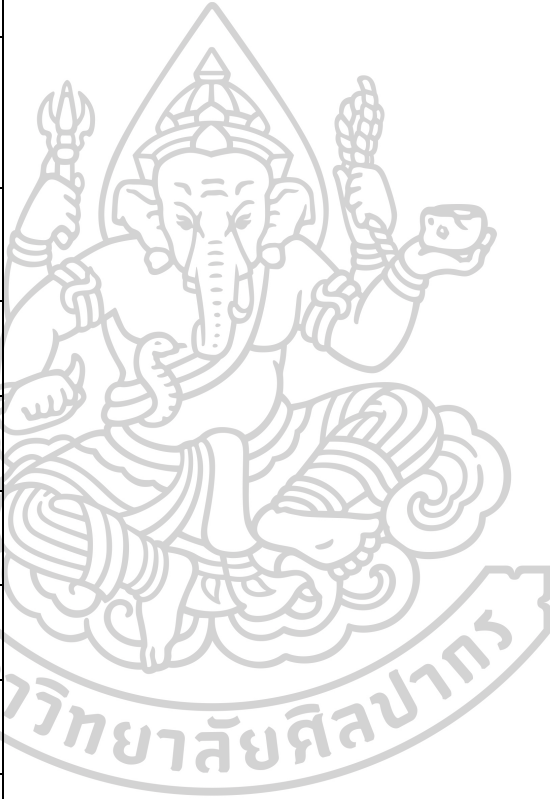
ภาคผนวก จ

ข้อมูลผลการทดลอง



ตารางที่ 11 ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการไตเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ

ชีวมวล	ซ้ำ	ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิลิตร)				ร้อยละปริมาณองค์ประกอบโดยน้ำหนัก			ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน				
		แอลฟา-เซลลูโลส		แกมมา-เซลลูโลส		เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน		
		1	2	เฉลี่ย	1							2	เฉลี่ย
ผักตบชวา	1	19.65	19.55	19.60	22.85	22.90	22.88	85.89	8.97	5.14	86.44 \pm 0.77	8.32 \pm 0.92	5.24 \pm 0.15
	2	20.00	20.00	20.00	22.80	22.80	22.80	86.99	7.67	5.34			



ตารางที่ 12 ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยไฮเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับปฏิกิริยาให้ความร้อนโดยใช้หม้อนิ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที

วิธีการ	เวลา (นาที)	ครั้ง	ซ้ำ	ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิลิตร)				ร้อยละปริมาตรองค์ประกอบโดยน้ำหนัก				ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน				
				แอลฟา-เซลลูโลส		แกมมา-เซลลูโลส		เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน			
				1	2	เฉลี่ย	1							2	เฉลี่ย	
0.5 % (w/v) NaOH	15	1	1	21.10	21.20	21.15	22.58	22.50	22.54	92.00	3.26	4.74	91.15±0.90	4.31±0.72	4.53±0.57	
			2	21.10	21.10	21.10	22.85	22.95	22.90	91.86	4.45	3.70				
		2	1	20.60	20.60	20.60	22.50	22.60	22.55	90.45	4.85	4.70				
			2	20.50	20.60	20.55	22.45	22.45	22.45	90.31	4.70	4.99				
		30	1	1	21.90	21.95	21.93	23.20	23.20	23.20	91.77	3.53	4.70	92.49±0.87	4.19±0.58	3.32±0.98
				2	22.00	22.00	22.00	23.65	23.80	23.73	91.97	4.77	3.25			
	2	1	22.25	22.15	22.20	23.80	23.90	23.85	92.53	4.57	2.91					
		2	22.70	22.55	22.63	24.00	24.05	24.03	93.70	3.87	2.42					
	45	1	1	21.80	21.65	21.73	23.35	23.25	23.30	92.04	4.32	3.64	92.02±0.23	4.50±0.41	3.47±0.21	
			2	21.90	21.70	21.80	23.35	23.25	23.30	92.25	4.11	3.64				
		2	1	21.70	21.80	21.75	23.40	23.40	23.40	92.11	4.52	3.37				
			2	21.70	21.50	21.60	23.50	23.40	23.45	91.70	5.07	3.23				
60	1	1	21.50	21.20	21.35	23.15	23.05	23.10	91.37	4.80	3.84	91.54±0.30	5.22±0.85	3.24±0.69		
		2	21.55	21.55	21.55	23.10	23.10	23.10	91.92	4.25	3.84					
	2	1	21.40	21.20	21.30	23.55	23.50	23.53	91.23	6.10	2.67					
		2	21.45	21.45	21.45	23.50	23.60	23.55	91.64	5.75	2.60					

ตารางที่ 13 ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับบการให้ความร้อนโดยใช้หม้อน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที

วิธีการ	เวลา (นาที)	ครั้ง	ซ้ำ	ปริมาณเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิกรัม)				ร้อยละปริมาณองค์ประกอบโดยน้ำหนัก				ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน			
				แอลฟา-เซลลูโลส		แกมมา-เซลลูโลส		เซลลูโลส	ลิกนิน	เซลลูโลส	ลิกนิน	เซลลูโลส	ลิกนิน		
				1	2	เฉลี่ย	1							2	เฉลี่ย
1.0 % (w/v) NaOH	15	1	1	21.90	21.85	21.88	23.20	23.05	23.13	92.55	3.53	3.92	92.21±0.78	4.59±0.93	3.21±0.85
			2	21.35	21.35	21.35	23.20	23.40	23.30	91.07	5.50	3.43			
		2	1	21.95	21.98	21.96	23.63	24.00	23.81	92.80	5.22	1.98	92.80	5.22	1.98
			2	21.80	21.85	21.83	23.25	23.30	23.28	92.41	4.09	3.50			
		1	1	22.65	22.35	22.50	23.30	23.40	23.35	93.35	2.85	3.80	93.35	2.85	3.80
			2	22.20	22.30	22.25	23.30	23.20	23.25	92.68	3.26	4.07			
	2	1	22.65	22.65	22.65	23.70	24.10	23.90	93.76	3.93	2.31	93.76	3.93	2.31	
		2	22.70	22.75	22.73	24.00	23.70	23.85	93.96	3.59	2.44				
	45	1	1	22.65	22.50	22.58	23.60	23.50	23.55	93.88	2.64	3.47	93.88	2.64	3.47
			2	22.60	22.60	22.60	23.50	23.40	23.45	93.95	2.31	3.74			
		2	1	22.80	22.60	22.70	23.90	23.90	23.90	94.22	3.26	2.52	94.22	3.26	2.52
			2	22.30	22.45	22.38	23.60	23.70	23.65	93.34	3.46	3.20			
1		1	21.95	21.65	21.80	23.50	23.55	23.53	91.41	4.63	3.96	91.41	4.63	3.96	
		2	22.20	22.20	22.20	23.50	23.50	23.50	92.48	3.49	4.03				
2	1	22.00	21.95	21.98	23.60	23.60	23.60	91.88	4.36	3.76	91.88	4.36	3.76		
	2	22.40	22.40	22.40	23.70	23.70	23.70	93.02	3.49	3.49					
60	1	1	22.40	22.40	22.40	23.70	23.70	23.70	93.02	3.49	3.49	93.02	3.49	3.49	
		2	22.40	22.40	22.40	23.70	23.70	23.70	93.02	3.49	3.49				
2	1	22.00	21.95	21.98	23.60	23.60	23.60	91.88	4.36	3.76	91.88	4.36	3.76		
	2	22.40	22.40	22.40	23.70	23.70	23.70	93.02	3.49	3.49					

ตารางที่ 14 ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับปฏิกิริยาความร้อนโดยใช้หม้อนิ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที

วิธีการ	เวลา (นาที)	ครั้ง	ซ้ำ	ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิลิตร)				ร้อยละปริมาณองค์ประกอบโดยน้ำหนัก				ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน			
				แอลฟา-เซลลูโลส		แกมมา-เซลลูโลส		เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน		
				1	2	เฉลี่ย	1							2	เฉลี่ย
1.5 % (w/v) NaOH	15	1	1	21.40	21.50	21.45	22.78	22.80	22.79	91.99	3.74	4.27	91.46±1.20	4.32±0.54	4.22±0.78
			2	21.78	21.73	21.75	23.20	23.20	23.20	92.83	4.05	3.12			
		2	1	21.08	21.05	21.06	22.65	22.73	22.69	90.91	4.54	4.55			
			2	20.75	20.80	20.78	22.55	22.55	22.55	90.11	4.96	4.93			
		1	1	22.40	22.55	22.48	23.60	23.65	23.63	93.29	3.66	3.05			
			2	22.30	22.50	22.40	23.50	23.60	23.55	93.08	3.66	3.26			
	30	1	1	22.45	22.45	22.45	24.00	24.20	24.10	93.22	5.02	1.76	93.13±0.15	4.37±0.82	2.49±0.77
			2	22.30	22.40	22.35	24.00	24.10	24.05	92.95	5.15	1.90			
		1	1	22.00	21.80	21.90	23.30	23.40	23.35	92.66	3.97	3.37			
			2	21.70	21.50	21.60	23.35	23.25	23.30	91.83	4.66	3.51			
		2	1	21.95	21.95	21.95	23.35	23.35	23.35	92.79	3.84	3.37			
			2	21.10	21.10	21.10	23.00	22.90	22.95	90.46	5.07	4.47			
45	1	1	21.40	21.60	21.50	23.10	23.20	23.15	91.67	4.66	3.67	91.94±1.07	4.38±0.58	3.68±0.53	
		2	21.75	21.90	21.83	23.15	23.15	23.15	92.59	3.74	3.67				
	2	1	21.65	21.45	21.55	23.05	23.15	23.10	91.82	4.37	3.81				
		2	22.15	22.05	22.10	23.20	23.30	23.25	93.37	3.25	3.39				
	1	1	21.40	21.60	21.50	23.10	23.20	23.15	91.67	4.66	3.67				
		2	21.75	21.90	21.83	23.15	23.15	23.15	92.59	3.74	3.67				
60	1	1	21.65	21.45	21.55	23.05	23.15	23.10	91.82	4.37	3.81	92.36±0.78	4.00±0.63	3.63±0.18	
		2	22.15	22.05	22.10	23.20	23.30	23.25	93.37	3.25	3.39				
	2	1	21.65	21.45	21.55	23.05	23.15	23.10	91.82	4.37	3.81				
		2	22.15	22.05	22.10	23.20	23.30	23.25	93.37	3.25	3.39				
	1	1	21.40	21.60	21.50	23.10	23.20	23.15	91.67	4.66	3.67				
		2	21.75	21.90	21.83	23.15	23.15	23.15	92.59	3.74	3.67				
2	1	21.65	21.45	21.55	23.05	23.15	23.10	91.82	4.37	3.81					
	2	22.15	22.05	22.10	23.20	23.30	23.25	93.37	3.25	3.39					

ตารางที่ 15 ปริมาตรเฟอร์รัสเอมโมเนียลเฟสที่ใช้ในการเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับบริการให้ความร้อนโดยใช้หม้อนิ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที

