View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Srinakharinwirot University: SWU e-Journals System

บทความวิจัย

การใช้ชานอ้อยและกากน้ำตาลในการผลิตโพลีไฮดรอกซีบิวทีเรตโดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01

วิสันต์ เชื้อวงค์[1] กตัญญู ชูกลิ่น[1] กนกพรรณ อนันต์สกุลชัย[1] ปาณิสรา ลี้เทียน[1]
ศิริขวัญ พลประทีป[2] และ ธิปชัย วัฒนวิจารณ์[3*]

ได้รับบทความ: 4 มิถุนายน 2561
ได้รับบทความแก้ไข: 6 กรกฎาคม 2561
ยอมรับตีพิมพ์: 9 กรกฎาคม 2561

บทคัดย่อ

โพลีไฮดรอกซีบิวทีเรตหรือพีเอชบีเป็นเทอร์โมพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพจัดอยู่ในกลุ่มของโพลีเอสเตอร์ พีเอชบีจะถูกผลิตและสะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ในสภาวะเครียดเพื่อเป็นพลังงานสำรอง ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพีเอชบีได้คือ *Bacillus* sp. SWU01 จากกากตะกอนน้ำเสียโรงงานปลาทูน่ากระป๋อง ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะผลิตพีเอชบีโดยใช้ชานอ้อยและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพีเอชบีด้วย *Bacillus* sp. SWU01 ในการใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนมีการศึกษาปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยสภาวะกรดหรือเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อให้ได้น้ำตาล ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.45 FPU/mL เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ปริมาณน้ำตาลสูง การผลิตพีเอชบีโดยใช้อาหารดัดแปลง M9 ที่เสริมด้วยน้ำตาลจากชานอ้อยหรือกากน้ำตาลโดย *Bacillus* sp. SWU01 พบว่าการใช้น้ำตาลจากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่ 48 ชั่วโมง ให้ผลผลิตพีเอชบีสูงสุดคือ 2.01 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 60.54 เปอร์เซนต์ต่อน้ำหนักแห้ง การระบุหมู่ฟังก์ชันและมอนอเมอร์ของพอลิเมอร์ด้วย Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) ^{1}H-Nuclear magnetic resonance spectroscopy และ differential scanning calorimetry technique (DSC) พบว่าพอลิเมอร์ที่ที่สกัดจากแบคทีเรียคือพีเอชบี จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp. SWU01 มีศักยภาพที่จะเป็นผู้ผลิตพีเอชบีที่มีประสิทธิภาพจากของเสียชีวภาพ

คำสำคัญ: โพลีไฮดรอกซีบิวทีเรต กากน้ำตาล น้ำตาลรีดิวซ์ ชานอ้อย *Bacillus* sp.

[1]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ
[3]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: tipachai.v@kmitl.ac.th

Utilization of Bagasse and Molasses for Polyhydroxybutyrate Production by *Bacillus* sp. SWU01

Wisan Chuavong[1], Katanyoo Chuklin[1], Kanokpan Anansakulchai[1], Panisara Leetian[1], Sirikwan Ponprateep[2], Tipachai Vatanavicharn[3*]

Received: 4 June 2018
Revised: 6 July 2018
Accepted: 9 July 2018

ABSTRACT

Polyhydroxybutyrate (PHB) is natural biodegradable thermoplastic belonging to the polyesters class. In physiological stress, PHB was produced and accumulated in intracellular granules of microorganisms as energy reserves in stress condition. Previously, we isolated the PHB producing bacteria, *Bacillus* sp. SWU01 from canned tuna wastewater. This research aimed to produce the PHB using bagasse and molasses as a carbon source by *Bacillus* sp. SWU01. To produce the PHB using bagasse, hydrolysis reaction was performed by cellulase or acid condition to get the reducing sugar. The results showed that enzymatic hydrolysis at the concentration of 0.45 FPU/mL for 48 h increased high content of reducing sugar. The PHB production using modified M9 medium, supplemented with reducing sugar from bagasse or molasses, by *Bacillus* sp. SWU01 was investigated. The highest PHB production of 2.01 g/L and PHB content constituted up to 60.54% of dry cell mass was obtained by reducing sugar from bagasse as carbon source at 48 h. To characterize functional group and monomer of polymer, the Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), 1H- Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and differential scanning calorimetry technique (DSC) revealed that the polymer extracted from the bacterial stain was PHB. These results suggested that *Bacillus* sp. strain SWU01 had potential to be the efficient PHB producer from biowaste.

Keywords: Polyhydroxybutyrate, Sugarcane molasses, Reducing sugar, Bagasse, *Bacillus* sp.

