การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดพอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 ด้วยคลอโรฟอร์มและโซเดียมไฮโพคลอไรต์

Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) extraction from *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 by chloroform and sodium hypochlorite

อภิรนันทน์ ปัจวิทย์[1] ชนิกา ชื่นแสงจันทร์[1] ณัฐวุฒิ คงกล่อม[1] จารุวรรณ มารุจกล้า[1]และ สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล[1]

Apiranun Patjawit[1] Chaniga Chuensangjun[1] Nuttawut Kongklom[1] Jaruwan Marudkla[1] and Sarote Sirisansaneeyakul[1]

บทคัดย่อ

พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ พีเอชบี เป็นพลาสติกชีวภาพชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจนำมาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์จากกระบวนการทางปิโตรเคมี พีเอชบีผลิตได้จากแบคทีเรีย *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 ซึ่งสร้างและสะสมพีเอชบีไว้ภายในเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. eutrophus* DSM 545 แบบเบ็ดเสร็จ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์ 5.873 กรัมต่อลิตร ผลได้พีเอชบีจากกลูโคส 0.150 กรัมพีเอชบีต่อกรัมกลูโคส ผลได้พีเอชบีจากเซลล์ 0.257 กรัมพีเอชบีต่อกรัมเซลล์ อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ 0.034 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้พีเอชบีสูงสุด 1.335 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 40 ชั่วโมง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพีเอชบีจากเซลล์ของแบคทีเรียด้วยการใช้คลอโรฟอร์มร่วมกับโซเดียมไฮโพคลอไรต์ และออกแบบการทดลองด้วยวิธีทะกุจิ ศึกษาปัจจัย 2 ปัจจัย และกำหนดระดับของปัจจัย 3 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส และเวลาสกัด 60 90 120 นาที พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพีเอชบีด้วยการใช้คลอโรฟอร์มและโซเดียมไฮโพคลอไรต์คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเวลาสกัด 120 นาที ผลได้การสกัดพีเอชบีสูงสุดเท่ากับ 95.38% และอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสกัดพีเอชบีมากกว่าเวลาสกัด ซึ่งสภาวะเหมาะสมที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นวิธีการสกัดพีเอชบีในอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

Abstract

Polyhydroxybutyrate (PHB), a type of bioplastics, has been attracted as an alternative source which is feasible for taking the place of petroleum-based plastics. Generally, PHB is produced as an intracellular product by *Alcaligenes eutrophus* DSM 545. In this study, the batch production of PHB was conducted in the shake flask culture controlled at 30 °C and 250 rpm. The results showed that the cell concentration, yields of PHB on glucose and cell, volumetric productivity of PHB and PHB concentration were maximized at 40 h of cultivation, which were 5.873 g L^{-1}, 0.150 g_{PHB} g_{glu}^{-1}, 0.257 g_{PHB} g_{cell}^{-1}, 0.034 g L^{-1} h^{-1} and 1.335 g L^{-1}, respectively. In addition, the extraction of PHB from *A. eutrophus DSM 545* was studied by using chloroform and sodium hypochlorite. The optimization condition of PHB extraction from dry cells was studied by Taguchi method. The two factors at three levels were chosen (temperature 25 30 and 35 °C and extraction time 60 90 and 120 min). The results showed that the optimal conditions were 30 °C and 120 min of extraction time that provided the maximum PHB recovery at 95.38%. Moreover, it was found that the temperature was the important factor greater than the extraction time. Interestingly, this finding can be possibly to apply in the industrial scale.