วิธีการ	เวลา (นาที)	ครั้ง	ซ้ำ	ปริมาตรเฟอร์รัสเอมโมเนียลเฟส (มิลลิลิตร)				ร้อยละปริมาณองค์ประกอบโดยน้ำหนัก				ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน			
				แอลฟา-เซลลูโลส		แกมมา-เซลลูโลส		เซลลูโลส	ลิกนิน	เซลลูโลส	ลิกนิน	เซลลูโลส	ลิกนิน	ลิกนิน	
				1	2	เฉลี่ย	1								2
2.0% (w/v) NaOH	15	1	1	22.20	21.85	22.03	23.10	24.00	23.55	93.27	4.18	2.55	92.61±1.02	4.45±0.59	2.94±0.44
			2	21.20	21.25	21.23	23.15	23.20	23.18	91.08	5.34	3.58			
		2	1	21.90	21.95	21.93	23.50	23.40	23.45	93.00	4.18	2.82	93.07	4.11	2.82
			2	21.90	22.00	21.95	23.40	23.50	23.45	93.07	4.11	2.82			
	30	1	1	22.30	22.20	22.25	23.90	23.80	23.85	93.89	5.25	0.86	94.68±0.62	4.61±0.60	0.71±0.14
			2	22.60	22.50	22.55	24.10	24.00	24.05	94.71	4.70	0.59			
		2	1	22.90	22.70	22.80	23.95	23.85	23.90	95.40	3.81	0.79	94.71	4.70	0.59
			2	22.50	22.60	22.55	24.00	24.10	24.05	94.71	4.70	0.59			
	45	1	1	21.80	21.90	21.85	23.60	23.65	23.63	91.65	6.58	1.77	91.92±0.21	6.12±0.39	1.96±0.17
			2	21.95	21.90	21.93	23.60	23.50	23.55	91.85	6.28	1.87			
		2	1	22.00	22.05	22.03	23.40	23.30	23.35	92.12	5.74	2.14	92.05	5.87	2.08
			2	22.00	22.00	22.00	23.45	23.35	23.40	92.05	5.87	2.08			
60	1	1	21.50	21.70	21.60	23.25	23.40	23.33	91.96	4.87	3.17	92.52	4.73	2.75	
		2	21.70	21.90	21.80	23.50	23.45	23.48	92.52	4.73	2.75				
	2	1	21.60	21.70	21.65	23.35	23.50	23.43	92.10	5.01	2.89	92.04±0.38	4.90±0.14	3.05±0.28	
		2	21.40	21.55	21.48	23.25	23.25	23.25	91.60	5.01	3.39				

ตารางที่ 16 ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการเตรตเพื่อหาปริมาณเฮลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร ร่วมกับปฏิกิริยาให้ความร้อนโดยใช้หม้อนิ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็น เวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที

วิธีการ	เวลา (นาที)	ครั้ง	ซ้ำ	ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิลิตร)				ร้อยละปริมาณองค์ประกอบโดยน้ำหนัก				ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน			
				แอลฟา-เฮลลูโลส		แกมมา-เฮลลูโลส		เฮลลูโลส	เฮมิเฮลลูโลส	ลิกนิน	เฮลลูโลส	เฮมิเฮลลูโลส	ลิกนิน		
				1	2	เฉลี่ย	1							2	เฉลี่ย
0.5 % (w/v) H ₂ SO ₄	15	1	1	18.10	17.70	17.90	21.10	21.30	21.20	79.94	9.13	10.93	78.78±0.99	10.17±1.01	11.05±0.21
			2	17.70	17.50	17.60	21.00	21.10	21.05	79.11	9.55	11.35			
		2	1	17.10	17.00	17.05	21.10	21.20	21.15	77.58	11.35	11.07			
			2	17.35	17.40	17.38	21.40	21.05	21.23	78.48	10.65	10.86			
	30	1	1	18.10	17.90	18.00	21.70	21.60	21.65	81.51	10.00	8.49	81.09±0.30	10.89±0.98	8.01±0.90
			2	17.70	17.80	17.75	21.50	21.50	21.50	80.82	10.28	8.91			
		2	1	17.80	17.80	17.80	22.30	22.20	22.25	80.96	12.19	6.85			
			2	17.70	18.00	17.85	21.90	21.90	21.90	81.09	11.10	7.81			
	45	1	1	18.30	18.60	18.45	22.60	22.40	22.50	81.23	11.43	7.34	82.01±1.43	11.20 ±0.98	6.79±0.59
			2	18.20	18.10	18.15	22.55	22.55	22.55	80.39	12.42	7.20			
		2	1	19.30	19.10	19.20	22.90	22.65	22.78	83.35	10.09	6.56			
			2	19.10	19.10	19.10	23.00	22.90	22.95	83.07	10.87	6.07			
60	1	1	19.75	19.65	19.70	23.30	23.50	23.40	84.98	9.83	5.18	84.72±0.42	10.28 ±0.43	5.00±0.18	
		2	19.35	19.40	19.38	23.45	23.40	23.43	84.12	10.76	5.12				
	2	1	19.55	19.65	19.60	23.70	23.40	23.55	84.72	10.50	4.78				
		2	19.75	19.70	19.73	23.65	23.35	23.50	85.05	10.03	4.92				

ตารางที่ 17 ปริมาตรเฟอร์รัสเอมโมเนี่ยมซัลเฟตที่ใช้ในการเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ร่วมกับปฏิกิริยาให้ความร้อนโดยใช้หม้อนิ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็น เวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที

วิธีการ	เวลา (นาที)	ครั้ง	ซ้ำ	ปริมาณเฟอร์รัสเอมโมเนี่ยมซัลเฟต (มิลลิกรัม)				ร้อยละปริมาณองค์ประกอบโดยน้ำหนัก				ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน				
				แอลฟา-เซลลูโลส		แกมมา-เซลลูโลส		เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน			
				1	2	เฉลี่ย	1							2	เฉลี่ย	
1.0 % (w/v) H ₂ SO ₄	15	1	1	17.15	17.00	17.08	21.10	20.90	21.00	80.19	10.43	9.38	79.82±0.28	10.90±0.37	9.28±0.23	
			2	16.80	16.85	16.83	21.00	21.10	21.05	79.52	11.23	9.25				
	30	2	1	17.05	16.75	16.90	21.00	20.90	20.95	79.72	10.76	9.51	86.85±0.84	6.77±0.87	6.38±0.46	
			2	16.80	17.10	16.95	21.20	21.10	21.15	79.85	11.16	8.98				
	45	1	1	20.55	20.25	20.40	22.90	22.80	22.85	87.65	6.58	5.77	85.71±0.40	9.01±0.44	5.27±0.07	
			2	20.25	20.40	20.33	22.40	22.50	22.45	87.45	5.71	6.85				
	60	2	1	19.90	19.60	19.75	22.50	22.60	22.55	85.90	7.52	6.58	86.80±0.68	9.10±0.84	4.10±0.51	
			2	19.70	19.80	19.75	22.60	22.70	22.65	85.90	7.79	6.31				
			1	1	19.70	19.95	19.83	23.20	23.30	23.25	85.11	9.67	5.22			
				2	20.10	20.10	20.10	23.20	23.20	23.20	85.89	8.75	5.36			
			2	1	20.10	20.10	20.10	23.30	23.20	23.25	85.89	8.89	5.22			
				2	20.20	20.05	20.13	23.20	23.25	23.23	85.96	8.75	5.29			
		1	1	19.80	19.60	19.70	22.90	22.70	22.80	86.58	8.58	4.84				
			2	20.00	20.25	20.13	23.20	23.00	23.10	87.75	8.23	4.01				
		2	1	19.85	19.65	19.75	23.30	23.10	23.20	86.72	9.55	3.74				
			2	19.55	19.55	19.55	23.15	23.20	23.18	86.16	10.03	3.81				

ตารางที่ 18 ปริมาตรเฟอร์รัสเอมโมเนียซัลเฟตที่ใช้ในการเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยปริมาตร ร่วมกับปฏิกิริยาให้ความร้อนโดยใช้หม้อนิ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็น เวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที

วิธีการ	เวลา (นาที)	ครั้ง	ซ้ำ	ปริมาตรเฟอร์รัสเอมโมเนียซัลเฟต (มิลลิลิตร)				ร้อยละปริมาณองค์ประกอบโดยน้ำหนัก				ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
				แอลฟา-เซลลูโลส		แกมมา-เซลลูโลส		เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	
				1	2	เฉลี่ย	1							2
1.5 % (w/v) H ₂ SO ₄	15	1	1	17.90	17.90	21.50	21.85	21.68	81.15	10.24	8.61	81.28 \pm 0.35	10.38 \pm 0.12	8.34 \pm 0.32
			2	17.60	18.00	21.55	21.80	21.68	80.88	10.51	8.61			
		1	18.00	18.00	21.80	21.90	21.85	81.42	10.44	8.14				
		2	18.00	18.20	21.80	22.00	21.90	81.69	10.31	8.00				
	30	1	1	19.90	20.10	20.00	23.60	23.55	85.33	9.82	4.84	84.90 \pm 0.56	10.36 \pm 0.95	4.74 \pm 0.41
			2	19.80	19.80	23.50	23.60	23.55	84.78	10.38	4.84			
		1	19.70	19.45	23.80	23.80	23.80	84.16	11.69	4.15				
		2	20.00	20.00	23.50	23.40	23.45	85.33	9.55	5.12				
	45	1	1	20.40	20.50	20.45	23.70	23.30	87.14	8.52	4.33	87.18 \pm 0.29	7.76 \pm 0.75	5.07 \pm 0.55
			2	20.30	20.40	23.20	23.30	23.25	86.86	8.10	5.03			
		1	20.50	20.70	23.10	22.95	23.03	87.56	6.78	5.66				
		2	20.45	20.45	23.15	23.20	23.18	87.14	7.62	5.24				
60	1	1	20.60	20.60	20.60	23.45	23.10	87.45	7.77	4.78	86.66 \pm 1.05	8.84 \pm 1.30	4.50 \pm 0.76	
		2	20.60	20.70	23.60	23.60	23.60	87.59	8.53	3.89				
	1	20.10	20.20	23.15	22.90	23.03	86.22	8.32	5.46					
	2	19.90	19.80	23.55	23.65	23.60	85.40	10.72	3.89					

ตารางที่ 19 ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการเตรตเพื่อหาปริมาณเซลลูโลส เซมิเซลลูโลส และลิกนิน ของผักตบชวาที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร ร่วมกับบการให้ความร้อนโดยใช้หม้อน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็น เวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที

วิธีการ	เวลา (นาที)	ครั้ง	ซ้ำ	ปริมาตรเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มิลลิลิตร)				ร้อยละปริมาตรองค์ประกอบโดยน้ำหนัก				ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน			
				แอลฟา-เซลลูโลส		แกมมา-เซลลูโลส		เซลลูโลส	เซมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เซลลูโลส	เซมิเซลลูโลส	ลิกนิน		
				1	2	เฉลี่ย	1							2	เฉลี่ย
2.0% (w/v) H ₂ SO ₄	15	1	1	18.70	18.95	18.83	23.00	23.00	23.00	82.84	14.24	2.92	83.39±0.75	13.18±0.81	3.43±0.43
			2	18.80	18.70	18.75	22.15	22.30	22.23	82.64	13.39	3.97			
		1	19.40	19.20	19.30	22.70	22.60	22.65	84.13	12.48	3.39				
		2	19.10	19.35	19.23	22.60	22.60	22.60	83.93	12.61	3.46				
	30	1	1	19.60	19.65	19.63	23.20	23.10	23.15	86.92	11.37	1.71	86.30±0.48	11.94±0.40	1.76±0.12
			2	19.15	19.25	19.20	23.00	23.00	23.00	85.75	12.33	1.92			
		1	19.40	19.45	19.43	23.20	23.20	23.20	86.37	11.99	1.64				
		2	19.20	19.50	19.35	23.10	23.10	23.10	86.16	12.06	1.78				
	45	1	1	19.80	19.70	19.75	23.10	23.10	23.10	87.04	9.18	3.78	87.11±0.20	9.38±0.34	3.51±0.22
			2	19.65	19.75	19.70	23.40	23.20	23.30	86.90	9.86	3.23			
		1	19.95	19.80	19.88	23.30	23.10	23.20	87.38	9.11	3.51				
		2	19.80	19.75	19.78	23.25	23.15	23.20	87.11	9.38	3.51				
60	1	1	19.90	19.70	19.80	23.00	23.10	23.05	87.81	8.91	3.29	88.42±0.48	8.53±0.47	3.05±0.23	
		2	20.20	20.25	20.23	23.10	23.10	23.10	88.97	7.88	3.15				
	1	20.10	19.95	20.03	23.35	23.15	23.25	88.42	8.84	2.74					
	2	20.10	20.00	20.05	23.10	23.20	23.15	88.49	8.49	3.01					