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok
[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok
[3]Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology, Ladkrabang Bangkok
[*]Corresponding author, email: tipachai.va@kmitl.ac.th

บทนำ

พลาสติก (plastics) เป็นวัสดุที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากพลาสติกมีความทนทาน สามารถขึ้นรูปได้ง่าย ปัจจุบันพลาสติกกว่า 80% มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี โดยพลาสติกประเภทนี้ไม่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติก่อให้เกิดปัญหาขยะและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม [1] นอกจากคุณสมบัติที่ทนทานของพลาสติกสังเคราะห์แล้ว พฤติกรรมการใช้ผลิตภัณฑ์จากพลาสติกอย่างฟุ่มเฟือยของมนุษย์ยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ปัญหาขยะจากพลาสติกเพิ่มมากขึ้น [2] จากปัญหานี้ พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติหรือพลาสติกชีวภาพจึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการนำมาใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์

โพลีไฮดรอกซีบิวทีเรตหรือพีเอชบี จัดเป็นเทอร์โมพลาสติกที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ชนิดพอลิโพรพิลีนที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี แต่มีข้อดีคือสามารถผลิตจากแหล่งพลังงานหมุนเวียนและย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ [3] แบคทีเรียจะมีการสะสมพีเอชบีอยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรียในสภาวะเครียด เช่น สารอาหารไม่สมดุลและมีคาร์บอนมากเกินพอ [4] กระบวนการสังเคราะห์พีเอชบีภายในเซลล์จะเริ่มจากแบคทีเรียเปลี่ยนสารตัวกลาง acetyl-CoA ผ่านวัฏจักรไกลโคไลซิสและเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์พีเอชบี ซึ่งถูกควบคุมโดยชุดยีน ได้แก่ ยีน *phaA* ยีน *phaB* และยีน *phaC* ซึ่งยีน *phaA* จะผลิตเอนไซม์ β-ketotiolase เพื่อเปลี่ยน acetyl-CoA ให้เป็น acetoacetyl-CoA จากนั้นเอนไซม์ Acetoacethyl-CoA reductase ซึ่งถูกสังเคราะห์จากยีน *phaB* จะเปลี่ยน acetoacetyl-CoA ให้อยู่ในรูป 3-hydroxybutyryl-CoA และเอนไซม์ PHB synthase ที่ควบคุมโดยยีน *phaC* ทำหน้าที่สร้างสายพอลิเมอร์พีเอชบี และสะสมอยู่ภายในเซลล์ในลักษณะแกรนูล [5] โดยพีเอชบีคือพอลิเมอร์ชีวภาพตามธรรมชาติ (natural biopolymers) อยู่ในกลุ่มของโพลีเอสเตอร์ จัดเป็น short chain length PHAs (scl-PHA) มีจำนวนคาร์บอน 4-5 อะตอม ประกอบด้วยมอนอเมอร์เพียงหนึ่งชนิด (homopolymer) คุณสมบัติทั่วไปของพีเอชบีคือ ไม่ละลายน้ำ มีจุดหลอมเหลวสูง จัดเป็นเทอร์โมพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ด้วยแบคทีเรียและมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีนซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์สามารถนำไปใช้ในการผลิตและขึ้นรูปเป็นบรรจุภัณฑ์ต่างๆ เช่น แคปซูลบรรจุยา ทำเป็นแผ่นฟิล์ม เป็นต้น [6]

อย่างไรก็ตาม การผลิตพีเอชบีในแบคทีเรียมีต้นทุนการผลิตสูง โดยประมาณ 40% ของต้นทุนคิดเป็นวัตถุดิบและแหล่งคาร์บอนทำให้การหาวัตถุดิบใหม่ๆ หรือแหล่งคาร์บอนราคาถูกเพื่อลดต้นทุนจึงมีความสำคัญมาก [7] จากงานวิจัยที่ผ่านมามีการนำแหล่งคาร์บอนราคาถูกชนิดอื่นๆ นำมาใช้เพื่อลดต้นทุนในการผลิต เช่น การใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพีเอชบี จาก *Bacillus megaterium* [8] และ *Pseudomonas aeruginosa* [9] การใช้เศษวัสดุทางการเกษตร เช่น การใช้กากจากผลปาล์มที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้ว [10] และชานอ้อย [11] โดยผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพีเอชบีได้

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการผลิตพีเอชบีจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 ซึ่งแยกจากกากตะกอนโรงงานปลาทูน่ากระป๋องโดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งได้จากการย่อยชานอ้อยและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นทำการสกัดพีเอชบีเพื่อระบุหมู่ฟังก์ชันเปรียบเทียบกับพีเอชบีมาตรฐานด้วย Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) และคุณสมบัติด้านอุณหภูมิของพอลิเมอร์ด้วยเทคนิค Differential scanning calorimetry (DSC)

วิธีการทดลอง

1. การปรับสภาพชานอ้อยด้วยเบส

นำกากชานอ้อย (ได้รับการอนุเคราะห์จากร้านขายน้ำอ้อย ลาดกระบัง ประเทศไทย) มาทำการล้างด้วยน้ำแล้วอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่น หลังจากนั้นนำชานอ้อยมาปรับสภาพด้วยเบสเพื่อกำจัดลิกนินโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่เข้มข้น 0.25 โมลาร์ ในอัตราส่วนชานอ้อย 1 กรัม ต่อ NaOH 20 มิลลิลิตร [8] และนำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองโดยเก็บส่วนกากชานอ้อยมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งวัดค่า pH ของน้ำได้เท่ากับ pH 7 นำชานอ้อยที่ปรับสภาพ pH แล้วไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เก็บในเดซิเคเตอร์เพื่อใช้ศึกษาไฮโดรไลซิสด้วยกรดและเอนไซม์

2. การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรด

นำชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสแล้วมาไฮโดรไลซิสกรดตามวิธีของ Pattana และคณะ [12] เติม 1% H_2SO_4 โดยปริมาตร ในอัตราส่วนชานอ้อย 1 กรัม ต่อ H_2SO_4 15 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยปั่นกวนขณะให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ปิดด้วยกระจกนาฬิกาเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง (เติมน้ำกลั่นเมื่อปริมาณน้ำลดลงจากเดิม) นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000x*g* เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสมาปรับ pH ด้วย 2 โมลาร์ NaOH จนกระทั่ง pH เท่ากับ 7 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) [13] โดยการปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลตร ใส่หลอดทดลองส่วนหลอดควบคุม (blank) จะใช้น้ำกลั่นแทนจากนั้นเติม 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส 5 นาที หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm เทียบกับกราฟกลูโคสมาตรฐาน

3. การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสชานอ้อย ได้แก่ เวลาในการบ่ม ปริมาณของเอนไซม์และขนาดอนุภาคของชานอ้อย โดยนำชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมา 2.5 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ) ความเข้มข้น 22.42 filter paper cellulase units (FPU) ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เซลลูเลสเป็น 0.22 FPU/mL) และเติมโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องบ่มแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที โดยทำการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส ดังนี้คือ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองด้วยเครื่องกรองลดความดันเพื่อเอากากส่วนที่เป็นชานอ้อยออก แล้วนำเอาส่วนใสไปวัดปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี DNS

การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์เซลลูเลสในการไฮโดรไลซิสชานอ้อย โดยทำการทดลองตามวิธีข้อ 3 แต่ปรับความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส โดยเพิ่มความเข้มข้นแบบอนุกรม (2-fold serial) ที่ความเข้มข้น 0.11, 0.22, 0.45, และ 0.90 FPU/mL เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี DNS

การศึกษาผลของขนาดอนุภาคชานอ้อยต่อการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ในการเตรียมชานอ้อยแบบบดหยาบทำคือนำชานอ้อยเข้าเครื่องบดแบบบดหยาบโดยอนุภาคชานอ้อยที่ได้มีขนาด 10 มิลลิเมตร และแบบบดละเอียดจะนำชานอ้อยที่บดหยาบมาเข้าเครื่องบดละเอียดอีกครั้งอนุภาคชานอ้อยที่ได้ขนาด 0.25 มิลลิเมตร จากนั้นนำชานอ้อยที่ได้มาปรับสภาพด้วย NaOH ทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ความเข้มข้น 0.45 FPU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที แล้วนำไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

4. การผลิตพีเอชบีโดยใช้น้ำตาลรีดิวส์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยและกากน้ำตาลจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01

4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและแหล่งคาร์บอนในการผลิตPHB

เตรียมอาหารสำหรับผลิตพีเอชบี modified M9 (ประกอบด้วย $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 64 กรัม, KH_2PO_4 15 กรัม NaCl 2.5 กรัม, NH_4Cl 5 กรัม, $MgSO_4$ 0.24 กรัม, $CaCl_2$ 0.01 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร) โดย $MgSO_4$ และ $CaCl_2$ ต้องฆ่าเชื้อแยก และอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเหลว Nutrient broth (NB) (ประกอบด้วย yeast extract 3 กรัม, peptone 5 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สำหรับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยชานอ้อยและกากน้ำตาล โดยนำอาหารสำหรับผลิตพีเอชบี modified M9 ผสมกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยชานอ้อยโดยทำการเจือจางที่ความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของน้ำตาลรีดิวซ์สำหรับกากน้ำตาลที่นำมาใช้มีความเข้มข้น 77% (v/v) นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 40% (v/v) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000×*g* จากนั้นนำแหล่งคาร์บอนที่เตรียมไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ modified M9 โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2% (v/v)

4.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียและการผลิตพีเอชบี

ทำการเตรียมหัวเชื้อโดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB 50 มิลลิลิตร เขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นวัดการเจริญของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นปิเปตเชื้อแบคทีเรีย (ประมาณ 10% inoculum) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified M9 ปริมาตร 250 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ที่มีกากน้ำตาลหรือน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยกำหนดให้ความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียคือ 0.5 (OD_{600} = 0.5) จากนั้นเขย่าเชื้อที่ 250 รอบต่อนาทีที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บเซลล์ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งและพีเอชบี

4.3 การหาน้ำหนักเซลล์แห้งจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01

นำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตัวอย่างละ 30 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000×*g* เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ละลายในน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร แล้วปิเปตแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000×*g* เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสและล้างซ้ำอีกรอบด้วยน้ำกลั่น นำตะกอนเซลล์ที่ได้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ แล้วบันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell Dry Weight)

4.4 การสกัดพีเอชบี

นำตัวอย่างเชื้อที่เก็บจากการเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มาอย่างละ 30 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000×*g* เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000×*g* เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วปิเปตแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด จากนั้นสกัดพีเอชบีโดยดัดแปลงวิธีการสกัดของ Hahn และคณะ [14] โดยเติมโซเดียมไฮโปคลอไรต์เข้มข้น 10% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000×*g* เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใสล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น อะซิโตน และ 95% เอทานอล อย่างละ1 มิลลิลิตร ตามลำดับ และอบตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนังคงที่ จากนั้นนำตะกอนที่สกัดได้ชั่งเพื่อหาน้ำหนักพีเอชบี

