การแยก การคัดเลือกแบคทีเรีย และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต
พอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHAs)

ปริญญานิพนธ์
ของ
ปรางค์ทอง จรลีรัตน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรกฎาคม 2558
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การแยก การคัดเลือกแบคทีเรีย และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต
พอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHAs)

บทคัดย่อ
ของ
ปรางค์ทอง จรลีรัตน์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กรกฎาคม 2558

ปรางค์ทอง จรลีรัตน์. (2558). *การแยก การคัดเลือกแบคทีเรีย และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHAs)*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชาภัค สมยูรทรัพย์, อาจารย์ ดร.ทายาท ศรียาภัย.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต polyhydroxyalkanoates (PHAs) จากตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่างในประเทศไทย เช่น ดินในป่า ดินป่าชายเลน ดินปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม ดินนาข้าว และดินแปลงเกษตร โดยทำการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียด้วยการย้อมสี 3 ชนิด ได้แก่ Sudan black B (มากกว่า 200 ไอโซเลท) Nile red (64 ไอโซเลท) และ Nile blue A (29 ไอโซเลท) พบว่า 5 ไอโซเลท คือ PE3, PPL2, PMK1, PMK5 และ PMS3 ที่มีปริมาณ PHAs สูงสุด เมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rDNA และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย พบว่าไอโซเลท PE3, PPl2, PMK5 และ PMS3 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน มีความเหมือนกับสปีชีส์ *Bacillus cereus* 99 เปอร์เซ็นต์ สำหรับไอโซเลท PMK1 มีความเหมือนกับสปีชีส์ *Lysinibacillus sphearicus* 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำตัวอย่าง PHAs ที่สกัดได้มาวิเคราะห์หมู่ฟังชันก์ด้วยวิธี FTIR พบว่าเป็นสารกลุ่มเอสเทอร์ และวิเคราะห์โครงสร้างสารด้วยวิธี NMR พบว่าเป็นสาร polyhydroxybutyrate หรือ (PHB) การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHB โดยนำ 5 ไอโซเลทเลี้ยงในอาหารเหลวเพิ่มแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส ซูโครส ไซโลส อะราบิโนส แลกโตส และกลีเซอรอลบริสุทธิ์และสกัด PHB ด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม พบว่า *B.cereus* สายพันธุ์ PE3 สามารถผลิต PHB ได้สูงจากทุกแหล่งคาร์บอนและทุกวิธีการสกัดจึงเลือกมาเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ N deficient ที่มีกลูโคส ซูโครส ฟรุกโตส กลีเซอรอลบริสุทธ์ โมลาส และกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และสกัดด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม พบว่า *B.cereus* สายพันธุ์ PE3 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุดในอาหารที่มีหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงด้วยซูโครส 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ได้ PHB 2.89 กรัมต่อลิตร (95.5% yield) และกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ได้ PHB 1.24 กรัมต่อลิตร (95.08% yield) เมื่อนำโมลาสและกลีเซอรอลดิบจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรและไบโอดีเซลนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิต PHB ได้เท่ากับ 2.44 กรัมต่อลิตร (85.26% yield) และ 1.19 กรัมต่อลิตร (39.70% yield) ตามลำดับ เมื่อนำกรดโพรพิโอนิก 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และกรดลิวูลินิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิต poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) หรือ (PHBV) เท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตร (22.96% yield) และ 0.27 กรัมต่อลิตร (25.66% yield) ตามลำดับ เมื่อนำโมลาส 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มาผสมรวมกับกรดไขมันทั้งสองชนิดได้ผลผลิต PHBV เท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร (20.30% yield) และ 0.22 กรัมต่อลิตร (12.19% yield) ตามลำดับ และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสองผ่านพบการสะสมแกรนูล 2-7 แกรนูลภายในเซลล์

SCREENING, ISOLATION AND OPTIMIZATION OF POLYHYDROXYALKANOATES (PHAs) PRODUCING BACTERIA.

AN ABSTRACT

BY

PRANGTONG JORALEERUT

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Biotechnology

at Srinakharinwirot University

July 2015

Prangtong Joraleerut. (2015). *Screening, isolation and optimization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) producing bacteria.* Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committees: Asst.Prof. Peechapack Somyoonsap, Dr. Thayat Sriyapai.

The purpose of this study is to isolate and optimize of polyhydroxyalkanoates (PHAs) producing bacteria. PHAs producing bacteria were collected from 15 soil samples in Thailand such as forest, mangrove forest, palm oil waste, paddy field and agriculture soil. The isolates were screened for PHB production by Sudan black B (more than 200 isolates), Nile red (64 isolates) and Nile blue A (29 isolates). Five isolates (PE3, PPl2, PMK1, PMK5 and PMS3) were identified by morphology characterization, biochemical characterization and phylogenetic tree analysis. The bacterial strains were identified as Gram positive, rod shape and 16S rDNA sequence showed 99% homology to *Bacillus cereus* (PE3, PPl2, PMK5 and PMS3) and 99% to *Lysinibacillus sphearicus* (PMK1). The functional group of extracted PHAs were detected as ester (C=O) group by using Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) and Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) which is a homopolymer of polyhydroxybutyrate (PHB). The optimization for PHB producing, five isolates produced PHB in various carbon sources (glucose, sucrose, xylose, arabinose, lactose and pure glycerol) and their PHB produced can be recovered by using chloroform extraction method. Strain PE3 displayed the high yield of PHB in all carbon sources and extraction methods. Glucose, sucrose, fructose, pure glycerol, molasses and crude glycerol were used as carbon sources for optimizing the suitable condition with N deficient medium at pH 7, 37^{o}C for 48 h with chloroform extraction method. Maximum amount of PHB with 10% inoculum from 4% (w/v) sucrose concentration as PHB 2.89 g/L:DCW 3.02 g/L (95.50% yield) and 3% (w/v) glucose concentration as PHB 1.24 g/L:DCW 1.30 g/L (95.08% yield). Molasses and crude glycerol are by-produced from agriculture and biodiesel industrial as carbon source for PHB production to PHB 2.44 g/L:DCW 2.86 g/L (85.26% yield) and PHB 1.19 g/L:DCW 3.0 g/L (39.70% yield), respectively. Furthermore, 0.5% (w/v) propionic acid and 0.1% (v/v) levulinic acid were used as precursor of copolymer, PHBV. The PHBV production were 0.3 g/L:DCW 1.32 g/L (22.96% yield) and 0.27 g/L:DCW 1.06 g/L (25.66% yield), respectively. Moreover, combination of 5% (v/v) molasses and fatty acids (propionic acid and levulinic acid) were showed PHBV production as 0.4 g/L (20.30% yield) and 0.22 g/L (12.19% yield), respectively. The accumulate granule was detected by transmission electron microscope (TEM) technique showed 2-7 granules of PHB in cell.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การแยก การคัดเลือกแบคทีเรีย และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

พอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHAs)

ของ

ปรางค์ทอง จรลีรัตน์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่ เดือน พ.ศ. 2558

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์	คณะกรรมการสอบปากเปล่า
....ที่ปรึกษาหลัก	....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชาภัค สมยูรทรัพย์)	(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)
....ที่ปรึกษาร่วม	....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ทายาท ศรียาภัย)	(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช)
	....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชาภัค สมยูรทรัพย์)
	....กรรมการ
	(อาจารย์ ดร.ทายาท ศรียาภัย)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาและคำแนะนำที่ดีจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชาภัค สมยูรทรัพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.ทายาท ศรียาภัย อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วม จนสามารถจัดทำปริญญานิพนธ์ได้เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนเพื่อการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษาจากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2557 ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ อาจารย์ ดร. สุขุมาภรณ์ กระจ่างสังข์ อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย และคณาจารย์ทุกท่านที่มอบความรู้และคำชี้แนะให้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา และขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สำหรับสถานที่และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้เกียรติเสียสละเวลามาเป็นกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สิริธร สโมสร ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สำหรับการช่วยเหลือและให้คำปรึกษาเกี่ยวกับเครื่องมือทางเคมีและการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

ท้ายที่สุดข้าพเจ้าขอขอบพระคุณของบิดา มารดา ที่สนับสนุนและให้กำลังใจข้าพเจ้าและขอขอบคุณพี่น้องและเพื่อนทุกคนในคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับความช่วยเหลือและแสดงน้ำใจให้กันอย่างสม่ำเสมอ และขอขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่มิได้กล่าวนามในที่นี้จนสำเร็จปริญญานิพนธ์

ปรางค์ทอง จรลีรัตน์

สารบัญ

บทที่ **หน้า**

1 บทนำ…… 1

ภูมิหลัง…… 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย…… 5

ขอบเขตของการศึกษาวิจัย…… 5

ผลที่ได้รับจากการวิจัย…… 5

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…… 6

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics)…… 6

ประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ…… 7

การย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ…… 8

พลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพ…… 9

พลาสติกชนิดย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน…… 9

พลาสติกย่อยสลายด้วยแสง…… 10

พลาสติกย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส…… 10

พอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalcanoates หรือ PHAs)…… 11

การจำแนกชนิดของ PHAs…… 12

สูตรโครงสร้างเคมีของ PHAs…… 13

วิถีการสังเคราะห์สารพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต…… 14

พอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly(3-hydroxybutyrate) หรือ PHB)…… 15

วิถีการสังเคราะห์สารพอลีไฮดรอกซีบิวไทเรต…… 17

พอลี(3-ไฮดรอกซีบิวไทเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลีเรต) หรือ PHBV…… 18

วิถีการสังเคราะห์สาร พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)…… 20

คุณสมบัติทางกายภาพของ PHAs…… 21

การนำ PHAs ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ…… 22

การคัดแยกแบคทีเรียด้วยสีย้อมชนิดต่างๆ…… 22

การสกัด PHAs ให้บริสุทธิ์…… 24

การผลิต PHAs จากวัสดุเหลือทิ้งราคาถูก…… 27

แบคทีเรีย *Bacillus cereus*…… 30

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย…………………………………………………………….……	31
อุปกรณ์และสารเคมี…………………………………………………………………	31
การเก็บกลุ่มตัวอย่างดินเพื่อนำมาคัดแยกแบคทีเรีย………...……………………..	35
การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ได้จากตัวอย่างดิน……………………	36
การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน……………………………….................	36
การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Sudan black B…......	36
การศึกษาลักษณะแกรนูลภายในแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Sudan black B………………………………………………………………......	37
การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Nile red……………..	37
การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Nile blue A…………	37
การศึกษาลักษณะเซลล์ที่ติดสีย้อม Nile blue A ภายในแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence microscope)…………………………….........................	38
การระบุชนิดแบคทีเรียด้วยการศึกษาลำดับเบสบริเวณยีน 16S rDNA……………	38
การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย…………………………………………………….	38
การระบุชนิดของเชื้อด้วยวิธีวิเคราะห์ยีน 16S rDNA…………………………	39
การศึกษาลักษณะเซลล์แบคทีเรียทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี…......	40
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแกรม..……………………	40
การศึกษาลักษณะทางชีวเคมี…………………………………………… …..	41
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs……………………………………	41
การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs ด้วยแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ.……….	41
การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs ด้วยแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ……….	41
การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ………..	42
การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs ที่ค่าความเป็นกรด-เบส……….....	42
การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ……………………...	42
การศึกษาวิธีการสกัด PHAs ออกจากเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม 4 วิธี…………………………………………………………………………	42
การสกัด PHAs ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คลอโรฟอร์ม……...………………… .	42
การสกัด PHAs ด้วยวิธีที่ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คลอโรฟอร์ม……………...	43

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

3 (ต่อ).. 43

การสกัด PHAs ด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) และความร้อนสูง.. 43

การสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS)........ 43

การสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) เอนไซม์ และความร้อนสูง.. 44

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ให้ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำกัดสารอาหารและใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่าง......................... 44

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs เมื่อเลี้ยงในอาหารจำกัดสารอาหารผสมกรดไขมันที่ให้ผลผลิตของพลาสติกชีวภาพในรูปแบบโครงสร้างของ PHBV ที่เป็นโคพอลิเมอร์ของ PHAs............................ 45

การศึกษาการผลิต PHBV ด้วยแหล่งคาร์บอนจากกรดไขมันกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และ กรดลิววูลินิก (levulinic acid) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.. 45

การศึกษาการผลิต PHBV ด้วยแหล่งคาร์บอนจากกรดไขมันกรดโพรพิโอนิก และ กรดลิววูลินิก ร่วมกับแหล่งคาร์บอนจากโมลาสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.. 45

การศึกษาการวิเคราะห์ผลผลิต PHAs ที่สกัดได้จากแบคทีเรียด้วยเครื่องมือวิทยาศาสตร์... 46

การยืนยันผลของการผลิต PHAs ด้วย FTIR spectrometer (Fourier Transform Infrared Spectrometer).................................

การยืนยันผลของการผลิต PHAs ด้วย ^{1}H-nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)... 46

การยืนยันผลของการผลิต PHAs ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด หรือ SEM (Scanning Electron Microscope)..................... 47

การยืนยันผลของการผลิต PHAs ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน หรือ TEM (Transmission electron microscopy)................. 47

การวิเคราะห์น้ำตาลโมลาส... 47

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

4 ผลการทดลอง.. 48

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Sudan black B 48

การศึกษาลักษณะแกรนูลภายในเซลล์แบคทีเรียที่ผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Sudan black B... 50

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Nile red.................. 51

การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Nile blue A.................. 52

การศึกษาลักษณะเซลล์ที่ติดสีย้อม Nile blue A ภายในแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนต์................................ 53

การจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยการศึกษาลำดับเบสบริเวณยีน 16S rDNA และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)........................... 54

การศึกษาลำดับเบสบริเวณยีน 16S rDNA.. 54

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ.. 55

การศึกษาลักษณะเซลล์แบคทีเรียทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี......... 56

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characterization)................... 56

ลักษณะทางชีวเคมี (Biochemistry characterization)............................ 57

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ของเชื้อแบคทีเรียที่สนใจทั้ง 5 สายพันธุ์... 59

การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs เมื่อเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ และทำการสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี.......... 59

การสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยสารละลายอินทรีย์คลอโรฟอร์ม.............. 59

การสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) และความร้อนสูง.. 60

การสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS)........ 61

การสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) ร่วมกับเอนไซม์และความร้อนสูง.. 62

การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs เมื่อเลี้ยง *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยแหล่งไนโตรเจนต่างๆ...................................... 66

การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs เมื่อเลี้ยง *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ในอาหารเหลวสูตรต่างๆ....................................... 68

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

4 (ต่อ).. 68

การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs เมื่อเลี้ยง *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ที่ค่าความเป็นกรด-เบสแตกต่างกัน........................... 69

การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ที่ช่วงเวลาต่างๆ... 70

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ได้สูงสุดของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารจำกัดสารอาหารและใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน.. 71

เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อ (inoculum) เริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v)…………………..... 71

เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อ (inoculum) เริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v)………………… 72

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs เมื่อเลี้ยงในอาหารจำกัดสารอาหารผสมกรดไขมันที่ให้ผลผลิตของพลาสติกชีวภาพในรูปแบบโครงสร้างของ PHBV.. 74

การผลิต PHBV ด้วยแหล่งคาร์บอนจากกรดไขมัน กรดโพรพิโอนิกและกรดลิวูลินิกร่วมกับแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลโมลาสที่ความเข้มข้นต่างๆ... 74

การศึกษาและยืนยันผลของการผลิต PHAs ด้วย FTIR spectrometer (Fourier Transform Infrared Spectrometer)....................................... 77

การศึกษาและยืนยันผลของการผลิต PHAs ด้วย nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR).. 79

การศึกษาลักษณะของเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด................................... 82

การศึกษาลักษณะแกรนูลของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.. 83

การผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHAs ที่ทำการสกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียที่ทำการศึกษา.. 84

การศึกษาสารประกอบในตัวอย่างน้ำตาลโมลาสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน…………..... 85

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.. 86

บรรณานุกรม.. 94

ภาคผนวก.. 103

ภาคผนวก ก 104

ภาคผนวก ข 109

ประวัติย่อผู้วิจัย.. 113

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	เปรียบเทียบคุณสมบัติของ PHB, PHBV, PHB4B, PHBHx และ PP.......................	21
2	เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง…………………………………………………………..	31
3	อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง…………………………………………	32
4	กลุ่มตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณต่างๆ ในประเทศไทย……………………………….	35
5	ส่วนประกอบการทำ PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA…………………….	39
6	จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากสีย้อม 3 ชนิด………………………..	54
7	การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของสายพันธุ์ PE3 เปรียบเทียบกับ *B.cereus*…………	58
8	สารประกอบในน้ำตาลโมลาสที่ทำการศึกษา…………………………………………...	83

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	แผนภาพแสดงประเภทและตัวอย่างของพอลิเอสเทอร์………………………………..	8
2	การสะสมแกรนูล PHB ของ *Bacillus* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน…………………………………………………………………………	11
3	สูตรโครงสร้างเคมีของ PHAs………………………..……………………………	13
4	วิถีการสังเคราะห์พอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ของ *Pseudomonas* spp. ……………	14
5	สูตรโครงสร้างของพอลีไฮดรอกซีบิวไทเรต……………………………………………	15
6	วิถีการสังเคราะห์พอลีไฮดรอกซีบิวไทเรต………………………..…………………	17
7	โครงสร้างของ PHBV หรือ Poly(Hydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate)………………	18
8	วิถีการสังเคราะห์พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)……………	20
9	การติดสีย้อม Sudan black B………………………………………………………..	49
10	การย้อมติดสี Sudan black B บนแกรนูล PHAs…………………………………...	50
11	การเรืองแสงของโคโลนีบนอาหารแข็ง minimal agar ผสมสี Nile red………………	51
12	การเรืองแสงของโคโลนีบนอาหารแข็ง minimal agar ผสมสี Nile blue A…………...	52
13	การย้อมติดสี Nile blue A ภายในเซลล์แบคทีเรียของไอโซเลท *A.eutrophus*, PE3, PPL2, PMK1, PMK5 และ PMS3…………………………………………………..	53
14	ผลผลิต PCR ของบริเวณยีน 16S rDNA……………………………………………	55
15	แผนภูมิทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์…………………………….....	55
16	การย้อมสีแกรมของ PE3, PPL2, PMK1, PMK5 และ PMS3………………………	56
17	กราฟร้อยละของการสกัด PHAs ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท PE3, PPL2, PMK1, PMK5, PMS3 และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคส………………...	63
18	กราฟร้อยละของการสกัด PHAs ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท PE3, PPL2, PMK1, PMK5, PMS3 และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยซูโครส………………...	63
19	กราฟร้อยละของการสกัด PHAs ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท PE3, PPL2, PMK1, PMK5, PMS3 และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยไซโลส………………..	64
20	กราฟร้อยละของการสกัด PHAs ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท PE3, PPL2, PMK1, PMK5, PMS3 และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยอะราบิโนส……………	64
21	กราฟร้อยละของการสกัด PHAs ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท PE3, PPL2, PMK1, PMK5, PMS3 และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยแลกโตส………………	65
22	กราฟร้อยละของการสกัด PHAs ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท PE3, PPL2, PMK1, PMK5, PMS3 และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลบริสุทธิ์…..	65

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

23 กราฟร้อยละของการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ (w/v)........................ 67

24 กราฟร้อยละของการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยสูตรอาหารจำกัดสารอาหาร 4 สูตร คือ N deficient, N limit, K limit และ S limit....... 68

25 กราฟร้อยละของการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยสูตรอาหาร N deficient ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH 6-8)............................. 69

26 กราฟร้อยละของการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ที่ช่วงเวลาต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง... 70

27 กราฟร้อยละของการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลิต PHAs ให้ได้สูงสุดด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่ความเข้มข้น1-5 เปอร์เซ็นต์ และใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v)...................... 73

28 กราฟร้อยละของการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลิต PHAs ให้ได้สูงสุดด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่ความเข้มข้น1-5 เปอร์เซ็นต์ และใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v).................... 73

29 กราฟร้อยละของการผลิต PHBV ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยกรดโพรพิโอนิก ที่ความเข้มข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ (w/v).............................. 75

30 กราฟร้อยละของการผลิต PHBV ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยกรดลิวูลินิก ที่ความเข้มข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ (v/v)................................. 75

31 กราฟร้อยละของการผลิต PHBV ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยน้ำตาลโมลาส 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ผสมกรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ (w/v).. 76

32 สเปกตรัม FTIR ของพลาสติกชีวภาพมาตรฐาน PHB (sigma)......................... 78

33 สเปกตรัม FTIR ของพลาสติกชีวภาพจาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3............ 78

34 ^{1}H NMR ของพลาสติกชีวภาพมาตรฐาน PHB (sigma)................................ 80

35 ^{1}H NMR ของพลาสติกชีวภาพจาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์.. 80

36 ^{1}H NMR ของพลาสติกชีวภาพมาตรฐาน PHBV (sigma).............................. 81

37 ^{1}H NMR ของพลาสติกชีวภาพจาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงด้วยโมลาส 5 เปอร์เซ็นต์ และกรดโพรพิโอนิก 0.5 เปอร์เซ็นต์........................... 81

38 ลักษณะของเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.. 82

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

39 ลักษณะภาพตัดขวางของเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน...................................... 83

40 ภาพตัวอย่างชิ้นส่วนพลาสติกชีวภาพที่สกัดได้จาก *Bacillus cereus*
สายพันธุ์ PE3... 84

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ปัญหาสิ่งแวดล้อมในปัจจุบันเกิดขึ้นจากหลายสาเหตุ เช่น การใช้ทรัพยากรทางธรรมชาติอย่างฟุ่มเฟือย ขาดการควบคุมดูแลและการกำจัดที่ถูกต้องเหมาะสมจึงทำให้เกิดการสะสมของขยะและปลดปล่อยมลพิษจำนวนมากสู่สิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะมลพิษจากขยะพลาสติก กระแสการรณรงค์การลดใช้พลาสติกเพื่อลดปริมาณขยะบนโลกนั้นเกิดขึ้นมานานนับทศวรรษ จึงมีผู้สนใจหาวิธีแก้ไขปัญหานี้ด้วยการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ง่ายมาทดแทนการผลิตพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีได้แก่ พลาสติกชีวภาพ (bioplastic) ที่มีคุณสมบัติในการทนความร้อน (thermoplastic) สามารถย่อยสลายได้หมดในสภาวะหมักปุ๋ย (compost) ได้เป็น ชีวมวล น้ำ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (biocompatible) พลาสติกชีวภาพสามารถผลิตได้จากพืชผลทางการเกษตรพวกแป้งมันสำปะหลัง ข้าวโพด อ้อย เช่น พอลีแลคติกแอซิด หรือพอลีแลคไทด์ (polylactic acid หรือ polactide) และจากการนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสะสมสารพอลิเอสเตอร์ประเภทพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (polyhydroxyalkanoates หรือ PHAs) มาเลี้ยงในน้ำหมักเพื่อให้เกิดการสะสม PHAs อยู่ในรูปของแกรนูลเก็บไว้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานภายในเซลล์ โดยจุลินทรีย์ที่พบในธรรมชาติที่สามารถสะสม PHAs ได้ส่วนใหญ่มักเป็นสารประกอบชนิด พอลีไฮดรอกซีบิวทิเรต (poly-3-hydroxybutyrate หรือ PHB) และพอลีไฮดรอกซีบิวทิเลต-โค-ไฮดรอกซีวาลีเรต (poly-β-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate หรือ PHBV)

การสะสมพลาสติกชีวภาพภายในเซลล์แบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อแบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่มีแหล่งของสารอาหารบางชนิดไม่สมดุลจึงต้องมีการสะสมแกรนูลไว้ใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์เพื่อความอยู่รอด จากรายงาน ในปี ค.ศ.1973 ดาเวสและซีเนีย (Dawes;& Senior. 1973: 225-238) พบว่าการสะสม PHAs จะเกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่สารอาหารขาดความสมดุล มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ แต่มีสารอาหารบางชนิดในปริมาณจำกัด เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ หรือ แมกนีเซียมซึ่งจุลินทรีย์จะสะสม PHAs ได้ปริมาณสูงเมื่อเข้าสู่ระยะช่วงปลายของการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (log phase) หลังจากนั้นในปี ค.ศ.1987 บาลลาดและคนอื่นๆ (Ballard; et al.1987: 293-314) ได้ศึกษาลักษณะของแกรนูลและพบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการสะสม PHAs จะได้จำนวนแกรนูลต่อเซลล์อยู่ในช่วง 8-12 แกรนูลทำให้เซลล์รูปท่อนมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.05 ไมโครเมตร รูปร่างของเซลล์จะเปลี่ยนเป็นค่อนข้าง

กลมและพบว่าการสะสมแกรนูลจะหยุดเมื่อมีปริมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์ถึงแม้จะยังมีเอนไซม์และสับสเตรททที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHAs อยู่ก็ตาม ภายในแกรนูลจะเป็น PHAs ประมาณ 98 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โปรตีน 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่เหลือเป็นไขมันจำพวกกรดฟอสฟาทิดิก (phosphatidic acid) และสารประกอบอื่นๆ ที่ละลายได้ในอะซิโตนเล็กน้อย

สารพอลิเมอร์ PHB ที่มักพบในแบคทีเรียนั้นสามารถแยกมาวิเคราะห์เพื่อหาคุณสมบัติได้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1926 โดยลามอยนี (Lamoigne. 1926: 770-782) ตั้งแต่นั้นมา PHB และ PHAs ได้รับความสนใจมากขึ้น นักวิทยาศาสตร์หลายท่านจึงได้ให้ข้อสรุปจากการศึกษาเกี่ยวกับ PHB ว่าแบคทีเรียจะสะสม PHB ไว้เป็นแหล่งพลังงาน แต่ข้อเสียของ PHB คือ มีเสถียรภาพของจุดหลอมเหลวต่ำ (poor melt stability) เนื่องจากมีอุณหภูมิสลายตัวที่ 200 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิของจุดหลอมเหลวที่ประมาณ 160-180 องศาเซลเซียสซึ่งอาจมีปัญหาในการผลิตเมื่อนำมาขึ้นรูป หลังจากนั้นจึงได้มีการปรับปรุงโดยการนำมาผสมให้เป็นสารพอลิเมอร์ร่วม เช่น P(3HB) ผสมกับ P(3HV) กลายเป็น Poly(3HB-*co*-3HV) หรือนำไปผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ และถ้ามีการเพิ่มสัดส่วนของ P(3HV) ก็จะช่วยทำให้คุณสมบัติของ PHB ดีขึ้น ทำให้ความแข็งของวัสดุลดลงและมีความเหนียวมากขึ้น ในปี ค.ศ.1960 PHB ได้รับความสนใจจากบริษัท W.R.Grace จึงถูกนำมาผลิตขายเป็นพอลิเมอร์ในเชิงพาณิชย์ขนาดเล็กครั้งแรก (Steinbuchel. 1991: pp. 124-213) หลังจากนั้นใน ปี ค.ศ.1982 บริษัท ICI (Imperial Chemical Industrie, Ltd.) ได้พัฒนาระบบการผลิต PHAs เพื่อผลิตพอลิเมอร์ในระดับอุตสาหกรรมจนสามารถทราบวิธีการสกัดแยกส่วนของพลาสติกชีวภาพได้ และนำออกเสนอขายด้วยเครื่องหมายการค้าที่ชื่อว่า Biopol® (Biodegradable polymer) (Choi, J.;& Lee, S.Y. 2000: 646-649) ซึ่งเป็นพลาสติกชีวภาพประเภทอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyester) มีหมู่เอสเทอร์ในสายของโมเลกุลจึงทำให้สามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ จากการศึกษาพบว่าสามารถย่อยสลายเกือบสมบูรณ์ภายในเวลา 10 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 55 และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 18 ต่อ 1 โคพอลิเมอร์ของ PHB ต่อ PHV ในอัตรา ส่วนร้อยละ 92 ต่อ 8 โดยน้ำหนัก และสามารถย่อยสลายเกือบสมบูรณ์ภายในเวลา 20 วันภายใต้สภาวะการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนในน้ำทิ้ง (Gross, RA.;& Kalra, B. 2002: 803-807) สำหรับระบบการผลิตและการพัฒนาการผลิตพลาสติกชีวภาพในปัจจุบันมีความก้าวหน้ามาก โดยเฉพาะการค้นพบจุลินทรีย์หลายร้อยชนิดที่มีความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพรวมถึงการพัฒนาวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์และวิธีแยกสกัดสารพอลิเมอร์เพื่อให้ได้สารพอลิเมอร์ที่มีความบริสุทธิ์และมีปริมาณเพียงพอต่อการนำมาเป็นสารตั้งต้นในการขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆเพื่อการนำไปใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมี

โดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่สามารถสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพกลุ่ม PHAs เช่น *Hymenobacter aerophilus*, *Sphingomonas pituitosa*, *Pectobacterium cypripedii*, *Alcaligenes euthrophus*, *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp. และ *Bacillus* sp. เป็นต้น (กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2553 อ้างอิงจาก Cox, M.K. 1994: pp.120-135)

ในช่วงแรกการสังเคราะห์ PHAs จะใช้จุลินทรีย์ *Alcaligenes euthrophus* โดยใช้แหล่งวัตถุดิบจากน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์โดยเชื่อมต่อ acetyl-CoA 2 โมเลกุล และเปลี่ยนสารนี้ไปเป็นมอนอเมอร์สำหรับใช้ในการผลิตเป็น PHB โดยมีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้องในปฏิกิริยาทั้งหมด 3 ชนิด คือ เอนไซม์ 3-ketothiolase (PhaA) จะเร่งให้เกิดการรวมตัวกันของ acetyl-CoA ได้เป็น acetoacetyl-CoA เอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) จะเป็นตัวรีดิวซ์ acetoacetyl-CoA ไปเป็น R(-)-3-hydroxybutyryl–CoA และเอนไซม์ PHA synthase (PhaC) จะมาเร่งปฏิกิริยา polymerizes เปลี่ยน (R)-3-hydroxybutyryl-CoA ได้เป็นพอลิเมอร์ PHB (Tsuge; et al. 2005: 112-117)

เมื่อมีการค้นพบและการพัฒนาทางด้านพันธุวิศวกรรมมากขึ้น จึงมีการนำจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพได้มาศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในระดับอุตสาหกรรม จากการศึกษาในปี ค.ศ. 2003 ของเวสเทอร์และคนอื่นๆ (Westers; et al. 2003: 2076-2090) พบว่า *B.subtilis* เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมสำหรับการผลิตโปรตีน กรดอะมิโน และสารเคมี และจากรายงานในปี ค.ศ.2009 ซายน์และคนอื่นๆ (Singh; et al. 2009: 38) ได้รายงานพบว่ากลุ่มของ *Bacillus* spp. เคยมีรายงานการผลิต PHAs โดยได้ปริมาณของ PHAs สูงถึง 11-69 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก PHAs ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง) เช่น *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* DSM7, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. laterosporus, B. circulans*, *B. firmus* G2, *B. subtilis* K8, *B. sphaericus* X3, *B. megaterium* Y6, *B. coagulans*, *B. brevis*, *B. sphaericus* ATCC 14577, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* RLJ B-017, *Bacillus* sp. JMa5, *Bacillus* sp. INT005 และ *B. cereus* UW85 เป็นต้น เมื่อนำ PHAs มาวิเคราะห์ก็พบว่าเชื้อใน genus *Bacillus* สามารถผลิตโคพอลิเมอร์ของ PHAs ได้หลากหลาย เช่น PHB, P(3HB-co-3HV), P(3HB-*co*-3HHx) ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ของบิวทิเรตกับเฮกซาโนเอต และ P(3HB-*co*-4HB-*co*-3HHx) ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซี, 4-ไฮดรอกซีบิวทิเรตกับเฮกซาโนเอต โดยชนิดของพอลิเมอร์ที่แบคทีเรียผลิตได้นั้นขึ้นอยู่กับสับสเตรทที่นำมาใช้เป็นแหล่งสารอาหาร จึงมีผู้สนใจนำผลผลิตเหลือใช้จากอุตสาหกรรมซึ่งมีราคาถูกมาเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของแบคทีเรียมากขึ้น ในปี ค.ศ. 2010 จวนและคนอื่นๆ (Jiun; et al. 2010: 1395-1402) ได้รายงานพบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHAs จากแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีราคาถูกหรือที่ได้จากของเสีย เช่น น้ำมันจากพืช

กรดไขมัน แอลเคน และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งในแต่ละปีมีปริมาณของเสียที่ถูกปล่อยออกมาจากอุตสาหกรรมการเกษตรและการแปรรูปอาหารจำนวนมาก และของเสียเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนสำหรับการผลิต PHAs โดยใช้เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งไม่เพียงแต่ช่วยลดค่าใช้จ่ายในต้นทุนการผลิตแล้วยังช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียได้อีกด้วย ในประเทศไทยมีรายงานอยู่หลายฉบับที่นำของเสียเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด อ้อย น้ำมันปาล์ม และน้ำเสียจากกระบวนการผลิตอาหารมาเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีรายงานในปี ค.ศ. 2012 สังขรักษ์และประเสริฐสรรพ์ (Sangkharak; & Prasertsan. 2012: 173-182) ได้ทำการแยกเชื้อจากอาหารดอง ดิน น้ำเสีย มูลวัวและไก่ สามารถแยก *Bacillus cereus* PHA 008 ที่ผลิต PHA ได้สูงถึง 64.09 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อนำมาเลี้ยงด้วยน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มภายใต้สภาวะแบบไม่ใช้ออกซิเจน

จากความสามารถในการผลิต PHAs ที่ได้พอลิเมอร์หลากหลายชนิดของแบคทีเรียและวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานที่แตกต่างกันไปนั้นทำให้เกิดงานวิจัยขึ้นอีกมากมายในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม แหล่งสารอาหารที่หาได้ง่ายราคาถูก และวิธีการสกัดใหม่ๆ ที่ลดการใช้สารพิษที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมเพื่อให้ได้พอลิเมอร์ที่มีคุณภาพสูงเพื่อมาใช้เป็นสารตั้งต้นผลิตผลิตภัณฑ์จากพลาสติกชีวภาพ จากแนวคิดนี้ทำให้เกิดความสนใจในการศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่ม PHAs โดยทำการศึกษาจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินในสถานที่ที่แตกต่างกันในประเทศไทยมาทำการคัดแยกด้วยวิธีการที่หลากหลาย และศึกษาคุณลักษณะของพลาสติกชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียภายใต้สภาวะและวิธีการสกัดที่เหมาะสมจากแหล่งสารอาหารราคาถูกซึ่งเป็นทางเลือกที่ทำให้เกิดแนวทางการพัฒนางานวิจัยเพื่อสิ่งแวดล้อมและนำไปสู่การสร้างประโยชน์จากการศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ต่อไปได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทำการแยก คัดเลือกและศึกษาลักษณะเพื่อระบุชนิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่ม PHAs จากดินในบริเวณที่แตกต่างกันในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่ม PHAs ได้สูงสุดและกระบวนการสกัด PHAs จากแบคทีเรีย
3. เพื่อวิเคราะห์ชนิดของพลาสติกชีวภาพกลุ่ม PHAs ที่ผลิตจากแบคทีเรีย

ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

การศึกษาแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่ม PHAs เริ่มจากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินในบริเวณต่างๆ ของประเทศไทย เช่น จังหวัดสตูล จังหวัดเลย และจังหวัดนครนายก โดยใช้สีย้อม 3 ชนิด คือ Sudan black B, Nile blue A และ Nile red เพื่อศึกษาลักษณะการติดสีของโคโลนีแบคทีเรียและแกรนูลภายในเซลล์ในเบื้องต้น เมื่อคัดแยกแบคทีเรียจากการติดสีย้อมทั้ง 3 ชนิด จากนั้นทำการระบุชนิดแบคทีเรียโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมี และทางพันธุกรรมโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA หลังจากนั้นทำการศึกษาหาความสามารถของแบคทีเรียในการผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่ม PHAs ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิต จากนั้นศึกษากระบวนการสกัด PHAs ด้วยสารละลายอินทรีย์ สารลดแรงตึงผิว เอนไซม์ และความร้อนสูง เพื่อให้ได้ผลผลิต PHAs จากเซลล์แบคทีเรียในปริมาณสูงสุดจากแหล่งสารอาหารที่หลากหลายรวมถึงการนำโมลาสและกรดไขมันมาเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับแบคทีเรียในการผลิตพลาสติกชีวภาพในกลุ่ม PHAs ชนิดต่างๆ เช่น PHB และ PHBV สุดท้ายวิเคราะห์ผลผลิต PHAs ที่ได้ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer (FTIR), Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), Scanning electron microscope (SEM) และ Transmission electron microscopy (TEM)

ผลที่ได้รับจากการวิจัย

การวิจัยนี้ทำให้ได้วิธีการคัดแยกเชื้อและลักษณะสำคัญของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่ม PHAs จากดินในประเทศไทย และสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs รวมทั้งกระบวนการสกัดที่ดีต่อการผลิต PHAs เพื่อให้ได้ปริมาณและคุณภาพสูงสุด และอาจนำไปพัฒนากระบวนการผลิต PHAs จากการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรราคาถูกมาเป็นแหล่งสารอาหารของแบคทีเรียได้ต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

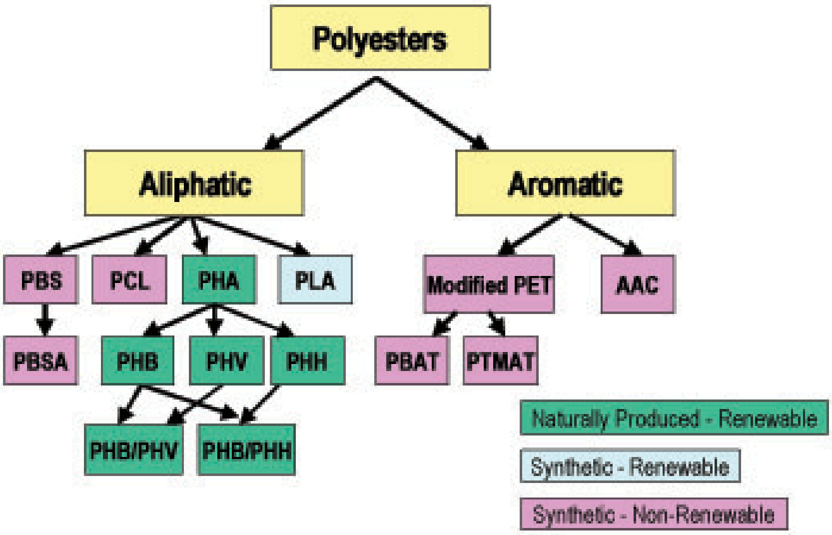
พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics)