Keywords: polyhydroxybutyrate, PHB, *Alcaligenes eutrophus*, chloroform, sodium hypochlorite

e-mail address: **fagissi@ku.ac.th**

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพคณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กรุงเทพฯ 10900

[1] Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900

บทนำ

พลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม นับเป็นทางเลือกใหม่ที่นำมาทดแทนการใช้พลาสติกสังเคราะห์จากกระบวนการทางปิโตรเคมี เนื่องจากกระบวนการเผาไหม้ในการผลิตและการย่อยสลายพลาสติกสังเคราะห์ปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สู่ชั้นบรรยากาศ ก่อให้เกิดภาวะโลกร้อนติดตามมา (Matavulj and Molitoris,1992) แต่พลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้เหล่านี้ เมื่อย่อยสลายหมดแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น น้ำ มวลชีวภาพ ก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ใช้ในการเจริญเติบโตของพืชวัตถุดิบสำหรับการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของวัตถุดิบต่าง ๆ จึงไม่ก่อให้เกิดปัญหาขยะตกค้างที่จะกลายเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อม (Kalia *et al*., 2000) พอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ พีเอชบี (Polyhydroxybutyrate; PHB) จัดเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิด อาทิ *Ralstonia eutrophus* (Brandl *et al*., 1989) *Bacillus megaterium* (Findlay *et al*., 1983) และ *Alcaligenes eutrophus* (Doi *et al*., 1988) โดยแบคทีเรียจะผลิตพีเอชบีเมื่อมีการเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่เหมาะสม คือ ภายใต้สภาวะจำกัดของธาตุอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โพแทสเซียม ออกซิเจน หรือซัลเฟอร์ เป็นต้น (Lefebvre *et al*., 1996) โดยที่ยังคงมีแหล่งอาหารคาร์บอนเหลืออยู่ในขณะเดียวกันพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์สร้างและสะสมขึ้นมาภายในตัวเซลล์นี้จะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำรองของแบคทีเรีย ในปัจจุบันการผลิตพีเอชบีมีต้นทุนการผลิตที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกที่ได้จากกระบวนการทางปิโตรเคมี การใช้แหล่งอาหารของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมและมีราคาถูก หรือเป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากการเกษตรจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการลดต้นทุนการผลิตพีเอชบี นอกจากแหล่งอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แล้วนั้น ในการสกัดและเก็บเกี่ยวเพื่อให้ได้พีเอชบีในปริมาณมากก็เป็นปัจจัยที่สำคัญเช่นกัน เพื่อให้สามารถผลิตพีเอชบีในอุตสาหกรรมที่มีต้นทุนต่ำ ได้ผลผลิตสูงต่อไป

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษากระบวนการสกัดพีเอชบีด้วยการย่อยโดยใช้คลอโรฟอร์มร่วมกับโซเดียมไฮโพคลอไรต์ให้ได้ปริมาณที่สูงพอต่อการนำไปขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพีเอชบีโดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทะกุจิเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพีเอชบีในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การผลิตพีเอชบีด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จระดับฟลาสก์เขย่า

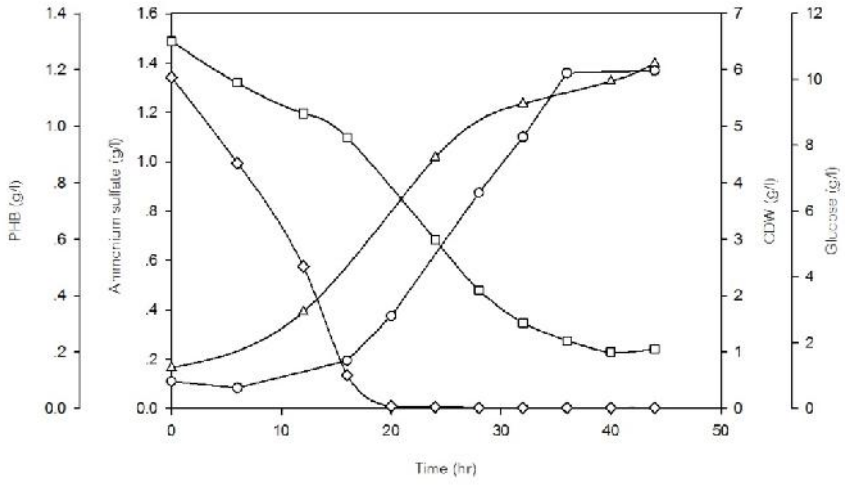
เตรียมกล้าเชื้อโดยขีด (streak) แบคทีเรีย *A. eutrophus* DSM 545 ลงบนอาหาร nutrient agar (NA) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อที่ได้จำนวน 2 ลูป ลงในอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายโอนเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหารสูตรเพาะเลี้ยงปริมาตร 45 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำกล้าเชื้อ *A. eutrophus* DSM 545 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารสูตรผลิตพีเอชบีปริมาตร 225 มิลลิลิตร โดยใช้กลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 10 และ 1.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างตลอดการเพาะเลี้ยง นำมาวิเคราะห์ค่าความขุ่นของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟต ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณพีเอชบี (หยาดฝน, 2542)