5. การตรวจสอบโครงสร้างและวิเคราะห์คุณสมบัติของพีเอชบี

ตรวจสอบหมู่ฟังค์ชันภายในโมเลกุลของพีเอชบีด้วยเครื่อง Fourier-transform infrared spectroscopy ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น SPECTRUM GX FTIR System เพื่อเปรียบเทียบหมู่ฟังก์ชันของพีเอชบีที่ผลิตได้กับพีเอชบีมาตรฐาน (Sigma) ตรวจสอบโครงสร้างของโมโนเมอร์จากตำแหน่งไฮโดรเจนภายในโมเลกุลด้วยเครื่อง Bruker Avance II 300 MHz Ultrashield™ ^{2}H-stop (46.072 MHz) NMR spectrometer และศึกษาคุณสมบัติของพีเอชบีจากการวัดค่าพลังงานความร้อนของพอลิเมอร์ด้วยเครื่อง Different Scanning Calorimetry (DSC) ยี่ห้อ NETZSCH รุ่น 204 F1 Phoenix® ให้ความร้อน 50-200 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

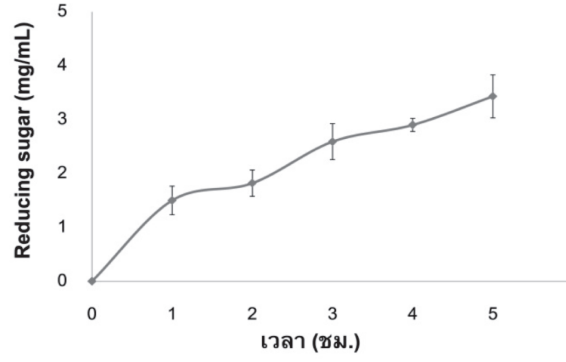
นำข้อมูลน้ำหนักแห้งและพีเอชบีมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences) วิเคราะห์ด้วย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการวิจัย

1. การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรด

จากการทดลองไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริกพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 ถึงชั่วโมงที่ 5 มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ดังรูปที่ 1 และพบว่าชั่วโมงที่ 5 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด คือ 3.43 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตาม ในการเตรียมอาหารสำหรับผลิตพีเอชบีต้องการปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดนั้นไม่เพียง

พอสำหรับนำมาใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นกรดที่ใช้ไม่มากพอหรือเวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยเกินไป ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนวิธีการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