เนื่องจากปัจจุบันพลาสติกก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อนำไปฝังดินจะเกิดการย่อยสลายได้ยากและใช้เวลานาน ทำให้ดินเสื่อมคุณภาพหรือถ้านำไปเผาทำลายจะก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ ด้วยเหตุนี้นักวิทยาศาสตร์จึงได้ศึกษาค้นคว้าและผลิตพลาสติกชนิดใหม่ขึ้นมาทดแทนเพื่อช่วยลดปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อม โดยเรียกพลาสติกชนิดใหม่นี้ว่า พลาสติกชีวภาพ (bioplastics) หรือ พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics) (ธนาวดี ลี้จากภัย. 2549: 5) ซึ่งพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพเป็นพลาสติกที่สลายตัวได้ด้วยจุลินทรีย์ ผลิตมาจากวัตถุดิบที่ทดแทนใหม่ได้จากธรรมชาติ (biobase) หรือ ปิโตรเคมี (petrobase) ซึ่งสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของโครงสร้างทางเคมีเนื่องจากปัจจัยต่างๆ ในสภาวะแวดล้อมได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ถูกดูดซึมและย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์อย่างสมบูรณ์เกิดเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ชีวมวล และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย จากรายงานในปี พ.ศ.2553 ของกรมวิทยาศาสตร์บริการพลาสติกชีวภาพถูกจัดเป็นสารพอลิเอสเทอร์ เนื่องจากประกอบด้วยมีพันธะเอสเทอร์อยู่ในสายโซ่ซึ่งมีความแข็งแรงน้อย สามารถแตกตัวได้ง่ายเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำโดยอาศัยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ดังนั้นจึงสามารถย่อยสลายเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลงได้ นอกจากนี้พอลิเอสเทอร์ยังสามารถจำแนกตามส่วนประกอบของสายโซ่เป็น 2 ประเภท คือ อะลิฟาติก พอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyester) และอะโรมาติก พอลิเอสเทอร์ (aromatic polyester) ในปัจจุบันมีการผลิตพอลิเมอร์ในกลุ่มนี้หลายชนิดส่วนใหญ่เป็นประเภท aliphatic polyester เนื่องจากสายโซ่มีความเหมาะสมต่อการสลายพันธะดีกว่า ในส่วนของ aromatic polyester จะต้องทำการปรับปรุงโครงสร้างให้เหมาะสมโดยอาจต่อกับสายโซ่ aliphatic polyester ให้เป็นโคพอลิเมอร์ aliphatic-aromatic polyester ก่อนจึงจะสามารถย่อยสลายได้ซึ่งสามารถใช้ polyethylene terephthalate (PET) เป็นส่วนประกอบหลักสำหรับวัตถุดิบที่ใช้ผลิต polyhydroxyalkanoates (PHAs) เป็นวัตถุดิบที่ปลูกทดแทนใหม่ได้ ได้แก่พืชผลทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด มันฝรั่ง มันสำปะหลัง และข้าว ในระยะแรกของการพัฒนาระบบการผลิต PHAs จะใช้เชื้อแบคทีเรีย *Alcaligenes euthrophus* H16 โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน ปัจจุบันมีการศึกษาเชื้อชนิดต่างๆ ที่มีคุณสมบัติที่ดีในการผลิตหรือการใช้วัสดุอื่นๆ เพื่อเป็นแหล่งพลังงานรวมไปถึงการศึกษาการกระจายตัวของยีนที่สำคัญในวิถีการสร้าง PHAs ในเซลล์แบคทีเรียหรือการนำยีนที่สำคัญไปใส่ในพลาสมิดของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น *Escherichia coli* หรือ *Saccharomyces cerevisiae* แล้วจึงทำการสกัดแยก PHAs ออกมาขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ เมื่อพลาสติกชีวภาพถูกใช้ไปก็นำมาจำกัดได้โดยการปล่อยให้ย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในดินภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต PHAs ได้แก่ ความคงตัวของระบบการผลิต ปริมาณเซลล์สะสม การสกัดได้ของ PHAs อัตราการใช้ PHAs เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน และคุณสมบัติของ

วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งอาหาร ซึ่ง PHAs ผลิตได้จากการนำแป้งหรือน้ำตาลมาหมักด้วยจุลินทรีย์ หลังจากนั้นจึงทำการแยกเอา PHAs ออกด้วยการทำลายเปลือกนอกหุ้มของจุลินทรีย์ โดย PHAs เป็นพลาสติกชีวภาพที่สามารถขึ้นรูปได้ มีคุณสมบัติทางความร้อนและทางกลใกล้เคียงกับพอลิเอทิลีน (polyethylene) หรือ พอลิโพรพิลีน (polypropylene) ซึ่งเป็นพลาสติกที่นิยมใช้กันมากที่สุดในปัจจุบันและเป็นพลาสติกชีวภาพที่ได้รับความสนใจจากตลาดเป็นอย่างมากเนื่องจากสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างหลากหลาย

ประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ได้แก่ แป้งเทอร์โมพลาสติก (thermoplastic starch, หรือ TPS), พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid หรือ PLA), พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates หรือ PHA), พอลิคาร์โปแลคโทน (polycaprolactone หรือ PCL), พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (polybutylene succinate หรือ PBS), พอลิบิวทิลีนเทอเรพธาเลต (polybutylene terephthalates หรือ PBT), พอลิไตรเมทิลีนเทอเรพธาเลต (polytrimethylene Terephtalate หรือ PTT), พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol หรือ PVA) เป็นต้น ดังแสดงในภาพประกอบ 1 โดยแบ่งประเภทของพลาสติกตามลักษณะของโครงสร้างหลักได้ 2 แบบ คือ แบบสายโซ่ตรง (aliphatic) และ แบบมีวงอะโรมาติก (aromatic) และยังจัดกลุ่มของวัตถุดิบที่นำมาผลิตพลาสติกชีวภาพได้อีก 3 แบบ คือ กลุ่ม 1 ผลิตจากวัตถุดิบปิโตรเลียมแต่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เช่น PBS, PCL, PBSA, modified PET, AAC เป็นต้น กลุ่ม 2 ผลิตจากวัตถุดิบที่ปลูกทดแทนได้ เช่น มันสำปะหลัง อ้อย ข้าวโพด เป็นต้น แล้วผ่านกระบวนการทางชีวภาพนั่นคือ PLA กลุ่ม 3 ผลิตจากจุลินทรีย์ เช่น PHA, PHB, PHV, PHH และ โคพอลิเมอร์ของสารกลุ่มเดียวกัน (European bioplastics. 2014: Online)



ภาพประกอบ 1 แผนภาพแสดงประเภทและตัวอย่างของพอลิเอสเทอร์

ที่มา : สำนักนวัตกรรมแห่งชาติ (NIA). http://www.nia.or.th/bioplastics/introduction.php

PHA	- polyhydroxyalkanoates	PHB	- polyhydroxybutyrate
PHH	- polyhydroxyhexanoate	PHV	- polyhydroxyvalerate
PLA	- polylactic acid	PCL	- polycaprolactone
PBS	- polybutylene succinate	PBSA	- polybutylene succinate adipate
AAC	- Aliphatic-Aromatic copolyesters	PET	- polyethylene terephthalate
PBAT	- polybutylene adipate/terephthalate	PTMAT	- polymethylene adipate/ terephthalate

การย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ

องค์กรในต่างประเทศหลายๆ องค์กรได้ดำเนินการจัดทำมาตรฐานวิธีการทดสอบและการรับรองการย่อยสลายได้ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ เช่น ISO (International Organization for Standardization), ASTM (American Society for Testing and Materials), DIN (Deutsches Institute for Normung or German Institute for Standardization), JIS (Japanese Industrial Standard), ORCA (Organic Reclamation and Composting Association, Belgium) และ ISR (Institute for Standards Research) โดยข้อกำหนดมาตรฐานสำหรับรับรองการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradability) ในระดับนานาชาติซึ่งมีรายละเอียดที่ใกล้เคียงกัน หากแต่จะมีความแตกต่างกันเล็กน้อยในเรื่ององค์ประกอบ วิธีการทดสอบ และคุณสมบัติเพื่อผ่านการรับรองการย่อยสลายทางชีวภาพซึ่งมีหลักที่คล้ายคลึงกัน อาทิเช่น การวัดความสามารถในการย่อยสลายได้

ทางชีวภาพ การวัดความสามารถในการแตกเป็นชิ้นเล็กๆ (disintegration) ของวัสดุทดสอบในสภาวะหมักปุ๋ย (compost) และการประเมินการย่อยสลายเบื้องต้น รวมถึงปริมาณโลหะหนักตลอดจนการวิเคราะห์คุณภาพ และความเป็นพิษต่อระบบนิเวศของปุ๋ยที่ได้จากการหมัก (ecotoxicity of the compost) การทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพโดยทั่วไปมักใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 6 เดือน เช่น มาตรฐาน ASTM 5338 กำหนดไว้ว่า พลาสติกที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์เพียง 1 ชนิดจะต้องเกิดการย่อยสลายอย่างน้อย 60 เปอร์เซ็นต์โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารประกอบโมเลกุลเล็ก เช่น น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ สารประกอบอนินทรีย์ สารชีวมวล เป็นต้น ภายใต้สภาวะการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์แบบใช้ออกซิเจนภายในเวลา 6 เดือน และสำหรับพอลิเมอร์ผสมต้องเกิดการย่อยสลาย 90 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักสามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นสารปรับสภาพดินได้ ต้องไม่มีความเป็นพิษต่อพืชและสัตว์ และสามารถกำจัดได้โดยกระบวนการหมักขยะอินทรีย์ (พริ้ม ศรีหานาม. 2553) การย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้แบ่งจากลักษณะการสลายตัวภายใต้สภาวะแวดล้อมและปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน (กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2553: อ้างอิงจาก Cox, M.K. 1994: pp.120-135) ดังนี้

1.พลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradable plastic)

เป็นพลาสติกย่อยสลายได้ที่มีกลไกการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และแบคทีเรียในธรรมชาติ เมื่อย่อยสลายหมดแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำ มวลชีวภาพ ก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการเจริญเติบโตและดำรงชีวิตของพืชรวมถึงมันสำปะหลังและข้าวโพดที่เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพ และมีแนวโน้มการทำตลาดที่ดีและมี การผลิตเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์ ได้แก่ PLA และ PHAs ซึ่งเป็นพลาสติกที่ได้จากธรรมชาติโดยใช้กระบวนการทางชีวเคมีในการเปลี่ยนสภาพจากแป้งที่ได้จากมันสำปะหลังและข้าวโพดให้เป็นพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ นอกจากพลาสติก 2 ชนิดนี้แล้วยังมีพลาสติกย่อยสลายได้อีกชนิดที่นิยมในตลาดเช่นกันคือ poly(butylene dipate-*co*-terephthalate) หรือ PBSA ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ ที่ได้จากวัตถุดิบปิโตรเคมี ซึ่งผลิตโดยบริษัท BASF ประเทศเยอรมันที่มีคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

2. พลาสติกชนิดย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidative degradation plastics)

เป็นพลาสติกที่สลายตัวได้โดยไม่ต้องพึ่งพาจุลินทรีย์ซึ่งมีการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสติก เป็นปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนลงในโมเลกุลของพอลิเมอร์ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติอย่างช้าๆ โดยมีออกซิเจน ความร้อน แสงยูวี และแรงทางกลเป็นปัจจัยสำคัญ เกิดเป็นสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide, ROOH) ในพลาสติกที่ไม่มีการเติมสารเติมแต่งที่ทำหน้าที่เพิ่มความเสถียร (stabilizing additive) ของแสงและความร้อนจะทำให้ ROOH แตกตัวกลายเป็นอนุมูลอิสระ RO และ OH ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยาต่อที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลอย่างรวดเร็ว

3. พลาสติกย่อยสลายด้วยแสง (photodegradable plastics)

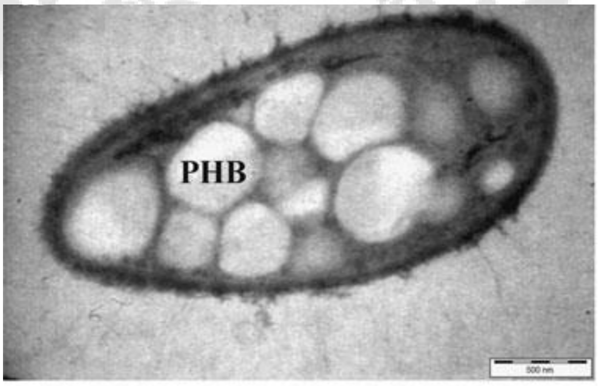
การย่อยสลายด้วยแสงมักเกิดจากการเติมสารเติมแต่งที่มีความว่องไวต่อแสงลงในพลาสติกหรือสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ให้มีหมู่ฟังก์ชันหรือพันธะเคมีที่ไม่แข็งแรง แตกหักง่ายภายใต้รังสี เช่น หมู่คีโตน (ketone group) อยู่ในโครงสร้างเมื่อสารหรือหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวสัมผัสกับรังสียูวี จะเกิดการแตกของพันธะกลายเป็นอนุมูลอิสระซึ่งไม่เสถียร จึงเข้าทำปฏิกิริยาต่ออย่างรวดเร็วที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่พอลิเมอร์ ทำให้เกิดการขาดของสายโซ่ แต่การย่อยสลายนี้จะไม่เกิดขึ้นภายในบ่อฝังกลบขยะกองปุ๋ยหมัก หรือ สภาวะแวดล้อมอื่นที่มืด หรือแม้กระทั่งชิ้นพลาสติกที่มีการเคลือบด้วยหมึกที่หนามากบนพื้นผิว เนื่องจากพลาสติกจะไม่ได้สัมผัสกับรังสียูวีโดยตรง

4. พลาสติกย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolytic degradation plastics)

การย่อยสลายของพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ หรือ เอไมด์ เช่น แป้ง พอลิเอสเทอร์ พอลิแอนไฮไดรด์ (polyanhydride) พอลิคาร์บอเนต (polycarbonate หรือ PC) และพอลิยูริเทน (polyurethane หรือ PU) ผ่านปฏิกิริยาก่อให้เกิดการแตกหักของสายโซ่พอลิเมอร์ โดยทั่วไปปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalytic hydrolysis) และไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (non-catalytic hydrolysis) ซึ่งประเภทแรกมี 2 แบบ คือ แบบที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจากภายนอกโมเลกุลเร่งให้เกิดการย่อยสลาย (external catalytic degradation) และแบบที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจากภายในโมเลกุลเองในการเร่งให้เกิดการย่อยสลาย (internal catalytic degradation) โดยตัวเร่งปฏิกิริยาจากภายนอกมี 2 ชนิด คือ ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น depolymerase lipase และesterase ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางชีวภาพและตัวเร่งปฏิกิริยาที่ไม่ใช้เอนไซม์ (non-enzyme) เช่น โลหะแอลคาไลน์ เบส และกรด ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมในธรรมชาติ ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางเคมี สำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบบที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจากภายในโมเลกุลของพอลิเมอร์นั้นใช้หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ของหมู่เอสเทอร์ หรือ เอไมด์ บริเวณปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

พอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalcanoates หรือ PHAs)

PHAs เป็นกลุ่มพอลิเมอร์ประเภทพอลิเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้ทางธรรมชาติโดยจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เช่น *Hymenobacter aerophilus, Sphingomonas pituitosa, Pectobacterium cypripedii* และ *Alcaligenes euthrophus* เป็นต้น ถึงแม้ว่าปัจจุบันมีการค้นพบอนุพันธ์พอลิเอสเทอร์ที่อยู่ในกลุ่มนี้มากกว่า 100 ชนิด แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่เป็นที่รู้จักแพร่หลายโดยอนุพันธ์พอลิเมอร์ที่เป็นที่รู้จักมากที่สุด ได้แก่ PHB ซึ่งถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1926 โดย Maurice Lemoigne นักวิทยาศาสตร์แห่ง Pestuer Institute ณ กรุงปารีส จากเชื้อ *Alcaligenes euthrophus* H16 เมื่อใช้กลูโคสเป็นสับเสตรท เนื่องจากมีโครงสร้างหลักของสายโซ่ที่ต่อกันด้วยคาร์บอน 3 อะตอมและมีหมู่แอลคิล (alkyl group) ที่แตกต่างกันมาต่ออยู่ที่บริเวณเบต้า (-β-) หรือ คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของสายโซ่หลักจึงถูกตั้งชื่อสารพอลิเมอร์ชนิดนี้ว่า “poly-3-hydroxybutyrate” ต่อมา ในปี ค.ศ. 1982 บริษัท Imperial Chemical Industries Ltd. (ICI) ประเทศอังกฤษ ได้นำเชื้อนี้ไปผลิตในระดับถังหมัก ได้ปริมาณ PHB ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีการเปลี่ยนชื่อเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* อีกหลายครั้งเป็น *Ralstonia eutropha* หรือ *Wautersia eutropha* และผลิตภัณฑ์จาก PHB ก็ถูกนำออกจำหน่ายด้วยเครื่องหมายการค้าชื่อ “Biopol” และ PHB มักพบบ่อยในจุลินทรีย์ธรรมชาติจึงนิยมนำมาศึกษาเพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพโดยผสมกับวัตถุดิบธรรมชาติ เช่น แป้งหรือไบโอพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆเพื่อให้ขึ้นรูปได้ง่ายขึ้น และจากการศึกษาของ Lemoigne ในปี ค.ศ. 1927 ได้รายงานเป็นครั้งแรกเกี่ยวกับการผลิต PHB ในถังหมักด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium* ซึ่งสามารถผลิต PHB ได้ 44 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (Lenz; & Marchessault. 2004)



ภาพประกอบ 2 การสะสมแกรนูล PHB ของ *Bacillus megaterium*. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ขนาดบาร์ 500 นาโนเมตร

ที่มา : Tay; et al. (2010). Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulating bacteria from the gut of higher termite *Macrotermes carbonarius* (Blattodea: Termitidae). *World Journal Microbiology Biotechnology*. 26: p.1021

การจำแนกชนิดของ PHAs

1. การจัดจำแนกกลุ่มโดยแบ่งตามชนิดมอนอเมอร์องค์ประกอบในสายพอลิเมอร์โดยแบ่งเป็น 2 ประเภท (สิริลักษณ์ บัวทอง. 2551: 11-12) ดังนี้

1.1 โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน เช่น poly-3-hydroxybutyrate และ poly-3-hydroxyvarerate เป็นต้น

1.2 เฮทเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์มากกว่า 2 ชนิดมาต่อกันโดยเรียกชื่อตามองค์ประกอบ ดังนี้

ก. โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายของพอลิเมอร์ เช่น poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvarerate) หรือ PHBV เป็นต้น

ข. เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกันเป็นสายของพอลิเมอร์ เช่น poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvarerate-*co*-4-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB) เป็นต้น

2. การจัดจำแนกกลุ่มโดยแบ่งตามจำนวนคาร์บอนในหน่วยมอนอเมอร์โดยแบ่งเป็น 3 ประเภท (Lee; et al.1996: 431) แสดงในภาพประกอบ 3 ดังนี้

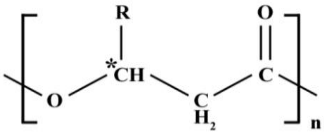
2.1 PHAs สายสั้น (short chain length, SCL) หรือ scl-PHAs มีคาร์บอน 3-5 อะตอม

2.2 PHAs สายกลาง (medium chain length, MCL) หรือ mcl-PHAs มีคาร์บอน 6-14 อะตอม ค้นพบ mcl-PHAs ที่มีความแตกต่างของมอนอเมอร์ประมาณ 100 ชนิดซึ่งตำแหน่งที่ถูกออกซิไดซ์ในมอนอเมอร์อาจไม่ใช่คาร์บอนตัวที่3 แต่เป็นคาร์บอนตำแหน่งอื่นๆ ได้ เช่น 4-hydroxybutyrate และ 5-hydroxyvarerate เป็นต้น

2.3 PHAs สายยาว (long chain length, LCL) หรือ lcl-PHAs มีคาร์บอนตั้งแต่ 14 อะตอมขึ้นไป

ในปี ค.ศ.2013 ดารานิและคนอื่นๆ (Darani; et al. 2013 :1407-1424) รายงานว่ากลไกและการเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ของ PHAs สามารถเปลี่ยนแปลงได้จากการดัดแปลงหรือเชื่อมต่อกับพอลิเมอร์อื่นๆ เอนไซม์ และสารอนินทรีย์ซึ่งทำให้เกิดชนิดของ PHAs ที่หลากหลายขึ้นโดย PHA synthases เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการผลิต PHAs โดยมีโคเอนไซม์ A-thioester ของ (R)-hydroxy fatty acids เป็นสับสเตรท และ PHA synthases ยังมีความจำเพาะต่อความยาวของ hydroxyl fatty acids ได้ต่างกัน 2 ชนิด คือ PHAs สายสั้น หรือ SCL และ PHA สายกลาง หรือ MCL ซึ่ง SCL-PHA พบว่าสังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Ralstonia eutropha* และ *Alcaligenes latus* ที่สามารถผลิต PHB และ MCL-PHA สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* และยังมีแบคทีเรียอื่นๆที่สามารถสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ชนิด SCL- PHA และ MCL-PHA ได้ เช่น *Aeromonas hydrophila* และ *Thiococcus pfennigii* เป็นต้น

สูตรโครงสร้างเคมีของ PHAs



Poly(3-hydroxyalkanoate)

R group	Carbon no.	PHA polymer
methyl	C_4	Poly(3-hydroxybutyrate)
ethyl	C_5	Poly(3-hydroxyvalerate)
propyl	C_6	Poly(3-hydroxyhexanoate)
butyl	C_7	Poly(3-hydroxyheptanoate)
pentyl	C_8	Poly(3-hydroxyoctanoate)
hexyl	C_9	Poly(3-hydroxynonanoate)
heptyl	C_{10}	Poly(3-hydroxydecanoate)
octyl	C_{11}	Poly(3-hydroxyundecanoate)
nonyl	C_{12}	Poly(3-hydroxydodecanoate)
decyl	C_{13}	Poly(3-hydroxytridecanoate)
undecyl	C_{14}	Poly(3-hydroxytetradecanoate)
dodecyl	C_{15}	Poly(3-hydroxypentadecanoate)
tridecyl	C_{16}	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)

ภาพประกอบ 3 สูตรโครงสร้างเคมีของ PHAs

ที่มา : Lu, J.; Tappel, R.C.; & Nomura, C.T. (2009). Mini-review : Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). *Polymer.* 49: p. 226.

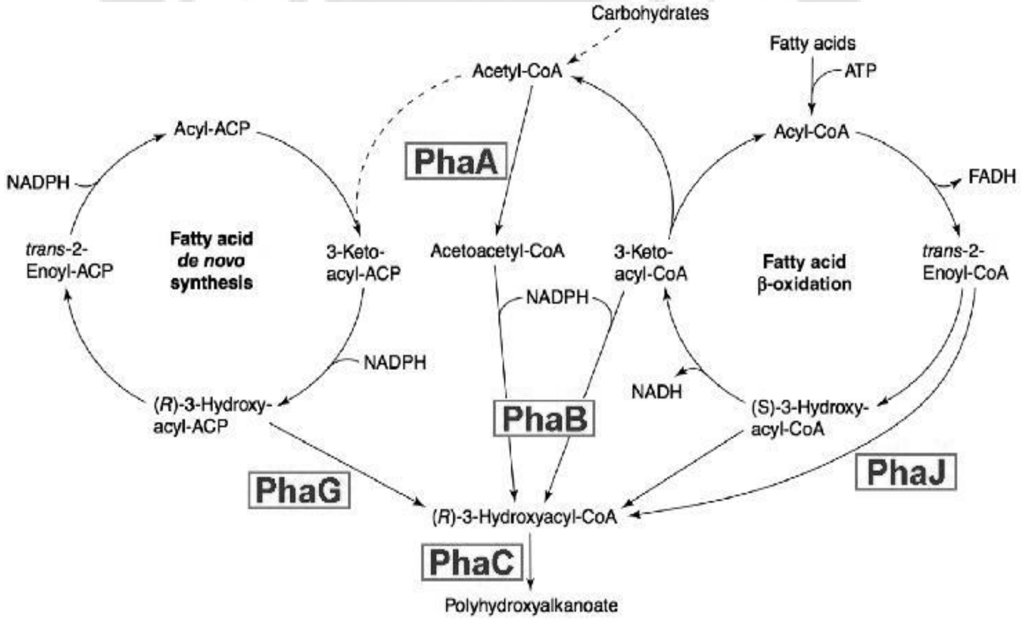
โครงสร้างของ PHAs ประกอบด้วยมอนอเมอร์หลักดังภาพประกอบ 3 และสามารถจำแนกได้ตามความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่ (R) ในหน่วยมอนอเมอร์นั่นคือ ความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่สั้น มอนอเมอร์จะประกอบด้วยอะตอมคาร์บอน 3-5 อะตอม ส่วนความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่ ปานกลาง มอนอเมอร์จะประกอบด้วยอะตอมคาร์บอน 6-14 อะตอม และความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่ยาว มอนอเมอร์จะประกอบด้วยคาร์บอนตั้งแต่ 14 อะตอมขึ้นไป PHAs ที่ผลิตได้โดยทั่วไปประกอบด้วยมอนอเมอร์ 100-30,000 หน่วย และมีความยาวสายโซ่ของหมู่แทนที่สั้น (กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2553: Online)

ในปี ค.ศ.2005 เจียมิน, ซินสกีและสตูบบ์ (Jiamin; Sinskey; & Stubbe. 2005: 3814-3824) ได้ทำการศึกษาการสะสมแกรนูลในช่วงเวลาต่างๆ ซึ่งพบพอลิเมอร์สูง 80-85 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้อง transmission electron microscopy (TEM) พบแกรนูลของ PHB 8-12 แกรนูลภายในเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2-0.5 ไมโครเมตร ดังภาพประกอบ 2 และเคยมีรายงานว่าที่ผิวของแกรนูลมีโปรตีน synthase (ยีน *phaC*) ปริมาณต่ำ และ phasin (ยีน *phaP*) ในปริมาณสูง และยังพบแบคทีเรียอื่นๆที่สะสมแกรนูล PHB ได้ เช่น *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* , *Rhodospirillum rubrum* และ *Chlorogloea fristschii* เป็นต้น

วิถีการสังเคราะห์สารพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต

การสังเคราะห์ PHAs มีกระบวนการที่สำคัญอยู่ 3 กระบวนการ ได้แก่ de novo fatty acid biosynthesis, chain elongation และ fatty acid β-oxidationซึ่งทั้ง 3 กระบวนการนี้มีสารประกอบคาร์บอนที่นำไปสังเคราะห์ PHAs ได้ คือ (R)-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein หรือ ACP, ketoacyl-CoA, (S)-3-hydroxyacyl-CoA และ 2-trans-enoyl-CoA โดยมีเอนไซม์ 3-hydroxyacyl-acyl-CoA-ACP transferase (ยีน *phaG*), ketoacyl-CoA reductase (ยีน *phaB*), 3-ketothiolase (ยีน *phaA*) และ enoyl-CoA hydratase (ยีน *phaJ*) เปลี่ยนสารประกอบคาร์บอนดังกล่าวไปเป็น (R)-3-hydroxyacyl-acyl-CoA ซึ่งเมื่อ (R)-3-hydroxyacyl-acyl-CoA เกิดปฏิกิริยา polymerization โดยเอนไซม์ PHA polymerase (ยีน *phaC*) จะได้ PHAs เป็นผลิตภัณฑ์

ในปี ค.ศ.2003 อัลดอร์และเคียส์ลิง (Aldor; & Keasling. 2003: 475-483) รายงานว่ามอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของสารพอลิเมอร์ชีวภาพนั้นจะขึ้นอยู่กับเอนไซม์ PHA synthase หรือ PHA polymerase และ hydroxyacyl-CoA thioester แต่อย่างไรก็ตามยังต้องพึ่งกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์และแหล่งคาร์บอนจากภายนอกเซลล์ กระบวนการสังเคราะห์มอนอเมอร์ของ PHAs มีวิถีการสังเคราะห์ที่สำคัญ เช่น tricarboxylic acid cycle หรือ (TCA), fatty acid degradation (β-oxidation) และ fatty acid biosynthesis ในการสังเคราะห์สารตั้งต้น และยังมีสารที่เกี่ยวข้องหลัก เช่น acetyl-CoA และ โคแฟกเตอร์ เช่น NADPH ดังแสดงในภาพประกอบ 4

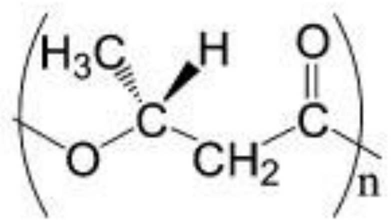


ภาพประกอบ 4 วิถีการสังเคราะห์พอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ของ *Pseudomonas* spp.

ที่มา : Aldor, S.I.; & Keaslingy, D.J. (2003). Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Biotechnology* 14: p. 478.

พอลีไฮดรอกซีบิวไทเรต (poly(3-hydroxybutyrate) หรือ PHB)

PHB เป็นอนุพันธ์ของสารพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอต ซึ่งจัดเป็นพอลิเมอร์ประเภทอะลิฟาติกพอลิเอสเตอร์ (aliphatic polyester) มีโครงสร้างเป็นสายยาว และมีคุณสมบัติเชิงกลของพอลิเมอร์คล้ายกับพลาสติกทั่วไป เช่น พอลิโพรพีลีน (polypropylene; PP) ซึ่งเป็นพลาสติกจากปิโตรเลียมที่ใช้ขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าในปัจุบัน ดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 สูตรโครงสร้างของพอลีไฮดรอกซีบิวไทเรต

ที่มา : Lenz, R. W.;& Marchessault, R. H. (2004). Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *ACS. Biomacromolecules.* 6: p. 2.

PHB เป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตและสะสมไว้เป็นแกรนูลภายในเซลล์จุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp., *Cupriavidus necator* และ recombinant *Escherichia coli* เป็นต้น การผลิตและสะสมพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรตเกิดขึ้นเมื่อเซลล์จุลินทรีย์เจริญภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมโดยเฉพาะในสภาวะที่สารอาหารไม่สมดุล สัดส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนแตกต่างกันสูงๆ โดยพอลีไฮดรอกซีบิวทิเรตที่จุลินทรีย์สะสมไว้ในเซลล์ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์

ในปี ค.ศ. 1986 สุซุกิและคนอื่นๆ (Suzuki; et al. 1986: 322-329) ได้รายงานการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. ด้วยเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลผลิต PHB เท่ากับ 66 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์ และทำการจำกัดความเข้มข้นของสารอาหารจากแหล่งไนโตรเจน ฟอตเฟต และแอมโมเนียมให้ต่ำลงเพื่อช่วยเพิ่มการสะสม PHB ได้มากขึ้น และการจำกัดการละลายของออกซิเจนจะไปลดการเจริญของเซลล์และผลผลิตของ PHB

ในปี ค.ศ.1995 เพจ (Page. 1995: 1-3) พบว่า PHB มีคุณลักษณะทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียสร้างสปอร์นั่นคือ *Bacillus* spp. ซึ่งมีการสร้าง lipid inclusion สะสมไว้ภายในเซลล์ในช่วง stationary phase ของการเจริญเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน

ในปี ค.ศ.1996 ยาเมเนและคนอื่นๆ (Yamane; et al. 1996: 165-170) ได้ทำการศึกษาการผลิต PHAs ด้วยเชื้อ *Alcaligenes latus* โดยใช้ซูโครสเป็นสับเสตรทพบว่าให้ปริมาณเซลล์สูงสุด 142 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 18 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักได้ PHB เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบการผลิต PHB ด้วยเชื้อ *Ralstonia eutropha* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะเดียวกันโดยใช้กลูโคสเป็นสับเสตรทพบว่าได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 122 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 30 แต่ได้ผลผลิต PHB สูงกว่าคิดเป็น 65 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์ และจากงานวิจัยของ เรนเนอและคนอื่นๆ (Renner; et al. 1996: 268-272) ได้ทำการศึกษาการผลิตโคพอลิเมอร์จากแบคทีเรีย 13 สายพันธุ์พบว่าแบคทีเรียต่างสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารกลุ่ม PHAs โดยให้อัตราส่วนของ PHB และ PHV ที่แตกต่างกัน

ในปี ค.ศ. 2000 พอล์และพอล (Pal; & Paul. 2000: p.58) ทำการคัดแยกเชื้อในจีนัส *Azotobacter* ซึ่งสามารถสะสม PHB ได้เท่ากับ 25-47 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และพบว่า *Azotobacter chroococcum* สามารถสะสม PHB ได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ในปี ค.ศ. 2003 ทาจิมะและคนอื่นๆ (Tajima; et al. 2003: 77-81) ทำการคัดแยกแบคทีเรียแกรมบวกจากดินทุ่งหญ้าพบว่าเชื้อ *Bacillus* sp.สายพันธุ์ INT005 สามารถผลิต PHAs ได้สูงกว่า *Bacillus megaterium* และ *Ralstonia eutropha* ที่อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส

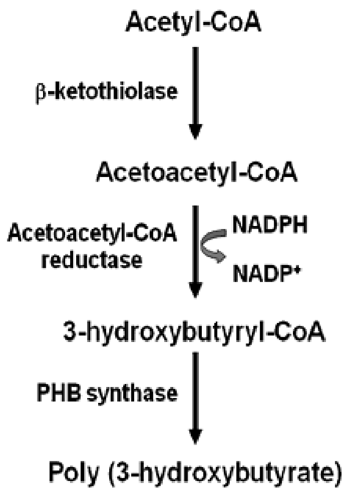
ในปี ค.ศ. 2004 อายับและคนอื่นๆ (Ayub; et al. 2004: 170-174) ทำการศึกษาเชื้อ *Pseudomonas* sp. จากแหล่งน้ำ Antarctic ซึ่งสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงด้วยออกทาโนเอท (octanoate) และทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อที่คัดแยกได้ด้วยยีนบริเวณ 16S ribosomal RNA

ในปี ค.ศ. 2005 โลเกชและคนอื่นๆ (Lokesh; et al. 2005: p.48) ทำการศึกษาแบคทีเรียที่ผลิต PHA จากเชื้อ *Sphingomonas* spp. ซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารผสมน้ำตาลที่หลากหลายและกรดอินทรีย์ เช่น ไดแซกคาไรด์ แอลโดเฮกโซส แอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์บางชนิดเมื่อเลี้ยงด้วยน้ำตาลซูโครสและแมนโนสให้ผลผลิต PHA ถึง 55-60 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์

ในปี ค.ศ. 2005 ยิลเมซและคนอื่นๆ (Yilmaz; et al. 2005: 565-566) ได้ทำการศึกษาเชื้อกลุ่ม *Bacillus* จำนวน 29 สายพันธุ์จากดินทุ่งหญ้าในประเทศตุรกีซึ่งจัดจำแนกเป็น *B. brevis, B. sphaericus*, *B. cereus, B. megaterium, B. circulans, B. subtilis, B. licheniformis* และ *B. coagulans* โดยสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 1.06-41.67 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งพบว่า *B. brevis* M6 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต PHB สูงสุด

วิถีการสังเคราะห์สารพอลีไฮดรอกซีบิวไทเรต

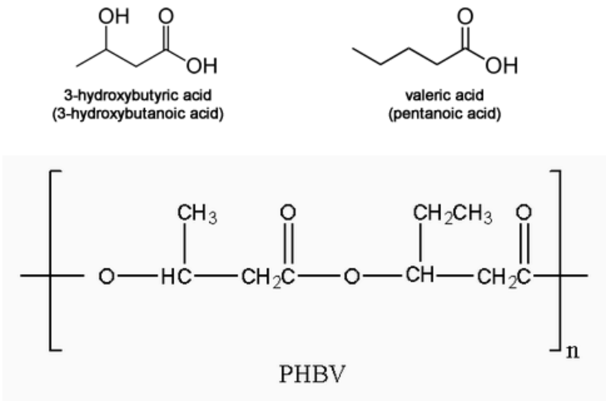
การสังเคราะห์ PHB ต้องเกี่ยวข้องกับวัฏจักรเคร็บ (TCA cycle) เมื่อแหล่งคาร์บอนถูกเปลี่ยนเป็นสาร อะเซตทิล-โคเอ (acetyl-CoA) แล้วเอนไซม์ เบตา-คีโตไทโอเลส (β-ketothiolase) (ยีน *phaA*) จะเปลี่ยน อะเซตทิล-โคเอ (acetyl-CoA) เป็น อะซิโตอะเซตทิล-โคเอ (acetoacetyl-CoA) จากนั้น อะซิโตอะเซตทิล-โคเอ (acetoacetyl-CoA) จะถูกเปลี่ยนเป็น ไฮดรอกซีบิวทิริล-โคเอ (3-hydroxybutyryl-CoA) และ โพลีไฮดรอกซีบิวทิเรต poly(3-hydroxybutyrate) โดยเอนไซม์อะซิโตอะเซตทิล-โคเอ-รีดักเทส (acetoacetyl-CoA reductase) (ยีน *phaB*) และพอลีไฮดรอกซี-บิวไทเรตซีนเทส (poly(3-hydroxybutyrate) synthase) (ยีน *phaC*) ตามลำดับ PHB จะถูกสะสมเป็นแกรนูลแล้วถูกล้อมรอบไปด้วยชั้นของ phospholipid monolayer, โปรตีน phasin (ยีน *phaP*) ทำหน้าที่ส่งเสริมการคงตัวของแกรนูล, เอนไซม์ polymerase (ยีน *phaC*), เอนไซม์ depolymerase (ยีน *phaZ*) ช่วยปลดปล่อย R-3-hydroxybutyrate โดยต้องอาศัยเอนไซม์อื่นๆมากระตุ้นให้เกิดการทำงานได้ เช่น ทริปซิน และ unknown protein เช่น cytosolic protein ส่วน phospholipid envelope ทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันไม่ให้สาร PHB เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น crystalline form ซึ่งจะไปทำลายเซลล์และป้องกันไม่ให้เซลล์ทำปฏิกิริยากับ PHB และ unknown protein อื่นๆ (Sudesh; & Doi. 2000: 1503-1555) ดังแสดงในภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 วิถีการสังเคราะห์พอลีไฮดรอกซีบิวไทเรต

ที่มา : Jo; et al. (2006). Production system for biodegradable polyester polyhydroxybutyrate by *Corynebacterium glutamicum. Journal of Bioscience and Bioengineering.* 102: p. 236.