การสกัดพีเอชบีจาก *A. eutrophus* DSM 545 ด้วยคลอโรฟอร์มและโซเดียมไฮโพคลอไรต์

ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลต่อสภาวะการสกัดพีเอชบีจากเซลล์แบคทีเรีย *A. eutrophus* DSM 545 ด้วยกระบวนการสกัดด้วยการใช้คลอโรฟอร์มร่วมกับโซเดียมไฮโพคลอไรต์ โดยกำหนดปัจจัยที่ศึกษาตลอดจนออกแบบการทดลองด้วยวิธีทะกุจิเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดพีเอชบี โดยทำการศึกษาปัจจัย 2 ปัจจัย คือ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัด กำหนดระดับของปัจจัย 3 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส และเวลาสกัด 60 90 120 นาที (Table 1) วิธีการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและโซเดียมไฮโพคลอไรต์ ดำเนินการโดยการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยการเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปทำการระเหยแห้ง ในส่วนของการสกัดทำได้โดยผสมเซลล์แห้งที่ได้กับคลอโรฟอร์มและสารละลายเจือจางโซเดียมไฮโพคลอไรต์ในอัตราส่วน เซลล์แห้ง 0.3 กรัม : คลอโรฟอร์ม 50 มิลลิลิตร : สารละลายเจือจางโซเดียมไฮโพคลอไรต์ 4% v/v 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่สภาวะต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 90 และ 120 นาที ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำมาแยกส่วนของเซลล์และสารละลายเจือจางโซเดียมไฮโพคลอไรต์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 4,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดชั้นคลอโรฟอร์มที่มีพีเอชบีละลายอยู่ออกมาและนำไประเหยคลอโรฟอร์มออกด้วยการอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Kshirsagar, 2013) จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักเพื่อหา %recovery ของพีเอชบีที่สกัดได้

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาผลการผลิตพีเอชบีในอาหารสูตรผลิตพีเอชบีด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จในระดับฟลาสก์เขย่า โดยใช้สภาวะในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที พบว่าแบคทีเรีย *A. eutrophus* DSM 545 สามารถใช้กลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการเจริญเติบโต



Glucose (g/l)	PHB_{max} (g/l)	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	Q_P ($gl^{-1}h^{-1}$)	%consumption
9.440 ± 0.774	1.335 ± 0.061	0.150 ± 0.007	0.257 ± 0.017	0.034 ± 0.001	84.58 ± 2.01

Figure 1 Changes of concentrations of glucose (□), ammonium sulfate (◇), PHB (○) and cell dry weight (△) with time course of batch cultivation.

จากการวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย (Figure 1) พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีปริมาณเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง สอดคล้องกับปริมาณกลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตที่ถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงผ่านไป 16 ชั่วโมง พบว่า *A. eutrophus* DSM 545 ได้ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจนหมดแต่ยังมีกลูโคสเหลืออยู่ *A. eutrophus* DSM 545 จึงเข้าสู่ระยะการผลิตพีเอชบี เนื่องจากแบคทีเรียจะมีการสังเคราะห์พีเอชบีเพื่อเป็นแหล่งอาหารและพลังงานสำรอง (Liu *et al*.,1996) โดยเซลล์จะเกิดการสร้างและสะสมพีเอชบีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 20 เป็นต้นไป จนเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ในชั่วโมงที่ 32 จากนั้น *A. eutrophus* DSM 545 สามารถสะสมพีเอชบีสูงขึ้นเรื่อย ๆ และสูงสุดในชั่วโมงที่ 40 ของการเพาะเลี้ยง และพบว่าได้ความเข้มข้นของเซลล์ 5.873 ± 0.270 กรัมต่อลิตร ผลได้พีเอชบีจากกลูโคส ($Y_{P/S}$) 0.150 ± 0.007 กรัมพีเอชบีต่อกรัมกลูโคส ผลได้พีเอชบีจากเซลล์ ($Y_{P/X}$) 0.257 ± 0.017 กรัมพีเอชบีต่อกรัมเซลล์ อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ (Q_P) 0.034 ± 0.001 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้พีเอชบีสูงสุดเท่ากับ 1.335 ± 0.061 กรัมต่อลิตร ที่เวลาในการเพาะเลี้ยง 40 ชั่วโมง

Table1 Experiment design and percentage of recovery of PHB from *A. eutrophu*s DSM 545 using chloroform and sodium hypochlorite extraction.

Experiment	Factor		%recovery	SD	MSD	S/N
	A[1]	B[2]				
1	25	60	34.80	6.10	0.0023261	26.33
2	25	90	52.92	5.26	0.0009149	30.39
3	25	120	59.67	3.10	0.0007208	31.42
4	30	60	80.55	4.81	0.0003938	34.05
5	30	90	92.73	0.71	0.0002900	35.38
6	30	120	93.32	7.13	0.0002799	35.53
7	35	60	65.91	1.32	0.0005787	32.38
8	35	90	94.22	4.62	0.0002863	35.43
9	35	120	93.03	5.96	0.0002839	35.47
		average	74.13	4.33		32.93

[1]A = temperature (^{o}C), and [2]B = time (min), %recovery = (weight of PHB film/ weight of dry cell mass)*100

SD = standard deviation, MSD = Mean Squared Deviation, S/N = Signal to Noise Ratio.

การศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดพอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรตจาก *A. eutrophus* DSM 545 โดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มร่วมกับโซเดียมไฮโพคลอไรต์โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทะกุจิได้การทดลองทั้งหมด 9 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ ให้ผลการทดลองดังตาราง (Table 1) จากการทดลองศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดพีเอชบีด้วยคลอโรฟอร์มกับโซเดียมไฮโพคลอไรต์ได้แก่ อุณหภูมิ และเวลาสกัด พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 25 เป็น 30 องศาเซลเซียส และเพิ่มระยะเวลาในการสกัดแต่ละระดับอุณหภูมิที่ 60 90 และ 120 นาที จะทำให้ %recovery จากการสกัดและเก็บเกี่ยวพีเอชบีมีค่าสูงขึ้น และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะมีค่า %recovery ของพีเอชบีที่สกัดได้

ใกล้เคียงกับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากคลอโรฟอร์มที่มีทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายจะทำงานได้ดีในอุณหภูมิห้อง แต่โซเดียมไฮโพคลอไรต์ที่มีหน้าที่ทำให้เซลล์แตกจะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Gambarini *et al*., 1998)

Table 2 Analysis of effect of factor base on S/N ratio (a) and average (b).

	S/N		average	
level	A[1]	B[2]	A[1]	B[2]
1	29.38	30.92	49.13	60.42
2	34.98	33.73	88.87	79.96
3	34.43	33.39	84.39	82.01
min	29.38	30.92	49.13	60.42
max	34.98	33.73	88.87	79.96
effect	5.60	2.81	39.73	19.54
%effect	66.59	33.41	67.04	32.96

[1]A = temperature (°C), [2] B = time (min).