ตารางที่ 20 ปริมาณน้ำตาเล็ดรูดจากการไฮโดรไลซิสผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยเซลล์ ในช่วงเวลาต่างๆ

ชั่วโมง	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร					ปริมาณน้ำตาเล็ดรูด (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		อัตราส่วนเจือจาง	1	2	3	เฉลี่ย		
0.5	1	2	0.497	0.494	0.497	0.496	2.65	2.63 \pm 0.02
	2	2	0.492	0.485	0.492	0.490	2.61	
	3	2	0.481	0.510	0.485	0.492	2.63	
1.0	1	2	0.500	0.491	0.491	0.494	2.64	2.69 \pm 0.05
	2	2	0.522	0.501	0.489	0.504	2.69	
	3	2	0.512	0.511	0.510	0.511	2.73	
2.0	1	4	0.227	0.247	0.240	0.238	2.54	2.65 \pm 0.10
	2	4	0.242	0.252	0.259	0.251	2.68	
	3	4	0.256	0.256	0.254	0.255	2.73	
6.0	1	4	0.244	0.235	0.239	0.239	2.55	2.62 \pm 0.06
	2	4	0.262	0.243	0.241	0.249	2.65	
	3	4	0.241	0.256	0.248	0.248	2.65	
12.0	1	4	0.263	0.265	0.253	0.260	2.78	2.77 \pm 0.02
	2	4	0.262	0.254	0.257	0.258	2.75	
	3	4	0.258	0.257	0.266	0.260	2.78	

ตารางที่ 20 ปริมาณน้ำตาสดที่ชั่งจากการไฮโดรไลซิสผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยเซลล์เลส ที่ระยะเวลาต่างๆ (ต่อ)

ชั่วโมง	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร					ปริมาณน้ำตาสดที่ชั่ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		อัตราส่วนเจือจาง	1	2	3	เฉลี่ย		
18.0	1	4	0.255	0.252	0.259	0.255	2.73	2.72 \pm 0.02
	2	4	0.256	0.258	0.258	0.257	2.75	
	3	4	0.250	0.252	0.256	0.253	2.70	
24.0	1	4	0.263	0.258	0.263	0.261	2.79	2.81 \pm 0.02
	2	4	0.264	0.264	0.257	0.262	2.79	
	3	4	0.268	0.264	0.264	0.265	2.83	
30.0	1	2	0.334	0.329	0.337	0.333	1.78	2.55 \pm 0.67
	2	2	0.530	0.554	0.535	0.540	2.88	
	3	2	0.558	0.554	0.562	0.558	2.98	
36.0	1	2	0.152	0.150	0.151	0.151	0.81	1.30 \pm 0.92
	2	2	0.139	0.132	0.142	0.138	0.73	
	3	2	0.442	0.443	0.447	0.444	2.37	
42.0	1	2	0.200	0.200	0.201	0.200	1.07	1.07 \pm 0.01
	2	2	0.212	0.201	0.200	0.204	1.09	
	3	2	0.198	0.199	0.200	0.199	1.06	

ตารางที่ 21 ปริมาณน้ำตาสดที่วิเคราะห์จากสารไฮโดรไลซิสผักตบชวาที่ผ่านการปรับปรุงสภาพด้วยไฮเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับสารเพิ่มอินทรีย์ความเข้มข้น 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเซลล์เลส ที่ระยะเวลาต่างๆ

ช่วงโม่ง	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร					ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		อัตราส่วนเจือจาง	1	2	3	เฉลี่ย		
0.5	1	2	0.700	0.714	0.703	0.706	3.77	3.54 \pm 0.32
	2	2	0.578	0.590	0.618	0.595	3.18	
	3	2	0.692	0.685	0.689	0.689	3.68	
1.0	1	4	0.388	0.385	0.388	0.387	4.13	4.17 \pm 0.35
	2	4	0.420	0.434	0.422	0.425	4.54	
	3	4	0.356	0.366	0.358	0.360	3.84	
2.0	1	6	0.299	0.306	0.297	0.301	4.81	5.38 \pm 0.49
	2	6	0.356	0.359	0.351	0.355	5.69	
	3	6	0.351	0.349	0.356	0.352	5.64	
6.0	1	8	0.350	0.352	0.355	0.352	7.52	7.41 \pm 0.18
	2	8	0.352	0.352	0.350	0.351	7.50	
	3	8	0.343	0.333	0.336	0.337	7.20	
12.0	1	10	0.381	0.365	0.405	0.384	10.24	10.07 \pm 0.17
	2	10	0.382	0.376	0.375	0.378	10.08	
	3	10	0.371	0.370	0.371	0.371	9.89	

ตารางที่ 21 ปริมาณน้ำตาคลอรีนซ์จากการไฮโดรไลซิสผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยไฮโดรเมทัลลอร์จิกซ์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวลต่อปริมาตร ร่วมกับคาร์ซีพหนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเซลล์เลส ที่ระยะเวลาต่างๆ (ต่อ)