พอลี(3-ไฮดรอกซีบิวไทเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาลีเรต) หรือ PHBV



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของ PHBV หรือ Poly(Hydroxybutyrate-*co*-Hydroxyvalerate)

ที่มา : Quarkology. (2012). from http://www.quarkology.com

PHBV หรือ poly(hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate) เป็นเทอร์มอพลาสติก ประกอบด้วยโครงสร้างของไฮดรอกซีบิวไทเรต หรือ hydroxybutyrate (HB) เชื่อมต่อกับโครงสร้างของไฮดรอกซีวาลีเรต หรือ hydroxyvalerate (HV) ดังภาพประกอบ 7 เริ่มมีการผลิต PHBV ขึ้น ในปี ค.ศ. 1980 โดยบริษัท Imperial Chemical Industries (ICI) ระดับโรงงานต้นแบบและใช้แบคทีเรียจีนัส *Alcaligenes* ในการผลิต และพบว่าสาร PHBV ที่ได้มีคุณสมบัติที่ดีกว่า PHB สามารถทนความร้อนได้สูง มีความยืดหยุ่นมากกว่า และมีคุณสมบัติในการนำมาขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้เหมือนกับพลาสติกประเภท polypropylene (Luzier, W.D. 1992: 839-842)

ในปี ค.ศ.1985 ฮอร์เมสและคนอื่นๆ (Holmes, P.A. et al. 1985: 32-36) ได้ทำการศึกษาการสะสมแกรนูล P(3HB-co-3HV) ของเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* โดยใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นของมอนอเมอร์ 3HB และใช้กรดโพรพิโอนิกเป็นโคพอลีเมอร์

ในปี ค.ศ. 1991 เชนและคนอื่นๆ (Chen; et al. 1991: 173-176) รายงานการผลิตโคพอลิเมอร์ระหว่าง 3HB กับ 3-hydroxyvalerate (3HV) ของเชื้อกลุ่ม *Bacillus* เมื่อทำการเพิ่มสารตั้งต้นประเภท n-alkanoic acids เช่น กรดโพรพิโอนิก กรดวารีลิก และกรดเฮปทาโนอิก

ในปี ค.ศ.1994 ฮอกกิงและมาเชสสอท (Hocking, P. J.; & Marchessault, R. H. 1994: p. 48-96) ได้ทำการศึกษาการสะสม PHB ของ mutant *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อนำกลูโคสมาเป็นแหล่งคาร์บอน และนำเชื้อชนิดเดิมไปเลี้ยงด้วยกลูโคสร่วมกับกรดโพรพิโอนิกแบบ two-staged fed-batch พบว่า *A. eutrophus* สามารถสะสม PHBV ได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งมีส่วนของ 3HV มอนอเมอร์อยู่ 33 โมลเปอร์เซ็นต์

ในปี ค.ศ. 1998 บรัวเนก เลอเฟบเบรอ และเจนเซอร์ (Braunegg; Lefebvre; & Genser. 1998) รายงานว่าบริษัท ICI ได้นำ *A. eutrophus* มาทำการผลิตโคพอลิเมอร์ชนิด HB/HV โดยเพิ่มแหล่งคาร์บอนผสมระหว่างกลูโคสและกรดโพรพิโอนิกในอัตราส่วนต่าง ๆได้ผลผลิตของ PHB/HV ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

ในปี ค.ศ. 2001 ลาบูเซกและราเดกกา (Labuzek;& Radecka. 2001: 353-357) รายงานการผลิตเทอร์โคพอลิเมอร์ชนิด 3HB, 3HV และ 6-hydroxyhexanoate (6HHx) ของเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ UW85A โดยใช้ ε-caprolactone เป็นสับเสตรท

ในปี ค.ศ. 2003 ทาจิมะและคนอื่นๆ (Tajima; et al. 2003: 77-81) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ INT005 สามารถผลิตสารกลุ่ม PHAs ได้หลากหลาย เช่น PHB, P(3HB-*co*-3HV), P(3HB-*co*-3HHx), P(3HB-*co*-4HB-*co*-3HHx), และ P(3HB-*co*-6HHx-*co*-3HHx) เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนจากสาร butyrate, valerate, hexanoate, octanoate, decanoate, 4HB, และ ε-caprolactone ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2010 อักกาคาร์ (Agharkar. 2010: p. 1-17) ได้รายงานถึงเชื้อที่สามารถผลิต PHBV ใช้สับเสตรทน้ำตาลกับกรดไขมัน เช่น *Alcaligenes faecalis, Pseudomonas aeruginosa, P. putida, B. cereus, B. mycoides, B. thuringiensis, B. megaterium*, *Methylobacterium* sp. และ *Azotobacter chrococcum* เป็นต้น

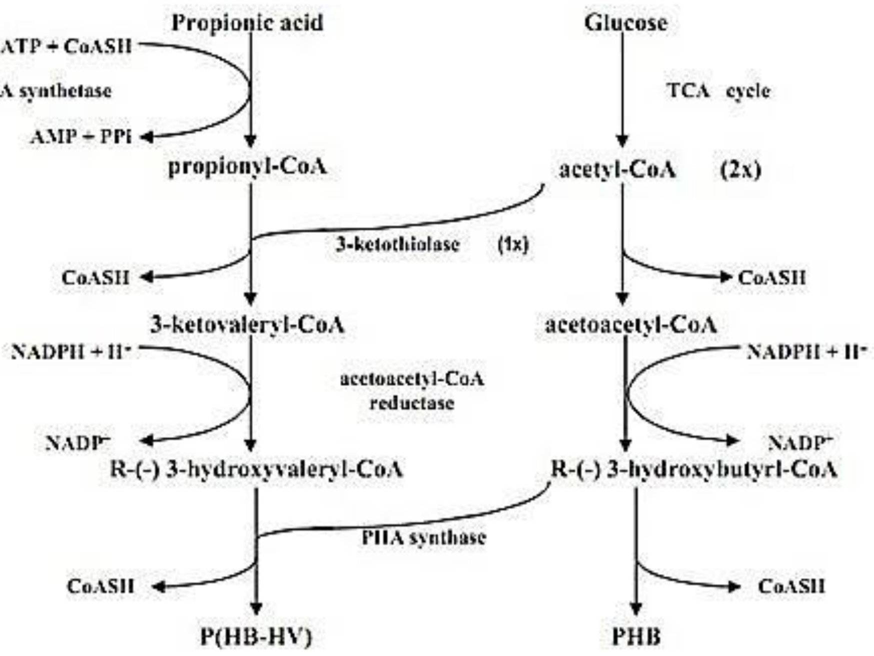
ในปี ค.ศ. 2012 เบอรีซินา (Berezina. 2012: 304-309) ได้รายงานถึงการผลิตสาร PHBV ของเชื้อ *Haloferax mediterranei* และ *Halomonas campisalis* จากสับเสตรท เช่น propionic acid, propanol, sodium propionate, valeric acid, pentanol, valerate, levulinic acid, heptanoic acid, น้ำมันมะกอก และน้ำมันดอกทานตะวัน และศึกษาการผลิต PHBV ของเชื้อ *Cupriavidus necator* ในถังหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยใช้ levulinic acid และ sodium propionate เป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลผลิตต่อหน่วยเวลา 2 และ 3.9 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2013 หวังและคนอื่นๆ (Wang; et al. 2013: 1-8) ทำการศึกษาคุณสมบัติและประสิทธิภาพการผลิต PHBV ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* H16 เมื่อใช้กรดลิววูลินิกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าได้ผลผลิตสูงสุด 12.61 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 15.53 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 53.9 เปอร์เซ็นต์

ในปี ค.ศ. 2014 ทอคและคิวลากัวแมน (Thuoc; & Quillaguaman. 2014: 991-997) ได้ทำการคัดแยกเชื้อ *Bacillus* sp. ND153 จากดินป่าชายเลนในเวียดนาม และนำมาศึกษาการผลิต PHAs ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของ NH_4Cl และ $MgSO_4$ ต่ำและมี KH_2PO_4 สูง และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิต PHAs ได้ถึง 79 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อนำสารโพรพิโอเนตมาใช้ร่วมกับแหล่งคาร์บอนกลูโคส พบว่าสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ชนิด PHBV ได้

วิถีการสังเคราะห์สารพอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

จากภาพประกอบ 8 แสดงวิถีการสังเคราะห์สาร PHB และ PHBV ของเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* จากสาร acetyl-CoA โดยอาศัยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ 3-ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase และ PHA synthase เมื่อเชื้อใช้แหล่งคาร์บอนจากกรดโพรพิโอนิกจะมีเอนไซม์ CoA-synthetase มาเปลี่ยนสารโพรพิโอนิกเป็น propionyl-CoA จากนั้นเอนไซม์ 3-ketothiolase จะมาเปลี่ยนสาร propionyl-CoA และ acetoacetyl-CoA ไปเป็น 3-ketovaleryl-CoA และเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase จะเปลี่ยนสารทั้งสองชนิดเป็น R(-)3-hydroxyvaleryl-CoA และสุดท้ายเอนไซม์ PHA synthase จะเข้าทำปฏิกิริยา polymerization นำสาร R(-)3-hydroxyvaleryl-CoA และ R(-)3-hydroxybutyryl-CoA มาเชื่อมต่อกันเป็น P(HB-HV) (Ojumu, T.V.;& Yu, J.; & Solomon, B.O. 2004: pp. 18-24)



ภาพประกอบ 8 วิถีการสังเคราะห์พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)

ที่มา : Ojumu, T.V.; & Yu, J.; & Solomon, B.O. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. African Journal of Biotechnology Vol. 3 (1): pp. 18-24.

คุณสมบัติทางกายภาพของ PHAs

ในปี ค.ศ.2007 เวอลินเดนและคนอื่นๆ (Verlinden; et al. 2007: 1437-1449) ได้รายงานว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs มีมวลโมเลกุล หรือ molecular mass (M_n) อยู่ในช่วง $4.0{\times}10^6$ ดาลตัน (Da) โดยมักมีความยาวของแต่ละโมเลกุลไม่เท่ากัน และน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน (M_w /M_n) ประมาณ 2.0 คุณลักษณะของพลาสติกชีวภาพเหล่านี้มีความใกล้เคียงกับพลาสติกทั่วไปอย่างเช่น polypropylene โดยได้เปรียบเทียบคุณสมบัติของ PHB, PHBV, PHB4B (scl) และ PHBHx (mcl) กับพลาสติก polypropylene (PP) ไว้ในตารางที่ 1 PHB มีความเป็นผลึกสูง (highly crystalline) แข็งแต่เปราะ เมื่อทำการฉีดเป็นเส้นใยจะเป็นวัสดุที่แข็งและยืดหยุ่น ส่วนโคพอลิเมอร์ เช่น PHBV (mcl-PHAs) มีความแข็งและเปราะน้อยกว่า PHB ส่วนใหญ่ PHB จะมีโครงสร้างผลึกแบบเกลียว (helical crystalline structure) PHAs มีจุดหลอมเหลว (melting point) และอุณหภูมิการสลายตัวแตกต่างกันไปตามชนิดของโคพอลิเมอร์ เมื่อเปรียบเทียบจาก PHB ของบริษัท Biopol® การสลายตัวจะเริ่มที่ 246.3 องศาเซลเซียส PHBV การสลายตัวจะเริ่มที่ 260.4 องศาเซลเซียสแสดงให้เห็นว่าถ้ามี valerate ในโครงสร้างจะทำให้พอลิเมอร์มีความคงตัวมากขึ้น

ส่วนคุณสมบัติของโคพอลิเมอร์ PHBV ขึ้นอยู่กับปริมาณ HV ที่เป็นองค์ประกอบ และการเติมสารเสริมสร้างพลาสติกโคพอลิเมอร์ PHBV ที่มีปริมาณ HV ร้อยละ 5-12 มี T_m ในช่วง 173-180 องศาเซลเซียส และ T_g ประมาณ 5 องศาเซลเซียส เนื่องจากหมู่เอทธิลซึ่งเป็นสายโซ่ด้านข้างของ HV ทำให้สายพอลิเมอร์มีการเรียงตัวกันอย่างไม่แน่น ส่งผลให้จุดหลอมเหลว ความทนต่อแรงดึง (tensile strength) และ modulus strength มีค่าลดลง ในขณะที่ความยืดหยุ่น (flexibility) ความทนต่อการกระแทก (impact strength) มีค่าเพิ่มขึ้น และสามารถทำให้เป็นเส้นหรือแผ่นบางได้ นอกจากนี้โคพอลิเมอร์ PHBV ยังมีความเสถียรในน้ำ น้ำมัน และแอลกอฮอล์ แต่ไม่ทนหรือทนน้อยต่อกรดและด่าง และสามารถย่อยสลายได้เร็วกว่า (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ: Online)

ตาราง 1 เปรียบเทียบคุณสมบัติของ PHB, PHBV, PHB4B, PHBHx และ PP

Parameter	PHB	PHBV	PHB4B	PHBHx	PP
Melting temperature (^{o}C)	177	145	150	127	176
Glass transition temperature (^{o}C)	2	-1	-7	-1	-10
Crystallinity (%)	60	56	45	34	50-70
Tensile strength (MPa)	43	20	26	21	38
Extension to break (%)	5	50	444	400	400

ที่มา : Verlinden; et al. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 102: p.1439.

การนำ PHAs ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ

ในปี ค.ศ. 2010 เชน (Chen, G.C. 2010: 17-30) ได้รายงานเกี่ยวกับการนำ PHAs มอนอเมอร์ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ดังนี้

1. ด้านการแพทย์ เช่น ไหมเย็บแผล (sutures) ตัวเย็บแผล (staples) วัสดุปิดแผล (wound dressing) อุปกรณ์ฝังในร่างกาย (surgical implants) อุปกรณ์สำหรับยึดกระดูก (orthopedic fixation devices) วัสดุสำหรับนำพาหรือปลดปล่อยตัวยา (drug delivery carriers) ซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. ด้านการเกษตร เช่น ภาชนะปลูกพืช วัสดุห่อหุ้ม วัสดุปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช หรือ ปุ๋ยตามช่วงเวลาที่กำหนด

3. ด้านบรรจุภัณฑ์ เช่น บรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ขวดแชมพู ถุงพลาสติก กล่องโฟม ฟิล์มสำหรับหีบห่อ เม็ดโฟมกันกระแทก ตัวเคลือบภาชนะกระดาษซึ่งทำจากพลาสติกชีวภาพผสมของ PHB-PHV โดยจะให้ความยืดหยุ่นได้สูง

4. ด้านเส้นใยและแผ่นผ้า เช่น ผลิตภัณฑ์อนามัย ผ้าอ้อมสำเร็จรูป เสื้อผ้าและเครื่องนุ่งห่ม เส้นใยสำหรับบรรจุในเครื่องนอน

5. ด้านพลังงาน พบว่า โคพอลิเมอร์ของ 3-hydroxybutyrate methyl ester หรือ 3HBME และ mcl 3-hydroxyalkanoate methyl หรือ 3HAME ซึ่งถูกเปลี่ยนแปลงมาจากโครงสร้างของ PHB และ mcl-PHA โดยปฏิกิริยา esterification เมื่อนำ 3HBME, 3HAME, ethanol, *n*-propanol, *n*-butanol, 0 diesel และ 90 gasoline มาผ่านกระบวนการเผาไหม้จะปลดปล่อยพลังงานของ 3HBME ประมาณ 20 kJ g^{-1} และ 3HAME ประมาณ 30 kJ g^{-1} เมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอลที่ได้พลังงานจากการเผาไหม้ประมาณ 27 kJ g^{-1} และถ้านำ 3HBME และ 3HAME มาผสมกับน้ำมันดีเซลหรือก๊าซโซลีนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานให้กับเครื่องยนต์ จะได้ 3HBME/diesel หรือ 3HBME/gasoline และ 3HAME/diesel หรือ 3HAME/gasoline ซึ่งมีราคาขายอยู่ที่ US $1,200 ต่อตัน

การคัดแยกแบคทีเรียด้วยสีย้อมชนิดต่าง ๆ

การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตสารพอลิเอสเทอร์ไว้ภายในเซลล์มีหลากหลายวิธี เพื่อเป็นการยืนยันการผลิตแกรนูลของ PHAs โดยมักนิยมตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แต่ก็มีขั้นตอนในการเตรียมเซลล์ค่อนข้างยุ่งยาก และหากต้องการคัดแยกแบคทีเรียจำนวนมากก็ยิ่งต้องใช้เวลานานและสิ้นเปลืองงบประมาณ จึงมีการคิดวิธีการนำสีย้อมชนิดไม่มีขั้ว และย้อมติดสารจำพวกไขมันมาช่วยในการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตสารพอลิเอสเทอร์ขึ้น เช่น Sudan black B ($C_{29}H_{24}N_6$), Nile blue A ($C_{40}H_{40}N_6O_6S$) และ Nile red ($C_{20}H_{18}N_2O_2$) เป็นต้น

ในปี ค.ศ.1940 ฮาร์ทแมน (Hartman. 1940) ได้รายงานการใช้สี Sudan black B ย้อมไขมันของแบคทีเรียเป็นครั้งแรก และแบคทีเรียที่ให้ผลบวกจะติดสีย้อมสีน้ำเงินภายในเซลล์ ได้แก่ *Bacillus cereus, Bacillus mycoides, Azotobacter beijerinckii, Rhizobium leguminosarum,*

Mycobacterium avium, Mycobacterium leprae, Oospora lactis, Bacillus tumescens และพวกเชื้อรา

ในปี ค.ศ. 1942 เบอร์ดอนและคนอื่นๆ (Burdon; et al.1942a) ได้ยืนยันการใช้สีย้อมไขมันภายในเซลล์แบคทีเรียโดยการย้อมเซลล์บนสไลด์ด้วยสารละลาย Sudan black B ในแอลกอฮอล์ แล้วย้อมทับด้วยสีซาฟรานิน

ในปี ค.ศ.1982 ออสเทิลและโฮลท์ (Ostle; & Holt.1982: 238-241) ได้รายงานว่า สี Nile blue A หรือ Nile blue sulfate เป็นสีในกลุ่ม oxazine ละลายได้ในน้ำและเอธิลแอลกอฮอล์ และยังมีสีในกลุ่มนี้อีก คือ Nile pink หรือ ปัจจุบันเรียก Nile red ผลิตได้จากการนำสี Nile blue มาละลายด้วยกรดซัลฟูริกแล้วนำไปต้มจะเกิดปฏิกิริยาจนกลายเป็น สี Nile red ซึ่งสีทั้งสองชนิดนี้สามารถย้อมติดไขมัน มักนำไปใช้กับงานด้านเนื้อเยื่อวิทยา (histology) เพื่อย้อมดูลักษณะของชิ้นเนื้อเยื่อ จึงนำสี Nile blue มาใช้กับการย้อม PHB เปรียบเทียบกับสีชนิดอื่นๆ ซึ่งพบว่า สี Sudan black B มีความว่องไวต่ำกว่าสี Nile blue A ต่อการคัดเลือกแกรนูลของ P(3HA) และชี้ให้เห็นว่าเม็ด PHB แสดงการเรืองแสงสีส้มที่เข้มกว่าเมื่อย้อมด้วยสี Nile blue A และในงานวิจัยอื่นๆ ได้มีการใช้สี Nile red ในการวัดปริมาณการเรืองแสงของ P(3HB) โดยสี Nile blue A จะเตรียมในปริมาตร 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายเอทานอลสำหรับการตรวจสอบโคโลนีแบคทีเรียบนอาหารแข็งซึ่งจะเรืองแสงสีส้มเมื่ออยู่บนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

ในปี ค.ศ.1985 กรีนสปันและคนอื่นๆ (Greenspan; et al.1985: 965-973) ได้รายงานว่าสีย้อม Nile red (Nile blue oxazone) เป็นสีแดงไม่มีขั้วได้จากการต้มสารละลาย Nile blue กับกรดซัลฟิวริก สามารถติดสีย้อมโดยเข้าไปจับกับหยดไขมันภายในเซลล์ สารนี้สามารถเรืองแสงได้เมื่อผสมกับโปรตีนที่ไม่มีขั้วแต่ส่วนใหญ่จะไม่เรืองแสงในสารละลายมีขั้ว ในสภาพที่มีไขมันมากจะสามารถเรืองแสงได้หลายสีตั้งแต่สีแดงเข้มจนถึงสีเหลืองทอง ความยาวคลื่น 485-525 นาโนเมตร การเรืองแสงของสีย้อมจะมากหรือน้อยขึ้นกับสารละลายที่ใช้ ความหนาแน่น และปริมาณของไขมัน

ในปี ค.ศ.1996 ทาคากิและคนอื่นๆ (Takagi; et al.1996: 123) ได้รายงานว่าการคัดแยกแบคทีเรียผลิต P(3HA) ด้วยสีย้อมแกรนูลมีหลายวิธี ที่ใช้กันมานานคือสี Sudan black B เป็นที่ยอมรับสำหรับการสันนิษฐานถึง P(3HB) ในเซลล์ และมีการใช้สี Sudan black B คัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียผลิต P(3HB) ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งจำกัดแหล่งไนโตรเจนได้

ในปี ค.ศ.1996 รอลทีและมาวินเคิฟ (Rawte; & Mavinkurve. 1998: p.241) ทำการคัดแยกแบคทีเรียผลิต PHB จากป่าชายเลนบริเวณปากแม่น้ำ Mandovi แล้วเลี้ยงบนอาหารแข็ง tributyrin agar จากนั้นจึงคัดแยกด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ Nile blue A พบว่า 60 ไอโซเลทสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศเองได้จึงสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจนอยู่

ในปี ค.ศ.1997 ครานซ์และคนอื่นๆ (Kranz; et al. 1997) ได้อธิบายวิธีการคักแยกเชื้อที่ผลิต PHAs ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *Rhodobacter capsulatus* โดยใช้สี Nile red ละลายในอะซิโตน เพื่อดูความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ได้กับที่ผลิต PHAs ไม่ได้

ในปี ค.ศ.1999 สปีเกอร์แมนและคนอื่นๆ (Spiekermann; et al.1999: 73-80) พบว่าสามารถเติมสีย้อมเหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อได้โดยตรงในปริมาตร 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไม่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ สามารถตรวจสอบการสะสม PHAs ได้ในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ โดยมีประสิทธิภาพทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ทั้งสี Nile red และ Nile blue A ไม่ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย และยังใช้สีกลุ่มนี้ในการย้อมดูโคโลนีของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Azotobacter vinelandii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, และ *Ralstonia eutropha* และแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus megaterium* และ *Rhodococcus ruber* ซึ่งอาจจะใช้ในการดูความแตกต่างระหว่าง wax, ester และ triacylglycerol ของแบคทีเรียทั้งแกรมลบและบวก

การสกัด PHAs ให้บริสุทธิ์

ในปี ค.ศ. 2013 กริฟฟิน (สิริลักษณ์ บัวทอง. 2551: 21-22 อ้างอิงจาก Griffin; 1994. pp. 8-154) ได้รายงานว่า การสกัด PHAs คือ การแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักแล้วนำไปย่อยเพื่อให้ผนังเซลล์แตกออกแล้วจึงแยก PHAs ออกจากกากตะกอนเซลล์ ในขั้นตอนการสกัดนี้มีผลต่อความบริสุทธิ์ของ PHAs และการย่อยสลายของพอลิเมอร์ การแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักมักใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง ส่วนการย่อยเซลล์นั้นทำได้ 3 วิธี ดังนี้

1. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) PHAs ถูกสกัดออกจากเซลล์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม เมทิลลีนคลอไรด์ 1,1,2-ไตรคลอโรเอทเธน หรือ โพรพิลีนคาร์บอเนต จากนั้นจึงกรองแยกกากออกแล้วตกตะกอน PHAs ด้วยการทำให้สารละลายเย็นตัวลงอย่างช้าๆ หรือเติม เมทานอล เอทานอล ไดเอทิลอีเทอร์ หรือ เฮกเซน หากต้องการให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยนำ PHAs ที่สกัดได้ไปละลายในคลอโรฟอร์มแล้วตกตะกอนด้วยไดเอทิลอีเทอร์หรือเฮกเซนอีกครั้ง และยังเพิ่มความบริสุทธิ์ได้ด้วยการล้างเซลล์ด้วยเมทานอล หรือ อะซิโตนก่อนการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อเพิ่มความสามารถในการเลือกผ่านเซลล์เมมเบรน ล้างไขมันและย่อยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ ออกก่อน จากวิธีนี้จะได้ PHAs ที่มีสีขาว น้ำหนักโมเลกุลสูง และมีความบริสุทธิ์สูง แต่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก

2. การย่อยด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite digestion) การสกัด PHAs โดยนำเซลล์ไปบ่มในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็นระยะเวลา 30-60 นาที เพื่อย่อยผนังเซลล์และสารประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่ PHAs จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยการล้างด้วยไดเอทิลอีเธอร์ หรือเมทานอลเพื่อแยกไขมันออก แต่การใช้สารเคมีที่มีความเป็นด่างสูงจะไปย่อยสลายสายพอลิเมอร์และทำให้น้ำหนักโมเลกุลเปลี่ยนแปลงไปด้วย

3. การย่อยด้วยเอนไซม์เฉพาะ (selective enzymatic digestion) วิธีนี้ใช้ความร้อนเพื่อช่วยในการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์และเอนไซม์ จากนั้นนำไปล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวเพื่อละลายเศษชีวมวลออกจาก PHAs แต่จะทำให้ผลผลิตมีความบริสุทธิ์น้อย ถ้าต้องการเพิ่มความบริสุทธิ์ต้องทำการสกัดร่วมกับตัวทำละลาย

ในปี ค.ศ. 1958 วิลเลียมสันและวิลคินสัน (Williamson; & Wilkinson. 1958: 198-209) ได้รายงานว่า การแยกพอลิเมอร์ของ PHB จากเชื้อ *Bacillus cereus* โดยใช้ 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรโซเดียมไฮโปคลอไรต์ย่อยผนังเซลล์นาน 60 นาที และล้างด้วยไดเอทธิลอีเธอร์ หรือ เมทานอล จะทำให้ได้พอลิเมอร์ที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น และการใช้สภาวะการสกัดที่เป็นด่างสูงจะทำลายสายพอลิเมอร์จึงมีผลต่อคุณสมบัติและโมเลกุลของพอลิเมอร์ โดยระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการใช้สารโซเดียมไฮโปคลอไรต์อยู่ที่ไม่เกิน 60 นาที ซึ่งจะได้ PHB สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และการใช้สารลดแรงตึงผิวก่อนทำการสกัดจะช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์และโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่สูงขึ้น

ในปี ค.ศ. 1990 ดอย (Doi. 1990) ได้อธิบายวิธีการสกัดคลอโรฟอร์มโดย PHAs จะถูกสกัดด้วยคลอโรฟอร์มร้อนนานกว่าชั่วโมง จากนั้น PHAs ถูกสกัดแยกออกจากส่วนของไขมันโดยการตกตะกอนกับอีเทอร์ เฮกเซน เมทานอล หรือเอทานอล สุดท้าย PHAs จะถูกละลายกลับในคลอโรฟอร์มให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเฮกเซน

ในปี ค.ศ. 1990 รัมเซย์และคนอื่นๆ (Ramsay; et al. 1990: 221-226) ได้ทำการศึกษาการสกัด PHAs ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* ด้วยสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ร่วมกับสารลดแรงตึงผิว 2 ชนิด คือ Triton X-100 และ sodium dodecyl sulfate (SDS) โดยสารลดแรงตึงผิวช่วยกำจัดโปรตีนออกไปได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไฮโปคลอไรท์จะช่วยย่อยโปรตีนได้อีก 10 เปอร์เซ็นต์

ในปี ค.ศ. 1994 รัมเซย์และคนอื่นๆ (Ramsay; et al. 1994: 589-594) ได้ทำการศึกษาการสกัด PHAs โดยใช้สารละลายอะซิโตนบ่มกับเซลล์ก่อน 15 นาที จากนั้นใช้คลอโรฟอร์ม 70 เปอร์เซ็นต์, methylene chloride 24 เปอร์เซ็นต์, และ 1,2-dichloroethane 66 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาชนิดละ 15 นาที ทำให้ได้ PHAs ที่มีความบริสุทธิ์จากสารละลายแต่ละชนิด 96, 95 และ 93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ฮาห์นและคนอื่นๆ (Hahn; et al. 1994: 34-39) ได้รายงานว่าสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์จะช่วยแยกสารที่ไม่ใช่ PHAs ออกจากส่วนของคลอโรฟอร์มได้ง่ายขึ้นโดยทำการสกัด PHAs จากเชื้อ *Ralstonia eutropha* สารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 30 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาทีและใช้คลอโรฟอร์มต่อสารละลายที่สกัดปริมาตร 1 ต่อ 1 (โดยปริมาตรต่อปริมาตร) จะได้ PHAs 91 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์และมีความบริสุทธิ์ถึง 97 เปอร์เซ็นต์

ฮุคคิงและคนอื่นๆ (Hocking; et al. 1994: 447-452) ได้รายงานว่ากระบวนการสกัด PHAs ในระดับอุตสาหกรรมต้องการปริมาณของ PHAs สูง โดยวัดจากเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของ PHAs ต่อน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ จึงมักใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกันโดยเอนไซม์ที่เลือกใช้ต้องไม่ทำปฏิกิริยาย่อยสลายกันเอง เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme) ฟอสฟอไลเปส (phospholipase) แลคซิเตส (lacitase) และ อัลคาเลส (alcalase) เป็นต้น

ในปี ค.ศ. 1996 แสตนเบอเชล (Steinbuchel. 1996: pp.403-464) ได้รายงานว่า บริษัท ICI ได้ใช้เอนไซม์หลายชนิดมาช่วยย่อยส่วนที่ไม่ใช่ PHAs ของเซลล์ เช่น lysozyme, phospholipase, lecithinase และ proteinase โดยที่ PHAs ไม่มีความเสียหายไปด้วย

ในปี ค.ศ. 2006 คาพริทครอฟและคนอื่นๆ (Kapritchkoff; et al. 2006: 453-462) ได้รายงานผลของการนำเอนไซม์มาสกัดแยก PHB ออกจากเซลล์ของ *Ralstonia eutropha* DSM545 โดยการใช้เอนไซม์ trypsin, bromelain, lysozyme, papain, bovine chymotrypsin และ cellulase นั้นขึ้นอยู่กับการแตกของเซลล์ พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ bromelain 2 เปอร์เซ็นต์ต่อมวลชีวภาพจะใช้เอนไซม์เท่ากับ 14.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 9.0 โดยให้ผลผลิตของ PHB ที่บริสุทธิ์ถึง 88.8 เปอร์เซ็นต์

ในปี ค.ศ. 2011 คุนาสุนดาริและสุเดช (Kunasundari; & Sudesh. 2011: 620-634) ได้รายงานการคัดแยกและวิธีสกัด PHAs จากเชื้อต่างๆ ไว้ว่าต้นทุนการผลิต PHAs ที่ราคาสูงส่งผลต่อส่วนแบ่งการขายทางการตลาดอันเนื่องมาจากขั้นตอนของการผลิตและกระบวนการทำบริสุทธิ์ของพลาสติกชีวภาพซึ่งปัจจุบันทั้งในห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรมได้มีวิธีสกัดแยก PHAs ที่หลากหลาย เช่น การใช้สารละลายอินทรีย์ (solvent extraction) สารเคมี (chemical digestion) เอนไซม์ (enzymatic treatment) วิธีกล (mechanical disruption) การสกัดด้วยเทคนิคซูเปอร์คริติคัลฟลูอิด (supercritical fluid disruption) การลอยแยกของสาร (flotation techniques) การใช้รังสีแกมมา (gamma irradiation) และการแยกชั้นของสาร (aqueous two-phase system) โดยเปรียบเทียบแต่ละวิธีจากความบริสุทธิ์ของผลผลิต PHAs ที่ได้ พบว่าจากการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์มได้ PHAs จากเชื้อ *Bacillus cereus* SPV ที่มีความบริสุทธิ์ 92 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณผลผลิต 31 เปอร์เซ็นต์ การสกัดด้วยสารเคมี เช่น SDS ได้ PHAs จาก recombinant *Escherichia coli* ที่มีความบริสุทธิ์ถึง 99 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณผลผลิต 89 เปอร์เซ็นต์ และสารโซเดียมไฮโปคลอไรต์ได้ PHAs จากเชื้อ *Cupriavidus necator* ที่มีความบริสุทธิ์ 86-93 เปอร์เซ็นต์ การสกัดด้วยเอนไซม์ เช่น ผสมเอนไซม์กับ SDS ได้ PHAs จากเชื้อ *Pseudomonas putida* ที่มีความบริสุทธิ์ 93 เปอร์เซ็นต์ การสกัดด้วยวิธีกล เช่น การแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียง (sonicate) ได้ PHAs จากเชื้อ *Bacillus flexus* ที่มีความบริสุทธิ์ 89 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณผลผลิต 20 เปอร์เซ็นต์ การสกัดด้วยเทคนิคซูเปอร์คริติคัลฟลูอิด เช่น ใช้ SC-CO_2 เป็นการสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลายได้ PHAs จากเชื้อ *C. necator* ที่มีปริมาณผลผลิตถึง 89 เปอร์เซ็นต์ วิธีการลอยแยกของสาร เช่น การใช้คลอโรฟอร์มร่วมในการสกัด ได้ PHAs จากเชื้อ *Zobellella denitrificans* ที่มีความบริสุทธิ์ 98 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณผลผลิต 85 เปอร์เซ็นต์ การใช้รังสีแกมมาจะใช้รังสีร่วมกับคลอโรฟอร์มได้ PHAs จากเชื้อ *B. flexus* ที่มีปริมาณผลผลิตถึง 45-54 เปอร์เซ็นต์ และการแยกชั้นของสารได้ PHAs จากเชื้อ *B. flexus* ที่มีความบริสุทธิ์สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณผลผลิตถึง 50 เปอร์เซ็นต์

การผลิต PHAs จากวัสดุเหลือทิ้งราคาถูก

การนำวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและการเกษตรมาเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานให้กับจุลินทรีย์เป็นวิธีที่ช่วยลดปัญหาของการกำจัดขยะที่เหลือจากกระบวนการผลิตในอุสาหกรรมต่างๆ ลดต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพที่ยังคงมีราคาสูงในท้องตลาด และเป็นวิธีการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับของเหลือใช้เหล่านั้นอย่างคุ้มค่า วัสดุที่นำมาเป็นแหล่งพลังงาน เช่น น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม กลีเซอรอลดิบ น้ำมันปาล์ม โมลาส น้ำแช่ข้าวโพด หางนมจากการทำชีสเป็นต้น

ในปี ค.ศ. 1992 เพจ (Page. 1992: 149-158) ได้รายงานการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นสับเสตรท เช่น โมลาสจากอ้อยและบีท มอลท์สกัด น้ำข้าวโพด รำข้าว แป้ง และน้ำเสียจากโรงงานผลิตชีส

ในปี ค.ศ. 1994 ลีและคนอื่นๆ (Lee; et al. 1994: 1337-1347) ได้รายงานว่าเชื้อ recombinant *Escherichia coli* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย เช่น กลูโคส ซูโครส แลกโตส และไซโลส และเลือกใช้วัตถุดิบราคาถูกจากโมลาส (molasses) เวย์ (whey) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose hydrolysate) มาลดต้นทุนการผลิต PHAs

ในปี ค.ศ. 1995 รัมเซย์ (Ramsay; et al. 1995: 262-266) ได้รายงานถึงการผลิต PHBV 60-70 เปอร์เซ็นต์ โดยมีส่วนประกอบของ PHV 20 เปอร์เซ็นต์ จากเชื้อ *Pseudomonas cepacia* ATCC 17759 เลี้ยงด้วยไซโลส (10 กรัมต่อลิตร) โดยได้ปริมาณเซลล์ 2.6 กรัมต่อลิตรคิดเป็น PHB 60 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักเซลล์เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่จำกัดแอมโมเนียม

ในปี ค.ศ.1999 เมดิสันและฮูสแมน (Madison; & Huisman. 1999.) ได้รายงานการใช้กลีเซอรอลดิบไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียโดยนำไปเป็นส่วนสำคัญในกาสังเคราะห์ PHAs ซึ่งกลีเซอรอลดิบจะมีส่วนประกอบหลัก คือ เอทานอลหรือเมทานอล,กลีเซอรีน, กรดเอทิล (หรือเมธิล) เอสเทอร์ กรดไขมันและไขมัน พบว่ามีแบคทีเรียกว่า 300 สายพันธุ์ที่สามารถสังเคราะห์ PHAs โดยเก็บสะสมไว้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในรูปแกรนูลภายในไซโทรพลาซึม การสังเคราะห์นี้จะถูกกระตุ้นจากการที่เซลล์ขาดแหล่งสารอาหารหลัก เช่น ไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัส หรือถูกจำกัดตัวรับอิเล็กตรอนอย่างออกซิเจน หรือเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีสารอาหารจำกัดจึงเกิดการเก็บสะสมคาร์บอนไว้เป็นแหล่งพลังงานชั่วคราว คาร์บอนจึงถูกเก็บสะสมไว้ในรูปแบบของโครงสร้าง PHAs ซึ่งปกติโครงสร้างที่พบ คือ poly-3-hydroxybutyrate (PHB), poly-hydroxyvalerate (PHV),และ poly-4-hydroxybutyrate (P4HB) ซึ่ง PHB จะมีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกพวก polypropylene