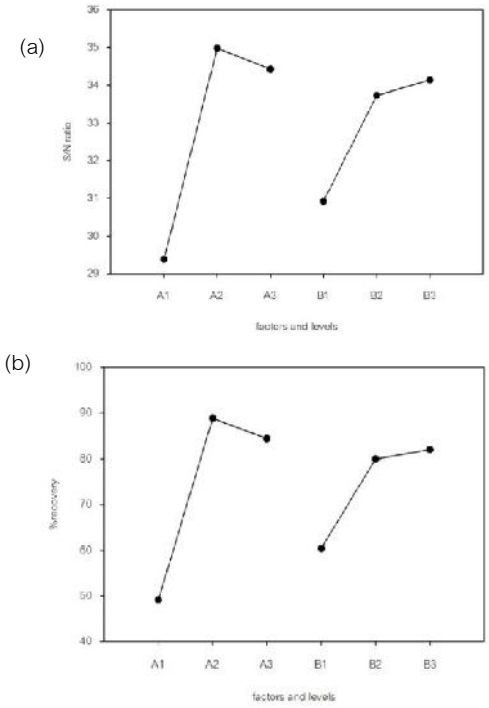


Figure 2 Effect of extraction condition to percentage of recovery of PHB based on (a) S/N ratio and (b) average.

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ ด้วยโปรแกรม Qualitek 4 (Table 2, Figure 2) โดยพิจารณาจากการคำนวณค่าอัตราส่วน S/N และค่าเฉลี่ยพบว่าปัจจัย A คือ อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสกัดพีเอชบีมากกว่าเวลา โดยมีค่าร้อยละอิทธิพลเท่ากับ 66.59% และ 67.04% เมื่อพิจารณาจากอัตราส่วน S/N และค่าเฉลี่ย ตามลำดับ

Table 3 ANOVA table of percentage of recovery of PHB from *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 by chloroform and sodium hypochlorite extraction based on S/N ratio and average.

Factor	DOF (f)	Sum of Sqrs. (S)	Variance (V)	F-ratio (F)	Pure Sum (S')	Percent P (%)	Confidence
S/N ratio							
Temp.	2	54.309	27.154	28.569	52.408	69.81	99.57
Time	2	16.968	8.481	8.923	15.062	20.06	96.65
Other/Error	4	3.801	0.950			10.13	
Total	8	75.075				100.00	
average							
Temp.	2	8524.026	4262.013	133.480	71.800	69.81	100.00
Time	2	2556.372	12278.186	40.031	2492.512	21.15	100.00
Other/Error	22	702.455	31.929			7.05	
Total	26	11,782.855				100.00	

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยพิจารณาจากอัตราส่วน S/N และค่าเฉลี่ย (Table 3) พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสกัดพีเอชบีมากที่สุด ได้แก่ อุณหภูมิ มีอิทธิพลเท่ากับ 69.81% ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัย (Table 2) ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น และมีระดับความเชื่อมั่นต่อ %recovery ของพีเอชบีที่สกัดได้เท่ากับ 99.57 และ 100% เมื่อพิจารณาจากอัตราส่วน S/N และค่าเฉลี่ยตามลำดับ โดยปัจจัยอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการสกัดพีเอชบีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพีเอชบีด้วยคลอโรฟอร์มกับโซเดียมไฮโพคลอไรต์ (Figure 2) โดยหาจากระดับของปัจจัยที่มีค่าอิทธิพลสูงที่สุดในปัจจัยนั้น ๆ ได้สภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ %recovery ของพีเอชบีที่สกัดได้สูงสุดคือ การสกัดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสระยะเวลา 120 นาที นอกจากนี้สามารถคำนวณค่าคาดหวังภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากสมการ $Y_{opt}= T+(A_2-T)+(B_3-T)$ ได้ %recovery ของพีเอชบีที่สกัดได้เท่ากับ 96.75% โดย Y_{opt} T A_2 และ B_3 คือ ค่าคาดหวัง และผลรวมทั้งหมดของค่าเฉลี่ยในทุกชุดการทดลอง ค่าเฉลี่ย %recovery ของชุดการทดลองปัจจัย A ระดับ 2 และค่าเฉลี่ย %recovery ของพีเอชบีที่สกัดได้ของชุดการทดลองปัจจัย B ระดับ 3 ตามลำดับ และเมื่อทำการทดลองยืนยันผลการสกัดพีเอชบีด้วยสภาวะที่เหมาะสมได้ %recovery ของพีเอชบีที่สกัดได้เท่ากับ 95.38 ± 1.18% (Table 4)

Table 4 Optimal condition derive from factors analysis base on S/N ratio and average.