ชั่วโมง	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร				ปริมาณน้ำตาคลอรีนซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		อัตราส่วนเจือจาง	1	2	3		
18.0	1	12	0.352	0.354	0.353	0.353	10.72 \pm 0.51
	2	12	0.329	0.322	0.324	0.325	
	3	12	0.326	0.324	0.328	0.326	
24.0	1	12	0.457	0.440	0.459	0.452	13.54 \pm 0.87
	2	12	0.385	0.404	0.405	0.398	
	3	12	0.416	0.418	0.421	0.418	
30.0	1	15	0.348	0.346	0.348	0.347	13.71 \pm 0.85
	2	15	0.320	0.319	0.319	0.319	
	3	15	0.363	0.364	0.356	0.361	
36.0	1	15	0.331	0.331	0.333	0.332	13.75 \pm 1.35
	2	15	0.319	0.317	0.316	0.317	
	3	15	0.379	0.386	0.380	0.382	
42.0	1	15	0.338	0.335	0.342	0.338	14.06 \pm 0.84
	2	15	0.372	0.378	0.377	0.376	
	3	15	0.338	0.341	0.341	0.340	

ตารางที่ 22 ปริมาณน้ำตาคลอรีนจากสารไฮโดรไลซิสผักตบชวาด้วยเซลล์ส ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ชนิดของน้ำตา	พื้นที่ได้กราฟ			ปริมาณน้ำตาคลอรีน (กรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3	1	2	3	
ผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ							
กลูโคส	564167	493837	517043	3.14	2.75	2.88	2.92 \pm 0.20
ผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพ [2.0 % (w/v) NaOH, 30 นาที]							
กลูโคส	2065563	1812031	2552026	11.49	10.08	14.20	11.92 \pm 2.09
มอลโทส	752099	634276	856586	4.09	3.45	4.65	4.06 \pm 0.60

ตารางที่ 23 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชนิดของแหล่งคาร์บอน จากการศึกษา *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

แหล่งไนโตรเจน	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			เซลล์แห้ง (g/L)	ค่าเฉลี่ย \pm มาตรฐาน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร			ปริมาณ PHB (g/L)	ค่าเฉลี่ย \pm มาตรฐาน	%PHB content	ค่าเฉลี่ย \pm มาตรฐาน		
		1	2	3			เฉลี่ย	1	2					3	
กลูโคส	1	40	0.541	0.517	0.509	0.522	7.08	100	0.674	0.711	0.717	0.701	1.07	15.152	17.82 \pm 2.32
	2	40	0.522	0.533	0.522	0.526	7.12	100	0.888	0.913	0.900	0.900	1.38	19.347	
	3	40	0.517	0.511	0.511	0.513	6.95	100	0.856	0.889	0.840	0.862	1.32	18.973	
ไฮโดรไลเซท	1	20	0.841	0.832	0.847	0.840	5.69	100	0.700	0.696	0.715	0.704	1.08	18.925	19.62 \pm 4.15
	2	20	0.785	0.798	0.810	0.798	5.40	100	0.590	0.550	0.544	0.561	0.86	15.898	
	3	20	0.791	0.799	0.787	0.792	5.37	100	0.856	0.846	0.835	0.846	1.29	24.112	

ตารางที่ 24 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ จากการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

แหล่งไนโตรเจน	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร				เซลล์แห้ง (g/L)	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร				ปริมาณ PHB (g/L)	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	%PHB content	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		เจือจาง	1	2	3			เจือจาง	1	2	3				
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	40	0.477	0.479	0.471	0.476	6.44	100	0.549	0.535	0.551	0.545	0.83	12.942	11.76±2.35
	2	40	0.444	0.455	0.449	0.449	6.09	100	0.528	0.511	0.521	0.520	0.80	13.072	
	3	40	0.411	0.411	0.406	0.409	5.54	100	0.320	0.322	0.329	0.324	0.50	8.932	
NH ₄ Cl	1	20	0.823	0.838	0.822	0.828	5.61	100	0.366	0.359	0.367	0.364	0.56	9.936	8.73±1.27
	2	20	0.790	0.827	0.817	0.811	5.50	100	0.251	0.261	0.285	0.266	0.41	7.397	
	3	20	0.767	0.770	0.752	0.763	5.17	100	0.296	0.299	0.300	0.298	0.46	8.833	
peptone	1	20	0.506	0.498	0.485	0.496	3.36	100	0.452	0.467	0.452	0.457	0.70	20.801	21.86±3.34
	2	20	0.436	0.434	0.430	0.433	2.93	100	0.479	0.496	0.507	0.494	0.76	25.754	
	3	20	0.470	0.476	0.457	0.468	3.17	100	0.400	0.405	0.399	0.401	0.61	19.387	
tryptone	1	20	0.625	0.619	0.595	0.613	4.15	100	0.537	0.533	0.546	0.539	0.82	19.852	17.27±2.30
	2	20	0.558	0.564	0.567	0.563	3.81	100	0.416	0.385	0.374	0.392	0.60	15.716	
	3	20	0.569	0.573	0.574	0.572	3.87	100	0.410	0.406	0.401	0.406	0.62	16.022	
yeast extract	1	20	0.841	0.832	0.847	0.840	5.69	100	0.700	0.696	0.715	0.704	1.08	18.925	19.62±4.15
	2	20	0.785	0.798	0.810	0.798	5.40	100	0.590	0.550	0.544	0.561	0.86	15.898	
	3	20	0.791	0.799	0.787	0.792	5.37	100	0.856	0.846	0.835	0.846	1.29	24.112	
ยูเรีย	1	20	0.794	0.807	0.830	0.810	5.49	20	0.543	0.540	0.487	0.523	0.16	2.918	2.89±0.60
	2	20	0.739	0.780	0.775	0.765	5.18	20	0.381	0.377	0.402	0.387	0.12	2.285	
	3	20	0.761	0.760	0.748	0.756	5.12	20	0.605	0.568	0.575	0.583	0.18	3.481	