ในปี ค.ศ. 2000 คาเลียและคนอื่นๆ (Kalia; et al. 2000: 433-435) ได้รายงานการผลิต PHB โดยใช้สับเสตรทจากกรดไขมัน น้ำทิ้งจากบ้านเรือน เปลือกกล้วย เปลือกธัญพืช กากถั่ว เปลือกแอบเปิล ของเสียจากน้ำมันปาล์ม โดยใช้แบคทีเรีย เช่น *Alcaligenes eutrophus, Bacillus megaterium, Pseudomonas oleovorans, Azotobacter, Beijerinckia, Rhizobium* และ *Nocardia*

ในปี ค.ศ. 2001 กอดา, สวิลลัม และโอมา (Gouda; Swellam; & Omar. 2001: 201-207) ได้ศึกษาเชื้อ *Bacillus megaterium* โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยและน้ำแช่ข้าวโพดซึ่งเป็นสับเสตรทราคาถูกในประเทศอียิปต์ เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตพลาสติกชีวภาพได้ ในงานนี้จึงแสดงผลของแหล่งคาร์บอนที่มาที่แตกต่างกันที่ทำให้ได้ผลผลิต PHB สูงสุดด้วยกากน้ำตาลอ้อยและน้ำตาลกลูโคสมาเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ PHB เท่ากับ 40.8, 39.9 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยโมลาสที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ จะได้ PHB สูงสุด 46.2 เปอร์เซ็นต์ต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการสังเคราะห์ PHB ได้ถึง 32.7 มิลลิกรัมต่อเซลล์แห้ง และในงานวิจัยอื่นๆ ยังพบว่าเชื้อจะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อได้รับ แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมออกซาเลต หรือแอมโมเนียมฟอสเฟต มาเป็นแหล่งไนโตรเจน

ในปี ค.ศ. 2001 โอมาร์และคนอื่นๆ (Omar; et al. 2001: 1119-1123) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *Bacillus megaterium* ด้วยการเลี้ยงเชื้อในอาหารผสมน้ำเชื่อมและบีทโมลาสซึ่งสามารถผลิต PHB ได้สูงและเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูก

ในปี ค.ศ. 2005 ซูจาตาและคนอื่นๆ (Sujata; et al. 2005: 216-221) ทำการศึกษาแบคทีเรียผลิต PHB จากหลายสถานที่ เช่น ดินสวน น้ำทิ้งโรงงานฟอกหนัง ตะกอนน้ำเสีย โดยสามารถผลิต PHB ได้สูงสุดจากเชื้อแกรมบวกเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำทิ้งจากโรงงานฟอกหนังและตะกอนน้ำเสีย

ในปี ค.ศ. 2009 ซานติมาโนและคนอื่นๆ (Santomano; et al. 2009:89-96) ได้ศึกษาเชื้อ *Bacillus* sp. strain COL1/A6 ซึ่งแยกจากฮิวมัสมาทำการผลิต PHAs โดยนำของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการเกษตรได้แก่ เศษขนมปังจากโรงงาน เปลือกส้ม และกากน้ำตาลอ้อย มาเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ผลผลิตของ PHAs เท่ากับ 64.41, 54.68 และ 47.5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2009 กุลปรีชาและคนอื่นๆ (Kulpreecha; et al. 2009: 240-245) ทำการศึกษาการผลิต PHB ของเชื้อ *Bacillus megaterium* BA-019 โดยใช้โมลาสจากอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในถังหมักแบบ fed-batch ได้ผลผลิตสูงสุด 42 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ต่อมาในปี ค.ศ. 2011 ได้ทำการศึกษาการผลิต PHBV ของเชื้อ *Bacillus megaterium* P12 แบบสองระยะในถังหมัก 5 ลิตร เมื่อใช้น้ำตาลอ้อย 9 กรัมต่อลิตรและโซเดียมโพรพิโอเนต 4.5 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ผลผลิต PHBV 23.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และสัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 25 โมลเปอร์เซ็นต์

อันชูแมนและคนอื่นๆ (Anshuman A.; et al. 2009: p. 2558-2565) กล่าวไว้ว่าการนำของเสียมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการผลิต PHB ของเชื้อ *Bacillus megaterium* อย่างโมลาสจะได้ธาตุอาหารและวิตามินจากอ้อยไปช่วยส่งเสริมการสะสม PHB ได้ดี แต่ก็เคยมีการรายงาน

ว่าโมลาสที่นำไปใช้ผลิต PHB ของเชื้อ *Ralstonia eutropha* NRRL B14690 และพบว่าระหว่างการหมักเกิดเอทานอลและกรดกลูโคนิกขึ้นจึงไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้เช่นกัน

ในปี ค.ศ. 2011 แก้วกันเนตรและธนะมูล (Kaewkannetra; & Tanamool. 2011: 397-400) ได้รายงานว่าในประเทศไทยนั้นมีรายงานการผลิต PHAs จากจุลินทรีย์ในจีนัส *Bacillus* ที่นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเป็นแหล่งสารอาหารอยู่หลายฉบับ เชื้อ *B. aryabhattai* ที่แยกจากดินสามารถผลิต PHAs ได้สูงถึง 57.62 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์เมื่อนำน้ำข้าวฟ่างมาเป็นแหล่งคาร์บอน

ในปี ค.ศ. 2011 ราวีนเดรนและคนอื่นๆ (Raveendran; et al. 2011: 783-794) ได้ทำการศึกษาการผลิต PHB จากกลีเซอรอลดิบที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลของเชื้อ *Bacillus sphaericus* NII 0838 ที่เลี้ยงในอาหารจำกัดไนโตรเจนโดยให้ผลผลิต PHB เท่ากับ 31 เปอร์เซ็นต์ ค่า T_m 165.24 องศาเซลเซียส

ในปี ค.ศ. 2012 สังขรักษ์และประเสริฐสรรพ์ (Sangkharak; & Prasertsan. 2012: 173-182) ได้ทำศึกษาแยกเชื้อจากอาหารดอง ดิน น้ำเสีย มูลวัวและไก่ จนแยกได้ *Bacillus cereus* PHA 008 ที่สามารถผลิต PHA ได้สูงถึง 64.09 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อนำมาเลี้ยงด้วยน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มภายใต้สภาวะแบบไม่ใช้ออกซิเจน งานวิจัยเหล่านี้จึงเป็นการสร้างมูลค่าของของเหลือทิ้งและช่วยลดต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพได้

แบคทีเรีย *Bacillus cereus*

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียชนิดที่ทำให้เกิดโรค (pathogen) อาหารเป็นพิษ เซลล์ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive bacteria) รูปร่างท่อน (rod shape) สร้างสปอร์ได้ (spore forming bacteria) เจริญได้ในที่มีอากาศ (aerobic bacteria) สามารถสร้างสารพิษ (toxin) ที่ทนต่อความร้อนได้เมื่ออยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง เช่น ในร่างกายมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 28-37 องศาเซียลเซียส เจริญที่อุณหภูมิ 4-55 องศาเซลเซียล ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้ออยู่ระหว่าง 6-7 และสามารถเติบโตได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน และจะสร้างสารพิษเมื่ออยู่ภายใต้สภาพที่มีออกซิเจนน้อย จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเน่าเสียเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน โดยมีการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ไว้ดังนี้ (Drobniewski. 1993: 324-338)

Kingdom: Bacteria
  Phylum: Firmicutes
    Class: Bacilli
      Order: Bacillales
        Family: Bacillaceae
          Genus: Bacillus
            Species: cereus

ถึงแม้ *Bacillus cereus* จะเป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสียและเกิดอาการอาหารเป็นพิษในคน แต่ในการนำมาใช้ผลิตพลาสติกชีวภาพกลุ่ม PHAs พบว่า การนำเชื้อแกรมบวกมาผลิต PHAs เพื่อทำวัสดุทางการแพทย์จะไม่เป็นอันตรายต่อระบบต่าง ๆในร่างกาย เพราะองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกไม่มีส่วนของ LPS หรือ lipopolysaccharide ซึ่ง LPS มีคุณสมบัติเป็นสารพิษเอนโดทอกซิน พบอยู่ที่ชั้นนอกสุดของเมมเบรนชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น โดยมีส่วนประกอบสำคัญ (1) lipid A อยู่ในเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) มีความสำคัญในการเป็น toxic component (endotoxin) (2) core polysaccharide พบอยู่ที่ผิวเมมเบรนทำหน้าที่เชื่อม Lipid A กับ Core Polysaccharid (3) specific antigen หรือ O antigen polysaccharide เป็นส่วนที่ยื่นออกมาจากผิวเมมเบรน สำหรับในร่างกายมนุษย์ LPS จะไปจับกับตัวรับ CD14 บนโมโนไซต์ แมโครฟาจ หรือนิวโตรฟิล กระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติ การตอบสนองนี้จะหลั่ง cytokines และกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น อาการบวม มีเลือดออกและการขาดเลือดไปเลี้ยงอวัยวะสำคัญ ผู้ป่วยถึงแก่ชีวิตได้ (Chen; & Wu. 2005: 6565-6578)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)	BIOBASE
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator)	Shel-lab
3. ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker)	New Brunswick Scientific
4. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)	TOMY
5. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	Fisher Scientific
6. เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	Hsiangtat
7. เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)	Sorvall
8. กล้องจุลทรรศน์ (microscope)	Olympus
9. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence microscope)	Olympus
10. เครื่อง thermo cycler	Eppendorf
11. เครื่องอิเล็คโตรโฟเรซิส (electrophoresis)	Bioer Technology
12. ชุดถ่ายภาพเจล (gel doc)	Major science
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	ISOTEMP
14. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air sterilizing oven)	Astell
15. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (uv-vis spectrophotometer)	SHIMADZU
16. เครื่องให้กำเนิดแสง UV (uv transilluminator)	Labnet

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ตาราง 3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท
1. Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] (P-3HB)	Sigma
2. Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid)	Sigma
3. Sudan Black B (MW 456.54 g/mol)	Sigma
4. Nile red (MW 732.85 g/mol)	Sigma
5. Nile blue A (MW 318.37 g/mol)	Sigma
6. Chloroform ($CHCl_3$)	LAB-SCAN
7. Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bio Basic Inc.
8. Dichloromethane (CH_2Cl_2)	Merck
9. Methanol (CH_4O)	Ajax Finechem
10. Sulfuric acid	Merck
11. Luria Bertani broth (LB broth)	Bio Basic Inc.
12. Nutrient broth (NB)	TM MEDIA
13. Lysozyme	Bio Basic Inc.
14. Sodium hypochlorite (NaOCl)	Chemicals CO.LTD.
15. Tris	Research Organics,Inc
16. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Bio Basic Inc.
17. TEA buffer	Merck
18. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
19. Nucleospin®Extract II Kit	Macheray-Nagel
20. Ex *Taq* DNA polymerase	TaKaRa
21. Agarose	Bio-Active Co.,Ltd.
22. Acetic acid	Merck
23. D-Glucose	Bio Basic Inc.
24. D(+)-Xylose	Merck
25. L(+)Arabinose	HiMedia
26. Sucrose	Bio Basic Inc.
27. Lactose	DIFCO
28. Glycerol	OmniPur®

ตาราง 3 (ต่อ)

29. Fructose	Merck
30. Sodium propionate	Sigma
31. Levulinic acid	ALDRICH
32. Yeast Extract	Biotech
33. Peptone	Bacto™
34. Sodium Chloride (NaCl)	Univar
35. Potassium phosphate (KH_2PO_4)	Univar
36. Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	ALDRICH
37. Ammonium chloride (NH_4Cl)	Univar
38. Ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$	Univar
39. Potassium chloride (KCl)	Univar
40. (defatted) soybean meal	Bacto™
41. Casein	Bacto™

วิธีดำเนินการวิจัย

ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การเก็บกลุ่มตัวอย่างดินเพื่อนำมาคัดแยกแบคทีเรีย
2. การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพ PHAs ได้จากตัวอย่างดิน
3. การระบุชนิดแบคทีเรียด้วยการศึกษาลำดับเบสบริเวณยีน 16S rDNA
4. การศึกษาลักษณะเซลล์แบคทีเรียทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี
5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs
6. การศึกษาวิธีการสกัด PHAs ออกจากเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม 4 วิธี
7. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ให้ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่จำกัดสารอาหารและใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน
8. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs เมื่อเลี้ยงในอาหารจำกัดสารอาหารผสมกรดไขมันที่ให้ผลผลิตของพลาสติกชีวภาพในรูปแบบโครงสร้างของ PHBV ที่เป็นโคพอลิเมอร์ของ PHAs
9. การศึกษาการวิเคราะห์ผลผลิต PHAs ที่สกัดได้จากแบคทีเรียด้วยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ FTIR, NMR, SEM และ TEM

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บกลุ่มตัวอย่างดินเพื่อนำมาคัดแยกแบคทีเรีย

กลุ่มตัวอย่างดินที่นำมาคัดแยกแบคทีเรียถูกสุ่มเก็บมาจากหลากหลายสถานที่ในประเทศไทยซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชาภัค สมยูรทรัพย์ และ อาจารย์ ดร.ทายาท ศรียาภัย จำนวน 15 ตัวอย่าง คือ ดินบริเวณเขตป่าชายเลนจังหวัดสตูล (8 ตัวอย่าง) ดินนาเขตจังหวัดสตูลและจังหวัดราชบุรี (2 ตัวอย่าง) ดินและน้ำจากสวนปาล์มจังหวัดสตูล (2 ตัวอย่าง) ดินนาเขตจังหวัดนครนายก (3 ตัวอย่าง) และดินบริเวณรากพืชเขตจังหวัดเลย (1 ตัวอย่าง) โดยเก็บดินลึกลงไปจากหน้าดินประมาณ 5 เซนติเมตร ตัวอย่างดินที่นำมาศึกษา แสดงข้อมูลในตารางที่ 4 ดังต่อไปนี้

ตาราง 4 กลุ่มตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณต่างๆ ในประเทศไทย

ตัวอย่างดิน	สถานที่เก็บตัวอย่าง
1. ดินสวนปาล์ม	จ.สตูล
2. ดินป่าชายเลน	อ.ทุ่งหว้า จ.สตูล
3. ดินป่าชายเลน	อ.ละงู จ.สตูล
4. ดินป่าชายเลน	อ.เมือง จ.สตูล
5. น้ำหีบปาล์ม	จ.สตูล
6. ดินนาบ้านโคกโพยม	อ.ละงู จ.สตูล
7. ดินป่าชายเลนบ้านโคกโพยม	อ.ละงู จ.สตูล
8. ดินป่าชายเลนบ้านน้ำเค็ม	ต.ท่าแพ จ.สตูล
9. ดินป่าชายเลนบ้านหัวทาง	อ.เมือง จ.สตูล
10. ดินแปลงเกษตรเคมี	อ.องครักษ์ จ.นครนายก
11. ดินแปลงเกษตรอินทรีย์	อ.องครักษ์ จ.นครนายก
12. ดินห้วยน้ำพุร้อน	จ.ราชบุรี
13. ดินรากพืชในป่า	จ.เลย
14. ดินอุทยานขุนด่านปราการชล	จ.นครนายก
15. ดินป่าชายเลนบ้านน้ำเค็มใต้	ต.ท่าแพ จ.สตูล

2. การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ได้จากตัวอย่างดิน

2.1 การคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

ชั่งตัวอย่างดินมา 1 กรัม ละลายในสารละลาย Winogradsky salt solution (ภาคผนวก ข ข้อ 1) (Wang J.G.; et al. 1996: 94-101) ในอัตราส่วน 1:10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายดินในหลอดทดลองที่ระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} โดยแต่ละความเข้มข้นปิเปตลงบนอาหารแข็ง Yeast extract-peptone agar medium (YP) และ M9 Salts agar (ภาคผนวก ก ข้อ 1 และ 5) (Singh; & Parmar. 2011: 4907-4919) จานละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นกระจายสารละลายดินให้ทั่วทั้งจานอาหารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ถึง 5 วัน เลือกเก็บโคโลนีเดี่ยวแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงต่อในหลอดอาหารแข็งเอียง nutrient agar slant (ภาคผนวก ก ข้อ 3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันจึงย้ายไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการทดสอบขั้นต่อไป

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Sudan black B

นำแบคทีเรียที่เป็นเชื้อควบคุมและแบคทีเรียทุกไอโซเลทที่แยกได้มาวางกลมเป็นจุด (spot) ลงบนจานอาหารแข็ง nutrient agar ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคส (ภาคผนวก ก ข้อ 3) โดยเชื้อควบคุมที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas oleovorans*, *Azotobacter vinelandii* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) *Bacillus megaterium* ใช้เป็นเชื้อควบคุมผลบวกที่มีการสะสมพอลิเมอร์ และ *Escherichia coli* strain DH5α เป็นเชื้อควบคุมผลลบที่ไม่พบการสะสมของพอลิเมอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เตรียมสารละลาย Sudan black B (ภาคผนวก ข ข้อ 4) (Phanse; et al. 2011: 27-32) ที่ความเข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในเอทานอลเก็บไว้ในขวดสีชา หลังบ่มเชื้อครบ 3 วัน จากนั้นนำสารละลาย Sudan black B หยดทับโคโลนีให้ท่วมและวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเททิ้งและล้างด้วย 96 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลนาน 10 วินาที หลังจากนั้นบันทึกผลบวกโดยดูจากสีโคโลนีสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเข้มและผลลบของโคโลนีที่ไม่มีการติดสี

2.3 การศึกษาลักษณะแกรนูลภายในแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Sudan black B

การย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม Sudan black B (Singh; & Parmar. 2011: 4907-4919) โดยนำเซลล์ของทุกไอโซเลทที่ให้ผลบวกและเชื้อควบคุมมากระจายเชื้อ (smear) บนแผ่นกระจก ทิ้งให้แห้ง ตรึงเซลล์ด้วยความร้อนหยดทับด้วยสารละลาย 0.03 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร Sudan black B (ภาคผนวก ข ข้อ 4) ใน 60 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลนาน 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นหยดทับด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของซาฟรานินนาน 5 วินาที ล้างออกด้วย 96 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอล ตรวจสอบเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า จากนั้นบันทึกผลบวกจากการติดสีแกรนูลสีน้ำเงินเข้มภายในเซลล์ และผลลบจากการไม่ติดสีแกรนูลสีน้ำเงิน

2.4 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Nile red

คัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่ให้ผลบวกจากการทดสอบเมื่อย้อมด้วยสี Sudan black B มาทดสอบต่อในขั้นตอนนี้ โดยเตรียมสารละลายสี Nile red เตรียมจาก 0.25 มิลลิกรัมของ Nile red ต่อ 1 มิลลิลิตรของ Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Wang, J.G.; et al. 1996: 94-101) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปใส่ลงในอาหารแข็ง minimal agar ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของกลูโคส (ภาคผนวก ก ข้อ 3) เขย่าขวดอาหารเบาๆ เพื่อให้สีผสมเข้ากันดีก่อนเทลงจานเพาะเลี้ยง จากนั้นขีดเชื้อ (streak) ที่ต้องการทดสอบลงบนจานอาหารแข็งที่เตรียมไว้ นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบการเกิดสีเรืองแสงของเชื้อที่สามารถผลิต PHAs ได้โดยดูผลบวกจากการเรืองแสงสีส้มภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ช่วงคลื่นประมาณ 312 นาโนเมตร) และผลลบของเซลล์ที่ไม่เรืองแสง

2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Nile blue A

คัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่ให้ผลบวกจากการทดสอบด้วยการย้อมสี Sudan black B มาทดสอบต่อในขั้นตอนนี้ โดยเตรียมสารละลายสี Nile blue A เตรียมจาก 0.5 มิลลิกรัมของ Nile blue A ต่อ 1 มิลลิลิตรของ DMSO (Wang, J.G.; et al. 1996: 94-101) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารแข็ง minimal agar ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของกลูโคส (ภาคผนวก ก ข้อ 3) เขย่าขวดอาหารเบาๆ ให้สีผสมเข้ากันดีก่อนเทลงจานเพาะเลี้ยง จากนั้นขีดเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนจานอาหารแข็งที่เตรียมไว้ นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบการเกิดสีเรืองแสงของเชื้อที่สามารถผลิต PHAs ได้โดยดูผลบวกจากการเรืองแสงสีฟ้า

ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 312 นาโนเมตร) และผลลบของเซลล์ที่ไม่เรืองแสง

2.6 การศึกษาลักษณะเซลล์ที่ติดสีย้อม Nile blue A ภายในแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence microscope)

การทดลองนี้ได้ทำการย้อมสีตามวิธีของราวีนดราน (Raveendran; et al. 2011: 783-794) โดยนำเซลล์ของไอโซเลทที่ให้ผลบวกจากการย้อมด้วยสี Nile red และ Nile blue A และเชื้อควบคุมมากระจายเชื้อบนแผ่นกระจก ทิ้งให้แห้งในอากาศ (air dry) ตรึงเซลล์ด้วยความร้อน (heat fix) หยดทับด้วยสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของ Nile blue A วางบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วล้างด้วย 8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตรของกรดอะซิติก วางทิ้งไว้จนแห้ง จากนั้นนำไปตรวจสอบผลบวกจากการเรืองแสงสีแดง-ส้มของเซลล์ที่ย้อมติดสี Nile blue A ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ที่ช่วงความยาวคลื่น 390 นาโนเมตร

3. การระบุชนิดแบคทีเรียด้วยการศึกษาลำดับเบสบริเวณยีน 16S rDNA

3.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการศึกษาในอาหารเหลว Luria Bertani broth (ภาคผนวก ก ข้อ 4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเก็บเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที เก็บเฉพาะเซลล์ไปสกัดดีเอ็นเอ การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอเริ่มจากเติม TES buffer pH 8 (ภาคผนวก ข ข้อ 9) เพื่อละลายเซลล์ เติมเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) โดยเตรียมจากความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เติม 50 มิลลิโมลาร์ของ $MgCl_2$ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,100xg นาน 5 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วเติม HTE buffer pH 8 (ภาคผนวก ข ข้อ 10) และผสมเซลล์ให้เข้ากัน แล้วเติม 10 เปอร์เซ็นต์ของ sodium dodecyl sulfate (SDS) บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม solution III (ภาคผนวก ข ข้อ 12) บ่มที่อุณหภูมิ 0 ถึง 4 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,100xg นาน 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol โดยบ่มที่อุณหภูมิ 0 ถึง 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,100xg นาน 1 นาที สังเกตเห็นตะกอนอยู่ล่างสุดจึงเทส่วนใส

ทิ้งไป เติม 70 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอล นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเทส่วนใสทิ้ง วางทิ้งไว้จนแห้งแล้วละลายตะกอนด้วยการเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ double distilled water (ddH_2O) จากนั้นนำดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยเตรียม 1 เปอร์เซ็นต์ของ agarose gel (ผงอะกาโรส 1 กรัม ผสมกับ 0.5X TEA buffer 100 มิลลิลิตร นำไปหลอมละลายเทลง gel apparatus) หลังทิ้งเจลไว้จนแข็งตัวนำไปใส่ chamber เท 0.5X TEA buffer จนท่วมเจล นำดีเอ็นเอที่ผสม loading dye แล้วหยอดลงแต่ละช่องของเจลและเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda Hind III marker ต่อชุดอุปกรณ์ให้ครบสมบูรณ์และเปิดระบบไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่แยกตามขนาดต่างๆ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV light) จากนั้นตรวจสอบและเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการศึกษาขั้นต่อไป

3.2 การระบุชนิดของเชื้อด้วยวิธีวิเคราะห์ยีน 16S rDNA

วิธีวิเคราะห์ยีน 16S rDNA เพื่อยืนยันและระบุว่าเชื้อแต่ละไอโซเลทที่แยกได้มีความใกล้เคียงกับเชื้อชนิดใดในฐานข้อมูล GenBank เริ่มจากนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่อบริเวณยีน 16S rDNA ซึ่งมีลำดับเบส (Lane, D.J. 1991: pp. 115-175) ดังนี้

Forward primer : 16SmetaF 5’ -AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3’

Reverse primer : 16SmetaR 5’ -GGT TAC CTT GTT ACG ACT T- 3’

ตาราง 5 ส่วนประกอบการทำ PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน16S rDNA

ส่วนผสม PCR Reaction	**Volume**	**Final concentration**
1. TaKaRa Ex Taq™ (5 units/µl)	0.1 µl	0.5 unit
2. 10X Ex Buffer	2.5 µl	1X
3. 2.5 mM dNTP Mixture	1.5 µl	0.15 mM
4. Genomic DNA Template	1.0 µl	-
5. Primer 16SmetaF (20µM)	2.0 µl	1.6 µM
6. Primer 16SmetaR (20µM)	2.0 µl	1.6 µM
7. Sterile ddH_2O	15.9 µl	-
ปริมาตรสุทธิ		25.0 µl

การกำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA ด้วยเครื่อง Thermo cycler มีดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	5	นาที
ขั้นตอนที่ 2 denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	45	วินาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing	อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	2	นาที
ขั้นตอนที่ 4 extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	2	นาที
ขั้นตอนที่ 5 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4	เป็นจำนวน 30 รอบ (cycles)			
ขั้นตอนที่ 6 final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	10	นาที
ขั้นตอนที่ 7	อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	คงที่ตลอด		

นำผลผลิตของ PCR (PCR product) มาวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสตามขั้นตอนในข้อ 3.1 ได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (bp) จากนั้นตัดเก็บแถบดีเอ็นเอจากแผ่นเจลเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุด Nucleospin® Extract II Kit นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาจัดจำแนกแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทโดยมาหาลำดับเบสด้วยการทำ DNA Sequencing และนำผลลำดับเบสของดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ผลต่อด้วยโปรแกรม Bioedit และโปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสมาจัดทำแผนภาพวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 4.1 โดยเลือกลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกัน 2-3 ลำดับแรกมาเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ทำการศึกษาที่ค่า bootstrapping 1,000 ครั้ง

4. การศึกษาลักษณะเซลล์แบคทีเรียทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแกรม

เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการศึกษาในอาหารเหลว nutrient broth ที่เพิ่ม 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของกลูโคส (ภาคผนวก ก ข้อ 3) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยดน้ำกลั่นบนแผ่นกระจกโดยใช้ลูปกระจายเชื้อ ทิ้งให้แห้งในอากาศ ตรึงเซลล์ด้วยความร้อน หยดทับด้วยสีคริสตัลไวโอเลตนาน 1 นาที และเทสีทิ้งล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที หลังจากนั้นหยด 95 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอล ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสีซาฟรานินทิ้งไว้ 1 นาที เทสีทิ้งแล้วล้างน้ำกลั่น วางทิ้งไว้จนแห้งนำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จากนั้นบันทึกผลการติดสีม่วงของเชื้อแกรมบวก การติดสีแดงของเชื้อแกรมลบ และลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย (Beveridge. 2001)

4.2 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมี

เพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการศึกษาในอาหารแข็ง nutrient broth ที่เพิ่ม 1 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคสโดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก ข้อ 3) เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางชีวเคมีที่บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัดเพื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่มีรายงานผลมาก่อนหน้านี้ (Priest; et al., 1988) และศึกษาการทดสอบการใช้น้ำตาลได้แก่ กลูโคส ซูโครส ไซโลส อะราบิโนส แลคโตส โมลาส และ กลีเซอรอลลบริสุทธิ์ โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีม่วงของสีอินดิเคเตอร์ brom cresol purple ไปเป็นสีเหลือง แสดงว่าสามารถใช้น้ำตาลแล้วเกิดกรดขึ้นในอาหารเหลว nutrient broth ที่ผสมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs

5.1 การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs ด้วยแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

เริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว nutrient broth (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ของแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ กลูโคส ซูโครส อะราบิโนส ไซโลส แลกโตส และกลีเซอรอลบริสุทธิ์ เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที ชั่งน้ำหนักเซลล์เปียกและเก็บเซลล์ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปสกัด PHAs ในขั้นต่อไปทั้ง 4 วิธี จากนั้นจึงนำมาเปรียบเทียบหาปริมาณ PHAs ที่ได้สูงสุดของแต่ละไอโซเลท

5.2 การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs ด้วยแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

เริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว nutrient broth (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เปปโตน (peptone) และสารสกัดยีสต์ (yeast extract) เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที ชั่งน้ำหนักเซลล์เปียกและทำการสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม จากนั้นนำมาเปรียบเทียบหาปริมาณ PHAs ที่สกัดได้

5.3 การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ

เริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว N deficient medium (ภาคผนวก ก ข้อ 6) N limit medium (ภาคผนวก ก ข้อ 7) และ K limit medium (ภาคผนวก ก ข้อ 8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่เติมกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักเซลล์เปียกและสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยวิธีคลอโรฟอร์มเพื่อเปรียบเทียบปริมาณ PHAs ที่ได้

5.4 การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs ที่ค่าความเป็นกรด-เบส

เริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว N deficient medium (ภาคผนวก ก ข้อ 6) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคส เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยปรับค่าความเป็นกรด-เบสในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 5-9 ด้วยเครื่อง pH meter ก่อนนำอาหารเลี้ยงเชื้อไป autoclave ภายหลังจากเลี้ยงเซลล์ได้ 48 ชั่วโมง นำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักเซลล์เปียกและทำการสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยวิธีคลอโรฟอร์มเพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณ PHAs ที่ได้

5.5 การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

เริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว N deficient medium (ภาคผนวก ก ข้อ 6) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคส เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 จำนวน 8 ฟลาสก์โดยเก็บเซลล์แต่ละฟลาสก์ในระยะเวลาห่างกันทุก 6 ชั่วโมงจนครบ 48 ชั่วโมง ในแต่ละฟลาสก์เก็บเซลล์ปริมาตร 2 มิลลิลิตรเพื่อมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นนำเซลล์ที่เหลือมาสกัดหาปริมาณ PHAs ด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม

6. การศึกษาวิธีการสกัด PHAs ออกจากเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม 4 วิธี

6.1 การสกัด PHAs ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คลอโรฟอร์ม (Chang; et al. 1994: 256-261 และ Law, J.H.; & Slepecky, R.A. 1961: 33-36)

เริ่มจากนำเซลล์ที่เก็บไว้มาละลายด้วยสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที เติมคลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) และ 6 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) (อัตราส่วน 12.5 ไมโครลิตร:12.5 ไมโครลิตร) ต่อ

มิลลิกรัมของน้ำหนักเซลล์ที่ชั่งได้ เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที สังเกตเห็นการแยกชั้นของสารละลายเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นบนสุดเป็นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ชั้นกลางเป็นส่วนของตะกอนเซลล์ และชั้นล่างสุดเป็นสารละลายคลอโรฟอร์มกับ PHAs จากนั้นใช้ปิเปตดูดเก็บเฉพาะชั้นล่างสุดไปไว้ในหลอดใหม่ จากนั้นเติม 5 เท่าของเมทานอลต่อน้ำกลั่น (อัตราส่วน 7:3 โดยปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปปั่นเหวี่ยงผสมที่ความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที ย้ายสารละลายทั้งหมดไปไว้ในหลอดแก้ว เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าผสมเล็กน้อยปิดปากหลอดด้วยแผ่นฟลอยด์นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สังเกตเห็นตะกอนของ PHAs ที่ก้นหลอด จากนั้นเก็บมาชั่งน้ำหนักและเปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์แห้ง การหาปริมาณเปอร์เซ็นต์ PHAs ที่ผลิตได้ คิดได้โดยการเทียบอัตราส่วนระหว่างปริมาณ PHAs (กรัมต่อลิตร) ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ดังสมการ

$$\%\text{PHAs content} = \frac{\text{น้ำหนักของ PHAs (g/L)}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)}} \times 100$$

6.2 การสกัด PHAs ด้วยวิธีที่ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คลอโรฟอร์ม (ดัดแปลงจาก Naheed; et al. 2011: 4097-4104 และ Louis, P.; & Paladino, A. 2009)

6.2.1 การสกัด PHAs ด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) และความร้อนสูง

นำเซลล์มาละลายด้วยสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) หรือน้ำกลั่น ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที เติมสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์ของ SDSโดยน้ำหนักต่อปริมาตรและน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์ที่ชั่งได้ เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาทีเพื่อนำมาสกัดพลาสติกชีวภาพขั้นต่อไป

6.2.2 การสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS)

นำเซลล์แบคทีเรียละลายด้วยสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) หรือน้ำกลั่น ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที เติมสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์ของ SDS โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์ที่ชั่งได้ เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาทีเพื่อนำมาสกัดพลาสติกชีวภาพขั้นต่อไป

6.2.3 การสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) เอนไซม์และความร้อนสูง

นำเซลล์แบคทีเรียมาละลายด้วยสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) หรือน้ำกลั่น ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที เติมเอนไซม์ไลโซไซม์ความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์ที่ชั่งได้ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 20 เปอร์เซ็นต์ของ SDS โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์ที่ชั่งได้ เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที เพื่อนำมาสกัดพลาสติกชีวภาพขั้นต่อไป

หลังจากนั้นนำเซลล์ที่เก็บได้จาก ข้อ 6.2.1, 6.2.2 และ 6.2.3 มาทำการสกัดแยก PHAs ออกจากตัวเซลล์โดยเติม 5 เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ และสารละลายอินทรีย์ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1:1 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 9,100xg นาน 10 นาที สังเกตเห็นการแยกชั้นของสารละลายเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นบนสุดเป็นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ชั้นกลางเป็นส่วนของตะกอนเซลล์ และชั้นล่างสุดเป็นสารละลายคลอโรฟอร์มกับพลาสติกชีวภาพ PHAs จากนั้นใช้ปิเปตดูดเก็บเฉพาะชั้นล่างสุดไปไว้ในหลอดใหม่ เติมเมทานอล 2 เท่าของสารละลายที่เก็บได้ (เตรียมจากเมทานอลต่อน้ำกลั่น อัตราส่วน 7:3 โดยปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที ย้ายสารละลายทั้งหมดไปไว้ในหลอดแก้วแล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 0.1 มิลลิลตร เขย่าผสมเล็กน้อยปิดปากหลอดด้วยแผ่นฟลอยด์นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สังเกตเห็นตะกอนของพลาสติกชีวภาพที่ก้นหลอดแล้วเก็บมาชั่งน้ำหนัก และเทียบกับปริมาณเซลล์ที่เก็บได้ว่าสามารถผลิตพลาสติกชีวภาพได้เท่าใด คำนวณจากสูตรในข้อ 6.1

7. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ให้ได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำกัดสารอาหารและใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

เมื่อทราบแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม จากนั้นจึงเลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิต PHAs สูงสุด (ซูโครส, กลูโคส, ฟรุกโตส และกลีเซอรอลบริสุทธิ์) มาเลี้ยงเซลล์เปรียบเทียบกับโมลาส และ กลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) ซึ่งนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานให้กับแบคทีเรีย (Naheed; et al. 2011: 4097-4104) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ N deficient medium

(ภาคผนวก ก ข้อ 6) (Gowda; & Shivakumar. 2013: 794-802) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนตั้งแต่ 1-5 เปอร์เซ็นต์และเปรียบเทียบผลผลิต PHAs จากการใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่งเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที ชั่งน้ำหนักเซลล์เปียก และเซลล์ที่เหลือนำมาสกัดหาปริมาณ PHAs ด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม

8. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs เมื่อเลี้ยงในอาหารจำกัดสารอาหารผสมกรดไขมันที่ให้ผลผลิตของพลาสติกชีวภาพในรูปแบบโครงสร้างของ PHBV ที่เป็นโคพอลิเมอร์ของ PHAs

8.1 การศึกษาการผลิต PHBV ด้วยแหล่งคาร์บอนจากกรดไขมัน กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และ กรดลิววูลินิก (levulinic acid) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เริ่มจากเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว N deficient medium (ภาคผนวก ก ข้อ 6) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ กรดโพรพิโอนิกและกรดลิววูลินิกที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนตั้งแต่ 0.1-1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและเปรียบเทียบผลผลิต PHAs จากการใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที ชั่งน้ำหนักเซลล์เปียก สำหรับเซลล์ที่เหลือนำมาสกัดหาปริมาณ PHAs ด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกชีวภาพที่สกัดได้เพื่อยืนยันผลของสาร PHBV

8.2 การศึกษาการผลิต PHBV ด้วยแหล่งคาร์บอนจากกรดไขมัน กรดโพรพิโอนิก และ กรดลิววูลินิก ร่วมกับแหล่งคาร์บอนจากโมลาส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เริ่มจากเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว N deficient medium (ภาคผนวก ก ข้อ 6) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้กรดโพรพิโอนิกและกรดลิววูลินิกที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนตั้งแต่ 0.1-1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรผสมกับโมลาสที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นเปรียบเทียบผลผลิต PHAs จากการใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์กับ 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,100xg นาน 10 นาที ชั่งน้ำหนักเซลล์เปียก และเซลล์ที่เหลือนำมาสกัดหาปริมาณ PHAs ด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกชีวภาพที่สกัดได้เพื่อยืนยันผลของสาร PHBV

9. การศึกษาการวิเคราะห์ผลผลิต PHAs ที่สกัดได้จากแบคทีเรียด้วยเครื่องมือวิทยาศาสตร์

9.1 การยืนยันผลของการผลิต PHAs ด้วย FTIR spectrometer (Fourier Transform Infrared Spectrometer)

FTIR ใช้ในการวิเคราะห์ตรวจสอบโครงสร้างของสาร โดยการวัดการดูดกลืนรังสีที่อยู่ในช่วงอินฟราเรดที่อยู่ในช่วงเลขคลื่น (Wave number) ประมาณ 10-12800 cm^{-1} โดยส่งวิเคราะห์ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อยืนยันผลเปรียบเทียบกับสารพอลีไฮดรอกซีบิวไทเลต หรือ PHB (Sigma) มาตรฐานซึ่งให้ผลของสเปกตรัม C=O ของกลุ่มเอสเทอร์ (ester group) ที่ 1728 cm^{-1} และ -CH group ที่ 1282 cm^{-1} ส่วน PHBV แสดงเลขคลื่นที่ C=O 1737 cm^{-1} และ –CH ที่ 1303,1229, 1196 และ 797 cm^{-1} (Shamala; et al. 2009: 251–258) โดยนำ PHAs ที่สกัดได้มา อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่าง 2-3 มิลลิกรัมใส่หลอดแก้วแล้วละลายด้วยสารคลอโรฟอร์ม 500 ไมโครลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR spectrometer รุ่น Perkin Elmer FT-IR spectrum BX. (Raveendran; et al. 2011: 783-794