	Optimal condition		%recovery	
	A[1]	B[2]	Expect result	Experiment result
S/N ratio	30	120	40.06	35.63 ± 1.45
average	30	120	96.75	95.38 ± 1.18

[1] A = temperature (°C), [2] B = extraction time (min).

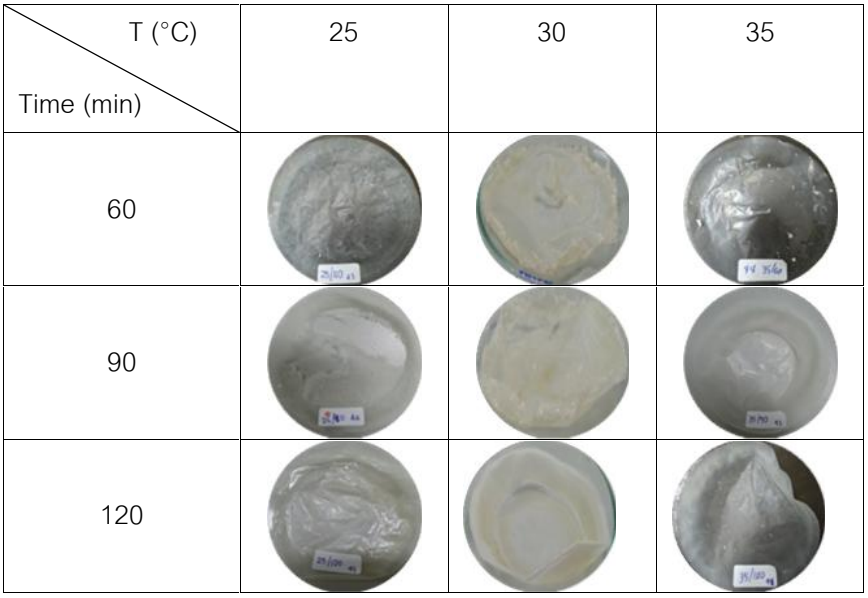


Figure 3 PHB films from each extraction condition.

นอกจากนี้ภายหลังจากการสกัดและระเหยคลอโรฟอร์มออกจากผลิตภัณฑ์พีเอชบีที่สกัดได้พบว่าผลิตภัณฑ์พีเอชบีจะมีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบางสีขาว ขุ่น (Figure 3) จากการสังเกตและสัมผัสพบว่า เมื่อเพิ่มเวลาและอุณหภูมิในการสกัด แผ่นฟิล์มจะมีความเหนียวมากขึ้น โดยลักษณะของแผ่นฟิล์มที่ได้จากการสกัดที่เวลา 60 นาทีและอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะมีความเปราะบางมากกว่าสภาวะการสกัดที่เวลาและอุณหภูมิอื่น ๆ อย่างไรก็ตาม มีรายงานวิจัยอธิบายว่าแบคทีเรียสามารถสะสมพีเอชบีได้มากสุดเพียง 80% ต่อน้ำหนักแห้ง (Bonartsev *et al.*, 2013) ดังนั้นแผ่นฟิล์มที่สกัดได้อาจยังไม่ใช่พีเอชบีบริสุทธิ์เนื่องจากผลได้ของการสกัดที่คำนวณมีค่ามากถึง 90% ต่อน้ำหนักแห้ง ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนของเศษเซลล์หรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ในขั้นตอนของการสกัดทำให้ %recovery ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่าค่าการวิเคราะห์พีเอชบีจากตัวอย่างน้ำหมัก