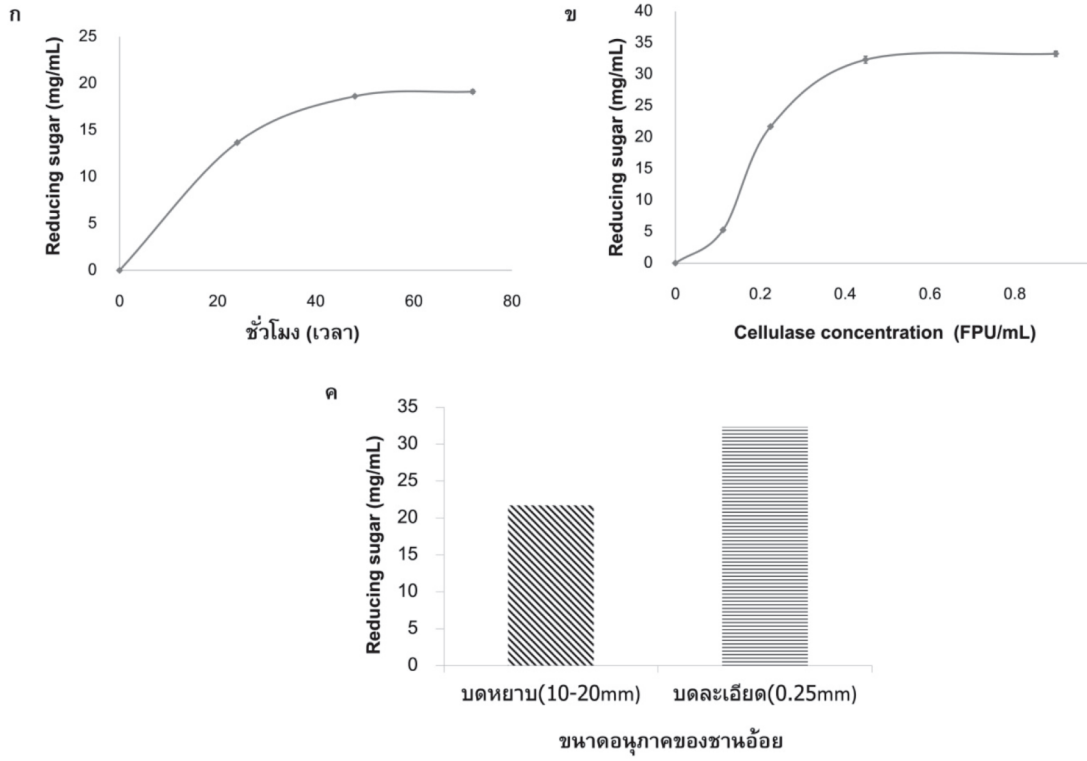


รูปที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก

2. การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ในการทดลองนี้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ เวลาและความเข้มข้นของเอนไซม์ โดยนำสารละลายที่ผ่านการไฮโดรไลซิสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากผลการทดลองพบว่า การไฮโดรไลซิสชานอ้อยโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส 0.22 FPU/mL บ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 13.67, 18.63 และ 19.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 2ก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการบ่มเอนไซม์เซลลูเลสกับชานอ้อยที่ 24 และ 48 ชั่วโมง มีอัตราการไฮโดรไลซิสสูง และลดต่ำลงที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นน้อยมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกการไฮโดรไลซิสที่เวลา 48 ชั่วโมง ในการบ่มระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับชานอ้อยในการทดลองถัดไป โดยเอนไซม์เซลลูเลสที่ทดสอบมีความเข้มข้น 0.11, 0.22, 0.45, และ 0.90 FPU/mL ดังแสดงในรูปที่ 2ข พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสในช่วง 0.11-0.45 FPU/mL มีการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์อย่างมากและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มคงที่ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 0.90 FPU/mL ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ ที่ 0.45 FPU/mL สามารถไฮโดรไลซิสชานอ้อยและได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถึง 32.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้น 0.45 FPU/mL เนื่องจากได้ปริมาณน้ำตาลเพียงพอต่อการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

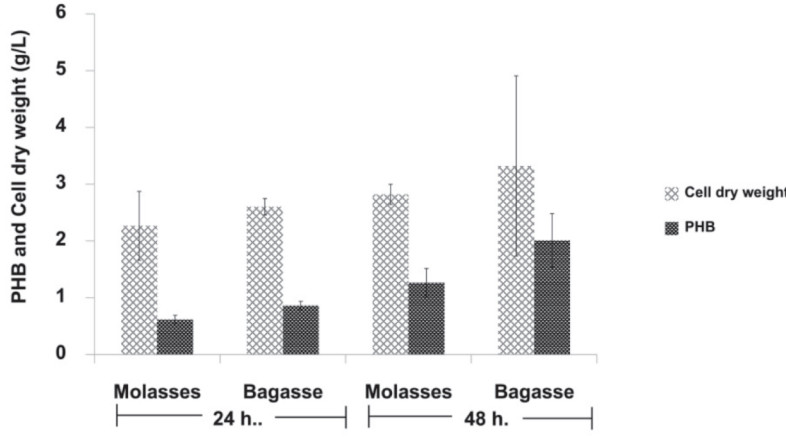
นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาผลของอนุภาคชานอ้อยต่อการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบขนาดอนุภาคแบบบดหยาบและบดละเอียด จากผลการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของการไฮโดรไลซิสชานอ้อยแบบละเอียดจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 32.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าการไฮโดรไลซิสชานอ้อยแบบหยาบ ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 21.71 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ก.เวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 0.45 FPU/mL ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ข.ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมโดยความเข้มข้นเท่ากับ0.11, 0.22, 0.45, และ 0.90 FPU/mL ในการไฮโดรไลซิสชานอ้อยที่ 48 ชั่วโมง ค.ผลของขนาดอนุภาคแบบหยาบและแบบละเอียดของชานอ้อยในการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 0.45 FPU/mL

3. การผลิตพีเอชบีโดยใช้น้ำตาลรีดิวส์และกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

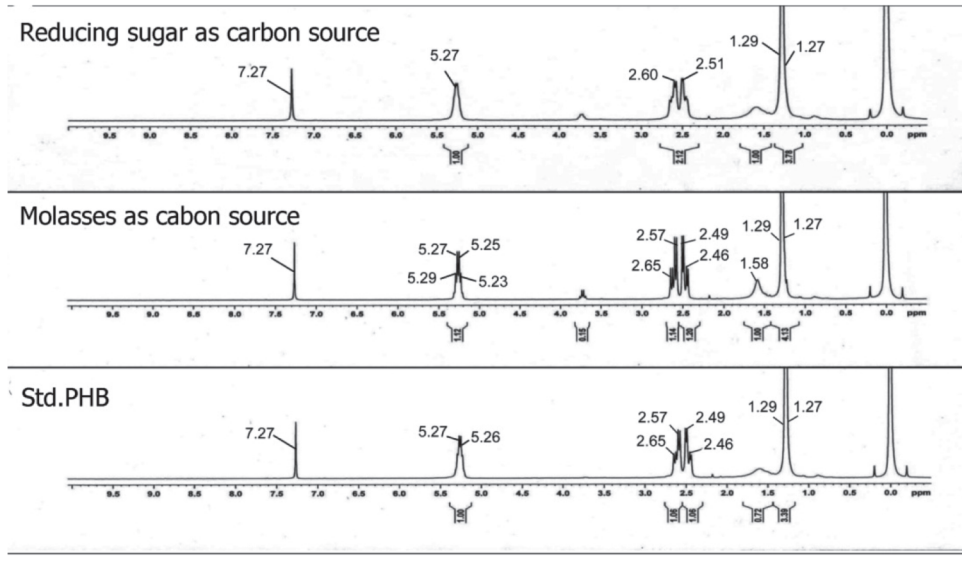
ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบการผลิตพีเอชบีของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 ในอาหาร modified M9 ที่มีกากน้ำตาลและน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งได้จากการไฮโดรไลซิสชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 3 พบว่าที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตได้ทั้งในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์และกากน้ำตาลซึ่งการเจริญเติบโตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับปริมาณพีเอชบีที่สกัดได้พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง แบคทีเรียสามารถผลิตพีเอชบีจากน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยได้มากกว่ากากน้ำตาล ซึ่งได้ปริมาณพีเอชบีเท่ากับ 2.01 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 60.54% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยแตกต่างจากช่วงเวลาอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