9.2 การยืนยันผลของการผลิต PHAs ด้วย ^{1}H-nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

NMR เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ และโครงสร้างในสารละลายของสารประกอบเหล่านี้ได้โดยการใช้รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่อยู่ในช่วงคลื่นวิทยุเข้าไปกระตุ้นอะตอมในสารประกอบตัวอย่างที่อยู่ในสนามแม่เหล็กที่กำหนดไว้และแสดงออกมาเป็นค่าของ chemical shifts โดยส่งวิเคราะห์ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อยืนยันผลเปรียบเทียบกับสารพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต PHB (Sigma) มาตรฐาน ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับค่า chemical shifts 5.25 ppm (ส่วนในล้านส่วน) และ PHBV มีค่า chemical shifts 5.17 ppm (ส่วนในล้านส่วน) โดยนำ PHAs ที่สกัดได้มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่าง 20-70 มิลลิกรัมใส่หลอดแก้วแล้วละลายด้วยสาร ดิวเทอโรคลอโรฟอร์ม ($CDCl_3$) 1 มิลลิลิตร นำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องรุ่น Bruker AVANCE 300 FT-NMR spectrometer และบันทึก spectrum ที่ช่วงคลื่น 300 MHz และ 75 MHz (Andreal; et al. 2010: 1119-1127)

9.3 การยืนยันผลของการผลิต PHAs ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด หรือ SEM (Scanning Electron Microscope)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีกำลังขยายไม่สูงเท่ากับเครื่อง TEM การสร้างภาพทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่สะท้อนจากพื้นผิวหน้าของตัวอย่างที่ทำการสำรวจซึ่งภาพที่ได้จากเครื่อง SEM นี้จะเป็นภาพลักษณะของ 3 มิติ ดังนั้นเครื่อง SEM จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาสัณฐานและรายละเอียดของลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง เช่น ลักษณะพื้นผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อและเซลล์ โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรุงเทพมหานคร เตรียมตัวอย่างจากการนำโคโลนีแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง Nutrient agar ที่มีกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

9.4 การยืนยันผลของการผลิต PHAs ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน หรือ TEM (Transmission electron microscopy)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่ใช้ศึกษาตัวอย่างแบคทีเรียเพื่อยืนยันผลการสะสมแกรนูล PHA ภายในเซลล์ โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เริ่มเตรียมตัวอย่างจากการนำโคโลนีแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว N deficient medium ที่มีกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขี่ยเชื้อมาละลายใน 2 เปอร์เซ็นต์ของ glutaraldehyde แล้วนำสารละลายเซลล์หยดลงบนแผ่นกริด (grid) และเคลือบทับด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ของ uranyl acetate ปล่อยทิ้งไว้จนแห้งแล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน รุ่น JEM-2100 (200kV) ที่กำลังขยาย 5x1000 เท่า (Berlanga; et al. 2006: 95-102)

9.5 การวิเคราะห์น้ำตาลโมลาส

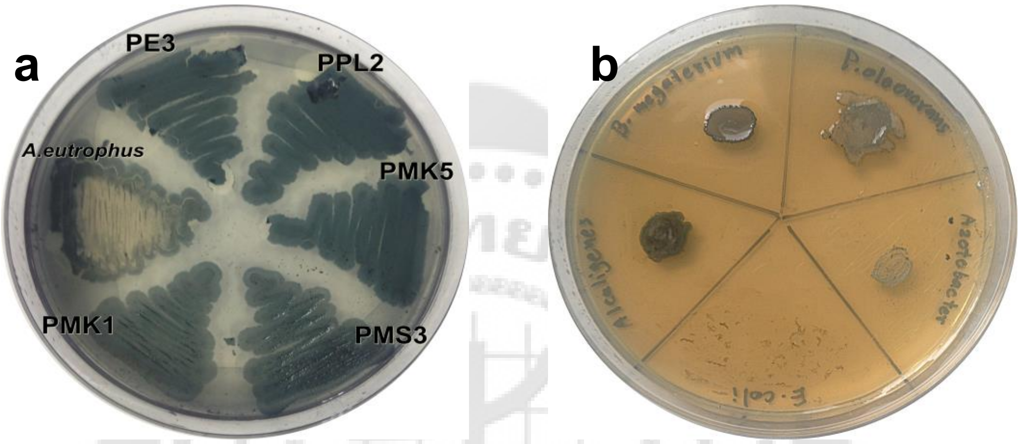
การวิเคราะห์น้ำตาลโมลาสเพื่อศึกษาส่วนประกอบต่าง ๆที่สำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย และเปรียบเทียบปริมาณแหล่งสารอาหารที่จำเป็นต่อการผลิต PHAs เช่น ซูโครส, กลูโคส, ฟรุกโตส และสารประกอบไนโตรเจน เป็นต้น (Beedle; et al. 2000: 375-383) โดยทำการเตรียมตัวอย่างน้ำตาลโมลาสบรรจุใส่ขวดแก้ว ปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และนำส่งวิเคราะห์ตัวอย่างที่ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เพื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Sudan black B

จากการนำตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยทั้งหมด 15 ตัวอย่างมาทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโดยเลี้ยงบนอาหารแข็งที่จำกัดสารอาหาร yeast extract-peptone agar medium (YP) และ M9 Salts agar จนได้โคโลนีเดี่ยวจากเพลทที่ความเจือจางตั้งแต่ 10^{-3} จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงต่อบนอาหาร nutrient agar ที่เพิ่มปริมาณกลูโคสลงไป 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ w/v) เป็นเวลา 3-5 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ได้ส่วนใหญ่เจริญเติบโตโดยให้โคโลนีสีขาวขุ่น (cream) หรือ เหลือง (yellow) รูปร่างโคโลนีกลม (circular) และรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) ขอบโคโลนีมีทั้งแบบโค้งมนเสมอกัน (entire) และแบบหยักไม่สม่ำเสมอ (undulate) ผิวหน้าโคโลนีเรียบแบน (smooth and flat) (Seeley; & Vandemark. 1962) หลังจากนั้นเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบมาขีดวนเป็นจุดกลม (spot inoculation) และขีดลงบนอาหารแข็งชนิดเดิมโดยเลี้ยงต่อเป็นเวลา 3 วัน จึงย้อมทับด้วยสีย้อม Sudan black B และล้างออกด้วยเอทานอล 96 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตรต่อปริมาตร หรือ v/v)ผลการทดลองพบว่ามีการติดสีของโคโลนีที่แตกต่างกัน คือ โคโลนีของแบคทีเรียที่คาดว่าน่าจะสามารถสะสม PHAs ได้จะติดสีย้อมสีฟ้า-น้ำเงินเข้ม จึงบันทึกผลการติดสีย้อมตามความเข้มของ สีบนโคโลนีด้วยสัญลักษณ์บวก (+) โดยเปรียบเทียบกับการติดสีของเชื้อควบคุมที่ให้ผลบวก คือ *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas oleovorans, Azotobacter vinelandii* และ *Bacillus megaterium* โดยให้ (+) คือ ติดสีได้น้อย (poorly stained), (++) คือ ติดสีได้ปานกลาง (medium stained), (+++) คือ ติดสีได้ดี (strongly stained) และ(++++) คือ ติดสีได้ดีมาก (excellently stained) ส่วนโคโลนีที่ไม่ติดสีย้อมหรือติดสีย้อมน้อยมากจะถือว่าเป็นผลลบ (-) ไม่สามารถสะสม PHAs ได้โดยใช้เชื้อ *Escherichia coli* strain DH5α เป็นเชื้อควบคุมของผลลบ จากโคโลนีทั้งหมดได้ผลบวกของการติดสีย้อม Sudan black B มากกว่า 200 ไอโซเลทซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่มาจากดินในป่า จังหวัดเลย ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม, ดินป่าชายเลน และดินนาข้าว จังหวัดสตูล ดินในแปลงเกษตร จังหวัดนครนายก จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อทำการทดสอบด้วยสีย้อม Nile blue A และ Nile red ต่อไป สำหรับผลการติด สีย้อม Sudan black B ของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสะสม PHAs ได้แสดงตัวอย่างไว้ดังภาพประกอบ 1(a) พบการติดสีย้อมได้ดี

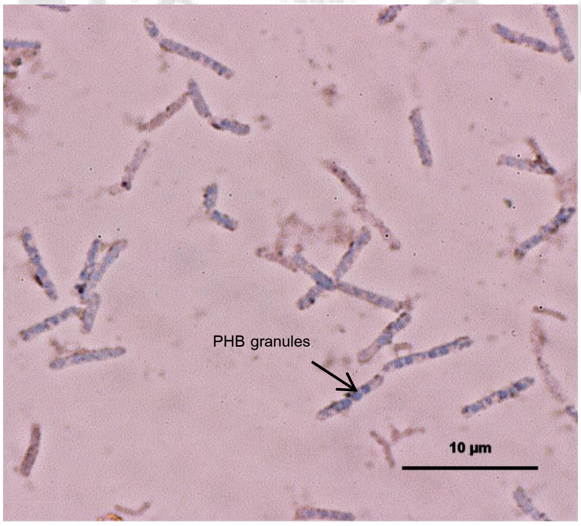
มาก (++++) ของแบคทีเรียไอโซเลท PE3, PPL2, PMK5, PMS3, PMK1 และการติดสีได้ดี (+++) ของเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* และภาพประกอบ 9 (b) แสดงการติดสีย้อมของเชื้อควบคุมทั้งหมด คือ *Alcaligenes eutrophus* (+++), *Bacillus megaterium* (++), *Pseudomonas oleovorans* (+) และ *Azotobacter vinelandii* (+) สำหรับ *Escherichia coli* strain DH5α ซึ่งเป็นเชื้อควบคุมผลลบไม่พบการติดสีย้อมของ Sudan black B และหลุดออกจากหน้าอาหารเมื่อล้างด้วยเอทานอล



ภาพประกอบ 9 การติดสีย้อม Sudan black B ของ (a) ไอโซเลท PE3, PPL2, PMK5, PMS3, PMK1 และ *Alcaligenes eutrophus* และการติดสีย้อม Sudan black B ของ (b) เชื้อควบคุมผลบวก *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas oleovorans, Azotobacter vinelandii*, และเชื้อควบคุมผลลบ *Escherichia coli* strain DH5α

2. การศึกษาลักษณะแกรนูลภายในเซลล์แบคทีเรียที่ผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Sudan black B

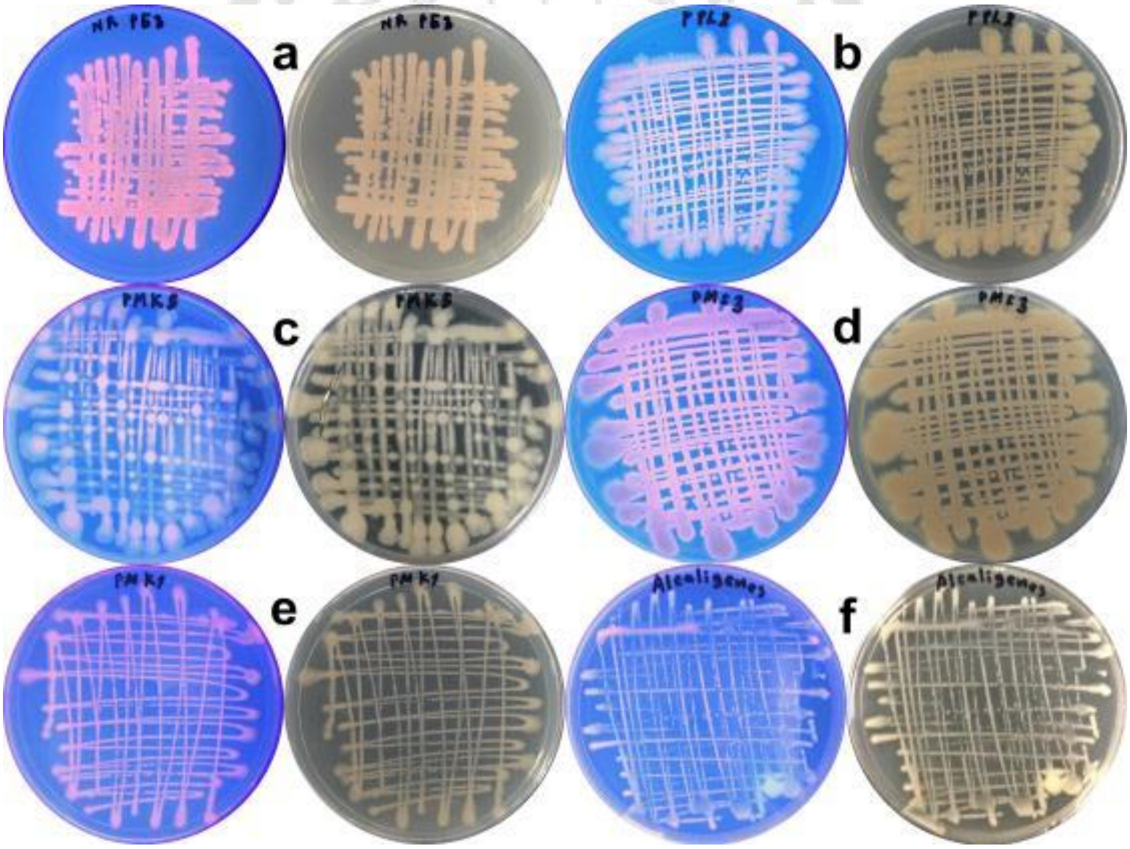
เมื่อคัดแยกแบคทีเรียจากดินแหล่งต่างๆ ด้วยการย้อมสีโคโลนีแบคทีเรีย จากนั้นเพื่อยืนยันผลการทดลองในการย้อมติดสี Sudan black B ของแต่ละไอโซเลทที่มีการสะสมแกรนูล PHAs จึงนำแบคทีเรียทุกไอโซเลทที่ให้ผลบวกมาเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth เพิ่มกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และนำมาตรึงบนแผ่นกระจก จากนั้นย้อมทับด้วยสี Sudan black B ที่ความเข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และสีซาฟานิน (Singh; & Parmar. 2011: 4907-4919) แล้วจึงส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อตรวจสอบการติดสีของแกรนูล PHAs ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสม PHAs จะสังเกตเห็นการติดสีฟ้าเข้มของ Sudan black B บนผิวของแกรนูลที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมขนาดเล็กภายในเซลล์ หลังส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ร่วมกับชุดกล้องถ่ายภาพดิจิตอลด้วยกำลังขยาย 500 เท่า พบว่าเห็นการติดสีฟ้าของ Sudan black B ลักษณะเป็นเม็ดกลมเล็กๆ เรียงต่อกันภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ดังแสดงในภาพประกอบที่ 10 แต่อาจสังเกตความชัดเจนของเม็ดสีบนแกรนูล PHAs ได้ค่อนข้างน้อยและมีการจับตัวเป็นก้อนของสี Sudan black B บนแผ่นกระจกบางส่วน อาจจะเป็นเพราะสีที่ติดบนแกรนูลถูกชะล้างออกไปด้วยเอทานอลในขั้นตอนการล้างสีขั้นสุดท้ายจึงมองเห็นสีฟ้าได้ไม่ชัดเจนและการละลายของสีที่ยังไม่ดีพอทำให้สีจับตัวเป็นก้อนได้ จึงทำให้สังเกตแกรนูลภายในเซลล์ด้วยสายตาได้ยากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพียงอย่างเดียว



ภาพประกอบ 10 การย้อมติดสี Sudan black B บนแกรนูล PHAs ภายในเซลล์แบคทีเรียของไอโซเลท PE3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รุ่น Olympus BX51 และกล้องถ่ายภาพดิจิตอล Canon EOS 450D ที่กำลังขยาย 500 เท่า

3. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ด้วยสีย้อม Nile red

ภายหลังจากการคัดแยกแบคทีเรียด้วยสีย้อม Sudan black B จากนั้นจึงนำทุกไอโซเลทที่ให้ผลบวกมาขีดเชื้อลงบนหน้าอาหารแข็ง minimal agar ที่เพิ่มกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และไซโลส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ผสมรวมกับสีย้อม Nile red (Wang, J.G.; et al. 1996: 94-101) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการบันทึกผลบวกของไอโซเลทที่มีความสามารถในการสะสม PHAs โดยการวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลทที่ช่วงความยาวคลื่น 300-500 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าไอโซเลทที่ให้ผลบวกจะแสดงการเรืองแสงสีแดง-ส้มของโคโลนีตามรอยขีดเชื้อบนหน้าอาหารได้อย่างชัดเจน ส่วนไอโซเลทที่ให้ผลลบจะไม่มีการแสดงการเรืองแสงของโคโลนีเกิดขึ้น ดังนั้นจากแบคทีเรีย 200 ไอโซเลทที่ทำการคัดแยกด้วยสี Sudan black B จึงเหลือผลบวกจากการเรืองแสงสีส้มของ Nile red บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของกลูโคสเป็นจำนวน 64 ไอโซเลท และบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของไซโลสเป็นจำนวน 27 ไอโซเลท ดังแสดงในภาพประกอบที่ 11

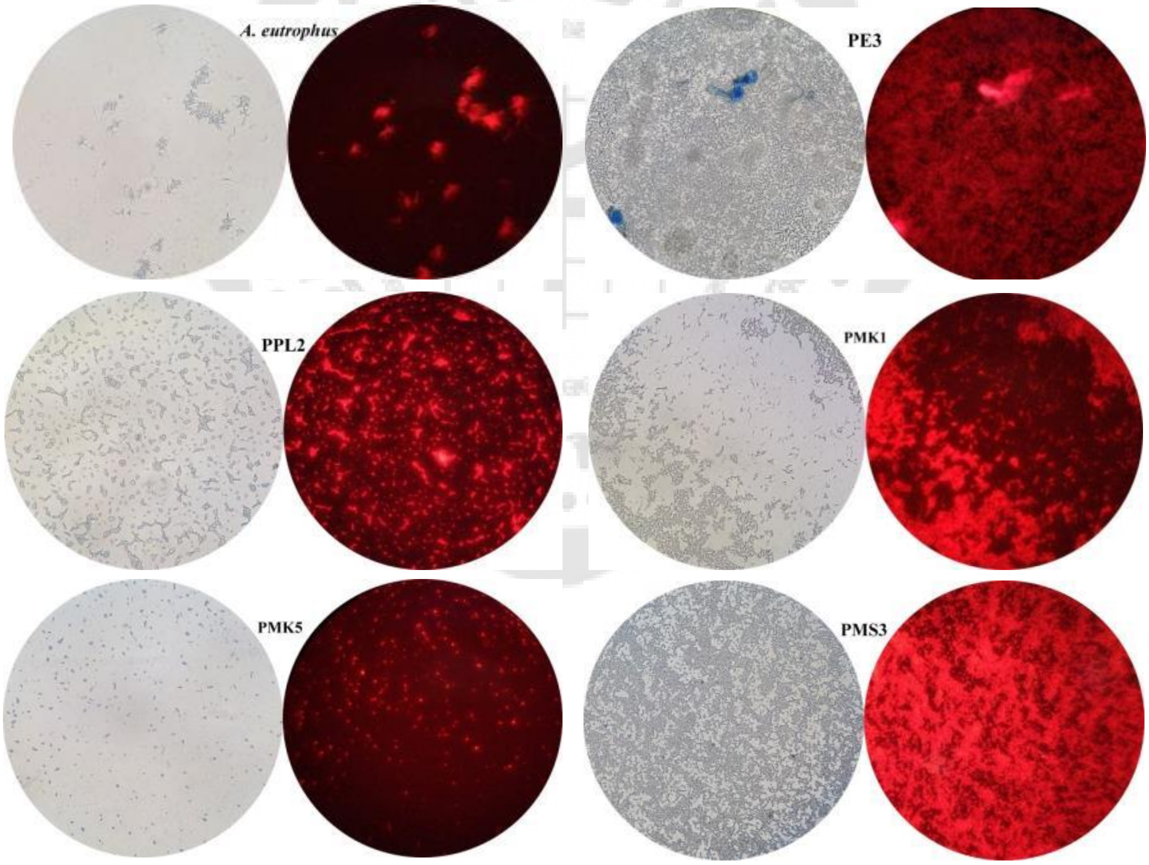


ภาพประกอบ 11 การเรืองแสงของโคโลนีบนอาหารแข็ง minimal agar ผสมสี Nile red ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ภาพซ้าย) และ โคโลนีภายใต้แสงปกติ (ภาพขวา) ของไอโซเลท (a) PE3, (b) PPL2, (c) PMK5, (d) PMS3, (e) PMK1 และ (f) *Alcaligenes eutrophus*

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

5. การศึกษาลักษณะเซลล์ที่ติดสีย้อม Nile blue A ภายในแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนต์

การศึกษาลักษณะเซลล์ที่ติดสีย้อม Nile blue A ภายในแบคทีเรียทำได้โดยนำเซลล์ของไอโซเลทที่ให้ผลบวกจากการย้อมด้วยสี Nile red และ Nile blue A มาย้อมด้วยสารละลายสี Nile blue A 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (Raveendran; et al. 2011: 783-794) แล้วจึงนำมาตรวจสอบการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนต์ Olympus BX51 ที่ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 390 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าการเรืองแสงสีส้ม-แดงของเซลล์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสม PHAs ดังแสดงในภาพประกอบ 13 ส่วนแบคทีเรียที่ไม่มีการเรืองแสงสีใด ๆของเซลล์แสดงว่าไม่สามารถสะสม PHAs และ *Escherichia coli* strain DH5α นั้นพบว่าไม่มีการเรืองแสงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนต์



ภาพประกอบ 13 การย้อมติดสี Nile blue A ภายในเซลล์แบคทีเรียของ ไอโซเลท *Alcaligenes eutrophus*, PE3, PPL2,PMK1, PMK5 และ PMS3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus BX51 (UV filter) ที่ช่วงความยาวคลื่น 390 นาโนเมตร

ตารางที่ 6 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากสีย้อม 3 ชนิด

Sudan black B	**Nile red**		**Nile blue A**
(glucose)	(glucose)	(xylose)	(glucose)
200+	64	27	29

6. การระบุชนิดแบคทีเรียด้วยการศึกษาลำดับเบสบริเวณยีน 16S rDNA และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)

6.1 การศึกษาลำดับเบสบริเวณยีน 16S rDNA

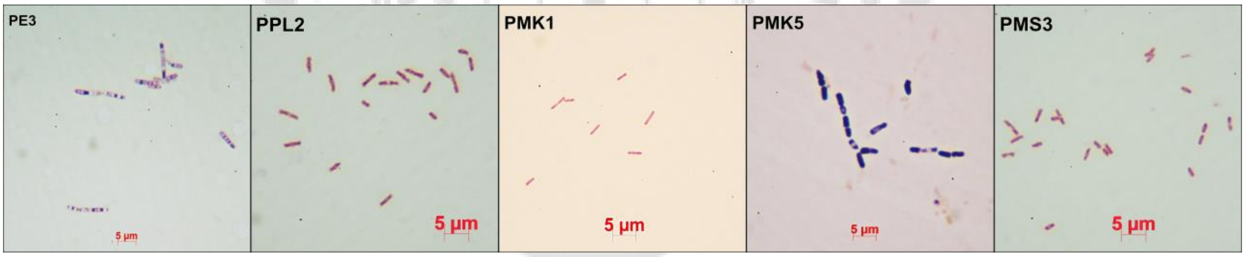
การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียเพื่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรียนั้นนิยมตรวจสอบที่ยีน 16S rDNA ซึ่งพบในแบคทีเรียทุกชนิดมีขนาดประมาณ 1500 คู่เบสหรือมากกว่า โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB broth จากนั้นนำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) แล้วจึงทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และนำผลผลิตของดีเอ็นเอ หรือ PCR product ที่ได้มาทำการตรวจสอบขนาดที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส จะได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส เปรียบเทียบกับขนาดของ 100 bp DNA ladder marker ดังแสดงในภาพประกอบ 14 ซึ่งจะเห็นแถบของดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทที่ได้ทำการศึกษาการผลิต PHAs แล้วได้ผลผลิตสูงสุด 5 ลำดับแรกจากทุกไอโซเลทที่คัดเลือกด้วยสีย้อม จากผลการทดลองพบว่ามีแถบของดีเอ็นเอที่ศึกษาขึ้นในบริเวณเดียวกันกับ marker ที่ขนาด 1.5 กิโลเบส (Kb) จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ก่อนส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำมาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียอื่นๆในฐานข้อมูล GenBank

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

7. การศึกษาลักษณะเซลล์แบคทีเรียทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี

7.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characterization)

หลังจากคัดแยกแบคทีเรียที่สะสม PHAS ด้วยสีย้อมทั้ง 3 ชนิด จากนั้นจึงนำเชื้อมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี โดยเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว nutrient broth ที่เพิ่มกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (ภาคผนวก ก ข้อ 3) เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเซลล์ตามวิธีย้อมแกรมเพื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่ทำการศึกษาจัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งสังเกตได้จากการย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) มีความยาวของเซลล์ตั้งแต่ 2-5 ไมโครเมตร และในตัวเซลล์ของสายพันธุ์ PE3 ยังพบการติดสีม่วงของสีคริสตัลไวโอเลทมีลักษณะเป็นจุดเข้มเรียงตัวภายในเซลล์อย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพประกอบ 16 และเห็นการติดสีเป็นจุดม่วงเข็มได้ชัดเจนที่สุดของสายพันธุ์ PE3 และ PMK5 ซึ่งตัวเซลล์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่นๆ ส่วนสายพันธุ์ PPL2 และ PMS3 มีการติดสีม่วงน้อยกว่าแต่ยังสามารถสังเกตเห็นลักษณะเซลล์เป็นท่อนสั้นมีจุดม่วงเข้มที่บริเวณหัวและท้ายของตัวเซลล์ ส่วนสายพันธุ์ PMK1 มีขนาดเซลล์ค่อนข้างเล็กกว่าเซลล์อื่นๆ



ภาพประกอบ 16 การย้อมสีแกรมของ PE3, PPL2, PMK1, PMK5 และ PMS3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

7.2 ลักษณะทางชีวเคมี (Biochemistry characterization)

การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียสายพันธุ์ PE3 ซึ่งเป็นการตรวจหาสารเคมีบางชนิดที่แบคทีเรียมีการผลิต เช่น โปรตีน กรดไขมัน เพื่อจำแนกจีนัส (Genus) ของแบคทีเรียซึ่งจีนัสเดียวกันนั้นคุณสมบัติของแบคทีเรียนั้นจะคล้ายกันอาจจะแตกต่างกันทางชีวเคมีในการใช้สารบางอย่างทำให้สามารถแยกแบคทีเรียชนิดนั้นออกเป็นสปีชีส์ (species) ได้เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารจำเพาะชนิดต่าง ๆ ข้อมูลดังกล่าวสามารถหารายละเอียดในการจำแนกแบคทีเรียได้จากหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1^{st} editon ปี 1986 Volume 2 และ 2^{nd} editon ปี 2009 Volume 3

ผลการทดสอบยืนยันได้ว่าสายพันธุ์ PE3 คือแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus cereus* และนำผลทดสอบที่ได้มาเปรียบเทียบกับลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Priest; et al. 1988) พบว่าสายพันธุ์ PE3 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเหลว nutrient broth ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน คือ กลุ่มแอโรบิคแบคทีเรีย (aerobic bacteria) ที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophile) ตั้งแต่ 30-37 องศาเซลเซียส ที่ค่า pH เท่ากับ 6-8 (neutrophile) สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 0-5.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ซึ่งมีความทนทานต่อเกลือได้สูง เมื่อทดสอบด้วยอาหารจำเพาะจะให้ผลบวก (+) ในอาหาร Vogas Proskauer, Hydrolysis starch, Hydrolysis casein, Hemolytic activity, Nitrate, Tyrosine, Oxidase, Methyl Red และให้ผลลบ (-) เมื่อทดสอบด้วยอาหาร Citrate, Indole, Catalase และ PE3 ยังมีความสามารถในการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย คือ Glucose, Sucrose, Xylose และ Glycerol แต่สามารถเจริญในอาหารที่มีน้ำตาล Arabinose และ Lactose ได้น้อยกว่าแหล่งคาร์บอนอื่นๆ โดยสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีม่วงของสีอินดิเคเตอร์ brom cresol purple จากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง ซึ่งแสดงว่ามีการใช้น้ำตาลแล้วผลิตกรดเกิดขึ้นและดูจากปริมาณเซลล์ที่เจริญได้ในอาหารเหลว nutrient broth ที่ผสมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ และเชื้อนี้ยังสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนอย่างน้ำตาลโมลาสจากอ้อย (sugarcane molasses) ซึ่งเป็นผลพลอยได้หรือของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมการเกษตร ดังสรุปไว้ในตารางที่ 6 และ NR (not show result) หมายถึง ไม่มีการรายงานผลไว้

ตารางที่ 7 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของ สายพันธุ์ PE3 เปรียบเทียบกับ *B.cereus*

Characterization	Strain PE3	*B.cereus*
Growth conditions		
Optimum temp. (^{o}C)	30-37	37
Optimum pH	6-8	6-8
Tolerance to NaCl (%, w/v)	5.0	< 2.0
Physiological		
Vogas Proskauer	+	+
Citrate	-	+
Hydrolysis starch	+	+
Hydrolysis casein	+	+
Hemolytic activity	+	NR
Nitrate	+	NR
Tyrosine	+	NR
Indole	-	-
Catalase	-	+
Oxidase	+	+
Methyl Red	+	+
Rhizoid growth	-	NR
Toxin crystal	-	NR
Growth on source		
Glucose	+	+
Sucrose	+	+
Lactose	+	-
Arabinose	+	NR
Xylose	+	-
Glycerol	+	+
Sugarcane molasses	+	NR

8. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ของเชื้อแบคทีเรียที่สนใจทั้ง 5 สายพันธุ์

8.1 การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs เมื่อเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ และทำการสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี

เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียด้วยสีย้อมทั้ง 3 ชนิด จากนั้นนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว nutrient broth เพิ่ม 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ กลูโคส, ซูโครส, ไซโลส, อะราบิโนส, แลกโตส และกลีเซอรอลบริสุทธิ์ โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียเพื่อนำมาสกัดแยกพลาสติกชีวภาพออกจากตัวเซลล์ด้วย 4 วิธี คือ (1) การสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์คลอโรฟอร์ม (chloroform), (2) การสกัดด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) และความร้อนสูง, (3) การสกัดด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) และ (4) การสกัดด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) ร่วมกับเอนไซม์ และความร้อนสูง จากนั้นเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตพลาสติกชีวภาพที่ได้จากการสกัดทั้ง 4 วิธีในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพประกอบ 17-22

8.1.1 การสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยสารละลายอินทรีย์คลอโรฟอร์ม

การสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์คลอโรฟอร์มเป็นวิธีที่นิยมใช้มานาน เพราะจะได้ผลผลิตพลาสติกชีวภาพจากเซลล์แบคทีเรียที่ค่อนข้างสะอาดและปริมาณสูง เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกด้วยสีย้อมทั้งหมดมาทำการเลี้ยงในอาหารเหลวผสมกลูโคสและสกัดเซลล์ด้วยคลอโรฟอร์ม ผลการทดลองพบว่าจากแบคทีเรียทั้งหมดได้ผลผลิตสูงสุดจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ PE3 จากตัวอย่างดินในป่า PPL2 จากตัวอย่างดินปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม PMK1, PMK5 และ PMS3 จากตัวอย่างดินป่าชายเลน จึงนำทั้ง 5 สายพันธุ์มาทำการเลี้ยงต่อในแหล่งคาร์บอนต่างๆ และเลือกใช้แบคทีเรีย *Alcaligenes eutrophus* ซึ่งเคยมีรายงานว่าสามารถผลิต PHAs ได้มาสกัดพลาสติกชีวภาพเพื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่สนใจศึกษา หลังจากสกัด PHAs จากเซลล์พบว่าสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ PMS3, PE3, PPL2, PMK5, *Alcaligenes eutrophus* และ PMK1 ตามลำดับซึ่งสายพันธุ์ PE3 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ครบทุกชนิดและให้ผลผลิต PHAs สูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคส เท่ากับ 0.6 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.34 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 44.78 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ซูโครสให้ PHAs เท่ากับ 0.56 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.31 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 42.75 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ PMS3 เมื่อเลี้ยงด้วยซูโครสได้ PHAs เท่ากับ 1.09 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.39 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 51.77 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกลูโคสได้ PHAs เท่ากับ 1.0

กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.11 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 45.37 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ PPL2 เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคสได้ PHAs เท่ากับ 0.99 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.28 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 43.42 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ซูโครสได้ PHAs เท่ากับ 0.55 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.29 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 40.64 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ PMK5 เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคสได้ PHAs เท่ากับ 1.3 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.63 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 39.43 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ซูโครส ได้ PHAs เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.36 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 27.78 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ PMK1 เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคสได้ PHAs เท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.0 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 20.00 เปอร์เซ็นต์ และไซโลสได้ PHAs เท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.19 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 17.96 เปอร์เซ็นต์ แต่สายพันธุ์ PMK1 ไม่ผลิต PHAs เมื่อเลี้ยงด้วยแลกโตสและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ ส่วน *Alcaligenes eutrophus* นั้นให้ผลผลิต PHAs สูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยซูโคสได้ PHAs เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.51 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 19.61 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตในแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้ค่อนข้างต่ำ จากผลการทดลองเห็นได้ว่าทุกสายพันธุ์ที่ทำการศึกษาสามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิต PHAs ได้สูงสุด คือ ซูโครสและกลูโคส หลังจากทำการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์คลอโรฟอร์ม และผลผลิต PHAs ที่สกัดได้นำส่งวิเคราะห์ชนิดของพลาสติกชีวภาพ โดยทำการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเครื่อง NMR และวิเคราะห์หมู่ฟังชันก์ของสารด้วยเครื่อง FTIR ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างจากทุกสายพันธุ์มีลักษณะโครงสร้างและหมู่ฟังชันก์ชนิดเดียวกันกับสาร PHB มาตรฐาน

8.1.2 การสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) และความร้อนสูง

การสกัดด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวจะช่วยทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายแทนการใช้คลอโรฟอร์มซึ่งค่อนข้างเป็นพิษและย่อยสลายยากในสิ่งแวดล้อม และใช้ความร้อนสูงจากหม้อนึ่งความดันไอน้ำช่วยทำลายเซลล์เพิ่มขึ้น ในขั้นตอนต่อไปก็จะสามารถละลาย PHAs ออกจากตัวเซลล์ได้ง่ายด้วยสารละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าคลอโรฟอร์ม เช่น ไดคลอโรมีเทน ผลการทดลองพบว่าจากการสกัดด้วยวิธีดังกล่าวจะให้ผลผลิต PHAs ที่แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ PE3 จะให้ผลผลิต PHAs สูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยซูโครสได้ PHAs เท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.32 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 31.25 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสายพันธุ์ PMK5 เมื่อเลี้ยงด้วยซูโครสได้ PHAs เท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.82 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 24.39 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ PMS3 เมื่อเลี้ยงด้วยซูโครสได้ PHAs เท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.65 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 28.02 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์PPL2 เมื่อ

เลี้ยงด้วยกลูโคสได้ PHAs เท่ากับ 0.17 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.75 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 22.67 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสายพันธุ์ PMK1 เมื่อเลี้ยงด้วยไซโลสได้ PHAs เท่ากับ 0.17 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.97 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 17.55 เปอร์เซ็นต์ และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลบริสุทธิ์ได้ PHAs เท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.26 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 11.54 เปอร์เซ็นต์

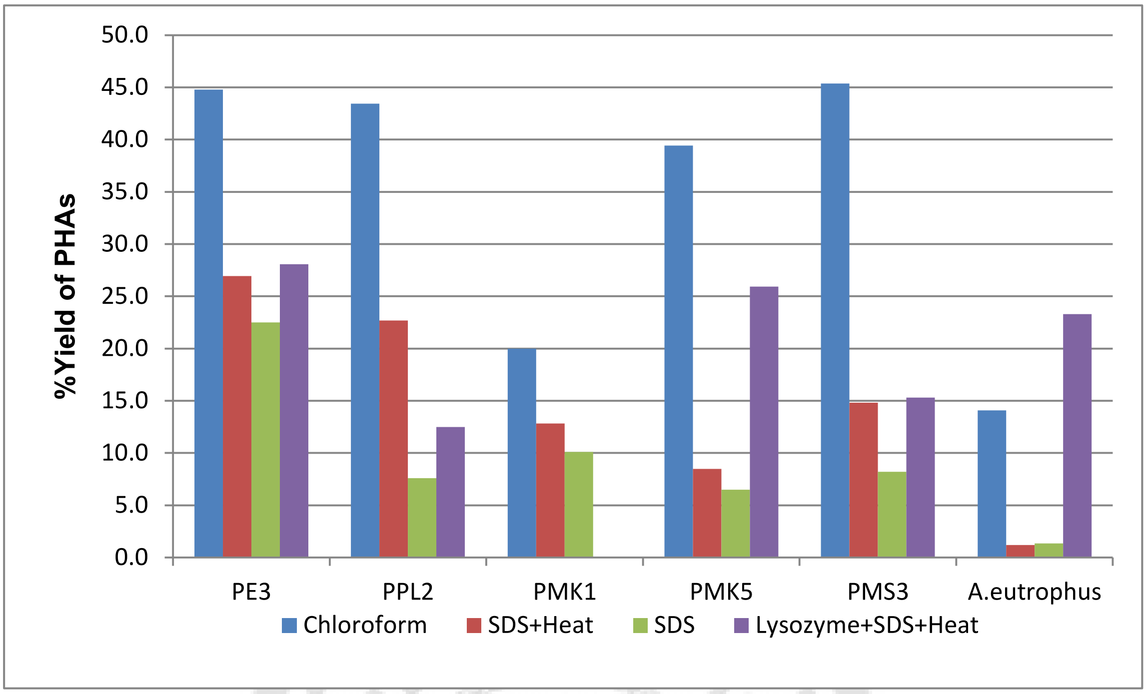
8.1.3 การสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS)