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย *A. eutrophus* DSM 545 มีความสามารถในการผลิตพีเอชบีโดยให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์คือ 5.873 กรัมต่อลิตร ผลได้พีเอชบีจากกลูโคสคือ 0.150 กรัมพีเอชบีต่อกรัมกลูโคส ผลได้พีเอชบีจากเซลล์คือ 0.257 กรัมพีเอชบีต่อกรัมเซลล์ อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์คือ 0.034 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและพีเอชบีสูงสุดคือ 1.335 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 40 ชั่วโมง และสามารถสกัดพีเอชบีจากเซลล์ได้โดยใช้คลอโรฟอร์มร่วมกับโซเดียมไฮโพคลอไรต์ ที่สภาวะในการสกัดที่เหมาะสมที่สุดคือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเวลาสกัด 120 นาทีโดยให้ผลได้การสกัดพีเอชบีมากที่สุดถึง 95.38 ± 1.18% นอกจากนี้ยังสามารถผลิตแผ่นฟิล์มพีเอชบีจากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและโซเดียมไฮโพคลอไรต์ได้ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษานี้ สามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานในการสกัดพีเอชบี และการประยุกต์ใช้พีเอชบีในอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการหมักภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพคณะอุตสาหกรรมเกษตรและศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านทรัพยากรธรรมชาติเขตร้อน โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่สนับสนุนการวิจัยและบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ประจำปีงบประมาณ 2555

เอกสารอ้างอิง

หยาดฝน มหาทรัพย์ไพบูลย์. 2542. **จลนพลศาสตร์การผลิตพอลิบีตาไฮดรอกซีบิวทิเรตของ *Alcaligenes eutrophus* DSM 545**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Bonartsev, A.P., S.G. Yakovlev, I.I. Zharkova, A.P. Boskhomdzhiev, D.V. Bagrov, V.L. Myshkina, T.K. Makhina, E.P. Kharitonova, O.V. Samsonova, A.V. Feofanov, V.V. Voinova, A.L. Zernov, Y.M. Efremov, G.A. Bonartseva, K.V. Shaitan and M.P. Kirpichnikov. 2013. Cell attachment on poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol) copolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. **BMC Biochem.** 14: 12.

Brandl, H., E.J. Jr. Knee, R.C. Fuller, R.A. Gross and R.W. Lenz. 1989. Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly(β-hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. **Int. J. Biol. Macromol.** 11: 49–55.

Doi, Y., H. Kimura and Y. Yoshida. 1992. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Pseudomonas acidovorans*. **Biotechnol. Lett.** 14(6): 445–450.

Finlay R.H. and D.C. White. 1983. Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 45: 71–78.

Gambarini, G., M. De Luca and R. Gerosa. 1998. Chemical stability of heated sodium hypochlorite endodontic irrigants. **J. Endod.** 24(6): 432–434.

Hahn, S.K., Y.K. Chang, B.S. Kim, K.M Lee and H.N. Chang. 1994. Communication to the editor optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. **Biotechnol. Bioeng.** 44: 256–261.

Kalia, V.C., N. Raizada, V. Sonakya. 2000. Bioplastics. **J. Sci. Ind. Res.** 59: 433–445.

Kshirsagar, P.R., S.O. Kulkarni, S.S. Nilegaonkar, M. Niveditha and P.P. Kanekar. 2013. Kinetics and model building for recovery of polyhydroxyalkanoate (PHA) from *Halomonas campisalis*. **Sep. Purif. Technol.** 103: 151–160.

Liu , W.T., T. Mino, K. Nakamura and T. Matsuo.1996. Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal. **Water. Res.** 30(1): 75–82.

Matavuli, M. and H.P. Molitoris.1992. Fungal degradation of poly-p-hydroxyalkanoates (PHA) and a semiquantitative assay for screening their degradation by terrestrial fungi. **FEMS Microbiol. Rev**. 103: 323–332.