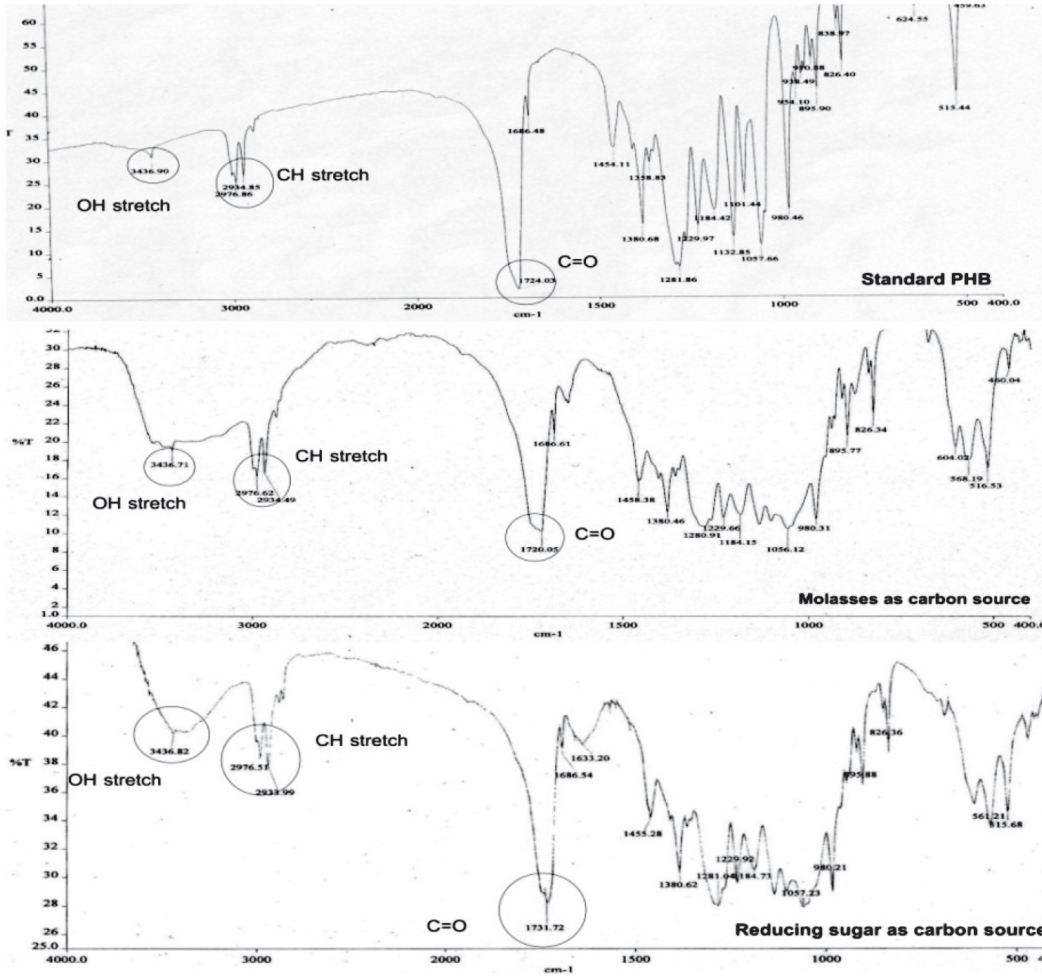
รูปที่ 3 การผลิตพีเอชบีของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU 01 ในอาหาร modified M9 โดยใช้กากน้ำตาลหรือน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

4. การระบุโครงสร้างของพีเอชบีจากหมู่ฟังค์ชันด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) และจากตำแหน่งของไฮโดรเจนภายในโมเลกุลด้วยเทคนิค ^{1}H- Nuclear magnetic resonance spectroscopy

นำเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 มาทำการสกัดพีเอชบีโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรด์ พบตะกอนของแข็งสีขาว หลังจากการอบแล้วนำไปตรวจสอบลักษณะของโมโนเมอร์จากไฮโดรเจนด้วยเครื่อง NMR พบว่าลักษณะพีคของสัญญาณโปรตอน (proton signals peak) และค่า chemical shift ที่แสดงดังรูปที่ 4 คล้ายกับพีเอชบีมาตรฐาน จากนั้นทดสอบด้วยการหาหมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่อง FTIR และเปรียบเทียบลักษณะพีคของหมู่ฟังก์ชันกับพีเอชบีมาตรฐาน พบหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญในพีเอชบีได้แก่ C=O ของหมู่คาร์บอนิล 1735-1730 cm^{-1}, OH stretch 3300-2500 cm^{-1} และ CH stretch 3000-2840 cm^{-1} แสดงดังรูปที่ 5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตะกอนขาวที่ผลิตได้จากอาหาร modified M9 โดยใช้กากน้ำตาลหรือน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 เป็นพีเอชบี โดยพีเอชบีที่สกัดได้จากทั้งสองแหล่งมีโครงสร้างเหมือนกับพีเอชบีมาตรฐาน



รูปที่ 4 ^{1}H-NMR-Spectra ของพีเอชบีมาตรฐานและพีเอชบีที่สกัดจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 โดยใช้กากน้ำตาลหรือน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 5 FTIR-Spectra ของพีเอชบีมาตรฐานและพีเอชบีที่สกัดจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 โดยใช้กากน้ำตาลหรือน้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