การสกัด PHAs ด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) ร่วมกับการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเพื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิต PHAs ที่ได้กับการใช้ความร้อนสูง (หัวข้อ 8.1.2) และเป็นการลดขั้นตอนของการใช้อุปกรณ์การสกัดราคาแพงอย่างเช่นหม้อนึ่งความดันไอน้ำโดยเปลี่ยนเป็นการต้มในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิแทน ผลการทดลองพบว่าสามารถสกัด PHAs ออกมาในปริมาณที่น้อยกว่าวิธีที่ใช้ความร้อนสูง โดยสายพันธุ์ PE3 ให้ผลผลิตจากแหล่งคาร์บอนได้ครบและสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคสได้ PHAs เท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.89 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 22.50 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ PPL2 เมื่อเลี้ยงด้วยซูโครสได้ PHAs เท่ากับ 0.25 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.58 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 15.82 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถสกัด PHAs จากแหล่งคาร์บอนอะราบิโนส แลกโตส และกลีเซอรอลบริสุทธิ์ได้ สายพันธุ์ PMK5 เมื่อเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลบริสุทธิ์ได้ PHAs เท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.1 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 14.29 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ PMS3 เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคสได้ PHAs เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.22 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 8.19 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ PMK1 ได้ปริมาณ PHAs ต่ำและสกัดได้เฉพาะในกลูโคสได้เท่ากับ 10.10 เปอร์เซ็นต์และไซโลส 6.00 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ส่วน *Alcaligenes eutrophus* พบว่าสามารถสกัด PHAs จากกลีเซอรอลบริสุทธิ์เท่ากับ 6.45 เปอร์เซ็นต์และกลูโคส 1.35 เปอร์เซ็นต์

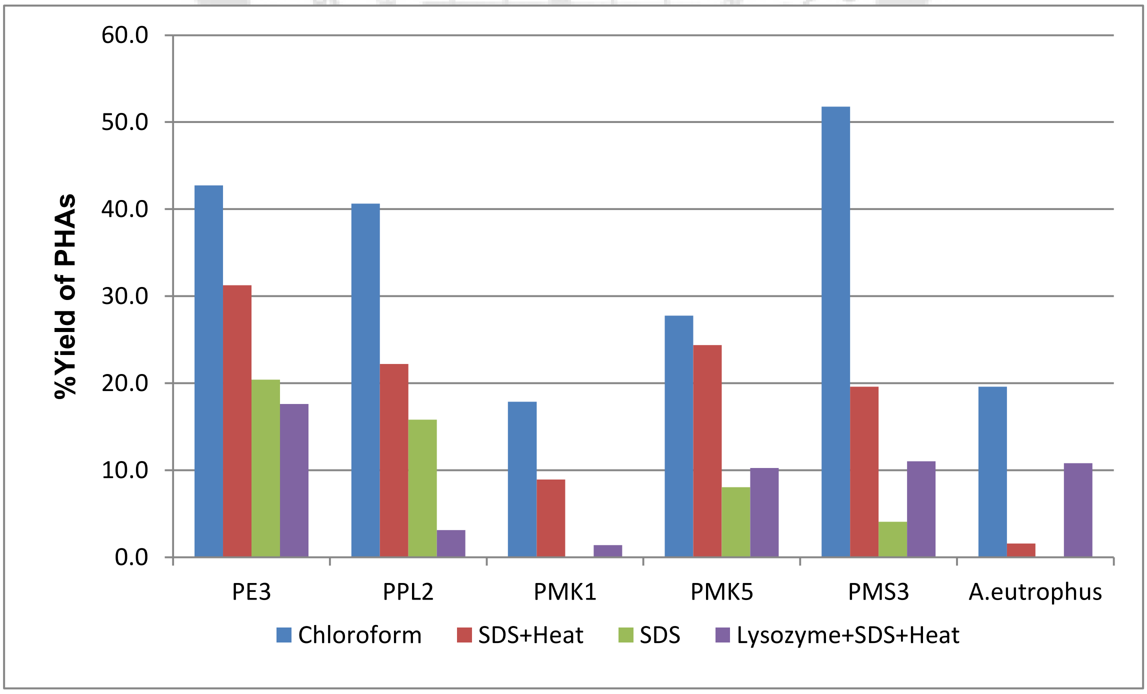
8.1.4 การสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) ร่วมกับเอนไซม์และความร้อนสูง

การสกัด PHAs ออกจากตัวเซลล์ด้วยสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) และความร้อนสูงนั้นจะเห็นได้ว่าสามารถสกัด PHAs ได้ค่อนข้างสูงกว่าการใช้ SDS เพียงอย่างเดียว จึงมีการนำวิธีนี้มาเพิ่มขั้นตอนของการบ่มเซลล์ด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ก่อนการใช้สาร SDS เพื่อช่วยย่อยสลายส่วนของโปรตีนภายในเซลล์และทำให้การสกัดขั้นต่อไปง่ายขึ้น โดยสายพันธุ์ PE3 ให้ผลผลิตสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลบริสุทธิ์ได้ PHAs เท่ากับ 0.73 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.33 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 31.61 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ PPL2 เมื่อเลี้ยงด้วย

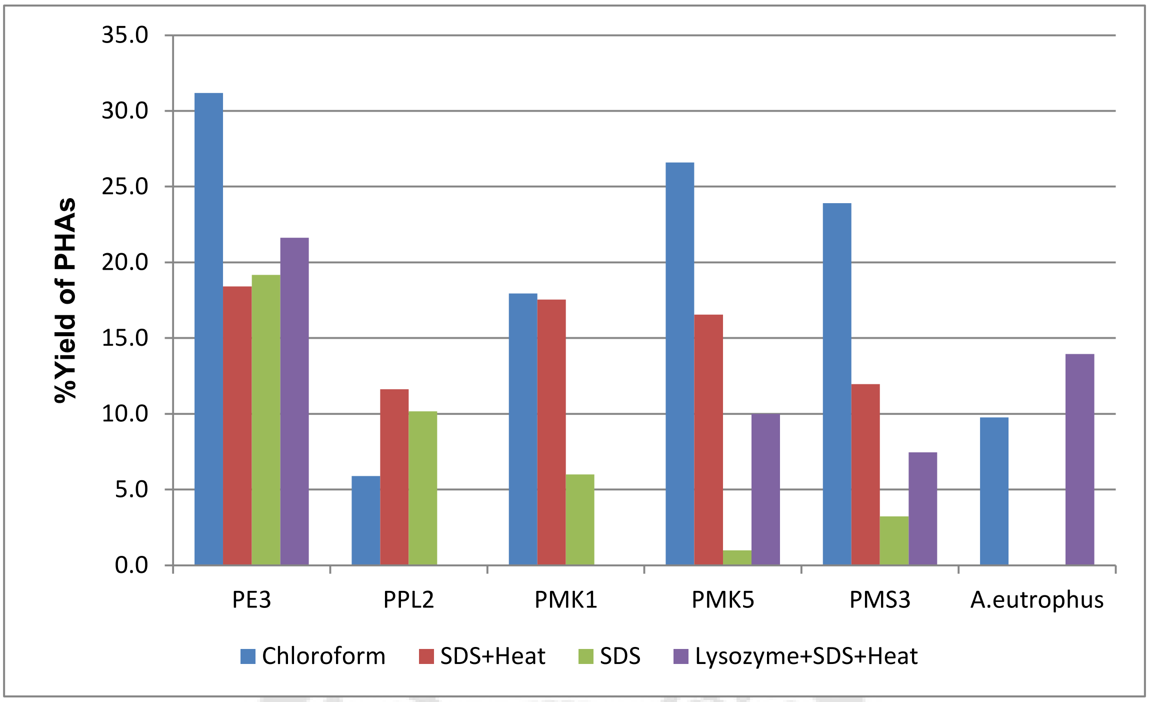
กลีเซอรอลบริสุทธิ์ได้ PHAs เท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.33 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 17.79 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ PMK5 เมื่อเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลบริสุทธิ์ได้ PHAs เท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.82 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 28.57 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ PMS3 เมื่อเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลบริสุทธิ์ได้ PHAs เท่ากับ 0.33 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.63 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 20.25 เปอร์เซ็นต์ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคสได้ PHAs เท่ากับ 0.17 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.73 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 23.29 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ PMK1 สามารถสกัด PHAs ได้ปริมาณต่ำจากการเลี้ยงในอาหารผสมกลูโคสและซูโครสเท่านั้น



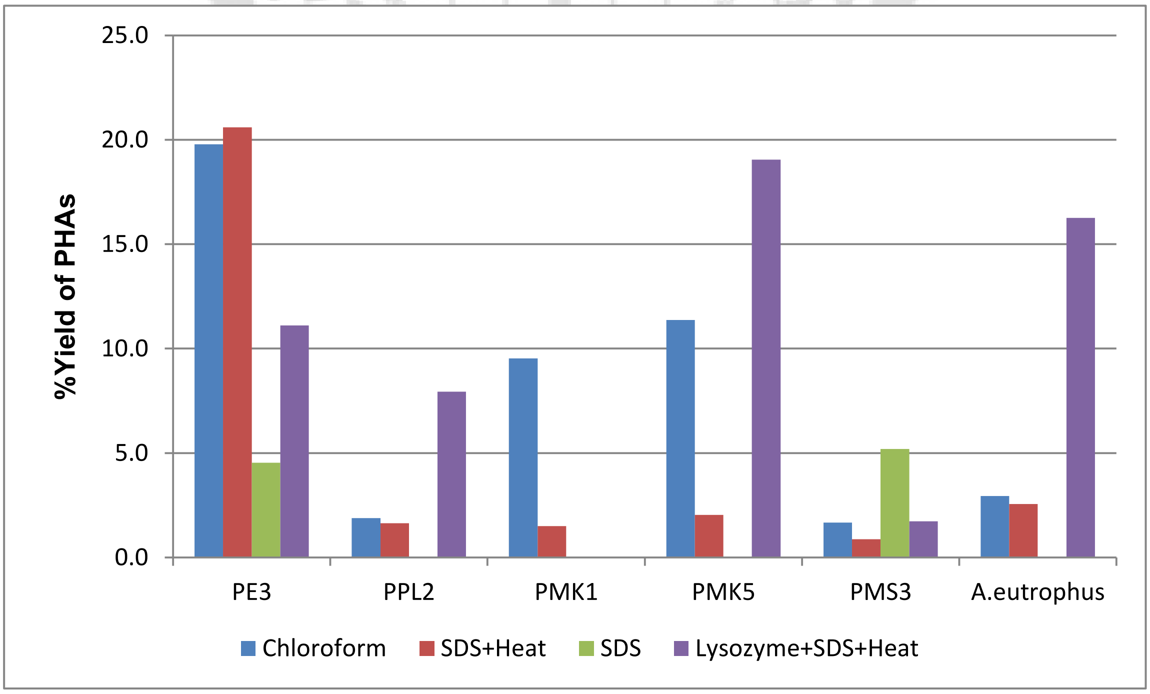
ภาพประกอบ 17 กราฟร้อยละของการสกัด PHAs ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท PE3, PPL2, PMK1, PMK5, PMS3 และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคส



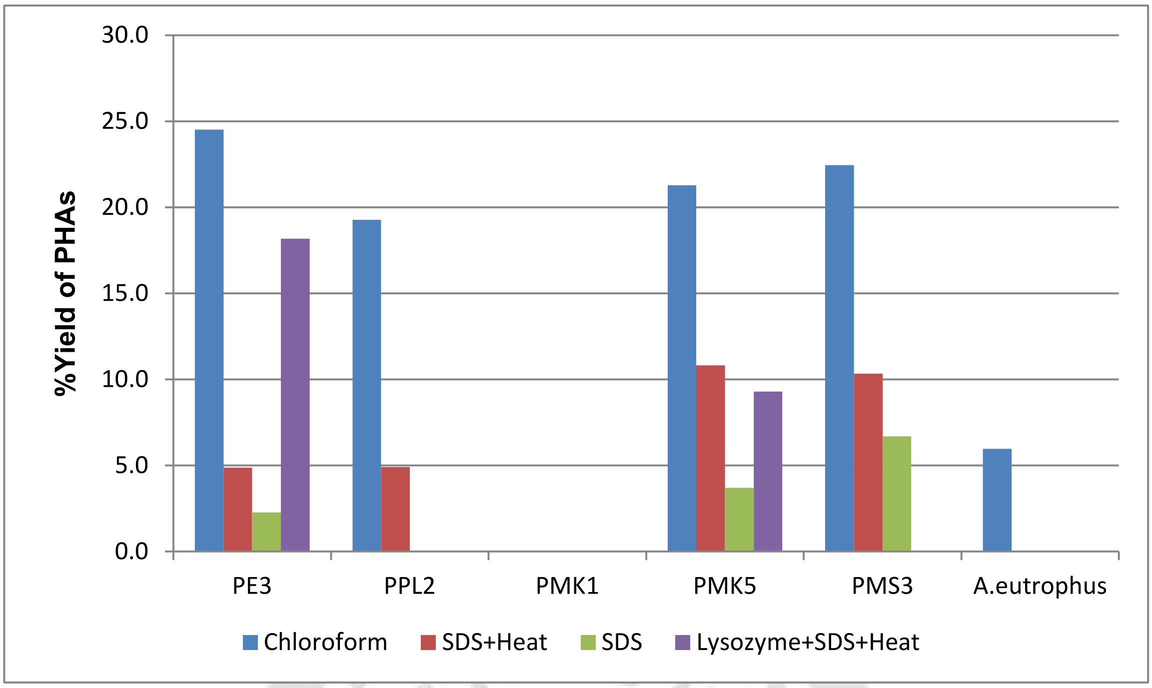
ภาพประกอบ 18 กราฟร้อยละของการสกัด PHAs ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท PE3, PPL2, PMK1, PMK5, PMS3 และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยซูโครส



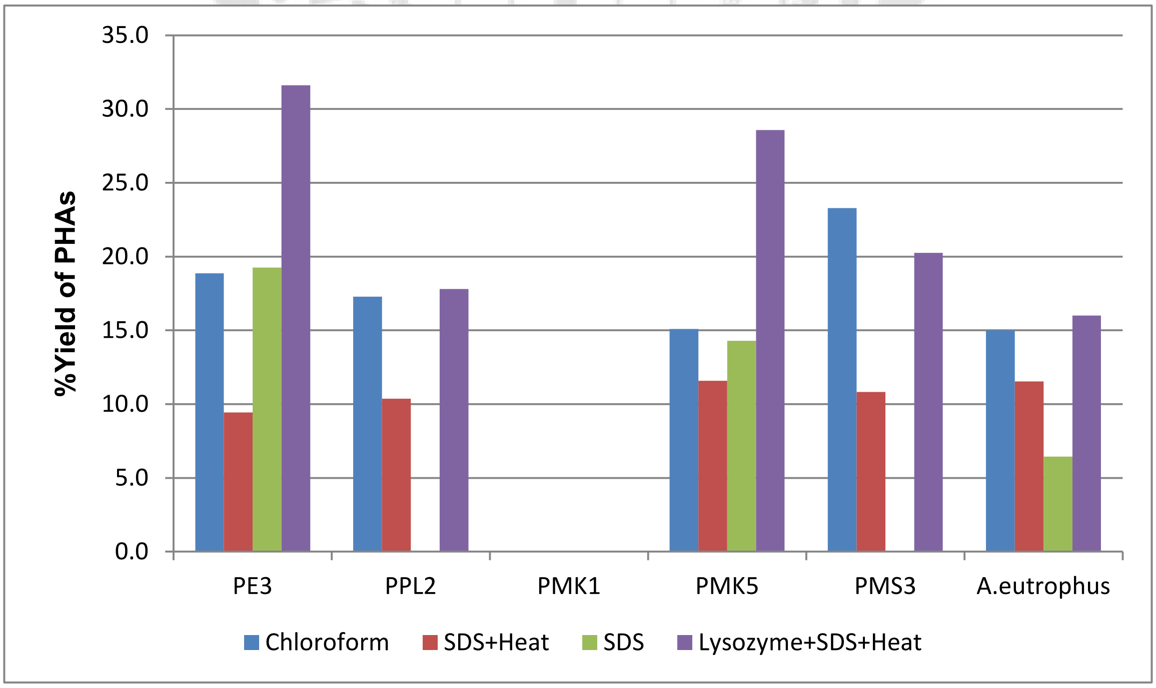
ภาพประกอบ 19 กราฟร้อยละของการสกัด PHAs ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท PE3, PPL2, PMK1, PMK5, PMS3 และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยไซโลส



ภาพประกอบ 20 กราฟร้อยละของการสกัด PHAs ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท PE3, PPL2, PMK1, PMK5, PMS3 และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยอะราบิโนส



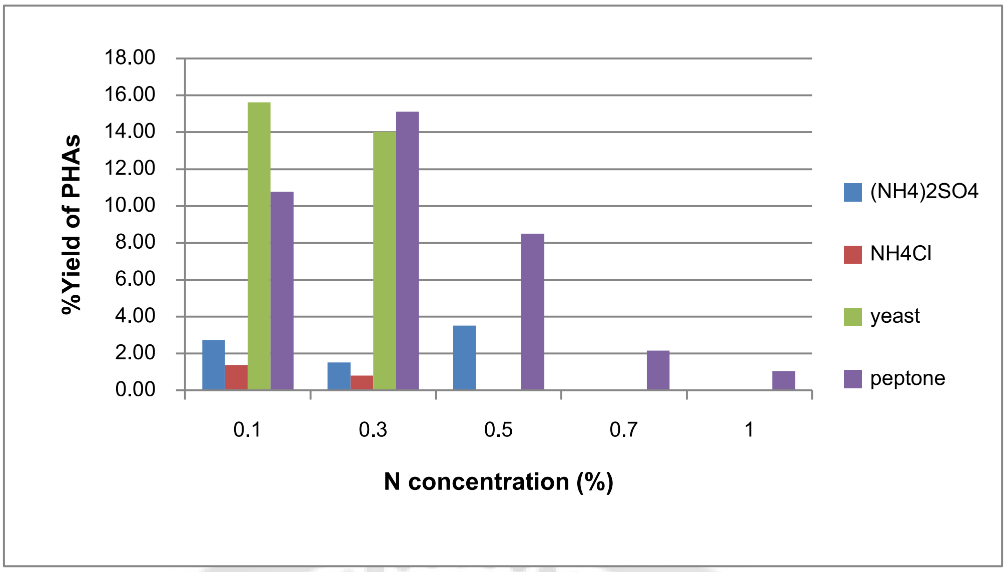
ภาพประกอบ 21 กราฟร้อยละของการสกัด PHAs ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท PE3, PPL2, PMK1, PMK5, PMS3 และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยแลกโตส



ภาพประกอบ 22 กราฟร้อยละของการสกัด PHAs ของเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท PE3, PPL2, PMK1, PMK5, PMS3 และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลบริสุทธิ์

8.2 การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs เมื่อเลี้ยง *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

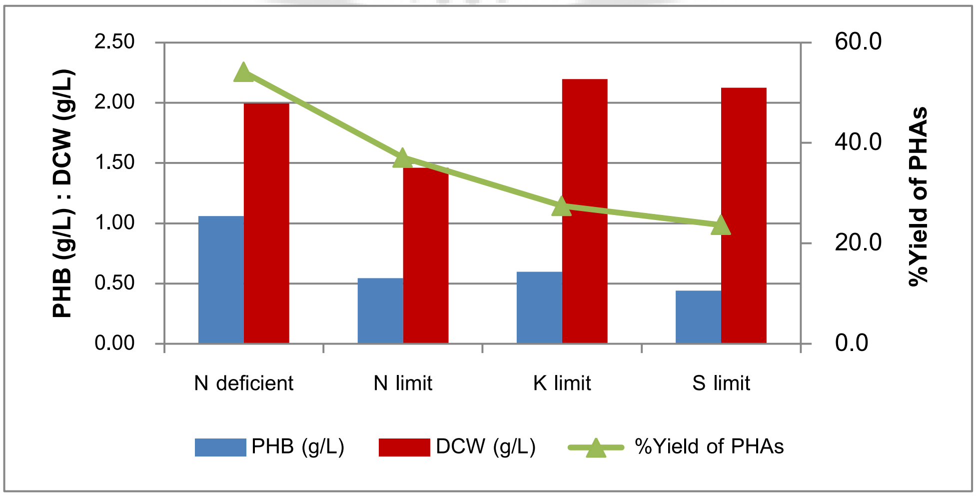
ภายหลังจากการศึกษาหาแหล่งคาร์บอนและวิธีการสกัดที่เหมาะสมในการผลิต PHAs พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 สามารถให้ผลผลิตได้สม่ำเสมอจึงถูกคัดเลือกมาศึกษาต่อในสภาวะต่างๆ เมื่อนำมาศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว nutrient broth เพิ่มกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์และเพิ่มแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$), แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl), ยีสต์สกัด (yeast extract) และเปปโตน (peptone) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการสกัด PHAs ด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม ผลการทดลองพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ ยีสต์สกัด, เปปโตน, แอมโมเนียมซัลเฟต และ แอมโมเนียมคลอไรด์ ตามลำดับ ซึ่งยีสต์สกัดให้ผลผลิต PHAs สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ได้ PHAs เท่ากับ 0.22 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.40 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 15.62 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ได้ PHAs เท่ากับ 0.27 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.93 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 14.03 เปอร์เซ็นต์ เปปโตนให้ผลผลิตสูงสุดที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ได้ PHAs เท่ากับ 0.04 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.26 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 15.12 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ได้ PHAs เท่ากับ 0.37 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.44 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 10.78 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ได้ PHAs เท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.88 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 3.52 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ได้ PHAs เท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.01 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 1.39 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพประกอบ 15 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิต PHAs คือ ยีสต์สกัดและเปปโตนที่ความเข้มข้น 0.1-0.3 เปอร์เซ็นต์ซึ่งให้ผลผลิต PHAs ได้สูงสุดและใกล้เคียงกัน ดังแสดงไว้ในภาพประกอบ 23



ภาพประกอบ 23 กราฟร้อยละของการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

8.3 การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs เมื่อเลี้ยง *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ในอาหารเหลวสูตรต่างๆ

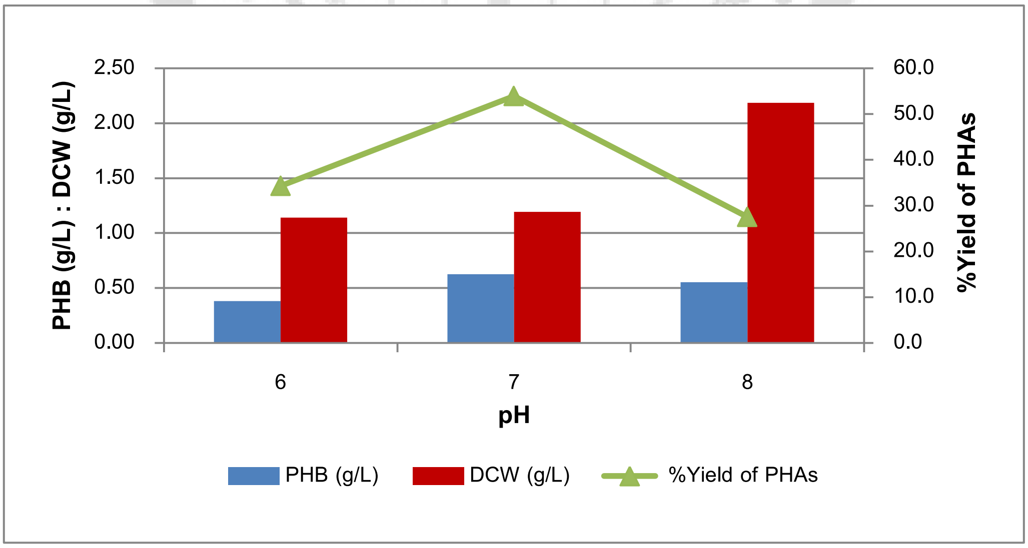
การศึกษาการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยสูตรอาหารที่แตกต่างกันเพื่อหาแหล่งสารอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการช่วยให้แบคทีเรียเกิดการสะสมแกรนูลของ PHAs ได้สูงที่สุดโดยทำการคัดเลือกสูตรอาหารเหลวซึ่งจำกัดปริมาณส่วนประกอบที่จำเป็นในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์แตกต่างกันไป เช่น การจำกัดปริมาณไนโตรเจน โพแทสเซียม และซัลเฟอร์ (Gowda; & Shivakumar. 2013: 794-802) โดยเลี้ยงเซลล์บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และใช้กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองการผลิต PHAs ในสูตรอาหารต่างๆ แสดงไว้ในภาพประกอบ 24 พบว่าสูตรอาหารที่ให้ผลผลิต PHAs สูงสุด คือ N deficient medium ได้ PHAs เท่ากับ 1.06 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.99 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 54.11 เปอร์เซ็นต์ สูตร N deficient medium มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนจาก yeast extract และ peptone อยู่ถึงอย่างละ 0.25% (w/v) ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตในปริมาณที่สูงกว่าสูตรอาหารอื่นๆ รองลงมา คือ สูตร N limit medium ได้ PHAs เท่ากับ 0.55 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.46 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 37.09 เปอร์เซ็นต์ สูตร K limit medium ได้ PHAs 0.60 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.20 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 27.46 เปอร์เซ็นต์ และสูตร S limit medium ได้ PHAs เท่ากับ 0.44 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.12 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 23.65 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ N deficient medium เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นสูตรอาหารหลักในการเพิ่มผลผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป



ภาพประกอบ 24 กราฟร้อยละของการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยสูตรอาหารจำกัดสารอาหาร 4 สูตร คือ N deficient, N limit, K limit และ S limit

8.4 การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs เมื่อเลี้ยง *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ที่ค่าความเป็นกรด-เบสแตกต่างกัน

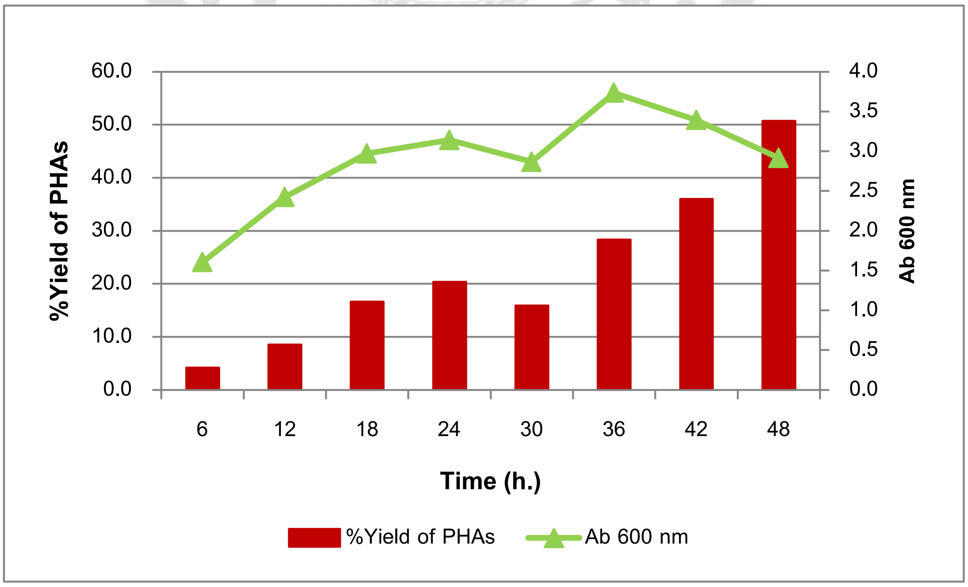
การศึกษาการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ที่ค่าความเป็น กรด-เบส คือ ค่าตั้งแต่ 5-9 โดยเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหาร N deficient medium และใช้กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเซลล์มีการเจริญได้ดีตั้งแต่ค่าความเป็นกรด-เบสตั้งแต่ 6-8 แต่เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารที่ปรับค่าความเป็นกรด-เบส 5 และ 9 จะไม่พบการเจริญเติบโตของเซลล์ และที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 ได้ผลผลิต PHAs สูงที่สุดเท่ากับ 0.62 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.19 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 53.92 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6 ได้ PHAs เท่ากับ 0.38 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.14 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 34.28 เปอร์เซ็นต์ และที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8 ได้ PHAs เท่ากับ 0.55 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.19 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 27.50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 จึงเหมาะสมต่อการผลิต PHAs ดังแสดงในภาพประกอบ 25



ภาพประกอบ 25 กราฟร้อยละของการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยสูตรอาหาร N deficient ที่ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH 6-8)

8.5 การศึกษาความสามารถในการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ที่ช่วงเวลาต่างๆ

การศึกษาการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ที่ช่วงเวลาที่แตกต่างกันตั้งแต่ 6-48 ชั่วโมง และทำการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ทุก 6 ชั่วโมงที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร เพื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิต PHAs ที่ได้กับระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อและเก็บเซลล์มาทำการสกัด PHAs โดยเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหาร N deficient medium ที่มีการเติมกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์สูงสุด ในชั่วโมงที่ 36 เมื่อวัดการดูดกลืนแสงที่ OD_{600} เท่ากับ 3.733 และได้ PHAs 0.52 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.84 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 28.37 เปอร์เซ็นต์ หลังจากชั่วโมงที่ 36 พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์เริ่มลดลงแต่ให้ผลผลิต PHAs ที่เพิ่มสูงขึ้น ในชั่วโมงที่ 42 ได้ PHAs 0.63 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.68 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 36.03 เปอร์เซ็นต์ และชั่วโมงที่ 48 ได้ PHAs 0.95 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.87 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 50.76 เปอร์เซ็นต์ จึงมีการทดลองเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบชั่วโมงที่ 72 ปริมาณ PHAs ที่สกัดได้ก็ไม่เพิ่มสูงขึ้นไปมากกว่าชั่วโมงที่ 48 และยังพบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือสูงขึ้นเช่นกัน ดังนั้นช่วงเวลาที่ทำการเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมที่สุด คือ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพประกอบ 26



ภาพประกอบ 26 กราฟร้อยละของการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ที่ช่วงเวลาต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

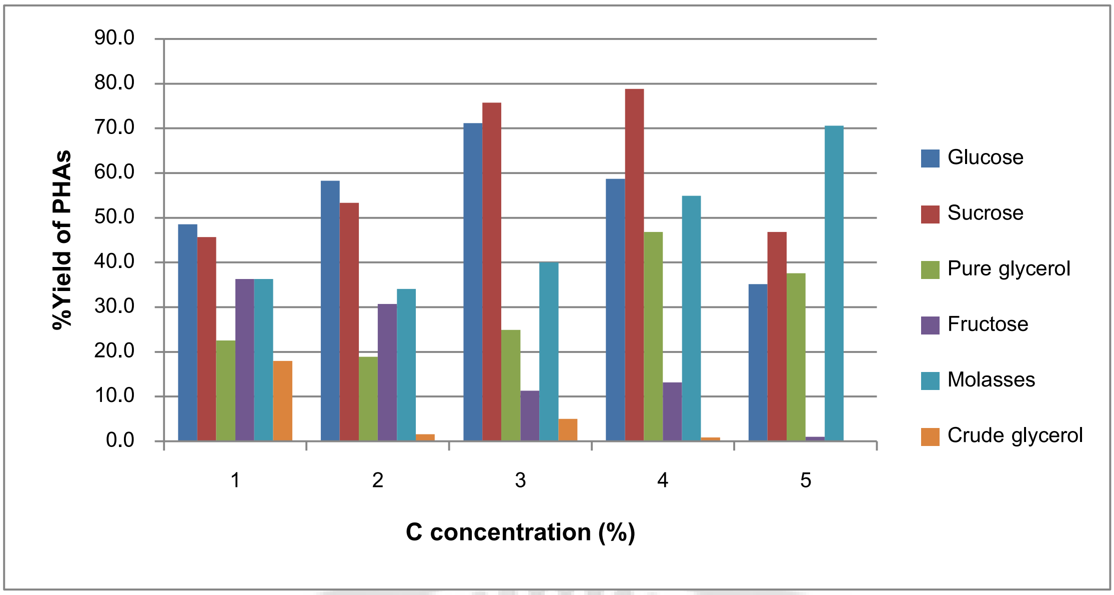
9. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ได้สูงสุดของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารจำกัดสารอาหารและใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

9.1 เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อ (inoculum) เริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

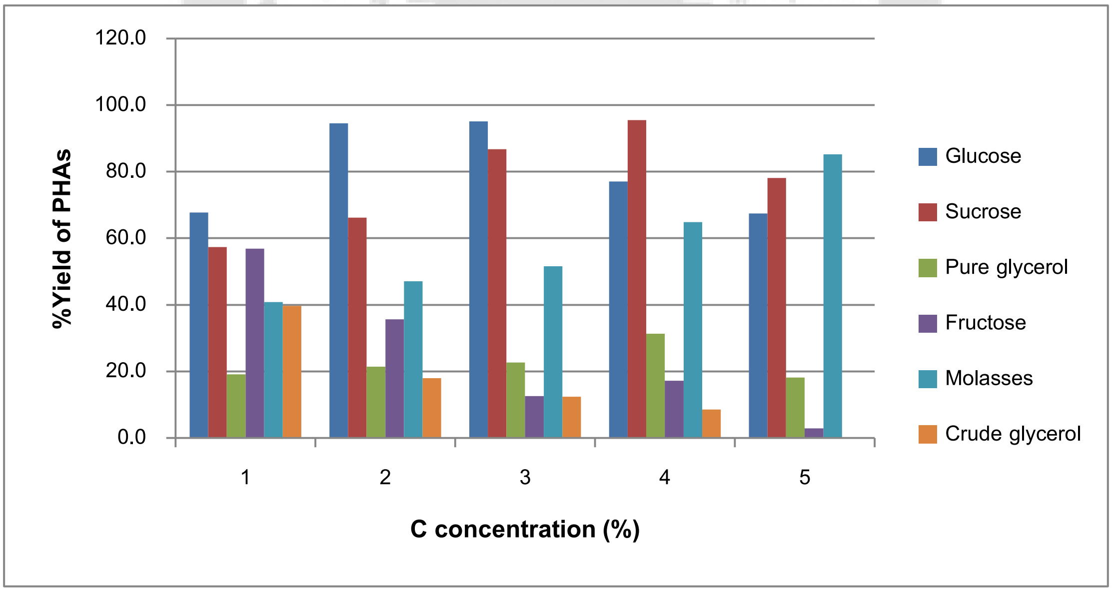
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ให้ได้สูงสุดของเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหาร N deficient medium และหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน 1-5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันจำนวน 6 ชนิด คือ กลูโคส, ซูโครส, กลีเซอรอลบริสุทธิ์, ฟรุกโตส, โมลาส และกลีเซอรอลดิบ ผลการทดลองพบว่าแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือซูโครสที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ได้ PHAs เท่ากับ 1.34 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.84 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 78.81 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ได้ PHAs เท่ากับ 0.83 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.17 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 71.18 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ได้ PHAs เท่ากับ 1.31 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.8 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 46.82 เปอร์เซ็นต์ ฟรุกโตสที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ได้ PHAs เท่ากับ 1.09 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.0 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 36.33 เปอร์เซ็นต์ โมลาสที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ได้ PHAs เท่ากับ 1.3 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.84 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 70.60 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอลดิบที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ได้ PHAs เท่ากับ 0.46 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.54 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 17.96 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพประกอบ 27

9.2 เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อ (inoculum) เริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ให้ได้สูงสุดของเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหาร N deficient medium และทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน 1-5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ค่า pH 7 เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันจำนวน 6 ชนิด คือ กลูโคส, ซูโครส, กลีเซอรอลบริสุทธิ์, ฟรุกโตส, โมลาส และกลีเซอรอลดิบ พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือ ซูโครสที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ได้ PHAs เท่ากับ 2.89 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.02 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 95.5 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ได้ PHAs เท่ากับ 1.24 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.3 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 95.08 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ได้ PHAs เท่ากับ 0.94 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.0 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 31.03 เปอร์เซ็นต์ ฟรุกโตสที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ได้ PHAs เท่ากับ 1.19 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.09 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 56.88 เปอร์เซ็นต์ โมลาสที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ได้ PHAs เท่ากับ 2.44 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.86 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 85.26 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอลดิบที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ได้ PHAs เท่ากับ 1.19 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.0 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 39.7 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพประกอบ 18 จะเห็นว่าแหล่งคาร์บอนที่เพิ่มผลผลิต PHAs ได้สูงสุด คือ ซูโครส และ กลูโคส ซึ่งให้ผลผลิตร้อยละของ PHAs ใกล้เคียงกันสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพประกอบ 28



ภาพประกอบ 27 กราฟร้อยละของการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลิต PHAs ให้ได้สูงสุดด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ และใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

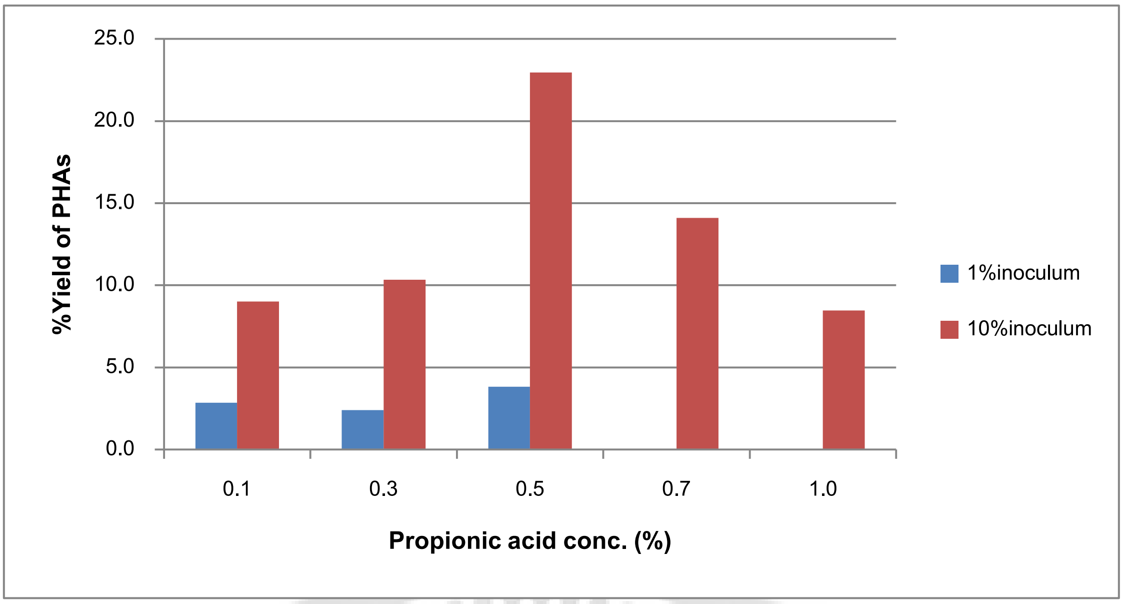


ภาพประกอบ 28 กราฟร้อยละของการผลิต PHAs ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลิต PHAs ให้ได้สูงสุดด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ และใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