ตารางที่ 25 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนต่างๆ จากการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

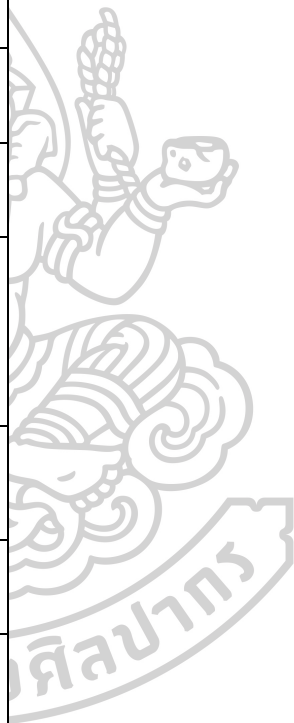
C:N ratio	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร				เซลล์แห้ง (g/L)	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร				ปริมาณ PHB (g/L)	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	%PHB content	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	
		เจือจาง	1	2	3			เจือจาง	1	2	3					เฉลี่ย
20:1	1	20	0.347	0.333	0.336	0.339	2.29	40	0.421	0.417	0.411	0.416	0.26		11.509	12.04±0.59
	2	20	0.307	0.301	0.298	0.302	2.05	40	0.462	0.460	0.454	0.459	0.28	0.27±0.01	12.680	
	3	20	0.340	0.344	0.336	0.340	2.30	40	0.456	0.447	0.445	0.449	0.28		11.943	
20:2	1	20	0.454	0.437	0.443	0.445	3.01	100	0.268	0.287	0.287	0.281	0.43		14.259	15.77±1.49
	2	20	0.479	0.493	0.493	0.488	3.31	100	0.365	0.386	0.367	0.373	0.57	0.52±0.08	17.241	
	3	20	0.519	0.521	0.516	0.519	3.51	100	0.350	0.352	0.387	0.363	0.56		15.811	
20:3	1	20	0.625	0.614	0.620	0.620	4.20	100	0.336	0.360	0.375	0.357	0.55		13.015	13.73±2.31
	2	20	0.639	0.640	0.640	0.640	4.33	100	0.462	0.463	0.460	0.462	0.71	0.59±0.10	16.305	
	3	20	0.647	0.659	0.646	0.651	4.41	100	0.328	0.360	0.337	0.342	0.52		11.863	
20:4	1	20	0.792	0.765	0.765	0.774	5.24	100	0.430	0.436	0.436	0.434	0.66		12.668	16.01±3.15
	2	20	0.759	0.758	0.763	0.760	5.15	100	0.637	0.644	0.629	0.637	0.97	0.83±0.16	18.925	
	3	20	0.766	0.759	0.763	0.763	5.17	100	0.549	0.562	0.555	0.555	0.85		16.450	
20:5	1	20	0.708	0.712	0.706	0.709	4.80	100	0.508	0.524	0.507	0.513	0.79		16.365	16.46±1.67
	2	20	0.730	0.731	0.723	0.728	4.93	100	0.473	0.485	0.476	0.478	0.73	0.81±0.10	14.833	
	3	20	0.757	0.735	0.745	0.746	5.05	100	0.592	0.596	0.612	0.600	0.92		18.178	

ตารางที่ 26 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ จากการศึกษาเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37±4 องศาเซลเซียส อัตราการกลั่น 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 44 ชั่วโมง

ชั่วโมง	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			เซลล์แห้ง (g/L)	ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)	ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
		เจือจาง	1	2			3	เจือจาง	1			2	3
0	1	3	0.488	0.537	0.516	0.514	0.52	0.412	0.396	0.402	0.403	10.07	10.32±0.35
	2	3	0.605	0.654	0.578	0.612	0.62	0.419	0.420	0.430	0.423	10.56	
2	1	3	0.495	0.496	0.488	0.493	0.50	0.392	0.394	0.379	0.388	9.70	10.07±0.52
	2	3	0.642	0.638	0.627	0.636	0.65	0.407	0.430	0.417	0.418	10.44	
4	1	3	0.522	0.533	0.488	0.514	0.52	0.397	0.409	0.393	0.400	9.98	10.39±0.58
	2	3	0.687	0.607	0.664	0.653	0.66	0.427	0.444	0.426	0.432	10.79	
6	1	3	0.503	0.523	0.520	0.515	0.52	0.394	0.372	0.397	0.388	9.68	10.10±0.59
	2	3	0.623	0.650	0.617	0.630	0.64	0.419	0.417	0.428	0.421	10.52	
8	1	3	0.564	0.571	0.586	0.574	0.58	0.351	0.399	0.399	0.383	9.56	10.13±0.81
	2	3	0.661	0.674	0.666	0.667	0.68	0.432	0.433	0.421	0.429	10.70	
12	1	3	0.657	0.761	0.609	0.676	0.69	0.338	0.384	0.372	0.365	9.11	9.97±1.22
	2	3	0.631	0.626	0.643	0.633	0.64	0.433	0.443	0.426	0.434	10.84	
16	1	10	0.531	0.559	0.560	0.550	1.86	0.786	0.777	0.783	0.782	9.76	10.06±0.41
	2	10	0.535	0.554	0.555	0.548	1.86	0.860	0.826	0.801	0.829	10.35	
20	1	20	0.315	0.329	0.306	0.317	2.14	0.684	0.710	0.710	0.701	8.76	9.16±0.57
	2	20	0.316	0.333	0.327	0.325	2.20	0.746	0.764	0.789	0.766	9.57	
24	1	20	0.478	0.500	0.493	0.490	3.32	0.666	0.652	0.653	0.657	8.20	8.63±0.61
	2	20	0.440	0.435	0.432	0.436	2.95	0.732	0.717	0.729	0.726	9.06	
28	1	20	0.684	0.699	0.691	0.691	4.68	0.513	0.513	0.508	0.511	6.38	7.34±1.35
	2	20	0.593	0.553	0.556	0.567	3.84	0.678	0.675	0.639	0.664	8.29	