5. ศึกษาคุณสมบัติของพีเอชบีจากการวัดค่าพลังงานความร้อนของพอลิเมอร์ด้วยเครื่อง Different Scanning Calorimetry (DSC)

ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของพีเอชบีโดยการวัดค่าพลังงานความร้อนที่เปลี่ยนแปลงของพอลิเมอร์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 โดยเปรียบเทียบกับพีเอชบีมาตรฐาน (ตารางที่ 1) ซึ่งแสดงค่าอุณหภูมิการหลอมเหลวของวัสดุ (melting temperature หรือ Tm) อุณหภูมิการเกิดผลึกของวัสดุ (crystallization temperature หรือ Tc), ปริมาณผลึกของวัสดุพอลิเมอร์ (% crystallinity) จากผลการทดสอบพบว่าพีเอชบีที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพีเอชบีมาตรฐาน ยกเว้นปริมาณผลึกของพอลิเมอร์ที่มีความแตกต่างโดยพีเอชบีที่สกัดจากแบคทีเรียมีความเป็นผลึกต่ำกว่า

ตารางที่ 1 คุณสมบัติด้านอุณหภูมิของพีเอชบีที่สกัดจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SWU01

Carbon source	T_m(°C)	T_c(°C)	ΔH J/g	% Crystallinity
Standard PHB	178.18	88.00	68.30	100.00
Reducing sugar from bagasse	165.51	99.59	33.25	48.68
Molasses	172.37	98.43	19.05	27.90

T_m: melting temperature, T_c: crystalization temperature ΔH; melting enthalpy of sample

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

แบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 เป็นแบคทีเรียที่คณะผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกได้จากกากตะกอนน้ำเสียจากโรงงานปลาทูน่าในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (submitted) ซึ่งพบว่าสามารถผลิตและสะสมพีเอชบีอยู่ภายในแกรนูลในเซลล์ โดยแบคทีเรียสามารถผลิตพีเอชบีได้โดยใช้แหล่งคาร์บอน เช่น โซเดียมอะซิเตท กลูโคส กลีเซอรอล เป็นต้น อย่างไรก็ตามแหล่งคาร์บอนดังกล่าวมีต้นทุนในการผลิตสูงเมื่อเปรียบเทียบกับชีวมวลหรือของเสียจากอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการนำมาผลิตพลาสติกชีวภาพเพื่อลดต้นทุนในการผลิต กากชานอ้อยที่ใช้ในการทดลองนี้ได้มาจากร้านผลิตน้ำอ้อย (ลาดกระบัง) ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำอ้อย และเป็นชีวมวลประเภทหนึ่ง ประกอบด้วย เซลลูโลสเป็นหลัก อย่างไรก็ตามการนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย จำเป็นต้องถูกไฮโดรไลซิสเพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบใน 2 สภาวะ คือ ไฮโดรไลซิสด้วยกรดและเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าการไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยกรดให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่าการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตาม การสรุปว่าวิธีการใดดีกว่าเป็นเรื่องยากโดยแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียที่ต่างกัน การไฮโดรไลซิสด้วยกรดต้องทำในสภาวะที่รุนแรงแต่ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยกว่าการใช้เอนไซม์ ส่วนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์แม้จะใช้เวลานาน และไม่ต้องทำปฏิกิริยาในสภาวะรุนแรงหรือที่อุณหภูมิสูงแต่ใช้ระยะเวลาที่นาน และค่าใช้จ่ายเรื่องเอนไซม์ก็เป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงด้วย จากผลการทดลองพบว่าการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงกว่า ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้การไฮโดรไลซิสชานอ้อยด้วยเอนไซม์เซลลูโลสมาใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 เพื่อใช้ในการผลิตพีเอชบี

การศึกษาการผลิตพีเอชบีของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 จากแหล่งคาร์บอน 2 ชนิดได้แก่ น้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยและกากน้ำตาล พบว่าแบคทีเรียสามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 2 ชนิดในการเจริญเติบโตและการสะสมพีเอชบี ในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างกัน แต่ปริมาณการสะสมพีเอชบีในแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแหล่งคาร์บอน พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เป็นแหล่งคาร์บอน มีการสะสมพีเอชบีในแบคทีเรียมากกว่ากากน้ำตาล โดยน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ง่ายกว่าเนื่องจากเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่การใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากชานอ้อยต้องผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานาน ใน

ขณะที่กากน้ำตาลมีน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่และมีสารประกอบอื่นๆ เจือปนอยู่ [15] ทำให้แบคทีเรียนำน้ำตาลไปใช้ได้น้อยและทำให้ปริมาณพีเอชบีที่ผลิตได้น้อย อย่างไรก็ตามแม้จะให้ปริมาณพีเอชบีน้อยกว่าแต่กากน้ำตาลไม่ต้องผ่านกระบวนการย่อย ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายเรื่องเอนไซม์ ดังนั้นการจะสรุปว่าแหล่งคาร์บอนใดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเป็นเรื่องยาก และต้องใช้ข้อมูลอื่นๆสนับสนุน เช่น ควรกำหนดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของแหล่งคาร์บอนแต่ละแหล่งในการเลี้ยงแบคทีเรียให้เท่ากัน เป็นต้น นอกจากนั้นการสะสมพีเอชบียังพบมากในเวลาที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่การเจริญเติบโตของแบคทีเรียคงที่ ซึ่งดูจากน้ำหนักแห้ง แหล่งคาร์บอนที่เหลืออยู่ในอาหารถูกนำมาใช้เป็นพลังงานสำรองเก็บอยู่ในเซลล์ในรูปของพีเอชบี ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ศึกษาการสะสมพีเอชบี ในแบคทีเรีย *Bacillus aryabhattai* และพบว่าแบคทีเรียเริ่มมีการสะสมพีเอชบีในช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตหลังจากนั้นอัตราการสะสมพีเอชบีเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะคงที่ (stationary phase) ที่ 60 ชั่วโมง [16]

การศึกษาหมู่ฟังก์ชันและลักษณะโมโนเมอร์ของพอลิเมอร์ที่สกัดจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลรีดิวซ์และกากน้ำตาล แสดงให้เห็นว่ามีพีคของหมู่ฟังก์ชันและพีคของโปรตอนที่สำคัญของพีเอชบี ซึ่งเหมือนกับพีคที่พบในพีเอชบีมาตรฐาน แสดงว่าพอลิเมอร์ที่ผลิตได้คือพีเอชบี นอกจากนั้นยังพบว่าคุณสมบัติของพีเอชบีซึ่งเป็นพลาสติกที่ทนความร้อนสูงมีความแตกต่างจากพีเอชบีมาตรฐานเล็กน้อย เนื่องจากพอลิเมอร์เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่มีการจัดเรียงตัวแบบกึ่งผลึก (semi-crystalline) [17] การให้ความร้อนเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของส่วนที่เป็นผลึก พบว่าพีเอชบีที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. SWU01 มีปริมาณผลึกน้อยกว่าจึงทำให้ค่าพลังงานความร้อนแตกต่างจากพีเอชบีมาตรฐาน ซึ่งการเกิดผลึกของพีเอชบีจะขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของพันธะ CH-O ของหมู่ CH_3 และ C=O [18] จากผล FTIR spectra พบว่าพีค ดังกล่าว ยังมีขนาดต่ำกว่าพีเอชบีมาตรฐานซึ่งสอดคล้องกับ ค่า % crystallinity ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย DSC ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรด์ในการสกัดไปทำลายพันธะไฮโดรเจนในโครงสร้างและทำให้การเกิดผลึกน้อยลง แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจัยอื่นเช่น อุณหภูมิ และ pH ก็ส่งผลต่อการเกิดผลึกของพอลิเมอร์เช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

1. Šprajcar, M., Horvat, P., & Kržan, A. (2013). Biopolymers and bioplastics plastics aligned with nature. National institute of chemistry, Ljubljana. 32.
2. European Commission. (2011). Plastic waste: Ecological and human health impacts science for environmental policy, In-depth reports. November, p. 41.
3. Oliveira, F. C., Freire, D. M. G., & Castilho, L. R. (2004). Production of poly (3-hydroxybutyrate) by solid-state fermentation with *Ralstonia eutropha. Biotechnology Letters, 26*(24),1851–1855.
4. Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Review, 54*(4), 450–472.

5. Tsuge, T., Yano, K., Imazu, S., Numata, K., Kikkawa, Y., Abe, H., Taguchi, S., & Doi, Y. (2005). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer from fructose using wild-type and laboratory-evolved PHA synthases. *Macromolecular Bioscience, 5*(2), 112–117.
6. Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and phb production by *Ralstonia eutropha. Process Biochemistry, 40*(6), 2173–2182.
7. Singh, G., Kumari, A., Mittal, A., Goel, V., Yadav, A., & Aggarwal, N. K. (2013). Poly-β-hydroxybutyrate by *Bacillus subtilis* NG05 using sugar industry waste water. *Journal of Polymers and the Environment, 21*(2), 441–449.
8. Gouda, M. K., Swellam, A. E., & 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. *Microbiology Research, 156*(3), 201–207.
9. Tripathi, A., Yadav, A., Jha, A., & Srivastava, S. (2011). Utilizing of sugar refinery waste (cane molasses) for production of bio-plastic under submerged fermentation process. *Journal of Polymers and the Environment, 20,* 446–453.
10. Zhang, Y., Sun, W., Wang, H., & Geng, A. (2013). Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. *Bioresource Technology, 147,* 307–314.
11. Gao, Y., Xu, J., Qi, W., Zhang, Y., Liu, Y., & Liang, C. (2014). Optimization of Fed-batch enzymatic hydrolysis from alkali-pretreated sugarcane bagasse for high-concentration sugar production. *Bioresource Technology, 167*C, 41-45.
12. Pattana, L., Arthit, T. Vichean, L. & Lakkana, L. (2009). Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresource Technology, 101,* 1036–1043.
13. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry, 31*(3), 426–428.
14. Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S., & Chang, H. N. (1994). Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering, 44*(2), 256–261.
15. Browne, C. A. 1919. The composition & calorific value of sirups and molasses derived from sugar cane. *Journal of American Chemical Society, 41*(9), 1432–1440.
16. Pillai, A. B., Kumar, A. J., Thulasi, K., & Kumarapillai, H. (2017). Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhattai. Brazilian Journal of Microbiology, 48*(3), 451–460.
17. Wongpiboon, T. (2013). Polymer chemistry. Chulapress. p. 41. (in Thai)
18. Porter, M., & Yu, J. (2011). Crystallization kinetics of poly(3-hydroxybutyrate) granules in different environmental conditions. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2*(3), 301–310.