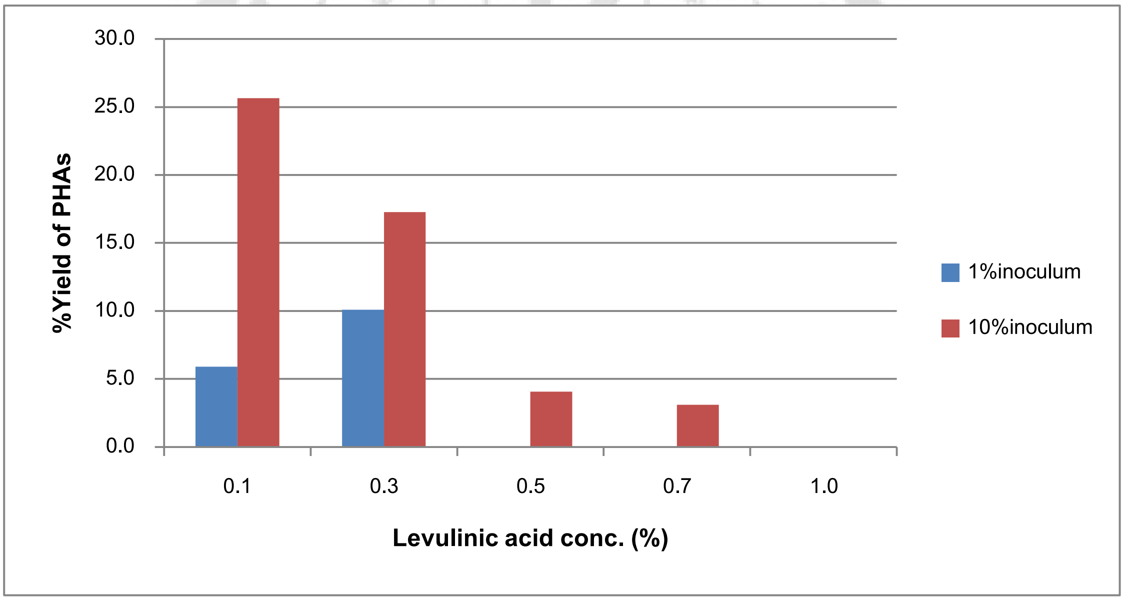
9.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs เมื่อเลี้ยงในอาหารจำกัดสารอาหารผสมกรดไขมันที่ให้ผลผลิตของพลาสติกชีวภาพในรูปแบบโครงสร้างของ PHBV

9.3.1 การผลิต PHBV ด้วยแหล่งคาร์บอนจากกรดไขมัน กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และ กรดลิววูลินิก (levulinic acid) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต PHAs และการเก็บตัวอย่างผลผลิตที่ได้ไปวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเครื่อง NMR และหมู่ฟังก์ชั่นของสารด้วยวิธี FTIR พบว่าเป็นพลาสติกชีวภาพชนิด PHB หรือ Polyhydroxybutyrate จึงมีการนำ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 มาเลี้ยงในกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และ กรดลิววูลินิก (levulinic acid) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งแบคทีเรียจะใช้กรดไขมันกลุ่มนี้ไปเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมที่ได้ผลผลิตเป็น PHBV หรือ Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) ซึ่งเป็นพลาสติกชีวภาพที่มีคุณภาพดีกว่า PHB เพราะมีความยืดหยุ่นสูงเหมาะแก่การนำไปขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นได้ดี โดยจุลินทรีย์จะนำกรดไขมันนี้ไปเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อร่วมสร้างสารตั้งต้น หรือ มอนอเมอร์ของ 3HV (3-hydroxy valerate) เชื่อมต่อกับ มอนอเมอร์ 3HB (3-hydroxy butyrate) ได้เป็นโครงสร้างของสาร PHBV เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ PE3 ในอาหารจำกัดสารอาหารโดยใช้กรดโพรพิโอนิกและกรดลิววูลินิกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มเข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าสามารถสกัดพลาสติกชีวภาพออกมาได้ในปริมาณน้อยซึ่งกรดโพรพิโอนิกให้ผลผลิตสูงสุดที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ได้ PHBV เท่ากับ 0.30 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.32 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 22.96 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพประกอบ 29 สำหรับการใช้กรดลิววูลินิกจะให้ผลผลิตสูงสุดที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ได้ PHBV เท่ากับ 0.27 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 25.66 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพประกอบ 30



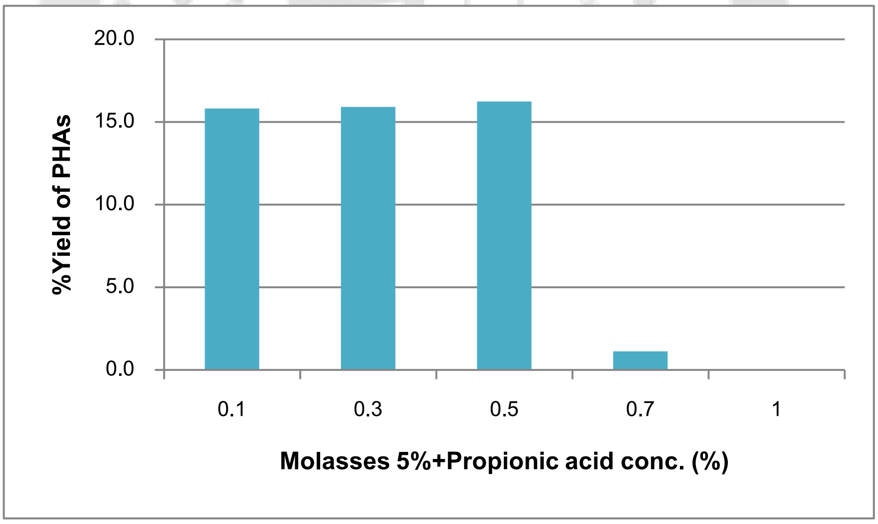
ภาพประกอบ 29 กราฟร้อยละของการผลิต PHBV ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยกรดโพรพิโอนิก ที่ความเข้มข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ (w/v)



ภาพประกอบ 30 กราฟร้อยละของการผลิต PHBV ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยกรดลิวูลินิก ที่ความเข้มข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

9.3.2 การผลิต PHBV ด้วยแหล่งคาร์บอนจากกรดไขมัน กรดโพรพิโอนิกและกรดลิวูลินิกร่วมกับแหล่งคาร์บอนจากโมลาสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เมื่อนำสารประเภทกรดไขมัน คือ กรดโพรพิโอนิกและลิววูลินิกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ มาผสมรวมกับน้ำตาลโมลาสที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้สารทั้งสองชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร N deficient และเป็นสารตั้งต้นให้เซลล์นำไปใช้สร้างพลาสติกชีวภาพ ชนิด PHBV พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารผสมกรดโพรพิโอนิกร่วมกับโมลาสที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถสกัด PHBV ได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของโพรพิโอนิกได้ PHBV เท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.86 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 20.30 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ในความเข้มเข้มที่ 0.7-1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของกรดโพรพิโอนิกจะไม่พบการผลิต PHBV ส่วนกรดลิววูลินิกนั้นเมื่อนำมารวมกับโมลาสที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) สามารถผลิต PHBV ได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เท่านั้นได้ PHBV เท่ากับ 0.22 กรัมต่อลิตรต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.78 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 12.19 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพประกอบ 31



ภาพประกอบ 31 กราฟร้อยละของการผลิต PHBV ของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ด้วยน้ำตาลโมลาส 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ผสมกรดโพรพิโอนิก ที่ความเข้มข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

10. การศึกษาและยืนยันผลของการผลิต PHAs ด้วย FTIR spectrometer (Fourier Transform Infrared Spectrometer)

FTIR เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์หาหมู่ฟังชันก์ในโมเลกุลของสารอินทรีย์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงอินฟาเรดของสารอินทรีย์ในช่วงเลขคลื่น (wave number) 4000-400 cm^{-1} สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ทั้งของแข็ง ของเหลว และก๊าซ ให้ข้อมูลออกมาเป็นอินฟาเรด สเปกตรัม (Infared spectrum) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเลขคลื่น กับ เปอร์เซ็นต์ทรานสมิตแตนซ์ (% transmittance) (วิไลวัลย์;& พันธุมนาวิน. 2548) ในขั้นตอนการวิเคราะห์นั้นเริ่มจากเก็บตัวอย่างพลาสติกชีวภาพที่สกัดได้มาละลายด้วยคลอโรฟอร์มและหยดสารละลายลงบนเซลล์ NaCl เกิดเป็นแผ่นฟิล์มบาง (thin film) แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Perkin Elmer FT-IR spectrum BX FT-IR spectrometer จากนั้นเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ PHB บริสุทธิ์ ผลการวิเคราะห์สเปกตรัมของตัวอย่างจาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ที่เลี้ยงด้วยกลูโคส พบแถบการดูดกลืนของคาร์บอนิล (C=O) ของหมู่เอสเทอร์ (ester group) ที่บริเวณ 1723.35 cm^{-1} และ ของ C-O-C ที่บริเวณ 1216.47 cm^{-1} ดังแสดงในภาพประกอบ 32 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสาร PHB มาตรฐานพบแถบการดูดกลืนของคาร์บอนิล (C=O) ที่บริเวณ 1722.58 cm^{-1} และ C-O-C ที่บริเวณ 1280.69 cm^{-1} ของหมู่เอสเทอร์ (ester group) ซึ่งทั้งสองค่ามีเลขคลื่นที่ใกล้เคียงกันมากจึงสามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างที่สกัดได้จากเซลล์ *B. cereus* สายพันธุ์ PE3 เป็นสารประเภทเดียวกันกับ PHB บริสุทธิ์ ดังแสดงในภาพประกอบ 33 และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างจากแบคทีเรียอีก 4 สายพันธุ์ คือ PPL2, PMK1, PMK5 และ PMS3 ที่ทำการ ศึกษาก็พบว่าให้ผลการวิเคราะห์ใกล้เคียงกันได้ลักษณะโครงสร้างของสาร PHB เหมือนกันทั้งหมด

11. การศึกษาและยืนยันผลของการผลิต PHAs ด้วย nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

NMR spectrometer เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์หาโครงสร้างของสารโดยใช้หลักการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของสารในช่วงคลื่นวิทยุซึ่งมีพลังงานอยู่ในช่วงที่ทำให้นิวเคลียสของอะตอมในโมเลกุลของสารเมื่ออยู่ภายใต้สนามแม่เหล็กเกิดการเปลี่ยนทิศการสปินได้ (spin flip) ให้ข้อมูลออกมาเป็น เอ็น เอม อาร์ สเปกตรัม (NMR spectrum) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสัมพัทธ์ของสัญญาณ ซึ่งไม่มีหน่วย และค่าความถี่สัมพัทธ์ หรือ เคมิคัลชิฟต์ (chemical shift, δ) มีหน่วยเป็น ppm (วิไลวัลย์;& พันธุมนาวิน. 2548) เมื่อทำการส่งตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Bruker AVANCE 300 FT-NMR spectrometer วิเคราะห์ทั้งโปรตอน (^{1}H) ที่ความถี่ 300 MHz และคาร์บอนอะตอม (^{13}C) ที่ความถี่ 75 MHz โดยใช้ $CDCl_3$ และ CD_3OD เป็นตัวทำละลายผสม ผลการวิเคราะห์ ^{1}H NMR spectrum แสดงไว้ในภาพประกอบที่ 34 พบสัญญาณแบบ doublet ของ methyl proton ตำแหน่ง 4 ที่ δ 1.19 ppm สัญญาณแบบ doublet of doublet จำนวน 2 ชุด ของ methylene proton ตำแหน่ง 2 ที่ δ ในช่วง 2.4-2.7 ppm และสัญญาณแบบ multiplet ของ methine proton ตำแหน่ง 3 ที่ δ ในช่วง 5.2-2.3 ppm ส่วนผลการวิเคราะห์ ^{13}C NMR spectrum ดังภาพประกอบที่ 35 พบสัญญาณของ methyl carbon ตำแหน่ง 4 ที่ δ 19.6 ppm methylene carbon ตำแหน่ง 2 ที่ δ 40.7 ppm methane carbon ตำแหน่ง 3 ที่ δ 67.65 ppm และ carbonyl carbon ที่ δ 169.3 ppm จากข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR สรุปได้ว่าพลาสติกชีวภาพที่ได้จาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ คือ PHB และนำ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 มาเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนจากโมลาส 5 เปอร์เซ็นต์และกรดโพรพิโอนิก 0.5 เปอร์เซ็นต์ จากข้อมูล ^{1}H NMR ดังภาพประกอบที่ 37 พบสัญญาณของ P(HB) ที่ค่า δ 1.1-1.4 ppm (methyl proton ที่ตำแหน่ง 4) ค่า δ 2.4-2.6 ppm (methylene proton ที่ตำแหน่ง 2) ค่า δ 5.2-5.3 ppm (methane proton ที่ตำแหน่ง 3) และพบสัญญาณของ P(HV) ที่ ค่า δ 0.7-0.9 ppm (methyl proton ที่ตำแหน่ง 9), ค่า δ 1.4-1.7 ppm (methylene proton ที่ตำแหน่ง 8), ค่า δ 2.4-2.6 ppm (methylene proton ที่ตำแหน่ง 6) และค่า δ 5.1-5.2 ppm (methane proton ที่ตำแหน่ง 7) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H NMR ที่ได้กับ PHBV มาตรฐาน แสดงในภาพประกอบที่ 36 พบว่าพลาสติกชีวภาพที่ได้จาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงด้วยโมลาส 5 เปอร์เซ็นต์ และกรดโพรพิโอนิก 0.5 เปอร์เซ็นต์ คือ PHBV ส่วนผลของการเลี้ยงเชื้อด้วยกรดโพรพิโอนิกและลิววูลินิก เพียงสารเดียวพบการแสดงสัญญาณของ P(HV) ที่ต่ำมากเนื่องจากตัวอย่างที่สกัดได้ละลายได้น้อยเมื่อนำไปละลายด้วยสารละลายอินทรีย์ก่อนการฉีดวิเคราะห์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

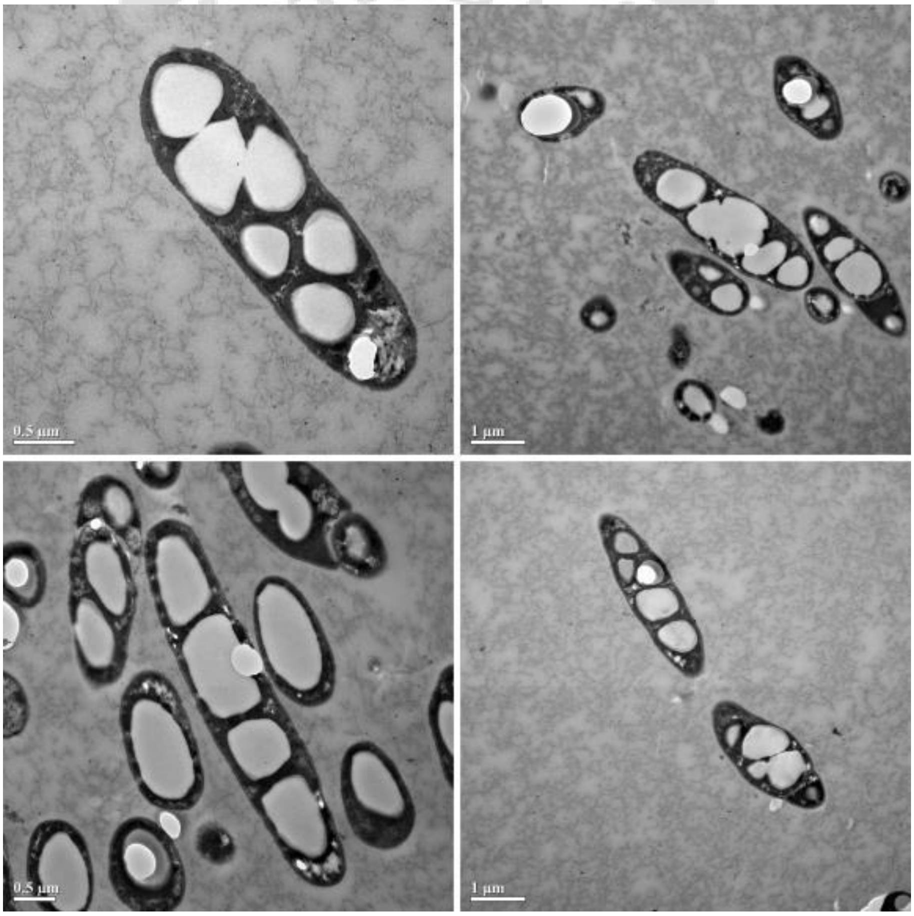
12. การศึกษาลักษณะของเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Scanning electron microscope (SEM)

นำเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 เลี้ยงบนอาหารแข็ง nutrient agar เพิ่มกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อนำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดจะเห็นลักษณะของตัวเซลล์ที่เป็นรูปท่อนได้อย่างชัดเจน ความยาวเซลล์มากกว่า 2 ไมโครเมตร ดังแสดงในภาพประกอบที่ 38

ภาพประกอบ 38 ลักษณะของเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 บนอาหารแข็ง nutrient agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

13. การศึกษาลักษณะแกรนูลของ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Transmission electron microscope (TEM)

นำเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 เลี้ยงในอาหารเหลว N deficient เพิ่มกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์ไว้ในสารละลาย glutaraldehyde 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ก่อนนำส่งเซลล์ไปเคลือบลงแผ่นกริตเพื่อทำการตัดขวางผ่านตัวเซลล์และเมื่อนำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน รุ่น JEM-2100 (200kV) ที่กำลังขยาย 5x1000 เท่า จะสังเกตเห็นลักษณะของตัวเซลล์ที่เป็นรูปท่อนมองเห็นส่วนของแกรนูล PHB สีขาวได้อย่างชัดเจน จากภาพประกอบ 39 จะเห็นว่ามีการสะสมแกรนูล PHB ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 ไมโครเมตร เรียงตัวตามความยาวของตัวเซลล์ตั้งแต่ 2-7 แกรนูล



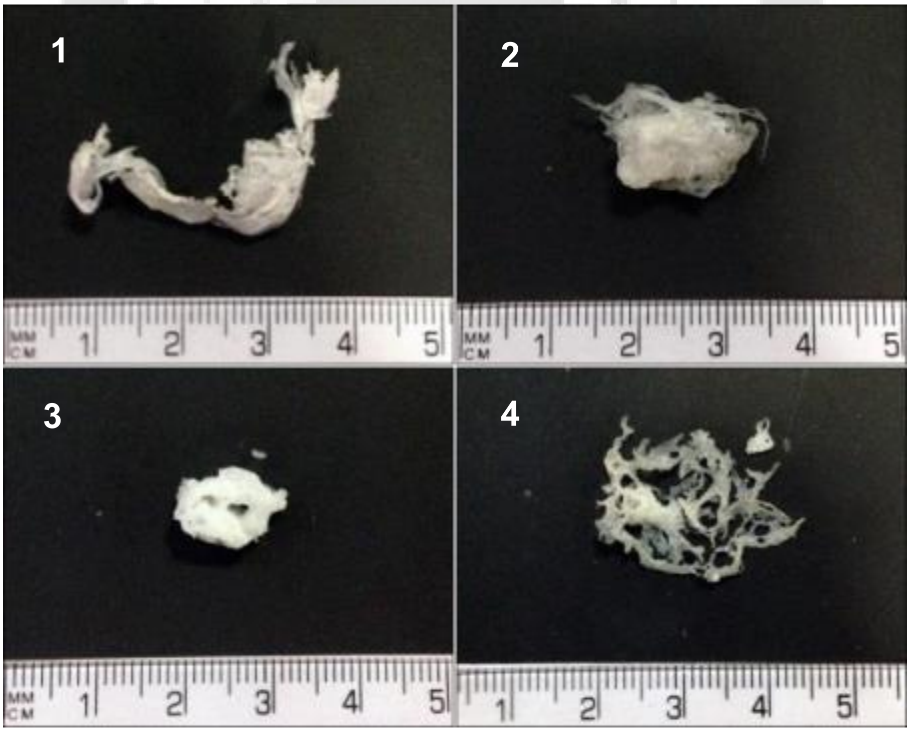
ภาพประกอบ 39 ลักษณะภาพตัดขวางของเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ในอาหาร N deficient เพิ่มกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่กำลังขยาย 5x1000 เท่า

14. การผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHAs ที่ทำการสกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียที่ทำการศึกษา

ผลผลิต PHAs ที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียที่สนใจศึกษาทั้ง 5 สายพันธุ์ เมื่อผ่านการสกัดขั้นสุดท้ายด้วยการต้มที่ความร้อนประมาณ 90 องศาเซลเซียส สามารถเก็บชิ้นพลาสติกชีวภาพในหลอดแก้วได้หลากหลายลักษณะ คือ

1. ลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบางขนาดใหญ่ น้ำหนักเบา
2. ลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มติดขอบหลอดและจับตัวเป็นก้อนแข็งที่ก้นหลอด
3. ลักษณะเป็นก้อนแข็งเนื้อสารหนาแน่น น้ำหนักสูง
4. ลักษณะเป็นชิ้นเล็กๆ จำนวนมาก เปราะหักง่าย ค่อนข้างเก็บรวบรวมได้ยาก

หลังจากนั้นนำผลผลิตพลาสติกชีวภาพที่ได้มาทำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก และทำการส่งตัวอย่างชิ้นพลาสติกชีวภาพไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR และ FTIR เพื่อยืนยันผลว่าเป็น PHB หรือ PHBV โดยใช้สารมาตรฐาน PHB และ PHBV ที่มีความบริสุทธิ์สูงจาก sigma ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบ



ภาพประกอบ 40 ภาพตัวอย่างชิ้นส่วนพลาสติกชีวภาพที่สกัดได้จาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3

15. การศึกษาสารประกอบในตัวอย่างน้ำตาลโมลาสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

น้ำตาลโมลาสที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการเกษตร การทำน้ำตาลทรายจากพืชอ้อย ซึ่งมีสารประกอบสำคัญหลายชนิดที่แบคทีเรียสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งสารอาหารได้ โดยทำการส่งตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารผสมที่อยู่ในสภาวะของเหลว อาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบที่ผ่านไปในคอลัมน์ (เฟสที่อยู่กับที่) โดยการชะหรือการพาของเฟสเคลื่อนที่ พบว่าในน้ำตาลโมลาส 100 กรัม ที่นำมาศึกษามีปริมาณ ซูโคส 18.93 กรัม กลูโคส 7.88 กรัม ฟรุกโตส 10.36 กรัม สารประกอบไนโตรเจน 0.5462 กรัม และน้ำตาลรีดิวส์ 0.33 กรัม ดังสรุปไว้ในตาราง 7

ตารางที่ 8 สารประกอบในน้ำตาลโมลาสที่ทำการศึกษา

Parameter	**g./100 g. of molasses**
Colour	Dark brown
pH	5.5
Sucrose	18.93
Glucose	7.88
Fructose	10.36
Nitrogen compounds	0.5462
Reducing sugar	0.33

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพลาสติกชีวภาพในกลุ่มของพอลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท หรือ PHAs เช่น PHB และ PHBV เป็นต้น จุลินทรีย์สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพเหล่านี้ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และแหล่งของสารอาหารที่นำไปใช้ในสภาวะแวดล้อมที่มีสารอาหารไม่สมดุล โดยจะต้องมีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอและมีแหล่งสารอาหารหลัก เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และโพแทสเซียมอยู่อย่างจำกัด (Singh; & Parmar. 2011: 4907-4919) จากการทดลองพบว่าเมื่อนำตัวอย่างดินจากสถานที่ต่างๆในประเทศไทยทั้งหมด 15 ตัวอย่าง เช่น ดินจากรากพืชในป่า ดินจากนาข้าว ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม ดินป่าชายเลน ดินจากเขื่อนขุนด่านปราการชล และดินจากแปลงการเกษตรสามารถทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสะสมพลาสติกชีวภาพได้ด้วยวิธีการย้อมสี Sudan Black B, Nile red และ Nile blue A ได้แบคทีเรียที่ย้อมติดสีน้ำเงินของ Sudan Black B มากกว่า 200 ไอโซเลท การย้อมติดสีของ Sudan Black B เคยมีรายงานว่าเป็นวิธีคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PHAs ได้ โดยสีชนิดนี้จะเข้าไปจับกับสารที่ไม่มีขั้วที่บริเวณผิวของแกรนูลของพลาสติกชีวภาพภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ (Madison; & Huisman. 1999: 21-53) แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่เลือกมาศึกษาสามารถสังเกตการติดสีได้ดีกว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบกับการติดสีของเชื้อควบคุมซึ่งติดสีได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นการให้คะแนนการติดสีมากหรือน้อยด้วยสายตาของผู้ทดลองจึงเป็นส่วนสำคัญในการพิจารณาคัดเลือกไอโซเลทที่ต้องการ และแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ย้อมติดสีชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยชั้นไขมันน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากสีย้อมชนิดนี้จะติดไขมันได้ดี ดังนั้นพวกแบคทีเรียแกรมลบจะมีปริมาณไขมันที่ผนังเซลล์สูงทำให้เมื่อชะล้างสีด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ผนังเซลล์จะเกิดรูพรุนมากขึ้น ไขมันจึงถูกล้างออกและจะหลุดออกจากเซลล์ได้ง่ายกว่า ดังนั้นการใช้สีย้อม Sudan Black B เพียงชนิดเดียวจึงไม่เพียงพอต่อการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพ

การนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วยสี Nile red ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะพบการเรืองแสงของรอยขีดเชื้อเป็นสีส้มค่อนข้างชัดเจนเมื่อนำจานเพาะเชื้อไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตทำให้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียจากการคัดเลือกด้วยสี Sudan Black B กว่า 200 ไอโซเลทที่สะสม PHAs ได้จำเพาะมากขึ้น โดยได้แบคทีเรียที่สามารถสะสม PHAs จากสี Nile red จำนวน 64 ไอโซเลท สำหรับแบคทีเรียที่ไม่ปรากฏการเรืองแสงใดๆ ได้คัดทิ้งออกไปเช่นเดียวกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสี Nile blue A ที่ความเข้มข้น

เดียวกัน แบคทีเรียที่สามารถสะสม PHAs ได้จะเรืองแสงสีฟ้าหรือเขียวภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จึงสามารถคัดเลือกแบคทีเรียจากสี Nile blue A ได้จำนวน 29 ไอโซเลท และทำการย้อมเซลล์แบคทีเรียที่ติดสีทั้ง 3 ชนิดได้ดีด้วยสารละลาย Nile blue A เพื่อนำไปศึกษาการติดสีแกรนูลของ PHAs ภายในตัวเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนส์ เซลล์จะแสดงแสงสีส้มแดงออกมาอย่างชัดเจน ผลการทดลองพบว่าได้ไอโซเลทที่ติดสีย้อมทั้ง 3 ชนิดมาทำการศึกษาต่อในขั้นตอนการสกัดพลาสติกชีวภาพด้วยคลอโรฟอร์ม การคัดเลือกแบคทีเรียด้วยการใช้สีย้อมทั้ง 3 ชนิด พบว่าการย้อมด้วยสี Nile red และ Nile blue A ให้ผลของการติดสีที่ดีและชัดเจนกว่า Sudan black B โดยสี Nile red และ Nile blue A จะเข้าจับกับสารประเภทไขมันภายในเซลล์ซึ่งจัดเป็นสารประกอบในกลุ่มเอสเทอร์ (ester group) ซึ่งแกรนูลของ PHAs ก็เป็นสารประกอบในกลุ่มของเอสเทอร์เช่นเดียวกัน และสีชนิดนี้จะเรืองแสงเกิดสีได้หลายสี เช่น แดง-เหลือง ที่ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 400-500 นาโนเมตร การเรืองแสงมากหรือน้อยจะขึ้นอยู่กับสารละลายที่ใช้ความหนาแน่นของเชื้อ และปริมาณไขมัน (Greenspan; et al.1985: 965-973) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการทดสอบประสิทธิภาพของการใช้สีย้อมแกรนูลด้วยสี Sudan black B จะมีความไวต่ำกว่าสี Nile blue A และ Nile red ในการคัดเลือกแกรนูลของ P(3HA) และ PHB เมื่อย้อมด้วยสี Nile blue A จะแสดงการเรืองแสงที่เข้มกว่าการใช้สีย้อม Sudan black B และพบว่าสามารถใช้สี Nile red ในการวัดปริมาณการเรืองแสงของ P(3HB) ได้ดีกว่าการย้อมด้วยสี Sudan black B เช่นกัน (Ostle; & Holt.1982: 238-241)

การนำแบคทีเรียที่ย้อมติดสีทั้ง 3 ชนิดไปทดลองต่อโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เพิ่มปริมาณกลูโคสเพื่อให้เกิดการสะสม PHAs มากขึ้น และนำไปสกัดพลาสติกชีวภาพออกจากเซลล์ด้วยวิธีคลอโรฟอร์ม โดยคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่ให้ปริมาณการสะสมของ PHAs สูงสุด 5 ลำดับแรกมาศึกษาการระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยการศึกษาลำดับเบสบริเวณยีน 16S rDNA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท PE3, PPL2, PMK5 และ PMS3 มีความเหมือนทางพันธุกรรมกับแบคทีเรียในสปีชีส์ *Bacillus cereus* สำหรับไอโซเลท PMK1 มีความเหมือนกับแบคทีเรียในสปีชีส์ *Lysinibacillus sphearicus* สำหรับแบคทีเรียในจีนัสของ *Bacillus* sp. มีความหลากหลายสูงและแต่ละสปีชีส์จะมีความใกล้เคียงกันมาก นอกจาก *Bacillus cereus* ยังมีสปีชีส์อื่นๆ ที่สามารถสร้างพิษในอาหารได้ เช่น *B.thuringiensis* และ *B.mycoides* โดยในปัจจุบันนี้การใช้ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rDNA จึงไม่ถูกต้องเพียงพอสำหรับการระบุสปีชีส์ของแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* sp. จึงมีการระบุชนิดของแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* sp. โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงต่อบริเวณยีนไกเรส (gyrase gene) เพื่อให้สามารถตรวจหา *Bacillus cereus* ได้

ง่าย รวดเร็ว และมีความจำเพาะสูงถึงแม้จะมีปริมาณเชื้ออยู่น้อยก็ตาม วิธีนี้จึงนำมาใช้ในขั้นตอนของการตรวจสอบคุณภาพอาหารในระบบอุตสาหกรรมได้ดี (Manzano; et al. 2003: 1361-1366) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ และศึกษาลักษณะทางชีวเคมีไปพร้อมๆกับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs และวิธีการสกัดที่ดีที่สุดจึงคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 มาทำการศึกษาหาสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิต PHAs ให้ได้สูงสุด เนื่องจาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย เช่น กลูโคส, ซูโครส, ไซโลส, อะราบิโนส, แลกโตส, โมลาส ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการเกษตร, กลีเซอรอลบริสุทธิ์ และกลีเซอรอลดิบที่ได้จากขั้นตอนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันเหลือทิ้งในครัวเรือน และยังสามารถผลิตพลาสติกชีวภาพออกมาในปริมาณสูงสม่ำเสมอในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต PHAs ของแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 6 ชนิด คือ กลูโคส, ซูโครส, ไซโลส, กลีเซอรอลบริสุทธิ์, อะราบิโนส และแลกโตส ด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน 4 วิธี จากนั้นนำน้ำหนักของผลผลิต PHAs ที่สกัดได้ (กรัมต่อลิตร) มาเปรียบเทียบกับน้ำหนักของเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) และคิดเป็นผลผลิตร้อยละ (%Yield) จากผลผลิตที่ได้ทั้งหมดพบว่าวิธีสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเป็นการสกัดที่ดีที่สุดซึ่งสามารถสกัด PHAs ออกมาได้สูงกว่าวิธีอื่นๆ โดยสายพันธุ์ PMS3 เมื่อเลี้ยงด้วยซูโครสได้ผลผลิตของ PHAs สูงสุดเท่ากับ 1.09 กรัมต่อลิตร (51.77 เปอร์เซ็นต์) สายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคสเท่ากับ 1.09 กรัมต่อลิตร (44.78 เปอร์เซ็นต์) สายพันธุ์ PPL2 เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคสเท่ากับ 0.99 กรัมต่อลิตร (43.42 เปอร์เซ็นต์) สายพันธุ์ PMK5 เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคสเท่ากับ 1.3 กรัมต่อลิตร (39.43 เปอร์เซ็นต์) สายพันธุ์ PMK1 เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคสเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (20.0 เปอร์เซ็นต์) และ *Alcaligenes eutrophus* เมื่อเลี้ยงด้วยซูโครสเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร (19.61 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งจะเห็นได้ว่าแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียนำไปใช้ผลิต PHAs ได้ปริมาณสูงสุด คือ ซูโครสและกลูโคส และการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์คลอโรฟอร์มวิธีนี้จะได้ PHAs ที่มีสีขาว น้ำหนักโมเลกุลสูง และมีความบริสุทธิ์สูง แต่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก (Griffin. 1994: pp. 8-154) มีรายงานก่อนหน้านี้พบว่าการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม จะได้ PHAs จาก *Bacillus cereus* ที่มีความบริสุทธิ์ถึง 92 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณผลผลิต 31 เปอร์เซ็นต์ (Kunasundari; & Sudesh. 2011: 620-634)

วิธีการสกัดด้วยสารละลาย SDS ที่เลือกมาใช้สกัดพลาสติกชีวภาพเพื่อต้องการลดการใช้สารคลอโรฟอร์มซึ่งมีความเป็นพิษและย่อยสลายได้ยากในสิ่งแวดล้อม การสกัดด้วย SDS ทั้ง 3 วิธี

พบว่าการสกัดด้วย SDS และความร้อนสูง สามารถสกัดพลาสติกชีวภาพออกมาได้ดีที่สุด โดยได้ผลผลิต PHAs สูงสุดจากสายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงด้วยซูโครสเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (31.25 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือวิธีการสกัดด้วย SDS ร่วมกับไลโซไซม์และความร้อนสูงได้ผลผลิต PHAs สูงสุดจากสายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลบริสุทธิ์เท่ากับ 0.73 กรัมต่อลิตร (31.61 เปอร์เซ็นต์) สำหรับการสกัดด้วย SDS เพียงอย่างเดียวได้ผลผลิต PHAs สูงสุดจากสายพันธุ์ PE3 เมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคสเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร (22.50 เปอร์เซ็นต์) จะเห็นได้ว่าปริมาณสูงสุดของ PHAs ที่สกัดได้จาก *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ค่อนข้างใกล้เคียงกันแต่ผลผลิตที่ได้มาจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน สำหรับทั้ง 3 วิธีที่ใช้ SDS เป็นสารสกัดหลักในการบ่มเซลล์และยังใช้สารที่มีความเป็นด่างสูงร่วมด้วย คือ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ซึ่งเคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าการแยก PHB จากเชื้อ *Bacillus cereus* ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์จะช่วยย่อยผนังเซลล์ และล้างด้วยเมทานอลจะทำให้ได้พอลิเมอร์ที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น การใช้สภาวะการสกัดที่เป็นด่างสูงจะทำลายสายของพอลิเมอร์จึงมีผลต่อคุณสมบัติและโมเลกุลของพอลิเมอร์โดยระยะเวลาที่เหมาะสมอยู่ที่ไม่เกิน 60 นาที และการใช้สารลดแรงตึงผิวก่อนทำการสกัดจะช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์และได้โมเลกุลของพอลิเมอร์ที่สูงขึ้นด้วย (Williamson; & Wilkinson. 1958: 198-209)

การผลิต PHAs ในเซลล์แบคทีเรียจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สภาวะไม่สมดุลจึงต้องสะสมแหล่งพลังงานไว้ในรูปของแกรนูลซึ่งสภาวะนั้นต้องมีแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอและมีแหล่งไนโตรเจนที่จำกัด (Sindhu; et al. 2011: 783-794) การศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว nutrient broth ที่เพิ่มกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และเพิ่มแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมคลอไรด์, ยีสต์สกัด และเปปโตน พบว่ายีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ให้ผลผลิต PHAs สูงสุดเท่ากับ 0.22 กรัมต่อลิตร (15.62 เปอร์เซ็นต์) เปปโตนที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ให้ผลผลิต PHAs สูงสุดเท่ากับ 0.04 กรัมต่อลิตร (15.12 เปอร์เซ็นต์) แต่สารอาหารทั้งสองชนิดเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่แล้วใน nutrient broth อย่างละ 0.15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายที่ผลิต PHAs ได้สูงสุดโดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

เมื่อทราบแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และวิธีสกัดที่เหมาะสม จึงทำการเลี้ยงเซลล์ในสูตรอาหารที่มีการจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจน โพแทสเซียม และซัลเฟอร์ ได้แก่ สูตร N deficient, N limit, K limit และ S limit (Gowda; & Shivakumar. 2013: 794-802) ซึ่งพบว่าสูตรอาหารที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ สูตร N deficient ได้ PHAs เท่ากับ 1.06 กรัมต่อลิตร (54.11 เปอร์เซ็นต์) อาหาร