ตารางที่ 26 น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลรีวิซ (กรัมต่อลิตร) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ จากการเพาะเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37±4 องศาเซลเซียส อัตราการกลั่น 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 44 ชั่วโมง (ต่อ)

ชั่วโมง	ชั่วโมง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร		เซลล์แห้ง (g/L)	ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร					ปริมาณน้ำตาลรีวิซ (g/L)	ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		1	2			3	1	2	3	เฉลี่ย		
32	1	20	0.815	0.814	5.55±0.02	5	0.472	0.483	0.463	0.473	5.90	6.84±1.33
	2	20	0.831	0.812		5.57	5	0.626	0.611	0.634		
37	1	40	0.459	0.470	6.69±0.57	2	0.976	0.951	0.940	0.956	4.77	5.49±1.02
	2	40	0.526	0.534		7.09	5	0.505	0.499	0.490		
40	1	40	0.486	0.491	7.26±0.88	2	0.907	0.915	0.923	0.915	4.57	4.96±0.56
	2	40	0.583	0.588		7.88	5	0.432	0.427	0.428		
44	1	40	0.482	0.508	7.64±1.33	2	0.858	0.828	0.852	0.846	4.22	4.39±0.23
	2	40	0.625	0.628		8.58	2	0.915	0.918	0.904		



ตารางที่ 27 ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และปริมาณ PHB สะสม (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ จากการศึกษาเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37±4 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 44 ชั่วโมง

ชั่วโมง	ชั่วโมง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร				ปริมาณ PHB (g/L)	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	%PHB content	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		เจือจาง	1	2	3				
0	1	2	0.125	0.112	0.125	0.121	0.004	0.71	0.58±0.18
	2	2	0.010	0.075	0.189	0.091	0.003	0.45	
4	1	2	0.200	0.103	0.139	0.147	0.005	0.86	0.64±0.28
	2	2	0.147	0.069	0.084	0.100	0.003	0.46	
8	1	4	0.061	0.076	0.080	0.072	0.004	0.76	0.67±0.12
	2	4	0.067	0.059	0.071	0.066	0.004	0.59	
12	1	4	0.103	0.027	0.067	0.066	0.004	0.59	0.60±0.03
	2	4	0.065	0.062	0.070	0.066	0.004	0.63	
16	1	4	0.259	0.246	0.189	0.231	0.014	0.76	0.79±0.05
	2	4	0.254	0.258	0.239	0.250	0.015	0.83	
20	1	4	0.607	0.499	0.573	0.560	0.034	1.60	1.91±0.44
	2	4	0.804	0.786	0.802	0.797	0.049	2.22	
24	1	40	0.197	0.199	0.171	0.189	0.116	3.48	2.98±0.76
	2	40	0.137	0.106	0.106	0.116	0.071	2.41	

ตารางที่ 27 ปริมาณ PHB (กรัมต่อลิตร) และปริมาณ PHB สะสม (ร้อยละของน้ำหนักเซลล์แห้ง) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ จากการศึกษาเลี้ยง *R. eutropha* NCIMB 11599 ที่อุณหภูมิ 37±4 องศาเซลเซียส อัตราการรวม 150 รอบต่อนาที่ อัตราการให้อากาศ 1 vvm เป็นเวลา 44 ชั่วโมง (ต่อ)

ชั่วโมง	ซ้ำ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร				ปริมาณ PHB (g/L)	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	%PHB content	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		เจือจาง	1	2	3				
28	1	80	0.296	0.282	0.207	0.262	0.320	6.84	8.44±2.51
	2	80	0.313	0.339	0.326	0.326	0.399	10.39	
32	1	120	0.641	0.657	0.672	0.657	1.206	21.77	21.99±0.30
	2	200	0.399	0.406	0.406	0.404	1.235	22.20	
37	1	100	0.826	0.792	0.753	0.790	1.209	19.25	18.35±1.20
	2	280	0.293	0.290	0.289	0.291	1.245	17.56	
40	1	200	0.377	0.389	0.377	0.381	1.166	17.57	16.58±1.29
	2	160	0.505	0.506	0.509	0.507	1.240	15.74	
44	1	160	0.320	0.321	0.308	0.316	0.774	11.55	11.52±0.04
	2	80	0.804	0.805	0.809	0.806	0.987	11.50	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวนภััสสรณ์ วิทิตสุวรรณกุล
วัน เดือน ปี เกิด	3 มกราคม 2537
สถานที่เกิด	สระบุรี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2554 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาปลายจากโรงเรียนราชินี จังหวัดกรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2558 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ (เกียรตินิยมอันดับสอง) คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม พ.ศ. 2559 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	58 หมู่ที่ 1 ตำบลตลิ่งชัน อำเภอเมือง จังหวัดสระบุรี 18000
ผลงานตีพิมพ์	1. Wititsuwankul, N. and Jaturapiree, P. (2018). Pretreatment of water hyacinth ("Eichhornia crassipes" (Mart.) Solms) for biodegradable polyhydroxybutyrate (PHB) production. The 2018 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2018). Hat Yai, Songkhla, Thailand. February 7-9, 2018. NP74-NP77. (Poster presentation and Proceeding) 2. Wititsuwankul, N. and Jaturapiree, P. (2019). Production of Bioplastics (Polyhydroxybutyrate) using Water Hyacinth Hydrolysate as Carbon Source. The 1st Thailand Biorefinery Conference. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand. July 25-26, 2019. 47-52. (Poster presentation and Proceeding) 3. Wititsuwankul, N. and Jaturapiree, P. (2021). Optimization and characterization of polyhydroxybutyrate using water hyacinth hydrolysate as carbon source. IOP Conference Series:

Materials Science and Engineering (MSE) (Submitted manuscript).