สูตรนี้มีส่วนประกอบของแหล่งไนโตรเจนจากยีสต์สกัดและเปปโตนอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร หรือ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เมื่อรวมกันจะมีแหล่งไนโตรเจนอยู่ทั้งหมด 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ซึ่งเป็นปริมาณความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการผลิต PHAs แต่เมื่อปรับสูตรอาหาร N deficient โดยการนำแหล่งไนโตรเจนออกทั้งหมดพบว่าเซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตได้น้อยและไม่ผลิต PHAs ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนจึงมีความสำคัญในการเจริญและการสะสม PHAs ของเซลล์

การศึกษาสภาวะความเป็นกรด-เบสตั้งแต่ 5-9 โดยเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหาร N deficient และใช้กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 มีความเหมาะสมที่สุดในการผลิต PHAs โดยให้ผลผลิต PHAs สูงถึง 0.62 กรัมต่อลิตร (53.92 เปอร์เซ็นต์) แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6 หรือ สูงกว่า 8 พบว่าเซลล์ไม่มีการเจริญเติบโต สำหรับช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุดชั่วโมงที่ 36 วัดการดูดกลืนแสงได้ OD_{600} เท่ากับ 3.733 และได้ผลผลิต PHAs เท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตร (28.37 เปอร์เซ็นต์) หลังจากนั้นเซลล์ก็เริ่มเจริญน้อยลงและเมื่อเลี้ยงเซลล์จนครบ 48 ชั่วโมง พบว่ามีการสะสม PHAs สูงสุดเท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตร (50.76 เปอร์เซ็นต์)

การศึกษา *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนเหมาะสมและถูกจำกัดแหล่งสารอาหารบางชนิดก็จะช่วยให้การสะสม PHAs ในตัวเซลล์เพิ่มสูงขึ้น การเพิ่มผลผลิต PHAs โดยเลี้ยงเซลล์ด้วยสูตรอาหาร N deficient และหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน 1-5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 โดยเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันจำนวน 6 ชนิด คือ กลูโคส, ซูโครส, กลีเซอรอลบริสุทธิ์, ฟรุกโตส, โมลาส และกลีเซอรอลดิบ เมื่อใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) พบว่าผลผลิต PHAs ที่ได้จากแหล่งคาร์บอนมีการเพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นและให้ปริมาณ PHAs สูงสุด คือ ซูโครส, กลูโคส, โมลาส, กลีเซอรอลบริสุทธิ์, ฟรุกโตส และกลีเซอรอลดิบ ตามลำดับ โดยซูโครสที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จะให้ผลผลิต PHAs เท่ากับ 1.34 กรัมต่อลิตร (78.81 เปอร์เซ็นต์) แต่ผลผลิต PHAs ที่สกัดได้จากฟรุกโตสและกลีเซอรอลดิบจะลดต่ำลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเซลล์ด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) พบว่ามีการผลิต PHAs เพิ่มสูงขึ้น และให้ปริมาณ PHAs สูงสุด คือ ซูโครส, กลูโคส, โมลาส,ฟรุกโตส, กลีเซอรอลบริสุทธิ์ และกลีเซอรอลดิบ ตามลำดับ ผลผลิต PHAs สูงสุดจากซูโครสที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เท่ากับ 2.89 กรัมต่อลิตร (95.50 เปอร์เซ็นต์) แต่ผลผลิต PHAs จากกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นเดียวกันกลับต่ำกว่าเดิม สำหรับโมลาสซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการเกษตรก็สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิต PHAs ได้ดีโดยให้ผลผลิตสูงกว่าการเลี้ยงด้วยหัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ถึง 14.67 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารผสมโมลาสที่ความเข้มข้นสูงกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) กลับไม่พบการเจริญเติบโตของเซลล์แสดงว่าสารอินทรีย์ต่าง ๆที่ปะปนอยู่ในโมลาสมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ สำหรับกลีเซอรอลดิบไม่สามารถผลิต PHAs ได้อย่างสม่ำเสมอในหลอดทดลองเนื่องจากมี

ปริมาณของเสียปนเปื้อนอยู่มาก และมีค่าความเป็นเบสสูงถึง 9 จึงต้องมีการใช้ 1N HCl ปริมาณมากในการปรับความเป็นกรด-เบสจึงอาจเกิดเกลือขึ้นซึ่งจะไปจำกัดการเจริญของเซลล์ได้ สำหรับผลผลิตจากกลีเซอรอลบริสุทธิ์ถึงแม้จะมีแนวโน้มของการผลิตเพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้น แต่ที่หัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) กลับให้ผลผลิตสูงสุดที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เพียง 0.94 กรัมต่อลิตร (31.33 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งต่ำกว่าผลผลิตจากการใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่ความเข้มข้นเดียวกันได้ผลผลิต 1.31 กรัมต่อลิตร (46.82 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่ากลีเซอรอลบริสุทธิ์เมื่อมีการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นสูงขึ้นแต่ปริมาณแหล่งคาร์บอนเท่าเดิมจึงอาจไม่เพียงพอต่อเชื้อที่เพิ่มขึ้นในอาหารเหลวผลผลิตที่ได้จึงลดต่ำลง กลีเซอรอลบริสุทธิ์นั้นจะถูกเชื้อนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ต่างจากสารกลุ่มน้ำตาลโดยผ่านกระบวนการของ β-oxidation มีเอนไซม์ enoyl-CoA hydratase จากยีน *phaJ* เข้ามาเปลี่ยนกรดไขมันไปเป็น 3-hydroxyacyl-CoA แล้วเกิดปฏิกิริยา polymerization โดยเอนไซม์ PHA polymerase จากยีน *phaC* ได้ PHA เป็นผลิตภัณฑ์ (Aldor; & Keaslingy. 2003: 475-483) ส่วนกลีเซอรอลดิบนั้นให้ผลผลิตลดต่ำลงตามความเข้มข้นและมีการเจริญเติบโตของเซลล์น้อยมาก เนื่องจากกลีเซอรอลดิบที่นำมาใช้มีความบริสุทธิ์ต่ำอาจมีสารอื่นๆเจือปนอยู่มาก จึงมีผลไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ซึ่งส่วนประกอบที่มีอยู่ในกลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลประกอบด้วย กลีเซอรีน, เอทานอลหรือเมทานอล, น้ำ, โซเดียมคลอไรด์ และสารประกอบอินทรีย์ (เมทิล/เอทิลเอสเทอร์และกรดไขมันอิสระ) (Cvengros; & Povazance. 1996: 145-150) ฟรุกโตสให้ผลผลิตสูงสุดที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และผลผลิตลดต่ำลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แสดงว่าฟรุกโตสเมื่อเข้าสู่ขั้นตอนของไกลโคไลซิสจะมีการผลิตกรดออกมาปริมาณมากกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆจนไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ จากการรายงานก่อนหน้านี้พบว่าการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของฟรุกโตสจะไปยับยั้งการเจริญของ *Ralstonia eutropha* เนื่องจากไปเพิ่มแรงดันออสโมซิสทำให้เกิดความไม่สมดุลกันระหว่างกระบวนการไกลโคไลซิสและกระบวนการออกซิเดชันภายในเซลล์และเมื่อแหล่งคาร์บอนเข้าสู่การเผาผลาญมากเกินความจำเป็นของเซลล์จึงเกิดการผลิตกรด เช่น กรดอะซิเตทมายับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ (Tabandeh; & Farahani. 2002: 37-42)

ผลผลิต PHAs ที่สกัดได้จากแหล่งคาร์บอนต่างๆ ทำการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยวิธี NMR และหมู่ฟังก์ชั่นของสารด้วย FTIR พบว่าผลผลิตจากทุกแหล่งคาร์บอนเป็นพลาสติกชีวภาพชนิด PHB หรือ Polyhydroxybutyrate ทั้งหมด จึงมีการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลเป็นกรดไขมัน คือ กรดโพรพิโอนิกและกรดลิวูลินิกที่ความเข้มข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยกรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ให้ผลผลิตสูงสุด 0.3 กรัมต่อลิตร (22.96 เปอร์เซ็นต์) และกรดลิวูลินิกที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ให้ผลผลิตสูงสุด 0.27 กรัมต่อลิตร (25.66 เปอร์เซ็นต์) แต่ภายหลังสกัดเก็บชิ้นพลาสติกได้ค่อนข้างยากเพราะมีลักษณะเป็นก้อนแข็งขนาดเล็กกระจายอยู่ในสารละลายภายในหลอดทดลอง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารมากขึ้น

เซลล์มีการเจริญน้อยลงจึงให้ผลผลิต PHBV น้อยลงตามไปด้วยอาจเป็นเพราะการใช้กรดลิวูลินิกที่ปริมาณความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้น้อยลง (Wang; et al. 2013: 1-8) เมื่อศึกษาจากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย NMR และ FTIR พบว่าตัวอย่างละลายได้ไม่หมดในสารละลายคลอโรฟอร์มอาจเป็นเพราะมีสารอื่นๆ เจือปนอยู่และมีสเปกตรัมคล้ายกับโคพอลิเมอร์ PHBV มาตรฐานแต่ค่อนข้างต่ำกว่าสเปกตรัมมาตรฐาน ดังนั้นกรดไขมันทั้งสองชนิดนี้จึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจในการนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อเพื่อให้เกิดการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารจาก PHB เป็น PHBV จึงนำกรดโพรพิโอนิกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ผสมรวมกับแหล่งคาร์บอนจากโมลาสที่ความเข้มข้นสูงสุด 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยให้ผลผลิต 0.4 กรัมต่อลิตร (20.30 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่าเชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากโมลาสมาเป็นแหล่งคาร์บอนนำมาสร้างเป็นสารตั้งต้นของมอนอเมอร์ P(3HB) และใช้กรดโพรพิโอนิกมาเป็นแหล่งคาร์บอนนำมาสร้างเป็นสารตั้งต้นของมอนอเมอร์ P(3HV) แล้วได้เอนไซม์ PHA synthase จากยีน *phaC* มาทำปฏิกิริยา polymerization เชื่อมต่อโมโนเมอร์ทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันเป็นสารประเภทโคพอลิเมอร์ Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) ซึ่งเคยมีการรายงานก่อนหน้านี้พบว่า *Bacillus sp.* หลายสายพันธุ์สามารถสะสม PHBV ได้เมื่อเลี้ยงด้วยสาร n-alkanoic acids เช่น propionic acid, valeric acid และ heptanoic acid (Chen; et al. 1991: 173-176)

ปี ค.ศ. 1992 ได้รายงานว่าการใช้กรดโพรพิโอนิกจะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. eutrophus* เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงกว่า 0.5 กรัมต่อลิตรในการหมัก (Kim, J.H. et al. 1992: 903-906) และผลผลิต PHBV ส่วนใหญ่ที่ได้จาก *Bacillus sp.* ที่ใช้ n-alkanoic acids เพิ่มเข้ามาเป็นแหล่งสารอาหารมักจะมีการสะสม PHBV ได้ต่ำในตัวเซลล์ แต่ถึงอย่างไรก็ตาม PHBV ก็ยังคงเป็นที่ต้องการทางการแพทย์เพราะมีโครงสร้างที่ยืดหยุ่นได้สูง สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อร่างกายได้ดี และสามารถย่อยสลายได้เอง (Valappil; et al. 2007: 1-17.; & Philip; et al. 2007: 233-247) และถ้าต้องการทราบปริมาณของมอนอเมอร์ P(HB) กับ P(HV) จากผลผลิต PHBV ได้นั้นต้องนำตัวอย่างพลาสติกชีวภาพที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี gas-chromatography (GC) เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างที่เป็นสารผสมโดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารผสมบนเฟสคงที่ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ อาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล จุดเดือด โครงสร้างของสารและสมบัติทางเคมีในการทำปฏิกิริยากับสารที่อยู่ภายในคอลัมน์จึงสามารถวิเคราะห์ P(HB) กับ P(HV) แยกกันได้เป็นโมลเปอร์เซ็นต์จึงจะทราบปริมาณที่แน่นอนของมอนอเมอร์แต่ละชนิดที่มีอยู่ในสารตัวอย่างได้ (Goh; & Tan 2012: 211-219) ซึ่งเคยมีรายงานตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1991 ว่าสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ระหว่าง 3-hydroxybutyrate (3HB) กับ 3-hydroxyvalerate (3HV) ของเชื้อจีนัส

Bacillus เมื่อทำการเพิ่มสารตั้งต้นประเภท n-alkanoic acids เช่น กรดโพรพิโอนิก กรดวารีลิก และกรดเฮปทาโนอิก (Chen; et al. 1991: 173-176) สำหรับการนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เคยมีการศึกษาการผลิต PHBV ของเชื้อ *Bacillus megaterium* P12 แบบสองระยะในถังหมัก 5 ลิตร เมื่อใช้น้ำตาลอ้อย 9 กรัมต่อลิตรและโซเดียมโพรพิโอเนต 4.5 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ผลผลิต PHBV 23.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้ปริมาณสัดส่วนของ 3HV เท่ากับ 25 โมลเปอร์เซ็นต์ (Kulpreecha; et al. 2009: 240-245)

จากผลการศึกษา *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 พบว่ามีศักยภาพสูงในการผลิตสารกลุ่ม PHAs ได้ปริมาณสูงและเชื้อนี้สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHB เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลที่หลากหลายและสามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุเหลือทิ้งอย่างโมลาสได้ดี โดยสามารถผลิต PHB ได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งโดยให้ผลผลิตสูงกว่ารายงานอื่นซึ่งใช้เชื้อในจีนัส *Bacillus* sp. เช่นเดียวกัน ดังรายงานที่มีก่อนหน้านี้ว่าการนำ *B. megaterium* BA-019 มาเลี้ยงโดยใช้โมลาสจากน้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนในถังหมักแบบ fed-batch ได้ผลผลิตสูงสุด 42 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Kulpreecha; et al. 2009: 240-245) และ *Bacillus cereus* PHA 008 ที่แยกได้จากดินในประเทศไทยสามารถผลิต PHA ได้ 64.09 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อนำมาเลี้ยงด้วยน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มภายใต้สภาวะแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Sangkharak; & Prasertsan. 2012: 173-182) และ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 ยังสามารถผลิตโคพอลิเมอร์ PHBV ได้เมื่อมีการเพิ่มแหล่งคาร์บอนจากกรดไขมัน เช่น กรดโพรพิโอนิกและกรดลิวลูลินิก แม้ว่าจะสามารถผลิดได้น้อยก็ตาม ฉนั้นการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHBV โดยใช้ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ PE3 น่าจะเป็นสิ่งที่น่าสนใจสำหรับการทดลองในอนาคต นอกจากนี้การศึกษาขั้นต่อไปควรนำผลผลิต PHAs ที่สกัดได้มาทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์ เช่น อุณหภูมิหลอมเหลว (Melting Temperature หรือ T_m) อุณหภูมิกลาสทรานสิชัน (Glass Transition Temperature หรือ T_g) อุณหภูมิสลายตัว (Degradation Temperature หรือ T_d) ความทนต่อแรงดึง (Tensile strength) ความยืดหยุ่น (Flexibility) และความทนต่อการกระแทก (Impact strength) เป็นต้น (Asrar, J.; & Gruys, K.J. 2001: 53-90) และการศึกษาประสิทธิภาพของ PHAs ที่สกัดได้ต่อการย่อยสลายได้เองในสภาวะแวดล้อมธรรมชาติ รวมถึงการพัฒนาปรับปรุงโครงสร้างโดยการเลี้ยงเชื้อด้วยสับเสตรทอื่นๆให้เหมาะสมต่อการผลิตโคพอลิเมอร์เพื่อการขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์

บรรณานุกรม

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บรรณานุกรม

กรมวิทยาศาสตร์บริการ. (2553). พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradeble plastic). กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. สืบค้นเมื่อ 11 ธันวาคม 2556, จาก http://siweb.dss.go.th/fulltext/IR12.html

ธนาวดี ลี้จากภัย. (2549). สาระน่ารู้ด้านโพลิเมอร์. *วารสารสมาคมโพลิเมอร์.* 6: 3-9. สืบค้นเมื่อ 5 มกราคม 2557, จาก http://www.vcharkarn.com/varticle/38245.html

ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และ วรวรรณ พันธุมนาวิน (2548) สรุปบรรยายวิชาชีวเคมี. (เอกสารประกอบคำสอน). ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

พริ้ม ศรีหานาม. (2553). BioPlastic ย่อยสลายได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามมาตรฐานสากล. สืบค้นเมื่อ 16 มกราคม 2557, จาก http://www.engineeringtoday.net/pdf/etoday8753/48-Environment.html

สิริลักษณ์ บัวทอง. (2551). การศึกษาศักยภาพในการผลิตสารโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอจากตะกอนของระบบบำบัดน้ำเสียโรงงานอุตสาหกรรม. ปริญญานิพนธ์ วศ.ม. (สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

สำนักนวัตกรรมแห่งชาติ (NIA). (2002). สืบค้นเมื่อ 3 มีนาคม 2557, จาก http://www.nia.or.th/bioplastics/introduction.php

Agharkar. (2010) A process for production of co-polymer PHB-*co*-PHV by *Bacillus cereus. Indian Patents*. p.1-17.

Aldor, S.I.; & Keaslingy, D.J. (2003). Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 475–483.

Anshuman; et al. (2009) Utilization of molasses spentwash for production of bioplastics by waste activated sludge. *Waste Management*. 29: 2558–2565.

Asrar, J.; & Gruys, K.J. (2001) Biodegradable Polymer (Biopol®) in Biopolymers, Polyesters I. *Wiley-VCH*. 3: p. 53-90.

Andrea; et al. (2010). Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other haloarchaeal species. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 87(3): 1119-1127.

Ayub; et al. (2004) A polyhydrobutyrate –porducig *Pseudomonas* sp. isolated from Antarctic environments with high stress resistance. *Current Microbiology*. 49: 170-174.

Ballard; et al. (1987). Formation of polymers of hydroxybutyric acid in bacterial cells and a comparison of the morphology of growth with the formation of polyethylene in the solid state. *Recent Advances in Mechanistic and Synthetic Aspects of Polymerization.* 215: 293-314.

Beedle; et al. (2000) A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a Zooloea sp. Carbohydrate Polymers. 42: 375-383

Beveridge, T.J. (2001) Use of the Gram stain in microbiology. *Biotech Histochem* 76(3): 111–8.

Berlanga; et al. (2006) Rapid spectrofluorometric screening of poly-3-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. International Microbiology 9: 95-102.

Berezina. (2012) Enhancing the 3-hydroxyvalerate component in bioplastic PHBV production by *Cupriavidus necator*. Biotechnology Journal. 7: 304-309.

Braunegg, G.; Lefebvre, G.; & Genser K. F. (1998) Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnol*. 65: 127-161.

Burdon; et al. (1942a) Studies of the common aerobic spore-forming Bacilli staining for fat with Sudan Black B- stain. *Journal of Bacteriology*, 43 : 717-72.

Chang; et al. (1994). Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of Sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering*. 44: 256-261.

Chen; et al. (1991) Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiology Letter*. 84: 173–176.

Chen, G.Q.; & Wu, Q. (2005) The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*. 26: 6565-6578.

Chen, G.Q. (2010). Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications. *Microbiology Monographs*. 14: 17-30

Choi, J.; & LEE, S.Y. (2000) Economic consideration on the production of poly(β-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacterial fermentation. *Applied Microbial Biotechnology*. 53: 646-649.

Cox, M. K. (1994). Properties and applications of polyhydroxyalkanoates. In : Y. Doi and K. Fukuda, Eds., Biodegradable plastics and polymers. *Elsevier Science*. pp. 120–135

Cvengros, J.;& Povazance, F. (1996) Production and treatment of rapeseed oil methyl ester as alternative fuels for diesel engines. *Bioresource Technology*. 55: 145-150.

Darani; et al. (2013). All rights reserved microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 97: 1407-1424.

Dawes, A.E.;& Senior, J.P. (1973). The regulation of poly- β-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal.* 134: 225-238.

Doi. (1990) Microbial Polyesters. *VCH Publishers, Inc*. New York, USA.

Drobniewski, F.A. (1993) Bacillus cereus and related species. *Clinical Microbiology and Infection***.** 6: 324-338.

European bioplastics. (2014). Retrieved January 30, 2014. from http://www.european-bioplastics.org

Greenspan, P.; Mayer, E.P.;& Fowler, S.D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *Journal Cell Biology.* 100: 965-973.

Goh; & Tan. (2012) Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island. *Microbiological Research*. 167: 211-219.

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. *Microbiological Research.* 156: 201-207.

Gowda; & Shivakumar (2013) Poly(3)hydroxybutyrate (PHB) production in *Bacillus thuringiensis* iam 12077 under varied nutrient limiting conditions and molecular detection of class iv PHA synthase gene by PCR. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 4(1): 794-802.

Griffin, G.J.L. (1994). Chemistry and technology of biodegradable polymers. London: Blackle academic and Professional. pp. 8-154

Gross, R.A.; & Kalra, B. (2002) Biodegradable polymers for the environment. *Science*. 297(5582): 803-807.

Hartman, T.L. (1940) The use of Sudan Black B as a bacterial fat stain. *Staining Technology.* 15: 23-28.

Hahn; et al. (1994) Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*. 61: 34-39.

Holmes, P.A. (1985) Application of PHB, a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physiology Technology*. 16: 32-36.

Hocking; et al. (1994). Enzymatic degradability of isotactic versus syndiotactic poly(β-hydroxybutyrate). *Macromolecular Rapid Communications.* 15(6): 447-452.

Hocking; & Marchessault. (1994): Biopolyesters. p. 48-96. In Griffin, G. J. L. (ed.), Chemistry and technology of biodegradable polymers. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK.

Jo; et al. (2006). Production system for biodegradable polyester polyhydroxybutyrate by *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 102: 233-236.

Jiamin, T.; Sinskey, A.J.; & Stubbe, J. (2005). Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy. *Journal of Bacteriology*. 11: 3814-3824.

Jiun; et al. (2010). Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. *Applied Microbiology and Biotechnology.* :1395-1402..

Kalia; et al. (2000) Bioplastics. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 59 : 433-445.

Kaewkannetra, P.; & Tanamool, V. (2011). Direct screening of potential Polyhydroxy-alkanoates (PHAs) bacterial from soil environment using sweet sorghum as a sole carbon source. *IEEE Journal*. P.397-400.

Kapritchkoff, F.M.; et al. (2006). Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*. 122: 453-462.

Kim, J.H.; et al. (1992) Effect of propionic acid on poly3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid production by *Alcaligenes eutropha*. *Biotechnology Letter*. 14: 903-906.

Kranz, R.G.; Gabbert, K.K.;& MADIGAN, M.T. (1997) Positive selection systems for discovery of novel polyester biosynthesis genes based on fatty acid detoxification. *Applied Environmental Microbiology.* 63(8): 3010-3013.

Kulpreecha; et al. (2009) Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 107(3): 240-245.

Kunasundari; & Sudesh. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters.* 5(7): 620-634.

Labuzek; & Radecka. (2001) Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. *Journal Application Microbiology*. 90: 353-357.

Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E.; & Goodfellow, M. editor. Nucleic acid technique in bacterial systematics. Chichester, UK: John Wiley and Sons, Inc. pp. 115-175.

Law, J.H.; & Slepecky R.A. (1961). Assay of poly-β-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*. 82: 33-36.

Lemoigne, M. (1926). Produit de déshydratation et de polymérisation del'acide- β-oxybutyrique. *Bull Soc Chim Biol (Paris)*. 8: 770-782.

Lewis, I.M. (1941) The cytology of bacteria. *Bacterialogical Reviews.* 5: 181-236.

Lee; et al. (1994) Comparison of recombinant Escherichia coli strains for synthesis and accumulation of poly (3-hydroxybytyric acid) and morphological changes. *Biotechnology and Bioengineering*. 44: 1337-1347.

Lee, S.Y. (1996). Plastic bacteria progress and prospects for polyhydroxyalkanoates production in bacteria. *Trends in Biotechnology.* 14: 431.

Lenz, R.W.; & Marchessault, R.H. (2004) Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules.* 6(1).

Lokesh, B.E.; Shamala, T.R.; & Chandrashekhar, A. (2005) Utilization of organic acids and sugars for PHA co-polymer biosynthesis by a native soil isolate, *Sphingomonas* spp. In : *46th Annual Conference of Association of Microbologists of India*. p. 48.

Louis, P.; & Paladino, A. (2009). Screening, optimization and extraction of polyhydroxyalkanoates and peptidoglycan from *Bacillus megaterium.* [Thesis M.Sc. Biological Sciences]. USA: Michigan Technological University. Photocopied.

Luzier, W.D. (1992) Materials derived from biomass/biodegradable materials. *ICI BioProducts and Fine Chemicals*. 89: pp. 839-842.

Lu, J.; Tappel, R.C.; & Nomura, C.T. (2009). Mini-review : Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). *Polymer.* 49: 226-248.

Madison, L.L.; & Huisman, G.W. (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 63(1): 21-53.

Manzano; et al. (2003). A molecular method to detect Bacillus cereus from a coffee concentrate sample used in industrial preparations. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 1361-1366.

MicrobeWiki. (2013). Retrieved March 13, 2013, from https://microbewiki.kenyon.edu

Naheed; et al. (2011). Screening of contaminated soils for biodegradable plastic producing bacteria and profiling of their resistance markers. *African Journal of Microbiology Research.* 5(24): 4097-4104.

Ojumu, T.V.; Yu, J.; & Solomon, B.O. (2004) Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*. 3(1): pp. 18-24.

Omar; et al. (2001) Optimziation of cell growth and poly-3-hydroxybutyrate accumulation on date syrup by *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letters*. 23: 1119-1123.

Ostle, G.A.; & Holt J.G. (1982). Nile blue A as a fluorescent stain for poly-3-hydroxybutyrate. Applied and *Environmental Microbiology*. 44(1): 238-241.

Page, W.J. (1992) Production of Polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* strain UWD in beet molasses culture. *FEMS Microbiol Reviews.* 103: 149-158.

Page, W.J. (1995). Bacterial polyhydroxy alkanoates, natural biodegradable plastics with a great future. *Canadian Journal of Microbiology*. 141: 1-3.

Pal, S.; & Paul, A.K. (2000) Accumulation of biodegradable plastics by *Azotobacter*. In : *59th Annual Conference of Association of Microbologists of India*. p. 58.

Phanse; et al. (2011). Screening of PHA (polyhydroxyalkanoate) producing bacteria from diverse sources. *International Journal of Biosciences.* 1(6): 27-32

Philip, S.; Keshavarz, T.; & Roy, I. (2007) Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal Chemical Technology Biotechnology*. 82: 233–247.

Priest, F. G.; et al. (1988). A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Journal Genetics Microbiology*. 134: 1847-1882.

Quarkology. (2012). Retrieved January 27, 2015. from http://www.quarkology.com

Ramsay; et al. (1990) Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant hypochlorite treatment. *Biotechnological technique*. 4: 221-226.

Ramasay; et al. (1994) Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnology and Bioengineering*. 8: 589-594.

Ramsay; et al. (1995) Hemicellulose as a potential substrate for production of (poly-3-hydroxybutyrates). *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 262-266.

Rawte; & Mavinkurve. (1998) Polyhydroxybutyrates from mangrove flora. *Annual Conference of Association of Microbiologists of India*: *Mangalore*. p. 241.

Raveendran; et al. (2011). Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from crude glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and improving its thermal properties by blending with other polymers. *Brazilian Archives of Biology and Technology.*4: 783-794.

Renner; Haage; & Braunegg. (1996) Production of short-side-chain polyhydroxyalkanoates by various bacteria from the rRNA superfamily III. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 46(3): 268-272.

Sangkharak, K.; & Prasertsan, P. (2012). Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. *Journal of General and Applied Microbiology*. 58: 173-182.

Santimano, M.C.; et al. (2009). PHA production using low-cost agro-industrial wastes by *Bacillus* sp. strain COL1/A6. *Research Journal of Microbiology*. 4(3): 89-96.

Seeley, H.W.; & Vandemark, P.J. (1962) Microbes In Action: A laboratory manual of microbiology. *WH Freeman* (San Francisco, London)

Shamala; et al. (2009) Production and characterization of bacterial polyhydroxyalkanoate copolymers and evaluation of their blends by fouriertransform infrared spectroscopy and scanning electronmicroscopy. *Indian Journal Microbiology*. 49(3): 251-258.

Singh; et al. (2009). *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Cell Factories*. 8: 38.

Singh, P.; & Parmar, N. (2011). Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate (PHB)-producing bacteria. *African Journal of Biotechnology*. 10(24): 4907-4919.

Spiekermann; et al. (1999). A sensitive, viable-colony staining method using nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology*. 171: 73-80.

Steinbuchel. (1991) Polyhydroxyalkanoic acids. In: Biomaterials: novel materials from biological sources. (Editor) D. Byrom. Stockton, New York. pp. 124-213.

Steinbuchel. (1996) PHB and other Polyhydroxyalkanoic Acids. In: Biotechnology, (eds.) Rehm, H.J.; & Reed. VCH, New York. pp. 403-464.

Sujatha; et al. (2005) A study on accumulation of PHB in native *Pseudomonas* isolates LDC-5 and LDC-25. *Indian Journal of Biotechnology*. 4: 216-221

Suzuki; et al. (1986) Mass production of poly-3-hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of Methylotroph. *Applied Microbial Biotechnology.* 23: 322-329.

Sudesh; & Doi. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Progress in. Polymer. Science. 25: 1503-1555.

Takagi, Y.; & Yamane, T. (1997). Replica technique for screening poly(3-hydroxyalkanoic acid)-producing bacteria by nile blue staining. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 83: 123.

Tabandeh; & Farahani (2002) Biosynthesis of Poly-β-hydroxybutyrate as a biodegradable polymer. *Iranian Polymer Journal*. 12(1): 37-42.

Tajima; et al. (2003) Isolation and characterization of *Bacillus* sp. INT005 accumulating polyhydroxyalkanoate (PHA) from gas field soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95(1): 77-81.

Tay; et al. (2010). Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulating bacteria from the gut of higher termite *Macrotermes carbonarius* (Blattodea: Termitidae). *World Journal Microbiology Biotechnology*. 26: 1015-1024.

Thuoc; & Quillaguaman (2014) Improving culture conditions for poly(3-hydroxybutyrate-co - 3-hydroxyvalerate) production by *Bacillus* sp. ND153, a bacterium isolated from a mangrove forest in Vietnam. Ann Microbiology. 64: 991-997.

Tsuge; et al. (2005). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer from fructose using wild-type and laboratory-evolved PHA synthases. *Macromolecular Bioscience*. 5: 112-117.

Valappil; et al. (2007) Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera Bacillus and Streptomyces. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 91: 1–17.

Verlinden; et al. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 102: 1437-1449.

Wang; et al. (1996). Screening of soil bacteria for poly-β-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. *Microbial Ecology*. 35: 94-101.

Wang; et al. (2013) Biosynthesis and thermal properties of PHBV produced from levulinic acid by *Ralstonia eutropha*. *PLoS ONE*. 8(4): 1-8.

Westers; et al. (2003). Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis. Molecular Biology and Evolution*. 20: 2076-2090.

Williamson, N.H.; & Wilkinson, J.F. (1958). The Isolation and Estimation of the Poly- β-hydroxybutyrate inclusions of *Bucillus* Species. *Journal of the Society for General Microbiology.* 19: 198-209

Yamane. (1996) Yield of poly-D(-)-hydroxybutyrate from various carbon sources : A theoretical study. *Biotechnology and Bioengineering*. 41: 165-170.

Yilmaz; et al. (2005) Determination of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiol Biotechnology.* 21(4): 565-566.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหาร

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพ (minimal agar)

M9 Salts มีส่วนประกอบ ดังนี้

$Na_2HPO_4 \cdot 7H_20$	30	กรัม
KH_2PO_4	15	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
NH_4Cl	5	กรัม
agar	20	กรัม

นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงจนพอจับขวดอาหารได้ ประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปรวมกับสารอื่นๆที่ทำการฆ่าเชื้อแยกไว้ คือ

$MgSO_4$	2	มิลลิโมลาร์
$CaCl_2$	0.1	มิลลิโมลาร์
glucose (หรือ แหล่งคาร์บอนอื่นๆ)	0.4%	น้ำหนัก/ปริมาตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ครบปริมาตร 1 ลิตร เขย่าเบาๆ ให้อาหารผสมเข้ากันดีจึงเทลงจานเพาะเชื้อ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพ (minimal media)

เตรียมสารละลาย M9 salts ที่ความเข้มข้นสูงๆ แล้วจึงแบ่งนำไปผสมกับสารละลายอื่นๆ เมื่อต้องการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว มีสูตรดังนี้

$Na_2HPO_4 \cdot 7H2O$	64	กรัม
KH_2PO_4	15	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
NH_4Cl	5.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ครบปริมาตร 1 ลิตร กวนผสมให้สารละลายเข้ากันดี แบ่งสารละลายไว้ฟาสก์ละ 200 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเมื่อต้องการเลี้ยงเชื้อจึงนำไปผสมกับสารละลายอื่นๆที่ฆ่าเชื้อแล้วตามปริมาตร ดังนี้

น้ำกลั่น	700	มิลลิลิตร
M9 salts	200	มิลลิลิตร
1M $MgSO_4$	2	มิลลิลิตร
20% glucose (หรือ แหล่งคาร์บอนอื่นๆ)	20	มิลลิลิตร
1M $CaCl_2$	100	ไมโครลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ครบปริมาตร 1 ลิตร เขย่าเบาๆ ผสมให้สารละลายเข้ากันดี แบ่งสารละลายใส่ฟาสก์ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ฟาสก์ละ 100 มิลลิลิตร สำหรับเลี้ยงเชื้อต่อไป

3. Nutrient broth เติม 1 เปอร์เซ็นต์ของแหล่งคาร์บอน

Nutrient broth	13	กรัม
Glucose (หรือ แหล่งคาร์บอนอื่นๆ)	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ประมาณ 7 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหารแข็งเติม agar 20 กรัม ก่อนนำไปฆ่าเชื้อ

3.1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลอง คือ glucose, sucrose, arabinose, lactose, xylose และ pure glycerol

3.2 แหล่งคาร์บอนจากผลผลิตเหลือใช้ โดยเตรียม stock 40 เปอร์เซ็นต์ของกากน้ำตาลและกลีเซอรอลดิบ ปรับ pH ประมาณ 7 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. Luria Bertani broth

Luria Bertani	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Yeast extract-peptone agar medium (YP)

peptone	5	กรัม
yeast extract	1	กรัม
$FePO_4$	0.01	กรัม
agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ประมาณ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. N deficient medium

Glucose	10	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
Peptone	2.5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ประมาณ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6.1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลอง คือ glucose, sucrose, fructose, molasses และ crude glycerol ใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-5 เปอร์เซ็นต์ propionate และ levulinic acid ใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-1 เปอร์เซ็นต์

7. N limit medium

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
KCl	3	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5.0	กรัม
defatted soybean dialysate	100	มิลลิลิตรl
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ประมาณ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7.1 defatted soybean dialysate เตรียมจาก defatted soybean meal 10 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

8. K limit medium

Glucose	10	กรัม
Peptone	10	กรัม
Casein	5	กรัม

NaCl	13	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ประมาณ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. S limit medium

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
KCl	3	กรัม
NH_4Cl	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ประมาณ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และวิธีการเตรียมสาร

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และวิธีการเตรียมสาร

1. สารละลายสำหรับคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน (Winogradsky salt)

K_2HPO_4	0.25	กรัม
$MgSO_4$	0.125	กรัม
NaCl	0.125	กรัม
$Fe_2(SO_4)_3$	2.5	มิลลิกรัม
$MnSO_4$	2.5	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. 5% sodium hypochlorite

sodium hypochlorite	5	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร	100	มิลลิลิตร

3. 20% sodium dodecyl sulfate (SDS)

sodium dodecyl sulfate	20	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร	100	มิลลิลิตร

4. Sudan Black B solution

Sudan Black B	0.03	กรัม
เอทานอล	60	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร	100	มิลลิลิตร

เก็บสารละลายในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

5. phosphate buffer stock solution

KH_2PO_4	64	กรัม
Na_2HPO_4	34	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร	1	ลิตร

ปรับ pH ประมาณ 7 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Nile red

stock : Nile red	0.5	มิลลิกรัม
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	1	มิลลิลิตร

ผสมรวมกับอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยปรับให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. Nile blue A

stock : Nile blue A	0.5	มิลลิกรัม
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	1	มิลลิลิตร

ผสมรวมกับอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยปรับให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8. Stock solution

8.1 1 M Tris-HCl pH 8

Tris	12.11	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร	100	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย 0.1 N HCl

8.2 0.5 M EDTA pH 8

EDTA	18.6	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร	100	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH

8.3 1 M Sucrose

Sucrose	34.23	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร	100	มิลลิลิตร

9. TES buffer pH 8 (10 mM Tris, 25 mM EDTA, 0.6 M Sucrose)

1 M Tris-HCl pH 8	1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA pH 8	5	มิลลิลิตร
1 M Sucrose	60	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	34	มิลลิลิตร

10. HTE buffer pH 8

1 M Tris-HCl pH 8	5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA pH 8	4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	91	มิลลิลิตร

11. 1 M $MgCl_2$

$MgCl_2$	9.52	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร	100	มิลลิลิตร

12. Solution III

CH_3COOH	11.5	มิลลิลิตร
CH_3COOK	29.4	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร	100	มิลลิลิตร

นำ stock solution และ buffer ไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวปรางค์ทอง จรลีรัตน์
วันเดือนปีเกิด	วันเสาร์ที่ 26 สิงหาคม พ.ศ. 2532
สถานที่เกิด	อ.เมือง จ.นครสวรรค์
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	14/6 หมู่ 7 ต.โกรกพระ อ.โกรกพระ จ.นครสวรรค์ 60170

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2551	จบการศึกษาในระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสตรีนครสวรรค์ จ.นครสวรรค์
พ.ศ. 2555	จบการศึกษาในระดับปริญญาตรี สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2558	จบการศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร

ผลงาน	เข้าร่วมการประชุมงานวิชาการระดับนานาชาติ The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference “3Bs : Biodiversity, Biotechnology and Bioeconomy” และจัดแสดงผลงานวิจัย เรื่อง Isolation and production by polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacterial from soil. ณ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย