



## รายงานการวิจัย

ความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชที่สามารถผลิต  
พลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) เพื่อการ  
ประยุกต์ใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ  
(Diversity of polyhydroxyalkanoates (PHAs)-producing  
bacteria from rhizosphere soil for bioplastic industrial  
application)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



## รายงานการวิจัย

ความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชที่สามารถผลิต  
พลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) เพื่อการ  
ประยุกต์ใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ  
(Diversity of polyhydroxyalkanoates (PHAs)-producing bacteria  
from rhizosphere soil for bioplastic industrial application)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร.วาสนา เป็นเครือ

สาขาวิชาปรีคลินิก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวพีระญาณ์ จิระพิพัฒนาพร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2563

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2565

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “ความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (พีเอชบี) เพื่อการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ” รหัสโครงการ SUT1-111-63-12-02(NEW) นี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2563 เพื่อสนับสนุนการสร้างและพัฒนาทีมวิจัยรุ่นใหม่ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.สายสมร ล้ายอง อาจารย์ประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่กรุณาอนุเคราะห์วัสดุและอุปกรณ์ รวมทั้งสารเคมีสำหรับการตรวจวิเคราะห์พลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.มัณฑนา แจ่มกลาง อาจารย์ประจำสาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ อาจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ ชุมเขียว อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สนับสนุนและส่งเสริมการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้ในด้านสถานที่ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาห้อง F2206 อาคารศูนย์เครื่องมือ 2 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับการอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการในการทำงานวิจัย

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณนางสาวพระญาณิ์ จิระพิพัฒน์พร และนางสาวจุฑามาส สันหรัดี นักศึกษาปริญญาตรี สาขาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ร่วมแลกเปลี่ยนเรียนรู้การทำงานด้านการงานวิจัยด้านจุลชีววิทยา ซึ่งเป็นผลลัพธ์หนึ่งของการนำโครงการวิจัยนี้ไปใช้ประโยชน์ในด้านการสอนและการวิจัย เพื่อผลิตนักศึกษาระดับปริญญาตรี

วาสนา เป็นเครือ

มกราคม 2565

หัวข้อโครงการวิจัย	ความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) เพื่อการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ
รหัสโครงการวิจัย	SUT1-111-63-12-02(NEW)
ผู้เขียน	อาจารย์ ดร.วาสนา เป็นเครือ
ปีที่วิจัย	2565

## บทคัดย่อ

การใช้พลาสติกจากปิโตรเคมีส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในด้านการจัดการของเสียที่เกิดขึ้น รวมทั้งกระบวนการผลิตยังก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) จากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินรอบรากพืชในจังหวัดนครราชสีมา ลำปางและชลบุรี ด้วยวิธี Dilution spread plate บนอาหาร Mineral salt medium (MSM) ที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 1 Brix° เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพีเอชเอโดยการย้อมเม็ดพลาสติกชีวภาพภายในเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธี Nile red staining ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงและวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย Gas chromatography โดยใช้สถิติ One-way ANOVA ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง นอกจากนี้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีเบื้องต้นและวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียคัดเลือก 5 ไอโซเลท ผลการวิจัยพบว่า แบคทีเรียจำนวน 396 ไอโซเลทถูกแยกจากตัวอย่างดินรอบรากพืชจำนวน 40 ตัวอย่างดิน และสามารถสะสมเม็ดพลาสติกชีวภาพชนิดพีเอชเอภายในเซลล์ ทั้งนี้พบว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Gas chromatography แบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท WP14-2, WP18-1, WP32-2, WP43-4 และ WP45-2 สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีวาลอเรท (พีเอชวี) ได้สูงสุด คือ  $78.73 \pm 1.29$ ,  $66.70 \pm 2.72$ ,  $58.69 \pm 0.53$ ,  $71.72 \pm 2.84$  และ  $89.03 \pm 1.17$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้จากการศึกษาความวิวัฒนาการทางพันธุกรรมเพื่อบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยยีน 16S rRNA พบว่า ไอโซเลท WP45-2 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces viridochromogenes* (99.57%) มากที่สุด ผลการวิจัยยังแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์รอบพืชมีความสามารถในการเป็นแหล่งผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHAs โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน

คำสำคัญ : พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท, พลาสติกชีวภาพ, จุลินทรีย์รอบรากพืช

<b>Research Title</b>	Diversity of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria from rhizosphere soil for bioplastic industrial application
<b>Research code</b>	SUT1-111-63-12-02(NEW)
<b>Author</b>	Dr. Watsana Penkhruie
<b>Year</b>	2022

## Abstract

The use of petroleum-based plastics affects the environment, especially in terms of waste management. Moreover, the production process also related with carbon oxide emission. This research aim at studying on polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from microorganisms which were isolated from rhizosphere soil samples in Nakhon Ratchasima, Lampang and Chonburi provinces. The soil samples were prepared using dilution spread plate method on mineral salt medium (MSM) containing 1 Brix° molasses. Primary and secondary screening were investigated using Nile red staining under fluorescent microscope and gas chromatography for selecting the highest efficiency of PHAs-producing microorganisms. One-way ANOVA Statistical analysis was implemented. Moreover, the morphological characteristics, biochemical characteristics and 16S rRNA phylogeny of selected 5 isolates were studied. The results showed that a total of 396 bacterial isolates were isolated from 40 rhizosphere soil samples. It can accumulate PHAs inside their cells. A total of 5 isolates including WP14-2, WP18-1, WP32-2, WP43-4 and WP45-2 showed the high polyhydroxyvalerate (PHV) yields as  $78.73 \pm 1.29$ ,  $66.70 \pm 2.72$ ,  $58.69 \pm 0.53$ ,  $71.72 \pm 2.84$  และ  $89.03 \pm 1.17$  mg/L, respectively. Isolate WP45-2 showed the highest PHV productivity and presented the greatest similarity to *Streptomyces viridochromogenes* (99.57%). It was also indicated that rhizosphere microorganisms can be PHAs bioplastic producer using molasses as a carbon source.

**Keyword :** Polyhydroxyalkanoates, Bioplastics, Rhizospheric microorganisms

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ค
สารบัญ .....	ง
สารบัญตาราง .....	ฉ
สารบัญภาพ .....	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย .....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
ขอบเขตของการวิจัย .....	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย .....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
โครงสร้างและคุณสมบัติของ PHAs .....	5
การผลิตพลาสติกชีวภาพ PHAs .....	9
เอนไซม์สังเคราะห์ PHAs (PHAs synthase) .....	12
การย่อยสลาย PHAs.....	13
อาหารและกระบวนการหมัก.....	14
การประยุกต์ใช้ PHAs.....	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	19
สารเคมี .....	20
วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล .....	25
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
ผลการวิจัย .....	26
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
สรุปผลการวิจัย .....	37
อภิปรายผล .....	37

ข้อเสนอแนะ .....	38
บรรณานุกรม .....	40
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก .....	47
ภาคผนวก ข .....	49
ภาคผนวก ค .....	50
ประวัติผู้วิจัย .....	52



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 2.1 คุณสมบัติบางประการของ PHAs และพลาสติกปิโตรเคมี (Khanna and Srivastava, 2005)	8
ตาราง 2.2 แสดงจีโนมของจุลินทรีย์ที่มีรายงานการสะสมพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Koller และคณะ, 2010)	10
ตาราง 2.3 ตัวอย่างของบริษัทที่มีการผลิต PHAs ทางการค้าในปัจจุบัน (Chanprateep, 2010)	16
ตาราง 4.1 ลักษณะทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินรอบรากพืชทั้ง 40 ตัวอย่างที่ใช้สำหรับแยกแบคทีเรียผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHAs	27
ตาราง 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดพืชและจำนวนแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างดินรอบรากพืชทั้งหมด 40 ตัวอย่าง	31
ตาราง 4.4 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียคัดเลือกร่วมกับฐานข้อมูล	36



## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 2.1 ภาพตัดของเซลล์ <i>Cupriavidus necator</i> สายพันธุ์ DSM 545 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM) แสดง PHAs ภายในแกรนูลของเซลล์ (Koller และคณะ, 2011)	4
ภาพ 2.2 โครงสร้างของ PHAs (a) และมอนอเมอร์ของ PHAs ที่พบบ่อยทั้งแบบ Short-chain-length (SCL-HA) และ Medium-chain-length (MCL-HA)	5
ภาพ 2.3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Khanna และ Srivastava, 2005)	5
ภาพ 2.4 โครงสร้างของจุลินทรีย์ที่มีการสะสม PHAs แกรนูล และกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ในการสังเคราะห์และสลาย PHAs (Luengo et al., 2003)	9
ภาพ 2.5 แสดงลักษณะจำลองของ PHAs แกรนูล สีแดง คือ PHAs synthase สีน้ำเงิน คือ ฟาซิน (Phasin) สีม่วง คือ PHAs ดีพอลิเมอร์ สีเขียว คือ ตัวยับยั้งของฟาซิน และสีเหลืองคือ ฟอสฟอลิพิด (Pötter และ Steinbüchel, 2006)	11
ภาพ 2.6 การจำแนกชนิดของ PHA synthase ตามโครงสร้างปฐมภูมิและความจำเพาะกับสารตั้งต้น (Park et al., 2012; Sudesh et al., 2000)	13
ภาพ 2.7 กระบวนการผลิต PHAs (Koller et al., 2010) จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร	15
ภาพ 2.8 ผลิตภัณฑ์ PHAs ทางการค้าภายใต้ชื่อสินค้า Biopol <sup>®</sup> (A) หมุดกอล์ฟ (B) ดำมีดโกน (C) แก้วน้ำ (D) ขวดแชมพู (Pötter และ Steinbüchel, 2006)	18
ภาพ 4.1 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างดินรอบบรากพีชและตัวอย่างดินบางส่วนที่ใช้ในการศึกษา	26
ภาพ 4.2 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่างดินด้วยวิธี Ten-fold Dilution spread plate technique บนอาหารวุ้นแข็ง MSM agar ที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 1 Brix <sup>°</sup> เป็นแหล่งคาร์บอน	30
ภาพ 4.3 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียที่บนอาหารแข็ง MSM agar ที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 1 Brix <sup>°</sup> เป็นแหล่งคาร์บอน (ซ้าย) และการเรืองแสงของโคโลนีแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ภายในเซลล์ภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ขวา)	32
ภาพ 4.4 ลักษณะเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท WP34-1 สะสมแกรนูลของ PHAs ภายในเซลล์ (ลูกศรสีแดง) เมื่อย้อมด้วย Sudan Black B และส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์	32
ภาพ 4.5 จำนวนไอโซเลทที่ให้ผลบวกทั้งวิธี Nile red (ก) และ Sudan Black B (ข) โดยแบ่งเป็นระดับสูงสุด ปานกลางและต่ำสุด	33

ตาราง 4.3 การผลิต PHAs ของแบคทีเรียคัดเลือกทั้งหมด 29 ไอโซเลท ในอาหารเหลว MSM	34
ภาพ 4.6 เซลล์แบคทีเรียไอโซเลท WP14-2 ที่ถูกย้อมด้วย Nile red ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง กำลังขยาย 1000 เท่า	35
ภาพ 4.7 Phylogenetic tree ของ 16S rRNA ของแบคทีเรียคัดเลือกโดยใช้ 16S rRNA ของ <i>Halobacterium piscisalsi</i> JCM14661 (AB663361) เป็น Out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1000 ครั้งด้วย Bootstrap	36



## คำอธิบายสัญลักษณ์

ANOVA	Analysis of variance
CDW	Cell dry weight
CFU	Colony forming unit
GC	Gas chromatography
GPC	Gel permeation chromatography
HA	Hydroxy acid
HPLC	High-performance liquid chromatography
ISP	International <i>Streptomyces</i> Project
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
lcl-PHAs	Long-chain length PHAs
LPS	Lipopolysaccharide
mcl-PHAs	Medium-chain length PHAs
$M_n$	Molecular mass distribution
$M_w$	Molecular weight
MSM	Mineral salt medium
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
PBS	Poly (butylene succinate)
PCL	Polycaprolactone
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Polyethylene
PET	Polyethyeneterephthalate
PDI	Polydispersity index
PHAs	Polyhydroxyalkanoates
PHB	Polyhydroxybutyrate

P(HB-co-HV)	Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate
PHBHHx	Hydroxybutyrate (R3HB) and 3-hydroxyhexanoate
PHD	Polyhydroxydodecanoate
PHO	Polyhydroxyoctanoate
PHP	Polyhydroxypropionate
PHV	Polyhydroxyvalerate
PL	Phospholipid
PLA	Polylactic acid
PP	Polypropylene
RNA	Ribonucleic acid
SEM	Scanning electron microscope
scl-PHAs	Short-chain length PHAs
TGA	Thermogravimetric analysis
TSB	Tryptic soy broth
$T_c$	Crystallization temperature
$T_d$	Thermo degradation temperature
$T_g$	Glass transition temperature
$T_m$	Melting temperature
UV	Ultraviolet

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การแสวงหาแหล่งใหม่สำหรับผลิตพลาสติกชีวภาพ (Bioplastic materials) รวมทั้งการพัฒนาคุณสมบัติของพลาสติกชีวภาพ จัดเป็นเรื่องที่ท้าทายและน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งสำหรับนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก มีหลากหลายปัจจัยที่เป็นแรงขับเคลื่อนความต้องการของตลาดพลาสติกชีวภาพ ได้แก่ (1) ปัจจัยภายนอก คือ ความต้องการที่เพิ่มสูงขึ้นของกลุ่มผู้บริโภคที่รักสิ่งแวดล้อม การใช้พลาสติกจากปิโตรเคมียังมีผลกระทบต่อที่ชัดเจนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (Climate change) รวมทั้งราคาที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องของน้ำมันและก๊าซธรรมชาติ ส่วน (2) ปัจจัยภายใน คือ พลาสติกชีวภาพที่มาจากวัสดุธรรมชาติและก่อให้เกิดความสมดุลต่อสิ่งแวดล้อม และปัญหาขยะพลาสติกจากปิโตรเคมีที่ทั่วโลกกำลังเผชิญ รวมทั้งการใช้พลาสติกชีวภาพสามารถลดการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) ได้ถึงร้อยละ 30-70 เมื่อเทียบในการผลิตพลาสติกสังเคราะห์ ทั้งนี้ประเด็นหลักที่มีการต่อยอดการผลิตพลาสติกชีวภาพคือ การนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Renewability) และการมีอยู่ตลอด Availability

พลาสติกชีวภาพที่มีศักยภาพในเชิงพาณิชย์ในปัจจุบัน ได้แก่ พลาสติกที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบพื้นฐาน (Starch-based plastic) พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid; PLA) พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates; PHAs) พอลิบิวทีลีนซัคซิเนต (polybutylene succinate; PBS) พอลิไตรเมทิลีนเทอเรพธาเลต (Polytrimethylene terephthalate; PTT) และ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol; PVA) โดยพบว่าจากพลาสติกชีวภาพทั้งหมด พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (PHAs) มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ชนิดพอลิโพรพิลีนและพอลิเอทิลีน ซึ่งสามารถที่จะย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการชีวภาพและเป็นพลาสติกชีวภาพชนิดเดียวที่มีกระบวนการผลิตตลอดทั้งแบบ “กระบวนการทางชีวภาพ” (Biological process) ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยมีเป้าหมายที่ชัดเจนที่จะศึกษากระบวนการผลิตพลาสติกชีวภาพ PHAs โดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรือของเสียจากอุตสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเน้นการใช้จุลินทรีย์ที่แยกและคัดเลือกได้จากธรรมชาติ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต PHAs และต่อยอดไปสู่องค์ความรู้ที่สามารถนำไปพัฒนาการผลิตพลาสติกชีวภาพ PHAs อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นรูปธรรมต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHAs ได้ จากดินรอบรากพืช (Rhizosphere soil)
- 1.2.2 เพื่อศึกษาการขั้นตอนการผลิตพลาสติกชีวภาพ PHAs ในอาหารที่ใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นแหล่งสับเสตรท
- 1.2.3 เพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกเบื้องต้นด้วยฐานฐานวิทยาและอนุชีววิทยา

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 ตัวอย่างดินรอบรากพืช (Rhizosphere soil) จำนวน 40 ตัวอย่าง ในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดลำปาง
- 1.3.2 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพ PHAs คือ กากน้ำตาล
- 1.3.3 ตัวแปรต้น ได้แก่ ชนิดแบคทีเรียที่แยกได้
- 1.3.4 ตัวแปรตาม ได้แก่ (1) การเรืองแสงของสีย้อม Nile red ที่ทำปฏิกิริยากับ PHAs (2) จำนวนเม็ดพลาสติกที่ถูกสะสมภายในเซลล์แบคทีเรีย และ (3) ปริมาณ PHAs (g/L)

## 1.4 ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวคิดความคิดของโครงการวิจัย

การผลิตพลาสติกชีวภาพเป็นกระบวนการระดับต้นน้ำที่มีความสำคัญ ซึ่งจะต้องมีการผลิตสารตั้งต้นที่มีประสิทธิภาพและเสียค่าใช้จ่ายไม่มากโดยการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ ซึ่งของเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบของน้ำตาล เช่น เปลือกผลไม้ กากน้ำตาล ก็จัดว่าเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดี หากจุลินทรีย์สามารถนำมาใช้เป็นสับเสตรทสำหรับการผลิต PHAs ได้ก็จะลดต้นทุนได้มากกว่าการใช้สับเสตรทอื่น คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดว่าการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อการผลิต PHAs จะสามารถนำไปพัฒนาเพื่อให้มีการผลิตระดับอุตสาหกรรมได้ โดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืชมักจะมีความสามารถในการดำรงชีวิตอยู่โดยใช้สารอาหารจากวัสดุธรรมชาติรอบ ๆ รากพืช ซึ่งดินบริเวณดังกล่าวมักจะมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรผสมอยู่ ดังนั้นการผลิตพลาสติก PHAs จากแบคทีเรียรอบรากพืชจึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจ ทำให้ต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพมีต้นทุนที่ถูกลง

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 เทคโนโลยีและองค์ความรู้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (PHAs) จากจุลินทรีย์โดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร
- 1.5.2 ได้แนวทางใหม่ที่น่าไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์พลาสติกชีวภาพที่สามารถใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ที่มีอยู่เดิมได้จริง
- 1.5.3 ลดปัญหาการเกิดมลพิษจากสิ่งแวดล้อมเนื่องจากพลาสติกชีวภาพมีสมบัติสามารถย่อยสลายได้ด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biodegradable) เป็นการแก้ปัญหาขยะพลาสติกที่ยากในการกำจัด

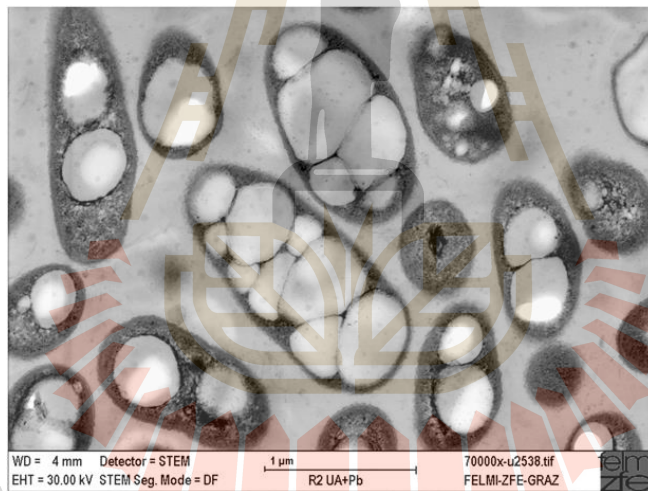
- 1.5.4 การพัฒนาศักยภาพนักวิจัยรุ่นใหม่ และผู้ช่วยนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญทางด้านพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกแอลคาโนเอท (PHAs)
- 1.5.5 สร้างเครือข่ายความร่วมมือทางการวิจัยทั้งภายในมหาวิทยาลัยและระหว่างมหาวิทยาลัย
- 1.5.6 การถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้ผ่านงานบริการวิชาการ หรือถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับหน่วยงานและกลุ่มผู้สนใจ



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates; PHAs) เป็นพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิเอสเทอร์ที่ผลิตและสะสมในเซลล์จุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบ (ภาพ 2.1) และมีคุณสมบัติเป็นพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการชีวภาพ (Biodegradable bioplastics) ซึ่งจุลินทรีย์ใช้ PHAs เป็นพลังงานและแหล่งเก็บสะสมในรูปสารประกอบคาร์บอนภายในเซลล์บริเวณภายในไซโทพลาซึมในรูปของแกรนูลที่ไม่ละลายน้ำ (Penkhrue et al., 2020) ภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสมหรือสภาวะเครียด (Stress condition) อาทิ ปริมาณของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส หรือออกซิเจนมีอย่างจำกัด ดังนั้นการสะสม PHAs ภายในเซลล์จะช่วยเพิ่มการอยู่รอดของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ (Madison และ Huisman, 1999) PHAs เกิดจากการสังเคราะห์ทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์

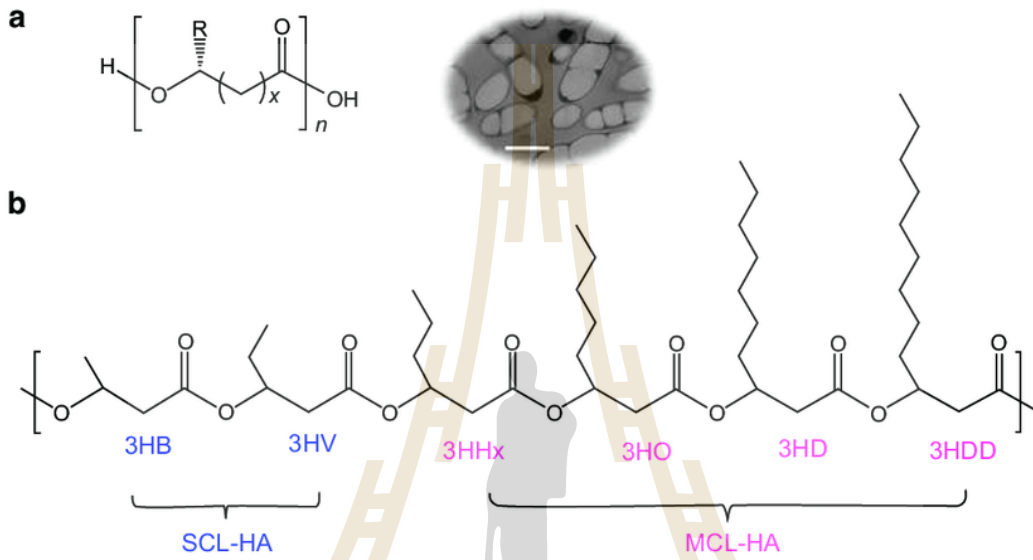


ภาพ 2.1 ภาพตัดขวางของเซลล์ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ DSM 545 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy, TEM) แสดง PHAs ภายในแกรนูลของเซลล์ (Koller และคณะ, 2011)

PHAs มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic) และอีลาสโตเมอร์ (Elastomer) คล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ได้จากแหล่งปิโตรเลียมชนิดพอลิโพรพิลีน (Polypropylene; PP) (Steinbüchel และ Schlegel, 1991) และด้วยเหตุที่ PHAs สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติและผลิตขึ้นจากแหล่งที่สามารถผลิตขึ้นได้ใหม่ จึงทำให้ PHAs ได้รับความสนใจอย่างมาก และได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน (Williams และ Martin, 2003) นับตั้งแต่การค้นพบพอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต (Poly-3-hydroxybutyrate) ; PHB) ใน *Bacillus megaterium* โดย Lemoigne (1926)



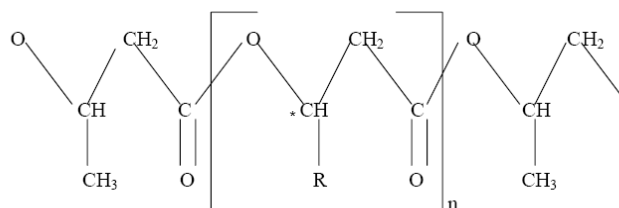
และมีการค้นพบอนุพันธ์ของ PHAs อีกหลาย ชนิด ซึ่งพบว่า PHAs จะมีองค์ประกอบของโซ่กิ่งคาร์บอน ที่ต่างกันระหว่าง 3-16 อะตอมที่บริเวณหมู่แอลคิล ปัจจุบันมีการค้นพบอนุพันธ์ของ PHAs มากกว่า 150 ชนิดซึ่งองค์ประกอบของโมโนเมอร์มีความหลากหลาย (ภาพ 2.2) ทั้งนี้เนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตและภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และจากการที่ PHAs มีอนุพันธ์ที่หลากหลายนั้นยังทำให้มีสมบัติที่ต่างกันอีกด้วย (Rehm, 2010)



ภาพ 2.2 โครงสร้างของ PHAs (a) และมอนอเมอร์ของ PHAs ที่พบบ่อยทั้งแบบ Short-chain-length (SCL-HA) และ Medium-chain-length (MCL-HA)

## 2.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของ PHAs

PHAs เป็นพลาสติกทนร้อน (Thermoplastic) และจัดเป็นพอลิเมอร์ประเภทเอสเทอร์สายตรง (Linear polyester) ชนิดหนึ่งที่มีมอนอเมอร์เป็น R-Hydroxyalkanoic acid (HA) ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ออกซิเจน และไฮโดรเจน (ภาพ 2.3) โมโนเมอร์ของสายพอลิเมอร์ต่อกันแบบหัวต่อหาง โดยโมโนเมอร์ในกลุ่มไฮดรอกซีเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่คาร์บอกซิลิกของโมโนเมอร์ตัวแรกกับหมู่ไฮดรอกซีของโมโนเมอร์ตัวถัดไป ตรงตำแหน่งปีต้าคาร์บอนจะเป็นไครัลคาร์บอน (Chiral carbon) แสดงโครงสร้างเป็น R-configuration (Madison และ Huisman, 1999) โดย PHAs มีโครงสร้างหลายประเภทและมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไปตามโครงสร้างทางเคมีซึ่งขึ้นอยู่กับหมู่ R



\*C แสดงตำแหน่งปีต้าคาร์บอน

n = 1	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีโพรพิโอเนท)	หรือ P(3HP)
	R = เมทิล (CH <sub>3</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท)	หรือ P(3HB)
	R = เอทิล (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีวาลเอร์เรท)	หรือ P(3HV)
	R = โพรพิล (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮกซะโนเอท)	หรือ P(3HHx)
	R = บิวทิล (C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีเฮปตะโนเอท)	หรือ P(3HH)
	R = เพนทิล (C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีออกตะโนเอท)	หรือ P(3HO)
	R = เฮกซิล (C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีนอนาโนเอท)	หรือ P(3HN)
	R = เฮปทิล (C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีเดคะโนเอท)	หรือ P(3HD)
	R = ออกทิล (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีอันเดคะโนเอท)	หรือ P(3HUD)
	R = โนทิล (C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> )	สารนี้คือ	พอลิ (3-ไฮดรอกซีโดเดคะโนเอท)	หรือ P(3HDD)
n = 2	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ	พอลิ (4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท)	หรือ P(4HB)
n = 3	R = ไฮโดรเจน (H)	สารนี้คือ	พอลิ (5-ไฮดรอกซีวาลเอร์เรท)	หรือ P(5HV)

ภาพ 2.3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Khanna และ Srivastava, 2005)

การจำแนกชนิดของ PHAs สามารถจำแนกได้ตามเกณฑ์ (1) ชนิดของมอนอเมอร์ และ (2) จำนวนคาร์บอนในหน่วยมอนอเมอร์ใน (Suriyamongkol et al., 2007)

2.1.1 การจัดจำแนกกลุ่มโดยแบ่งตามชนิดของมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์ แบ่งเป็น 2 ประเภทดังนี้ (สุชาติ จันทรประทีป, 2539)

2.1.1.1 โฮมอพอลิเมอร์ (Homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย มอนอเมอร์เพียงชนิดเดียวมาต่อกัน เช่น พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท (Poly-3-hydroxybutyrate) และ พอลิ-3-ไฮดรอกซีวาลเอร์เรท (Poly-3-hydroxyvalerate) เป็นต้น

2.1.1.2 เฮเทอโรพอลิเมอร์ (Heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย มอนอเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนของมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ตัวอย่างเช่น โคพอลิเมอร์ (copolymer) ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เช่น พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท-โค-3-ไฮดรอกซีวาลเอร์เรท) [Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) หรือ PHBV] พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท) [Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB-co-4HB)] เป็นต้น สำหรับพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกัน เรียกว่า เทอโรพอลิเมอร์ (Terpolymer) ตัวอย่างเช่น พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรท-โค-3-ไฮดรอกซีวาลเอร์เรท-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรท) [Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) หรือ P(3HB-co-3HV-co-4HB)] เป็นต้น

2.1.2 การจัดจำแนกกลุ่มโดยแบ่งตามจำนวนคาร์บอนในหน่วยมอนอเมอร์ แบ่งออกเป็น 2 ประเภทดังนี้ (Li et al., 2007)

2.1.2.1 PHAs สายสั้น (Short chain length, SCL) หรือ scl-PHAs เป็น PHAs ที่มีคาร์บอน 3-5 อะตอม เช่น พอลิ-3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-3-hydroxybutyrate)

2.1.2.2 PHAs สายกลาง (Medium chain length, MCL) หรือ mcl-PHAs เป็น PHAs ที่มีคาร์บอน 6-12 อะตอม

2.1.2.3 PHAs สายยาว (Long chain length, LCL) หรือ lcl-PHAs เป็น PHAs ที่มีคาร์บอนมากกว่าหรือเท่ากับ 13 อะตอม

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) มีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับพลาสติก Polyethylene terephthalate (PET) และ Polypropylene (PP) เช่น จุดหลอมเหลว (Melting temperature) ความเป็นผลึก (Crystallinity degree) อุณหภูมิเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature) และความต้านทานแรงดึง (Tensile strength) โดย PHAs มีมวลโมเลกุลสูงอยู่ในช่วง 10-3,000 kDa และเป็นผลึกประมาณร้อยละ 20-40 และมีจุดหลอมเหลวสูงสุดที่ 180 องศาเซลเซียส (ตาราง 2.1)

Polyhydroxybutyrate (PHB) เป็นสารชีวโมเลกุลเชิงซ้อนในกลุ่มไขมันที่สะสมได้ในสิ่งมีชีวิตและเป็นส่วนหนึ่งของสารประกอบที่พบมากที่สุดในกลุ่ม PHAs มีลักษณะเป็นสายพอลิเอสเทอร์ประกอบด้วยหมู่เมทิล มีการประยุกต์ใช้เป็น สารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เนื่องจากให้คุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเลียม ทั้งในเรื่องของมวลผลึก ค่าแรงดึง จุดหลอมเหลว รวมไปถึงความสามารถในการย่อยสลายตัวเองได้อย่างรวดเร็วในธรรมชาติผ่านกระบวนการของจุลินทรีย์ ซึ่งความสามารถนี้ไม่พบในพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเลียม (Brandi et al., 1995) ประกอบด้วยปิโตรเลียมที่เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการผลิตจัดว่าเป็นทรัพยากรที่ใช้แล้วหมดไป ส่งผลให้อาจเกิดปัญหาในการหาวัสดุทดแทนได้ยากในอนาคต รวมไปถึงวิธีกำจัดพลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเลียมผ่านกระบวนการฝังกลบและเผา ล้วนแต่ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมเป็นอย่างมาก ปัจจุบันมีการนำพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตได้จาก PHB มาใช้ประโยชน์หลากหลายด้าน ได้แก่ ผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ เช่น แก้วน้ำ ภาชนะบรรจุอาหาร ถุงพลาสติก เป็นต้น ผลิตเป็นวัสดุเพื่อประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น ไหมละลาย กระดูกเทียม วัสดุยึดกระดูก เป็นต้น (ธนาวัต, 2549) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการศึกษาขั้นตอนและปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อกระบวนการสะสม PHB เพื่อให้มีคุณภาพสูงเหมาะแก่การนำมาใช้ในอุตสาหกรรมและการศึกษาวิจัยเชิงลึกต่อไป

**ตาราง 2.1** คุณสมบัติบางประการของ PHAs และพลาสติกปิโตรเคมี (Khanna and Srivastava, 2005)

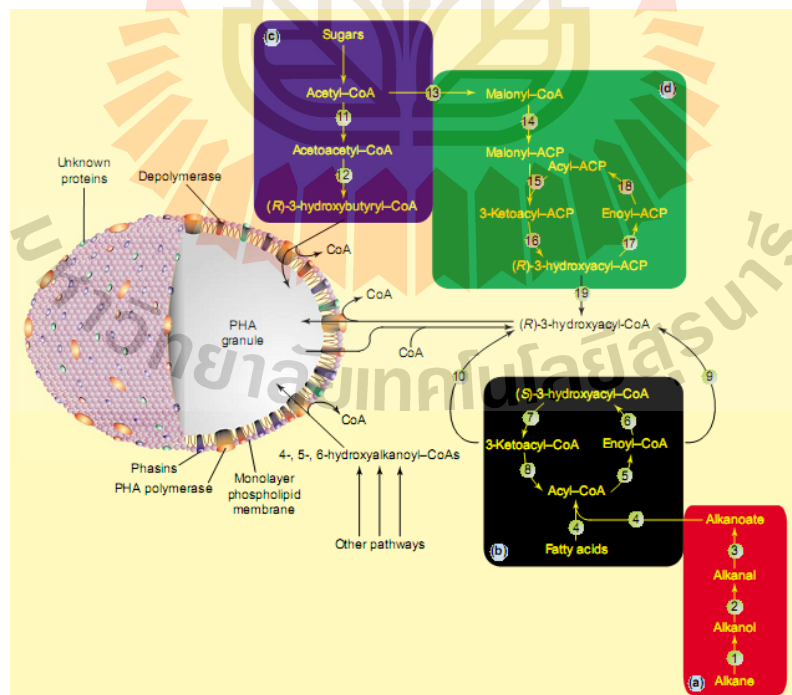
Polymer	Melting point (°C)	Young's modulus (GPa)	Tensile strength (MPa)	Elongation to break (%)	Glass transition temperature (°C)
P(3HB)	179	3.5	40	5	4
P(3HB-co-3 mol%3HV)	170	2.9	38	-	-
P(3HB-co-3 mol%4HB)	159	-	24	45	-
P(4HB)	53	149	104	1000	-
P(3HHx-co-3HO)	61	-	10	300	-
P(3HHx-co-6 mol% 3HA)	133	0.2	17	680	-8
P(3HB-co-67 mol% HP)	44	-	-	-	-19
P(3HB-co-3HHx)	52	-	20	850	-4
Polypropylene	170	1.7	34.5	400	45
Polyethylene-terephthalate	262	2.2	56	7300	3400
Polystyrene	110	3.1	50	-	21

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## 2.2 การผลิตพลาสติกชีวภาพ PHAs

PHAs สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์และพืช ส่วนใหญ่แล้วการผลิตได้จากจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์หลายชนิดในกลุ่มแบคทีเรียและอาร์เคียที่สามารถผลิต PHAs ได้ (Castro-Sawinski et al., 2010) และยังสามารถย่อยสลาย PHAs ที่อยู่ในและนอกเซลล์ได้ จุลินทรีย์ที่สามารถสร้าง PHAs มีรายงานการผลิต PHAs ในจุลินทรีย์กว่า 107 ชนิด ดังแสดงในตาราง 2.2 ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียแกรมลบ 70 species เช่น *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Azotobacter* เป็นต้น และแบคทีเรียแกรมบวก 12 species ได้แก่ *Bacillus*, *Actinomycetes*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* เป็นต้น (Lu et al., 2009; Trakunjae et al., 2021) แต่ปัญหาที่ประสบคือ การใช้พื้นที่และการลงทุนที่ค่อนข้างสูง (Poirier et al., 1995) และจากคุณสมบัติที่โดดเด่นของ PHAs พบว่า มีรายงานว่ามีการนำเอา PHAs ไปใช้ในการผลิตที่หลากหลาย อาทิ บรรจุภัณฑ์อาหารที่สามารถย่อยสลายได้ 100% รวมถึงการสามารถประยุกต์ใช้ในงานด้านเกษตรกรรมและอุปกรณ์ทางการแพทย์ (William et al., 1999; Poirier et al., 2002; Chen and Wu, 2005) ถือว่าเป็นพลาสติกชีวภาพที่แพร่หลายและสามารถนำไปใช้ได้จริง มีความคุ้มค่าในการลงทุนและสนองความต้องการรักษาสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี

การสังเคราะห์ PHAs จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ มีรายงานการศึกษาจำนวนมาก กล่าวว่า อะซิติลโคเอ (Acetyl-CoA) เป็นส่วนประกอบสำคัญที่จะทำให้เกิด 3-ไฮดรอกซีแอลคานอยล์โคเอ (3-Hydroxyalkanoyl-CoA) ที่มีความยาวต่างกันขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นและเอนไซม์ที่จำเพาะ ซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHAs ทั้งทางตรงและทางอ้อม สรุปได้เป็น 4 วิถีหลัก ๆ (ภาพ 2.4)



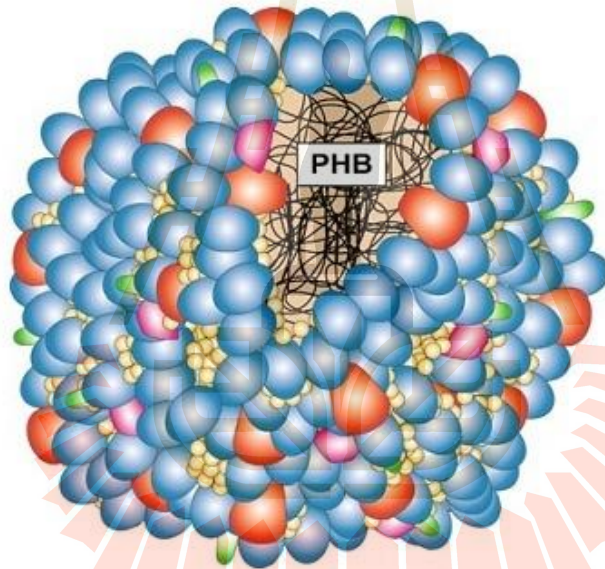
ภาพ 2.4 โครงสร้างของจุลินทรีย์ที่มีการสะสม PHAs แกรนูล และกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ในการสังเคราะห์และสลาย PHAs (Luengo et al., 2003)

ตาราง 2.2 แสดงจีโนมของจุลินทรีย์ที่มีรายงานการสะสมพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (<sup>b</sup>Koller และคณะ, 2010)

<i>Acidovorax</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Methanomonas</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Actinobacillus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Cupriavidus</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Cyanobacterium</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Rubrivivax</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Defluviicoccus</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>Saccharophagus</i>
<i>Allochromatium</i>	<i>Dexia</i>	<i>Methylovibrio</i>	<i>Shinorhizobium</i>
<i>Anabaena</i>	<i>Delftia</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Aphanotheca</i>	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Asticcaulus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Microlunatus</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Azomonas</i>	<i>Ferrobacillus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Stella</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Gamphosphaeria</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Gloeocapsa</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Synechococcus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Gloeotheca</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Thiococcus</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Haloarcula</i>	<i>Oceanospirillum</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Brachymonas</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Haloquadratum</i>	<i>Paucispirillum</i>	<i>Thiosphaera</i>
<i>Caryophanon</i>	<i>Haloterrigena</i>	<i>Pedomicrobium</i>	<i>Variovorax</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Chloroflexus</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Protomonas</i>	<i>Wautersia</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Lamprocystis</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Zoogloea</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Rhizobium</i>	



กระบวนการสังเคราะห์ PHAs ในจุลินทรีย์นั้น PHAs จะอยู่ในรูปของแกรนูลบริเวณไซโทพลาซึมของเซลล์ โดยแกรนูลของ PHAs ที่สมบูรณ์แล้วจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 200 – 500 นาโนเมตร แกรนูลของ PHAs ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Williamson และ Wilkinson (1958) ภายในแกรนูลของ PHAs ประกอบไปด้วย PHAs 97.5% โปรตีน 2% และฟอสโฟลิพิด 0.5% โดยประมาณ (Griebel et al., 1968) แต่บางครั้งอาจพบว่ามีปริมาณไขมันมากกว่า 0.5% (Steinbüchel และ Valentin, 1995) ทั้งนี้ Lundgren และคณะ (1964) ได้ทำการศึกษาลักษณะพื้นผิวแกรนูลของ PHAs จากแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* และ *B. cereus* โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าพื้นผิวของแกรนูลถูกปกคลุมไปด้วยเยื่อหุ้มที่มีความหนาประมาณ 15-20 นาโนเมตร (Griebel และ Merrick, 1971) ต่อมา De Koning และ Maxwell (1993) ได้จำลองโครงสร้างของแกรนูลซึ่งล้อมรอบไปด้วยฟอสโฟลิพิด ดังภาพ 2.5



ภาพ 2.5 แสดงลักษณะจำลองของ PHAs แกรนูล สีแดง คือ PHAs synthase สีน้ำเงิน คือ ฟาซิน (Phasin) สีม่วง คือ PHAs ดีพอลิเมอร์ สีเขียว คือ ตัวยับยั้งของฟาซิน และสีเหลือง คือ ฟอสโฟลิพิด (Pötter และ Steinbüchel, 2006)

Mayer และ Hoppert (1997) และ Boatman (1964) ได้ทำการศึกษาโปรตีนที่ผิวของแกรนูลเหล่านี้ พบว่าชั้นของโปรตีนบริเวณผิวของแกรนูลมีความหนา 4 นาโนเมตร แต่ถ้ารวมชั้นของไขมันจะมีความหนา 8 นาโนเมตร ลักษณะทางกายภาพของแกรนูลมี 2 แบบ คือ เป็นแกรนูลที่มีลักษณะอสัณฐาน และ แกรนูลที่มีลักษณะเป็นผลึกบางส่วน (Jendrossek และ Handrick, 2002) ลักษณะโดยทั่วไปของผิวแกรนูลจะล้อมรอบไปด้วยชั้นของโปรตีนและฟอสโฟลิพิด เมื่อชั้นเหล่านี้ถูก

ทำลายระหว่างกระบวนการคัดแยก ค่าความเป็นผลึกของพอลิเมอร์จะเพิ่มสูงขึ้น 50-60% แกรนูลที่มีลักษณะเป็นผลึกจะหลอมละลายที่อุณหภูมิระหว่าง 170-180 องศาเซลเซียส

โปรตีนที่อยู่บริเวณผิวของแกรนูล (Granule-associated proteins; GAPs) ของแบคทีเรียมีด้วยกัน 4 ชนิด คือ PHAs ซินเทส (PHAs synthase; PhaC) PHAs ดีพอลิเมอร์ส (PHAs depolymerases; PhaZi) ฟาซิน (Phasin; PhaP) และ ตัวควบคุมการแสดงออกของฟาซิน (regulator of phasin expression; PhaR)

### 2.3 เอนไซม์สังเคราะห์ PHAs (PHAs synthase)

PHAs synthase หรือ PHAs polymerase (PhaC) เป็นเอนไซม์สำคัญในวิถีของการสังเคราะห์ PHAs ด้วยจุลินทรีย์ ในปัจจุบันมากกว่า 50 ชนิดของ PHAs synthase ได้มีการรายงานโครงสร้างของยีน ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) และพบกว่า 30 ชนิดยีนที่สำคัญสำหรับ PHAs synthase หากแบ่งกลุ่มของ PHAs synthase ตามความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นและโครงสร้างปฐมภูมิ (Primary structure) ของเอนไซม์สามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภท (ภาพ 2.6) มีดังต่อไปนี้ (Park et al., 2012; Sudesh et al., 2000)

ประเภทที่ 1 : เป็นกลุ่มของ PHAs synthase จาก *Ralstonia eutropha* ซึ่งบริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site) จะมีความจำเพาะกับ Short chain length PHAs monomer หรือ scl-PHAs monomer [ในกลุ่มของ (R)-enantiomers ของ 3-,4 และ 5-HA ที่มีคาร์บอน 5 อะตอม] และจะเป็นยีน *phaC* ที่มีความยาว 1,767 คู่เบส ได้แก่กลุ่มจุลินทรีย์ *Aeromonas caviae*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodocylus gelatinosus*, *Rhodococcus ruber* และ *Rhodobacter sphaeroides*

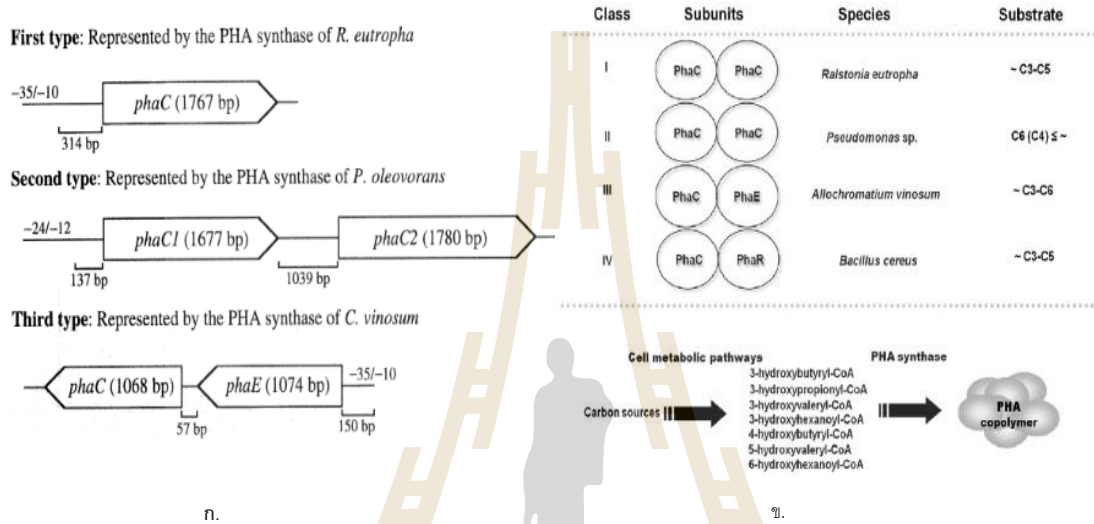
ประเภทที่ 2 : เป็นกลุ่มของ PHAs synthase จาก *Pseudomonas oleovorans* ซึ่งบริเวณเร่งของเอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น (R)-3HA monomer ที่มีคาร์บอนอะตอมจำนวน 6-14 อะตอม หรือ Medium chain length PHAs (mcl-PHAs) และ Long chain length PHAs (lcl-PHAs) ซึ่งประกอบด้วยยีน *phaC* จำนวน 2 ยีนคือ *phaC1* และ *phaC2* ที่มีขนาด 1,667 และ 1,780 คู่เบส ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยพบว่า PHAs synthase จาก *Pseudomonas* sp. 61-3 ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ mcl-PHAs ในธรรมชาติและยังไม่มีความสามารถในการเร่ง scl-PHAs ชนิด (3HB)

ประเภทที่ 3 : เป็นกลุ่มของ PHAs synthase ใน *Chromatium vinosum* เป็นเอนไซม์เพียง 2 หน่วยย่อย (Subunit) ได้แก่ C-subunit (ขนาดประมาณ 40 kDa) และ E-subunit (ขนาดประมาณ 40 kDa) ซึ่งมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นของ scl-PHAs จะพบได้ในจุลินทรีย์จำพวก *Chromatium vinosum*, *Thiocyctic violacea*, *Thiocapsa pennigii* และ *Synechocystia* sp.



นอกจากนี้ยังพบในจุลินทรีย์ *Thiococcus pfennigii* แต่มีความจำเพาะกับสารตั้งต้นที่กว้างกว่าทั้ง scl-PHAs และ mcl-PHAs

ประเภทที่ 4 : เป็นกลุ่มเอนไซม์ PHAs synthase ที่อยู่ใน *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มี 2 subunits ได้แก่ PhaC และ PhaR และมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นที่เป็นคาร์บอน 3-5 อะตอม



ภาพ 2.6 การจำแนกชนิดของ PHA synthase ตามโครงสร้างปฐภูมิและความจำเพาะกับสารตั้งต้น (Park et al., 2012; Sudesh et al., 2000)

## 2.4 การย่อยสลาย PHAs

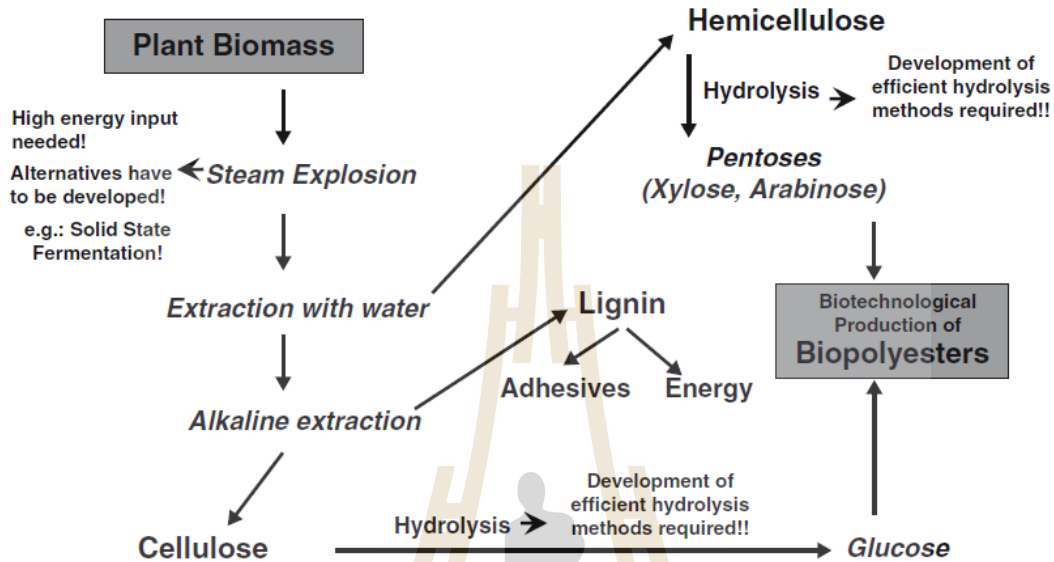
พลาสติกชีวภาพชนิด PHAs สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ด้วยการทำงานของเอนไซม์จากจุลินทรีย์กลุ่ม Depolymerase และเอนไซม์จากสัตว์ทั้งแบบ Enzyme hydrolysis และ Non-enzyme hydrolysis (Gogolewski et al., 1990) ทั้งนี้ประสิทธิภาพของการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิดนี้ ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ความเป็นกรดต่าง สารอาหาร และคุณสมบัติทางเคมีของ PHAs (หน่วยย่อย ความเป็นผลึก และจุดหลอมเหลว เป็นต้น) โดยพบว่า PHAs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าจะสามารถสลายทางชีวภาพได้ง่ายกว่า หากมีจุดหลอมเหลวที่สูงขึ้นความสามารถในการย่อยสลายจะลดลง เช่น เอนไซม์ไลเปส (Lipase) ไม่สามารถย่อยสลายพลาสติกชนิด PHB เนื่องจากพลาสติกชนิดนี้มีอุณหภูมิหลอมเหลวที่สูงถึง 178 องศาเซลเซียส (Tokiwa และ Suzuki, 1977) รวมทั้งความเป็นผลึกที่สูงขึ้นจะทำให้การย่อยสลายลดลง

จุลินทรีย์หลายชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชนิดนี้ เนื่องจาก PHAs ถูกผลิตขึ้นและสะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ดังนั้นจุลินทรีย์จำเป็นต้องมีเอนไซม์ในการย่อยสลาย PHAs ภายในเซลล์ (Intracellular PHAs-degrading enzyme) และ/หรือภายนอกเซลล์ (Extracellular PHAs-degrading enzyme) ที่ทำหน้าที่นำ PHAs กลับมาใช้ด้วยเช่นกัน เมื่อ PHAs ถูกย่อยภายในเซลล์จุลินทรีย์จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูป Acetoacetate เมื่อเกิดปฏิกิริยา Esterification สารจะถูกเปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-coenzyme A จากนั้นจะถูกย่อยเป็น Acetyl-coenzyme A ซึ่งเป็นสารตั้งต้นใน Krebs cycle ซึ่งเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเซลล์จึงได้รับพลังงาน (Matsumura, 2005) นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดสามารถย่อยสลาย PHAs ภายนอกเซลล์ได้ด้วย โดยใช้เอนไซม์กลุ่ม PHAs depolymerase เป็นหลัก เพื่อเริ่มทำลายพันธะของ PHAs ให้เป็น Oligomer และในจุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ Dimer hydrolase ในการสลายพันธะของ Oligomer ให้กลายเป็น Monomer (Tanaka et al., 1981) โดยทั้ง Oligomer และ Monomer สามารถถูกนำเข้าสู่เซลล์เพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงาน คาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) และน้ำได้ จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถย่อยสลาย PHAs ได้แก่ แอคติโนแบคทีเรียแฟมมีลี Pseudonocardiae, Micromonosporaceae, Thermomonosporaceae, Streptosporangiaceae และ Streptomycetaceae (Tokiwa และ Calabia, 2004) รวมทั้งแบคทีเรียจีโนส Acidovorax faecilis, Aspergillus fumigatus, Comamonas sp., Pseudomonas lemoignei และ Variovorax paradoxus จากดิน Alcaligenes faecalis และ Pseudomonas sp. จากตะกอนบำบัด Comamonas testosterone จากน้ำทะเล Ilyobacter delafieldii จากตะกอนบำบัดในระบบที่ไม่มีออกซิเจน

## 2.5 อาหารและกระบวนการหมัก

การเลือกอาหารเป็นสิ่งสำคัญทั้งในกระบวนการหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตและการผลิตในปริมาณสูง ซึ่งจะต้องคำนึงถึงราคาวัตถุดิบในการผลิตเมื่อเทียบราคากับพลาสติกจากปิโตรเคมี โดยต้นทุนส่วนใหญ่ในการผลิต PHAs คืออาหาร ดังนั้นจึงต้องลดค่าใช้จ่ายในการผลิตโดยการหาอาหารที่มีราคาถูกและให้ผลผลิตสูง สับสเตรทตั้งต้นสำหรับจุลินทรีย์ที่ใช้เพื่อผลิต PHAs ในรูปของเหลือทิ้งต่าง ๆ ที่พบได้แตกต่างกันซึ่งมีทั้งไนโตรเจนราคาถูกเพื่อเพิ่มชีวมวล ของเสียจากกระบวนการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ ของเสียรูปไขมัน เวย์ ของเสียที่เป็นลิกนินและเซลลูโลส แป้ง วัสดุจากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล กรดแลกติกที่เป็นสารตัวกลางเป็นต้น (ภาพ 2.7) (Koller et. al., 2010) การหมักโดยจุลินทรีย์เพื่อผลิต PHAs มี 2 ระยะ คือ ระยะแรกเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มีปริมาณสูง และระยะที่ 2 เป็นการสังเคราะห์ PHAs ให้ได้ปริมาณมากเมื่อใช้การจำกัดสารอาหารบางชนิดใน

กระบวนการหมัก โดยการหมักจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และอุณหภูมิในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส รวมถึงการจำกัดปริมาณออกซิเจน ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (Salem et al., 2021)



ภาพ 2.7 กระบวนการผลิต PHAs (Koller et al., 2010) จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

## 2.6 การประยุกต์ใช้ PHAs

การนำ PHAs ไปใช้งานทั้งการเป็นวัสดุห่อหุ้มหรือบรรจุและนำไปประยุกต์ใช้สำหรับงานประเภทต่าง ๆ ได้อย่างหลากหลายไม่ว่าจะเป็นวัสดุสำหรับการเกษตร เกษษกรรม และการแพทย์ สำหรับข้อได้เปรียบของ PHAs ที่ทำให้ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมี โดยการนำ PHAs มาใช้เชิงพาณิชย์เริ่มตั้งแต่ปลายปี ค.ศ. 1982 บริษัทอิมพีเรียล เคมีเคิล อินดัสตรี (Imperial Chemical Industries, ICI) ได้พัฒนาการผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งผลิต PHB จาก *R. eutropha* H16 โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Biopol® (Reddy et al., 2003) นำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตขวดแชมพูโดยบริษัท Wella AG ซึ่งนับเป็นจุดเริ่มต้นของ PHAs ในทางการค้าและต่อมา Biopol® ได้ถูกซื้อสิทธิ์โดยบริษัท Zeneca ให้แก่บริษัท Monsanto ในปี 1996 และในปี 1998 บริษัท Metabolic Inc. ได้ซื้อสิทธิ์และพัฒนา PHAs ร่วมกับโรงพยาบาลเด็กในบอสตัน ภายใต้เครื่องหมายการค้า Tephra ในการพัฒนา PHAs สำหรับใช้ในทางการแพทย์ เช่น ลึ้นหัวใจเทียม ด้ายสำหรับเย็บแผล และวัสดุสำหรับช่วยยึดกระดูก (Philip et al., 2007) ต่อมาการพัฒนาการผลิต PHAs ในระดับอุตสาหกรรมมากขึ้น โดยบริษัทระดับโลกต่าง ๆ ที่มีชื่อเสียง ดังแสดงในตาราง 2.3

ในปี 2006 ราคา PHB อยู่ในช่วง 10-12 ยูโรต่อกิโลกรัม ซึ่งมีราคาสูงกว่าพอลิเมอร์ที่ทำจากแป้ง และพอลิเมอร์ที่ทำจากวัสดุธรรมชาติอื่น ๆ เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตที่สูง เช่น ราคาวัตถุดิบที่สูงขึ้น (Kosior et al., 2006) การที่จะนำ PHB ไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางหรือไม่ขึ้นอยู่กับ

ต้นทุนการผลิต โดยต้นทุนของการผลิต PHB ในปัจจุบัน (2010) มีราคาถูกลง เนื่องจากมีเทคโนโลยีที่มีการพัฒนามากขึ้น และมีหลายบริษัทที่สามารถผลิต PHAs ชนิดต่าง ๆ ได้เช่น บริษัท Telles เป็นบริษัทร่วมทุนระหว่าง Metabolix และ Archer Daniels Midland Company (ADM) สามารถผลิต PHB โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Mirel™ โดยมีอัตราการผลิต 50,000 ตันต่อปี โดย Telles ประกาศราคาขายที่ 1.50 ยูโรต่อกิโลกรัม บริษัท P&G สามารถผลิต PHBH โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Nodax™ โดยมีอัตราการผลิต 20,000-50,000 ตันต่อปี และประกาศราคาขายที่ 2.50 ยูโรต่อกิโลกรัม เป็นต้น และมีแนวโน้มที่จะขยายระดับการผลิตในอนาคตต่อไป (Kosior et al., 2006)

ตาราง 2.3 ตัวอย่างของบริษัทที่มีการผลิต PHAs ทางการค้าในปัจจุบัน (Chanprateep, 2010)

บริษัท	ชนิดของ PHA	ระดับการผลิต (ตัน)	ชื่อทางการค้า	ราคา (ยูโรต่อกิโลกรัม)
Mitsubishi Gas Chemical Company Inc. (Japan)	PHB	10,000	Biogreen®	2.5 - 3.0
Telles (USA)	PHB	50,000	Mirel™	1.50
PHB Industrial Company (Brazil)	PHB	50	Biocycle®	-
Biomer Inc. (Germany)	PHB และ PHBV	50	Biomer®	3.0 - 5.0
Tianan Biologic, Ningbo (China)	PHBV และ PHBV ผสมกับ Ecoflex	10,000	Enmat®	3.26
P&G (US)	PHBH	20,000 - 50,000	Nodax™	2.50
Lianyi Biotech (China)	PHBH	2000	Nodax™	3.70
Kaneka Corporation (Japan)	PHBH	1000	Kaneka PHBH™	-
Tianjin Green Bioscience Co/DSM	P(3HB-co-4HB)	10,000	Green Bio	-
Meredian (US)	PHBH	272,000 (2013)	Meredian	-

### 2.6.1 การประยุกต์ใช้ทางการเกษตรและปศุสัตว์

การนำ PHAs ไปประยุกต์ใช้กับการเกษตร ได้แก่ การนำ PHAs ไปทำแคปซูลสำหรับบรรจุแบคทีเรียในกลุ่มที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะปลูก (López et al., 1998) นอกจากนี้ยังได้มีการนำ PHAs ไปทำแคปซูลบรรจุยาฆ่าวัชพืช ยาฆ่าแมลง หรือผลิตเป็นแคปซูลสำหรับบรรจุยารักษาโรคของสัตว์ และบรรจุยาประเภทที่มีกลไกการออกฤทธิ์นาน (Reddy et al., 2003) อีกทั้ง PHB ยังได้รับการรับรองจากการทดสอบความเป็นพิษในการนำไปใช้ในรูปอนุภาคนาโนกับสัตว์ทดลองตามมาตรฐาน ISO 10993 (Pötter และ Steinbüchel, 2006) และเมื่อไม่นานมานี้บริษัท P&G ได้ผลิตแผ่นฟิล์ม PHB โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Nodax™ สำหรับใช้บรรจุปุ๋ย ยาฆ่าแมลงและวัชพืช สำหรับใช้ในนาข้าว (Philip et al., 2007)

### 2.6.2 การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์

เนื่องจาก PHAs มีสมบัติเข้ากันได้ทางชีวภาพกับสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility) ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ทางการแพทย์และทางเภสัชกรรมได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง P(3HB) P(3HB-3HV) P(4HB) P(3HO) และ P(3HB-3HHx) ซึ่งได้มีการทดสอบแล้วว่าสามารถเข้ากับได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อสัตว์หลายชนิด (Valappil et al., 2007) จึงได้มีการนำมาใช้ในงานด้านการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ และวัสดุในงานศัลยกรรม เช่น ใช้ทำหลอดเลือดเทียม กระดูกเทียม เข็มเย็บผ้า ผ้าซับเลือด (Chen และ Wu, 2005) การใช้เป็นวัสดุในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ (Williams และ Martin, 2003) เป็นต้น ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ดังเช่นการทดลองของ Sevastianov และคณะ (2003) ได้ทดสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ P(3HB) และ P(3HB-3HV) พบว่าพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดไม่ส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันและการตอบสนองระดับเซลล์ แต่มีการตอบสนองในระบบคอมพลิเมนต์และการเหนี่ยวนำเชิงตัวของเลือด ทั้งนี้เนื่องจากพอลิเมอร์มีลิโปพอลิแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS) ปะปนมากับพอลิเมอร์ทำให้เกิดการตอบสนองต่อระบบคอมพลิเมนต์ ดังนั้นการนำ PHAs มาใช้ในทางการแพทย์ กระบวนการผลิตและทำบริสุทธิ์ PHAs มีความสำคัญอย่างยิ่ง แต่เนื่องจาก PHAs ที่มีขายในทางการค้านั้นเป็น PHAs ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมากกว่าใช้ในทางการแพทย์ จึงทำให้ PHAs ยังคงมีโปรตีน สารลดแรงตึงผิว และเอนโดทอกซิน (Endotoxin) ซึ่งเป็นไพโรเจน (Pyrogen) ปะปนอยู่ ดังนั้นในกระบวนการสกัด PHAs เพื่อใช้สำหรับการแพทย์ จะต้องได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ไม่มีสารเคมีที่ใช้ในการสกัด หรือสารอื่น ๆ ปะปนอยู่ และพอลิเมอร์ที่ได้ต้องมีประสิทธิภาพ สามารถย่อยสลายได้ทั้งหมด และการที่จะได้รับอนุญาตจาก FDA เพื่อใช้ในทางการแพทย์ PHAs ที่ได้จะต้องพบเอนโดทอกซินไม่เกิน 0.5 US Pharmacopeia endotoxin units ต่อมิลลิลิตร (EU) (Valappil et al., 2007)

### 2.6.3 การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

ใช้ทำบรรจุภัณฑ์ประเภทถุง ภาชนะบรรจุอาหารสำเร็จรูป และแผ่นฟิล์มถนอมอาหาร และวัสดุอื่น ๆ เช่น หมุดกอล์ฟ ด้ามมีดโกน แก้วน้ำ และขวดแชมพู (ภาพ 2.8) นอกจากนี้ PHAs



latex ใช้ในการเคลือบกระดาษหรือกระดาษลึงเพื่อให้มีพื้นผิวที่กันน้ำได้แทนที่จะใช้การผสมอลูมิเนียมเข้ากับกระดาษซึ่งเป็นสารที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ รวมทั้งบริษัทไบโอเมอร์ (Biomer) ได้ผลิตหวีปากกาและกระสุนจาก PHB ที่ผลิตได้จาก *Alcaligenes latus* (Lauzier et al., 1993)



ภาพ 2.8 ผลิตภัณฑ์ PHAs ทางการค้าภายใต้ชื่อสินค้า Biopol<sup>®</sup> (A) หมุดกอล์ฟ (B) ด้ามมีดโกน (C) แก้วน้ำ (D) ขวดแชมพู (Pötter และ Steinbüchel, 2006)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความเป็นกรด เบส-(Digital pH meter) รุ่น F-21 บริษัท HORIBA, UK
2. เครื่องวัดอุณหภูมิดิน Soil thermometer รุ่น WT-1 บริษัท MOSEKO, China
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 10S UV-VIS บริษัท Thermo Spectronic, USA
4. เครื่องวัดความหวาน (Refractometer) รุ่น MS-HR บริษัท China-Apiculture, China
5. เครื่องชั่งหยาบ (Laboratory balance) รุ่น Quintix3102-18 บริษัท Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Germany
6. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) รุ่น ML204 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
7. เครื่องนึ่งออบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น HV-1100 บริษัท Hirayama manufacturing Corp., Japan
8. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow ISSCO รุ่น ABS1200CLS2-MK2, บริษัท Bioquell Inc, USA
9. ตู้แช่แข็งชนิดจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep freezer) -20 องศาเซลเซียส บริษัท Sanyo Electric, Japan
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น 1255PC บริษัท Sheldon Manufacturing, USA
11. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น ILW240 บริษัท POL-EKO APRATURA, EU
12. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie2) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA
13. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น FD-115 บริษัท Binder Co., Ltd., USA
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan
15. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA
16. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 200 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
17. ตู้เย็น (Freezer) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท Mitsubishi Electric, Japan
18. เครื่องส่องเจล (Blue view transilluminator) รุ่น Ultrabright LB-16 บริษัท Maestrogen, Taiwan
19. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น Primo Star บริษัท Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Germany
20. กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล (Confocal microscope) รุ่น Ti-E บริษัท Nikon, USA

21. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography MS) รุ่น 7890A บริษัท Agilent Technologies, USA
22. แคปพิลลารีคอลัมน์ (Capillary column) ชนิด HP-5 ขนาด 30mm x 25 mm (ID) x 0.32  $\mu\text{m}$  Df
23. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) รุ่น C1000 Touch บริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
24. เครื่องแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) รุ่น Mupid-One บริษัท Advance, Japan
25. เครื่องทำแห้งด้วยวิธีเยือกแข็ง (Freeze dry) รุ่น 6L บริษัท Thermo Labconco Co., US
26. ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane) ขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  บริษัท Sartorius, Germany
27. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (Cryotube) บริษัท Bioadvance, Thailand
28. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) บริษัท PYREX, USA
29. หลอดทดลอง (Test tube) บริษัท PYREX, USA
30. กระบอกตวง (Cylinder) บริษัท PYREX, USA
31. ปีกเกอร์ (Beaker) บริษัท PYREX, USA
32. หลอดทดลองฝาเกลียว (screw-cap tube) บริษัท PYREX, USA
33. กระบอกเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge ware) บริษัท Nalgene, USA

### 3.2 สารเคมี

1. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Biospringer, France
2. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Ireland
3. ทริปโตส (tryptose) บริษัท Difco Laboratories, USA
4. เปปโตน (peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
5. ฐันผง (agar) บริษัท บิกเบน โปรดักตอรา เดอ อะการ์ เอส.เอ., Chile
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
7. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
8. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท Merck, Germany
9. กรดซัลฟูริก ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) บริษัท Merck, Germany
10. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, Germany
11. กรดเบนโซอิก ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ ) บริษัท Nacalai tesque, Japan
12. กลูโคส (Glucose;  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
13. กลีเซอรอล ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) บริษัท Merck, Germany



14. คลอโรฟอร์ม (CHCl<sub>3</sub>) บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Ireland
15. เมทานอล (CH<sub>3</sub>OH) บริษัท Merck, Germany
16. คอปเปอร์ไดคลอไรด์ไดไฮเดรต (CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) บริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
17. ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) บริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A, Italy
18. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) บริษัท Merck, Germany
19. เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) บริษัท Merck, Germany
20. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) บริษัท Merck, German
21. แมงกานีสไดคลอไรด์เตตระไฮเดรต (MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O) บริษัท Merck, Germany
22. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) บริษัท Merck, Germany
23. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) บริษัท Merck, Germany
24. แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) บริษัท Merck, Germany
25. เอทานอล (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand
26. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
27. แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl<sub>2</sub>) บริษัท Merck, Germany
28. สารมาตรฐาน PHB บริษัท Sigma Chemical Co., USA
29. แก๊สไฮโดรเจน (H<sub>2</sub>) บริษัท PRAXAIR, Thailand
30. แก๊สออกซิเจน (O<sub>2</sub>) บริษัท TIG (Thai Industrial Gas), Thailand
31. แก๊สไนโตรเจน (N<sub>2</sub>) บริษัท PRAXAIR, Thailand
32. Sudan Black B (C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O) บริษัท Merck, Germany

### 3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.3.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชชนิดต่าง ๆ ในพื้นที่อำเภอปรางค์กู่ จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 16 ตัวอย่าง อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง จำนวน 18 และอำเภอเสด็จ จังหวัดชลบุรี จำนวน 6 ตัวอย่าง รวมทั้งหมดจำนวน 40 ตัวอย่างโดยทำการขุดดินที่ใกล้บริเวณรากพืชมากที่สุดและลึกประมาณ 10-15 เซนติเมตร และเก็บตัวอย่างดินปริมาณ 100 กรัม ลงในถุงซิปปลาสติก แห้งในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการแยกเชื้อ (Lin et al., 2021)

#### 3.3.2 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของตัวอย่างดิน

3.3.2.1 วัดอุณหภูมิดิน: ทำการวัดอุณหภูมิของดินด้วย Soil thermometer ซึ่งมีความยาว 12 เซนติเมตร โดยทำการปัก Probe ลงในร่องดินที่ขุดเตรียมไว้ จากนั้นอ่านค่าอุณหภูมิดินจำนวน 3 ครั้ง และจดบันทึก

3.3.2.2 วัดค่า pH ดิน: ชั่งตัวอย่างดินที่แห้ง บดให้ละเอียดและร่อนแล้วน้ำหนัก 20 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้อัตราส่วนดิน:น้ำ เท่ากับ 1:1 จากนั้น

ใช้แท่งแก้วคนสารละลายตัวอย่างดินเป็นเวลา 30 วินาที แล้วพักทิ้งไว้ 3 นาที จนครบ 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้จนดินในบีกเกอร์ตกตะกอน วัดค่า pH ของส่วนใสด้านบนด้วยเครื่องวัด pH (Osaiqbovo et al., 2021)

3.3.2.3 วัดความชื้นในดิน: ทำการชั่งตัวอย่างดินก่อนอบน้ำหนัก 20 กรัม โดยประมาณ ใส่ในกระป๋องหรือกระดาษสำหรับใส่ตัวอย่างดิน จากนั้นนำตัวอย่างดินไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักของแต่ละตัวอย่างดินหลังอบ แล้วคำนวณหาค่าความชื้นตามสูตร (Reynolds, 1970) ดังนี้

$$\text{ความชื้นของดิน (\%)} = \left( \frac{\text{มวลของดินเปียก} - \text{มวลของดินแห้ง}}{\text{มวลของดินแห้ง} - \text{กระป๋องเปล่า}} \right) \times 100$$

3.3.2.4 การตรวจวัดสีดิน: ทำการเทียบสีของดินโดยใช้ Soil solid color Chart และตรวจวัดเนื้อดิน (Soil texture) บันทึกผล (Nzeugang et al., 2021)

### 3.3.3 การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพูนขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มี 0.85% (w/v) NaCl (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้สารละลายตัวอย่างดินผสมเข้ากันดี และทำการเจือจางให้ได้ความเจือจาง  $10^{-5}$  และนำสารละลายที่ความเจือจาง  $10^{-2}$ - $10^{-5}$  มาคัดแยกบนอาหารวุ้นแข็ง Minimal salt medium (MSM) agar (ภาคผนวก ก) ที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 1 Brix<sup>o</sup> เป็นแหล่งคาร์บอนและ 50 µg/ml Cycloheximide ด้วยวิธี Spread plate technique จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของจุลินทรีย์และเลือกโคโลนีที่ลักษณะแตกต่างกันจากแต่ละตัวอย่างมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อบนอาหารแข็งและเก็บไว้ใน 20% (v/v) Glycerol (ภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ -20 °C (ดัดแปลงจาก Penkhrue et al., 2020)

### 3.3.4 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว Minimal salt medium (MSM) สำหรับเลี้ยงหัวเชื้อนำไปเลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85% (w/v) NaCl ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นปั่นแยกเซลล์และทำซ้ำอีกรอบ กระจายเซลล์ใน 20% (v/v) กลีเซอรอล นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปรับให้อยู่ในช่วง 0.8-1.0 บรรจุลงในหลอดเยือกแข็ง (Cryotube) ที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน หรือเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

### 3.3.5 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ภายในเซลล์ชั้นปฐมภูมิ

#### 3.3.5.1 การย้อมโคโลนีแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ด้วย Nile red

โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียด้วยเทคนิค Point inoculation ลงบนอาหารวุ้นแข็ง MSM agar ที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 1 Brix° เป็นแหล่งคาร์บอน และเติม 5 µg/ml Nile red (ภาคผนวก ข) เป็นสีย้อมจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลาทำการตรวจสอบการสะสม PHAs ภายในเซลล์แบคทีเรียโดยนำจานเพาะเชื้อวางใต้แสง UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs จะเกิดการเรืองแสงสีแดงและปริมาณความเข้มของการเรืองแสงบ่งชี้ถึงปริมาณ PHAs ที่ผลิตภายในเซลล์สูงได้โดยตรง (Spiekermann et al., 1999)

#### 3.3.5.2 การย้อมเซลล์แบคทีเรียที่ผลิต PHAs ด้วย Sudan Black B

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียด้วยเทคนิค Point inoculation ลงบนอาหารวุ้นแข็ง MSM agar ที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 1 Brix° เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลา นำแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วมากระจายตัวลงบนสไลด์หยดสารละลาย Sudan Black B (ภาคผนวก ข) ร้อยละ 1 ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาทีล้างด้วยไซลีน และหยด Safranin O ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ถ้ามี PHAs ซึ่งสะสมอยู่ในรูปของแกรนูล โดยแกรนูลจะติดสีดำของ Sudan Black B และเซลล์ของแบคทีเรียจะติดสีแดงของ Safranin O (Burdon, 1946)

### 3.3.6 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ภายในเซลล์ชั้นทุติยภูมิ

#### 3.3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ทำการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียคัดเลือกจากอาหารแข็งลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร Tryptic soy broth (TSB) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ความขุ่นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.8-1.0 ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Penkhrue et al., 2020)

#### 3.3.6.2 การผลิต PHAs ในอาหารเหลวระดับห้องปฏิบัติการ

ปิเปตหัวเชื้อความเข้มข้น 10% (v/v) ลงในอาหารเหลว MSM ที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 1 Brix° เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Penkhrue et al., 2020)

#### 3.3.6.3 การตรวจนับจำนวนแกรนูลของ PHAs ภายในเซลล์แบคทีเรีย

หลังจากนั้นผสม Nile red ความเข้มข้น 1 µg/ml กับเซลล์แบคทีเรีย ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนพื้นผิวของ 1% (w/v) Agarose gel ที่ตั้งอยู่บนแผ่นสไลด์ รอให้แห้งแล้ว

ปิดด้วย Cover slip จากนั้นนำไปตรวจนับจำนวนแกรนูลของ PHAs ภายในเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Jendrossek et al., 2007)

### 3.3.6.4 การตรวจสอบปริมาณ PHAs ด้วยวิธี Gas chromatography

ทำการปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็รรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำเซลล์แบคทีเรียไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยวิธีเยือกแข็ง (Freeze dry) และบันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นทำการสกัด PHAs โดยซึ่งเซลล์แห้งน้ำหนัก 8 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดฝาเกลียว เต็มคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตรและเติมเมทานอลปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีกรดซัลฟูริกร้อยละ 3 และมีกรดเบนโซอิก 2 กรัมต่อลิตรเป็นสารมาตรฐานภายใน ปิดฝาเกลียวให้แน่น นำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง เขย่าด้วยเครื่องเขย่าทุก 30 นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด ทิ้งให้เย็นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าอย่างรุนแรงเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น เก็บเฉพาะสารละลายชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของคลอโรฟอร์มเก็บในขวดฝาเกลียวขนาดเล็ก ปิดฝาให้แน่น และตรวจวัดปริมาณ Hydroxyalkanoyl-methylester ด้วยเทคนิค Gas chromatography (Lageveen et al., 1988; Penkhrue et al., 2020) ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปิลลารีคอลัมน์ชนิด HP-5
	ยาว 30 mm., 25 mm. (ID), 0.32 $\mu$ m. (df)
อุณหภูมิของ injector	: 250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของ column	: 290 องศาเซลเซียสนาน 18.57 นาที
	เพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 องศาเซลเซียส
	ด้วยอัตรา 2 องศาเซลเซียสต่อนาที
	รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ detector (FID)	: 275 องศาเซลเซียส (Isothermal)
Split ratio	: 10 ต่อ 1
แก๊สตัวพา (carrier gas)	: N <sub>2</sub> อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรฉีด	: 1 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์ โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (Retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารมาตรฐาน การคำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ PHAs (กรัมต่อลิตร) คำนวณปริมาณโมโนเมอร์ (ที่มีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน

### 3.3.7 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียคัดเลือกที่สามารถผลิต PHAs

#### 3.3.7.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3.6 บนอาหารรุ้นแข็ง Nutrient agar (NA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี หลังจากนั้นทำการย้อมสีเซลล์แบคทีเรีย โดยวิธีย้อมสีแกรม (Gram staining) เพื่อศึกษารูปร่าง และลักษณะการติดสีแกรมของแบคทีเรีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### 3.3.7.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA (16S rRNA)

3.3.7.2.1 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA: คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสมแกรนูล PHAs จากข้อ 3.3.6 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA โดยนำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในรูปของโคโลนีในจานเพาะเชื้อ ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ ATGC Co., Ltd ประเทศไทย โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแล้ว นำไปเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bioedit 7.2 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกจีโนสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.3.7.2.2 สร้าง Phylogenetic tree: นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือก ทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X จากนั้นนำข้อมูล ที่ผ่านการปรับแนว มาคำนวณ Distance matrix สร้าง phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์แบบ neighbor-joining และ bootstrap ด้วยโปรแกรม MEGA version 11.0 โดย phylogenetic tree ที่ถูกสร้างขึ้น นำเสนอโดยใช้โปรแกรม TREEVIEW (Kimura, 1980)

## 3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองทั้งหมดวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS version 20.0 และวิเคราะห์ผล ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) โดยใช้ Duncan's test เมื่อ  $p < 0.05$  เป็นค่าที่ข้อมูลแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ (Penkrue et al., 2020)



## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 ตัวอย่างดินและคุณสมบัติบางประการของตัวอย่างดิน

จากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ข้าว ตะไคร้ ถั่วลิสง ต้นสัก พริก ข้าวโพด โสน ต้นไผ่ มันสำปะหลัง โกกนาง โททะเล และสน ในพื้นที่ (1) อำเภอปรางค์กู่ จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 16 ตัวอย่าง (2) อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง จำนวน 18 และ (3) อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี จำนวน 6 ตัวอย่าง รวมทั้งหมดจำนวน 40 ตัวอย่าง (ภาพ 4.1) พบว่า ตัวอย่างดินรอบรากพืชมีค่าอุณหภูมิของดินอยู่ในช่วง 27-31 องศาเซลเซียส ค่า pH อยู่ระหว่าง 4.70-7.76 และความชื้นของดินระหว่าง 5.02-100% ทั้งนี้อุณหภูมิดิน ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความชื้นในดินเฉลี่ย เท่ากับ 28.9 องศาเซลเซียส pH 6.18 และ 25.61% ตามลำดับ ลักษณะทางกายภาพของดินส่วนใหญ่จะเป็นดินร่วนสีน้ำตาลถึงสีดำ (ตาราง 1)



ภาพ 4.1 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างดินรอบรากพืชและตัวอย่างดินบางส่วนที่ใช้ในการศึกษา

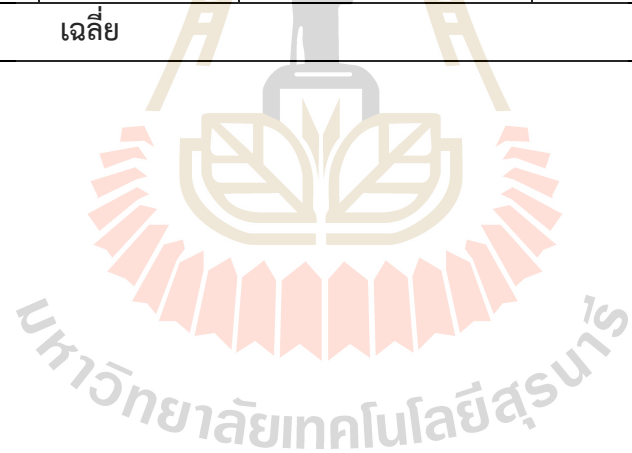
ตาราง 4.1 ลักษณะทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างดินรอบรากพืชทั้ง 40 ตัวอย่างที่ใช้สำหรับแยกแบคทีเรียผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHAs

No.	ตัวอย่างดิน	จังหวัด	Latitude	Longitude	สีดิน	ชนิดของเนื้อดิน	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความชื้น (%)
1	ข้าว 3	ลำปาง	18.5237102	99.6504895	น้ำตาลอ่อน (#eab64f)	เหนียว	28.8	5.62	25.60
2	ตะไคร้	นครราชสีมา	14.6914014	101.905794	ดำ (#15161b)	ร่วนปนทราย	28.7	7.12	12.81
3	ถั่วลิสง 1	นครราชสีมา	14.6924055	101.907396	น้ำตาล (#926829)	ร่วนปนทราย	29.5	6.98	5.02
4	ต้นสัก 1	นครราชสีมา	14.8938293	101.537764	น้ำตาลเข้ม (#3e3117)	ร่วน	29.8	6.32	10.94
5	ข้าว 1	นครราชสีมา	14.6929990	101.903103	น้ำตาลเข้ม (#3e3117)	ร่วนปนทราย	28.1	6.82	11.19
6	พริก 1	นครราชสีมา	14.8938293	101.537764	น้ำตาลดำ (#27221c)	เหนียว	31.0	7.41	16.90
7	ข้าวโพด 1	นครราชสีมา	14.6928047	101.908056	น้ำตาล (#926829)	ร่วนปนทราย	29.5	7.10	3.40
8	โสน 1	นครราชสีมา	14.7017929	101.8939575	ดำ (#15161b)	เหนียว	28.0	6.29	36.65
9	โสน 2	นครราชสีมา	14.7017929	101.8939575	ดำ (#15161b)	เหนียว	28.6	6.24	34.43
10	ต้นไผ่ 1	ลำปาง	18.5219271	99.6484272	ดำ (#15161b)	ร่วน	28.7	6.08	21.00
11	ข้าวโพด 1	ลำปาง	18.5217367	99.6466824	น้ำตาลเข้ม (#3e3117)	ร่วนปนทราย	29.6	5.71	17.79
12	มันสำปะหลัง 1	ลำปาง	18.5356965	99.6408717	น้ำตาล (#926829)	ร่วนปนทราย	28.8	5.43	17.08
13	ต้นไผ่ 2	ลำปาง	18.5219271	99.6484272	ดำ (#15161b)	ร่วน	28.8	4.99	43.77
14	ข้าวโพด 2	ลำปาง	18.5217367	99.6466824	น้ำตาล (#926829)	ร่วนปนทราย	28.8	6.35	13.36
15	ข้าว 1	ลำปาง	18.5237102	99.6504895	น้ำตาลอ่อน (#eab64f)	เหนียว	27.8	6.17	23.08
16	ข้าว 2	ลำปาง	18.5237102	99.6504895	น้ำตาลอ่อน (#eab64f)	เหนียว	28.8	5.46	28.34

No.	ตัวอย่างดิน	จังหวัด	Latitude	Longitude	สีดิน	ชนิดของเนื้อดิน	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความชื้น (%)
17	ข้าวโพด 3	ลำปาง	18.5369550	99.6381885	น้ำตาล (#926829)	ร่วนปนทราย	30.7	5.14	21.44
18	ข้าวโพด 1	ลำปาง	18.5369550	99.6381885	น้ำตาลอ่อน (#eab64f)	ร่วน	30.3	5.98	11.16
19	สั๊ก 1	ลำปาง	18.5369550	99.6381885	น้ำตาลเข้ม (#3e3117)	ร่วนปนหิน	27.7	5.63	10.27
20	มันสำปะหลัง 2	ลำปาง	18.5356965	99.6408717	น้ำตาลดำ (#27221c)	ร่วน	30.1	4.70	10.71
21	สั๊ก 2	ลำปาง	18.5369550	99.6381885	น้ำตาล (#926829)	ร่วนปนทรายและหิน	27.0	5.12	11.18
22	ข้าวโพด 2	ลำปาง	18.5369550	99.6381885	น้ำตาลดำ (#27221c)	ร่วน	31.3	5.34	15.51
23	สั๊ก 3	ลำปาง	18.5369550	99.6381885	น้ำตาล (#926829)	ร่วนปนทราย	27.6	5.27	9.85
24	ข้าวโพด 3	ลำปาง	18.5217367	99.6466824	น้ำตาลดำ (#27221c)	ร่วน	29.3	6.62	22.99
25	ต้นไผ่ 3	ลำปาง	18.5219271	99.6484272	น้ำตาล (#926829)	ร่วน	29.8	6.09	10.10
26	มันสำปะหลัง 3	ลำปาง	18.5356965	99.6408717	น้ำตาลเข้ม (#3e3117)	ร่วนปนทราย	29.1	5.49	11.72
27	โพทะเล 1	ชลบุรี	12.6214591	100.918221	ขาวเหลือง (#FAF2C3)	ทราย	27.5	7.76	29.27
28	โกก่าง 1	ชลบุรี	12.6465502	100.931683	น้ำตาลแดง (#800000)	โคลน	28.6	5.90	100.00
29	สน	ชลบุรี	12.6214591	100.918221	น้ำตาลอ่อน (#eab64f)	ร่วนปนทราย	29.5	7.03	17.12
30	โพทะเล 2	ชลบุรี	12.6214591	100.918221	ขาวเหลือง (#FAF2C3)	ทราย	28.1	7.69	36.43
31	โกก่าง 2	ชลบุรี	12.6465502	100.931683	น้ำตาลดำ (#27221c)	โคลน	28.9	6.62	96.92
32	โกก่าง 3	ชลบุรี	12.6465502	100.931683	น้ำตาลดำ (#27221c)	โคลน	29.1	7.17	100.00
33	โสน	นครราชสีมา	14.8730319	101.562390	น้ำตาลอ่อน (#eab64f)	ร่วน	28.1	6.27	15.20



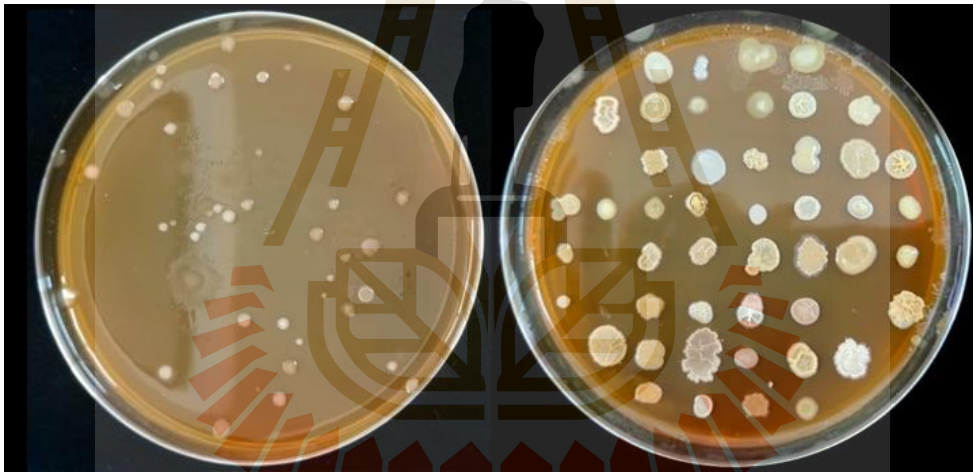
No.	ตัวอย่างดิน	จังหวัด	Latitude	Longitude	สีดิน	ชนิดของเนื้อดิน	อุณหภูมิ (°C)	pH	ความชื้น (%)
34	พริก	นครราชสีมา	14.6907462	101.90608	น้ำตาลเข้ม (#3e3117)	ร่วนปนทราย	29.1	6.28	26.60
35	สั๊ก	นครราชสีมา	14.6926886	101.910029	น้ำตาลเข้ม (#3e3117)	ร่วนปนทราย	28.9	6.35	25.98
36	ข้าวโพด	นครราชสีมา	14.8938293	101.537764	น้ำตาลอ่อน (#eab64f)	ร่วน	29.6	6.25	19.50
37	ข้าว	นครราชสีมา	14.694259	101.900134	น้ำตาลอ่อน (#eab64f)	ร่วนปนทราย	27.4	5.36	18.25
38	ข้าว	นครราชสีมา	14.6933266	101.902503	น้ำตาลเข้ม (#3e3117)	ร่วนปนทราย	27.7	6.54	29.50
39	ตะไคร้	นครราชสีมา	14.6924055	101.907396	น้ำตาลอ่อน (#eab64f)	ร่วนปนทราย	28.7	6.24	50.50
40	ถั่วลิสง	นครราชสีมา	14.693058	101.906722	น้ำตาลดำ (#27221c)	ร่วนปนทรายและหิน	29.3	6.50	3.240
เฉลี่ย							<b>28.92</b>	<b>6.18</b>	<b>25.61</b>



#### 4.2 การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน

เมื่อทำการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินทั้งหมด 40 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารรุ้นแข็ง MSM agar ที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 1 Brix° เป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยวิธี Spread plate technique จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพ 4.2) พบว่า แบคทีเรียในตัวอย่างดินรอบรากพืชสามารถใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้และสามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียดังกล่าวจากตัวอย่างดินทั้งหมดเฉลี่ย เท่ากับ  $9.98 \times 10^5$  CFU/g soil ทั้งนี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่ต่างกันไปทั้งหมด 396 ไอโซเลท (ตาราง 4.2)

จากพืชทั้งหมด 12 ชนิด ได้แก่ ข้าว ตะไคร้ ถั่วลิสง ต้นสัก พริก ข้าวโพด โสน ต้นไผ่ มันสำปะหลัง โกงกาง โพทะเล และสน พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินรอบรากต้นข้าวโพดจำนวน 8 ตัวอย่าง จากจังหวัดลำปางและนครราชสีมาได้มากที่สุด เท่ากับ 84 ไอโซเลท และพบว่าไม่สามารถแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในตัวอย่างดินรอบรากต้นโพทะเล จังหวัดชลบุรี



ภาพ 4.2 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่างดินด้วยวิธี Ten-fold Dilution spread plate technique บนอาหารรุ้นแข็ง MSM agar ที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 1 Brix° เป็นแหล่งคาร์บอน

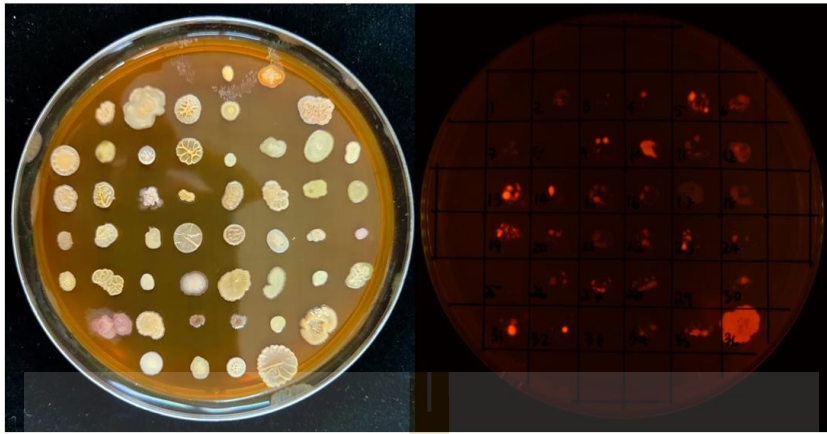
ตาราง 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดพืชและจำนวนแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างดินรอบรากพืชทั้งหมด 40 ตัวอย่าง

พืช	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียที่สามารถแยกได้ (ไอโซเลท)
ข้าว	6	55
ตะไคร้	2	34
ถั่วลิสง	2	18
สัก	5	64
พริก	2	15
ข้าวโพด	8	84
โสน	3	53
ไผ่	3	54
มันสำปะหลัง	3	3
โพทะเล	2	0
สน	1	6
โกกวาง	3	10
<b>รวม</b>	<b>40</b>	<b>396</b>

#### 4.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ภายในเซลล์ชั้นปฐมภูมิ

เมื่อทำการตรวจสอบการสะสมแกรนูลของ PHAs ภายในเซลล์แบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 396 ไอโซเลท ด้วยวิธีการย้อมโคโลนีด้วย Nile red พบว่า มีทั้งหมด 103 ไอโซเลท ให้ผลบวกต่อการเรืองแสงสีแดงของ Nile red ภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ภาพ 4.3) [การเรืองแสงสูงสุด (+++) เท่ากับ 28 ไอโซเลท ปานกลาง (++) เท่ากับ 20 ไอโซเลท และต่ำสุด (+) เท่ากับ 55 ไอโซเลท] อีกทั้งเมื่อทดสอบด้วยการย้อม Sudan Black B พบว่า แบคทีเรียทั้งหมด 135 ไอโซเลท ให้ผลบวกเมื่อย้อมด้วย Sudan Black B (ภาพ 4.4) [จำนวน PHAs มากกว่า 5 แกรนูล 37 ไอโซเลท จำนวน 3-5 แกรนูล 4 ไอโซเลท และจำนวน 1-2 แกรนูล 94 ไอโซเลท]

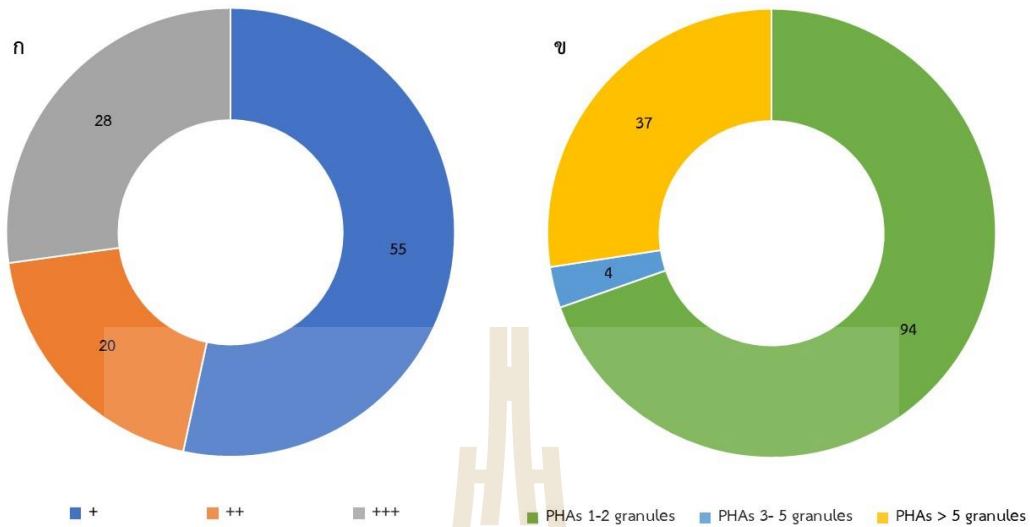
ทั้งนี้ทำการคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่ให้ผลบวกทั้งการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Nile red และ Sudan Black B ที่สูงสุดทั้งหมดจำนวน 29 ไอโซเลท (ภาพ 4.5) โดยสามารถจำแนกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 23 ไอโซเลท และแบคทีเรียแกรมลบ 6 ไอโซเลท เพื่อนำไปคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ชั้นทุติยภูมิในอาหารเหลวระดับห้องปฏิบัติการและตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงและวิธี Gas chromatography ในลำดับถัดไป



ภาพ 4.3 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียที่เรี่ยที่บนอาหารแข็ง MSM agar ที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 1 Brix° เป็นแหล่งคาร์บอน (ซ้าย) และการเรืองแสงของโคโลนีแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ภายในเซลล์ภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ขวา)



ภาพ 4.4 ลักษณะเซลล์แบคทีเรียไอโซเลท WP34-1 สะสมแกรนูล PHAs ภายในเซลล์ (ลูกศรสีแดง) เมื่อย้อมด้วย Sudan Black B และส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพ 4.5 จำนวนไอโซเลทที่ให้ผลบวกทั้งวิธี Nile red (ก) และ Sudan Black B (ข) โดยแบ่งเป็นระดับสูงสุด ปานกลางและต่ำสุด

#### 4.5 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ภายในเซลล์ชั้นทุติยภูมิ

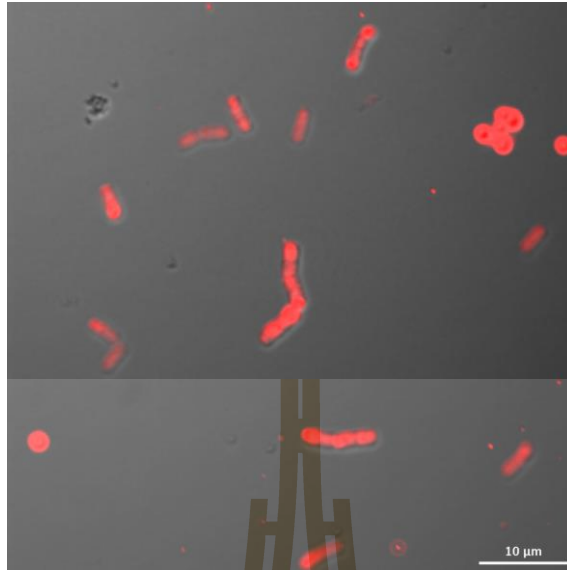
เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 29 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการผลิต PHAs ในอาหารเหลว MSM ที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 1 Brix<sup>o</sup> เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และนำเซลล์แบคทีเรียไปย้อมด้วย Nile red และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง พบว่า แบคทีเรียเพียง 15 ไอโซเลท ที่มีการเจริญที่ติดบนอาหารวุ้นแข็งดังกล่าวและมีลักษณะโคโลนีเรืองแสงสีแดงเข้มใต้แสง UV ทั้งนี้พบว่าแบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลท (WP14-2 และ WP15-5/2) ที่สามารถสะสม PHAs granules สูงภายในเซลล์ได้ (ภาพ 4.6) นอกจากนี้เมื่อทำการสกัด PHAs จากเซลล์แบคทีเรียทดสอบเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณ PHAs ด้วยเทคนิค Gas chromatography พบว่า แบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ได้แก่ WP14-2, WP18-1, WP32-2, WP43-4 และ WP45-2 สามารถผลิต PHAs ชนิด Polyhydroxyvalerate (PHV) ปริมาณสูงกว่า 50 mg/L (ตาราง 4.3) ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ชนิดของมอนอเมอร์พลาสติกชีวภาพ PHAs ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท สะสมพอลิเมอร์ชนิด Poly 3-hydroxyvalerate (P3HV) ซึ่งจัดเป็น PHAs ชนิดโฮโมพอลิเมอร์

ดังนั้น จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ WP14-2, WP18-1, WP32-2, WP43-4 และ WP45-2 ไปศึกษาการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียในลำดับถัดไปและเพื่อการพัฒนาต่อยอดเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHAs โดยใช้กากน้ำตาลในระดับอุตสาหกรรมในอนาคต

ตาราง 4.3 การผลิต PHAs ของแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้งหมด 29 ไอโซเลท ในอาหารเหลว MSM

ไอโซเลท	การติดสีแกรม	การตรวจสอบการผลิต PHAs ในอาหารเหลว		
		การเรืองแสง	จำนวนแกรนูล	PHV yield (mg/L)
WP5-9	+	-	2	18.8±0.58 <sup>l</sup>
WP7-2	+	+	1	7.27±0.67 <sup>p</sup>
WP7-7	+	-	ND	ND <sup>q</sup>
WP7-8	+	-	1	0.08±0.68 <sup>q</sup>
WP7-16	+	-	2	16.05±0.49 <sup>m</sup>
WP9-3/1	-	+++	2	29.27±0.64 <sup>i</sup>
WP9-3/2	-	NG	3	NG <sup>q</sup>
WP9-7	+	+++	1	36.30±1.33 <sup>h</sup>
WP13-5	-	+++	2	37.35±2.40 <sup>sh</sup>
WP13-8	+	-	ND	ND <sup>q</sup>
<b>WP14-2</b>	+	++	8	78.73±1.29 <sup>b</sup>
WP14-4/1	+	+	1	0.59±0.51 <sup>q</sup>
WP14-4/2	+	-	NG	NG <sup>q</sup>
WP15-5/1	+	-	1	ND <sup>q</sup>
WP15-5/2	+	-	5	0.40±0.13 <sup>q</sup>
WP17-5	+	+++	3	42.53±2.25 <sup>f</sup>
WP17-7	+	++	2	12.53±2.14 <sup>n</sup>
<b>WP18-1</b>	+	+++	3	66.70±2.72 <sup>d</sup>
WP25-7	+	-	2	9.91±0.60 <sup>o</sup>
WP31-1	+	+	3	28.72±0.52 <sup>i</sup>
WP31-2	+	+	2	26.43±0.87 <sup>j</sup>
WP31-4	+	-	1	15.44±0.18 <sup>m</sup>
WP31-9	-	-	1	21.80±1.57 <sup>k</sup>
<b>WP32-2</b>	-	++	3	58.69±0.53 <sup>e</sup>
WP34-1	+	-	2	42.81±0.27 <sup>f</sup>
<b>WP43-4</b>	+	+++	4	71.72±2.84 <sup>c</sup>
WP43-5	-	-	3	38.46±0.26 <sup>s</sup>
WP45-1	+	+++	2	27.51±0.47 <sup>ij</sup>
<b>WP45-2</b>	+	+	3	89.03±1.17 <sup>a</sup>





ภาพ 4.6 เซลล์แบคทีเรียไอโซเลท WP14-2 ที่ถูกย้อมด้วย Nile red ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง กำลังขยาย 1000 เท่า

#### 4.6 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียคัดเลือกที่สามารถผลิต PHAs

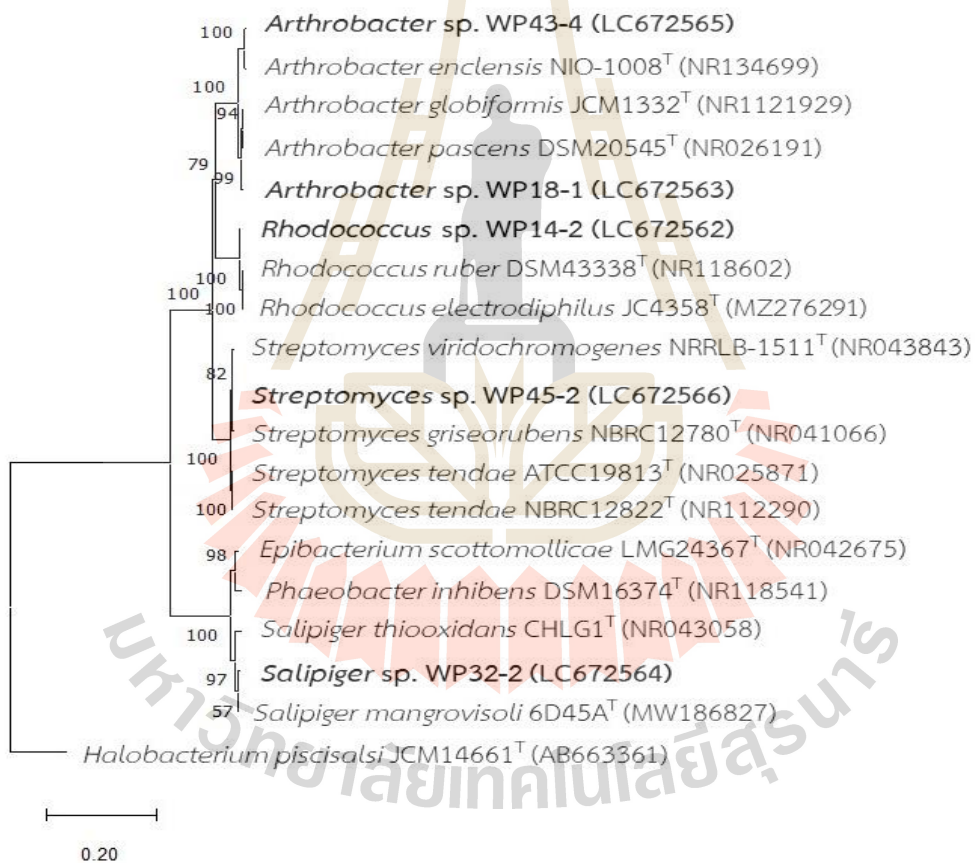
ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียคัดเลือกทั้ง 5 ไอโซเลท มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ดังแสดงในตาราง 4.4 รวมทั้งแสดงการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท WP14-2, WP18-1, WP32-2, WP43-4 และ WP45-2 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Rhodococcus ruber* DSM43338<sup>T</sup>, *Arthrobacter globiformis* JCM1332<sup>T</sup>, *Salipiger mangrovisoli* 6D54A<sup>T</sup>, *Arthrobacter enclensis* NIO- 1008<sup>T</sup> และ *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1511<sup>T</sup> ตามลำดับ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของแบคทีเรียคัดเลือกทั้ง 5 ไอโซเลทเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn) โดยทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X และนำข้อมูลที่ได้ผ่านการปรับแนวมาสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 11.0 พบว่า แบคทีเรียคัดเลือกทั้ง 5 ไอโซเลท มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่กล่าวข้างต้น (ภาพ 4.7)



ตาราง 4.4 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่เรียคัดเลือกกับฐานข้อมูล

Isolates	Accession number	Length (bp)	The most closely related strain	16S rRNA gene sequence identity (%)
WP14-2	LC672562	1336	<i>Rhodococcus ruber</i>	99.10
WP18-1	LC672563	1341	<i>Arthrobacter globiformis</i>	99.25
WP32-2	LC672564	1314	<i>Salipiger mangrovisoli</i>	99.23
WP43-4	LC672565	1369	<i>Arthrobacter enclensis</i>	98.97
WP45-2	LC672566	1397	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	99.57



ภาพ 4.7 Phylogenetic tree ของ 16S rRNA ของแบคทีเรียที่เรียคัดเลือกโดยใช้ 16S rRNA ของ *Halobacterium piscisalsi* JCM14661 (AB663361) เป็น Out-group และตัวเลขที่กิ่งสาขาบอกถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 1000 ครั้งด้วย Bootstrap

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชชนิดต่าง ๆ จำนวน 40 ตัวอย่าง ซึ่งมีอุณหภูมิดินเฉลี่ยเท่ากับ 28.9 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เฉลี่ยเท่ากับ 6.18 ความชื้นในดินเฉลี่ยเท่ากับ 25.61% และลักษณะทางกายภาพของดินส่วนใหญ่จะเป็นดินร่วนสีน้ำตาลถึงสีดำ เมื่อนำมาแยกแบคทีเรีย พบว่า สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันทั้งหมด 396 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Mesophiles โดยทำการคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่ให้ผลบวกทั้งการย้อมเซลล์ด้วยวิธี Nile red และ Sudan Black B ที่ให้ผลบวกสูงสุด พบว่า แบคทีเรียจำนวน 29 ไอโซเลท ติดสี Nile red และ Sudan Black B ทำให้สามารถสังเกตให้ PHAs granules ภายในเซลล์ของแบคทีเรียได้ชัดเจน จึงถูกคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาการผลิต PHAs ในอาหารเหลว จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่า การแยกจุลินทรีย์จากดินบริเวณรอบรากพืชทำให้สามารถแยกจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายและมีปริมาณจุลินทรีย์ที่สูง รวมทั้งจุลินทรีย์ที่แยกได้บางไอโซเลทมีคุณสมบัติในการผลิต PHAs ได้ ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ PHAs ด้วยเทคนิค Gas chromatography พบว่า มีเพียงแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ได้แก่ WP14-2, WP18-1, WP32-2, WP43-4 และ WP45-2 สามารถผลิต PHAs ปริมาณสูงกว่า 50 mg/L ซึ่งเป็นชนิด Polyhydroxyvalerate (PHV) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท WP14-2, WP18-1, WP32-2, WP43-4 และ WP45-2 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของ *Rhodococcus ruber* DSM43338<sup>T</sup>, *Arthrobacter globiformis* JCM1332<sup>T</sup>, *Salipiger mangrovisoli* 6D54A<sup>T</sup>, *Arthrobacter enclensis* NIO-1008<sup>T</sup> และ *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1511<sup>T</sup> ตามลำดับ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้พลาสติกชีวภาพที่ผลิตได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางอาหารและการแพทย์ได้ดี เนื่องจากไม่มีสารพิษกลุ่ม Lipopolysaccharide (LPS) ปนเปื้อนระหว่างการผลิตเมื่อเทียบกับแบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้น ไอโซเลท WP14-2, WP18-1, WP32-2, WP43-4 และ WP45-2 จะถูกคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาต่อในการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHV ในลำดับถัดไป

#### 5.2 อภิปรายผล

การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs granules ภายในเซลล์นั้น สามารถแยกได้จากแหล่งดินเป็นส่วนใหญ่ (Wang and Bakken, 1998; Chien et al., 2007) ซึ่งตัวอย่างดินที่แตกต่างกันจะทำให้สามารถแยกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเมแทบอลิซึมสารที่แตกต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งดินบริเวณรอบรากพืช (Rhizosphere soil) ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีรายงานว่า ดินบริเวณรอบรากพืชเป็นแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรียหลายสายพันธุ์เมื่อเทียบกับดินโดยทั่วไป เนื่องจากองค์ประกอบของดินจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียกลุ่ม Root-

associated bacteria กลุ่มเด่น คือ Betaproteobacteria (เช่น *Burkholderia*) Bacteroidetes Alphaproteobacteria (เช่น *Rhizobia*) Gammaproteobacteria (เช่น *Pseudomonas*) และ Firmicutes (เช่น *Bacillus*) (Nuccio et al., 2020; Nwachukwu et al., 2021) โดยแบคทีเรียเหล่านี้ มักถูกนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การผลิตสารต้านจุลชีพ และสามารถใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ การบำบัดทางชีวภาพ และปุ๋ยชีวภาพ ซึ่งจะช่วยปรับปรุงสุขภาพของดิน ความอุดมสมบูรณ์ของดิน และผลผลิตของพืชผล (Garrido-Oter et al., 2018) สำหรับอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อและการผลิต PHAs คือ Minimal salt medium (MSM) ที่เติมกากน้ำตาล ความเข้มข้น 1 Brix° เป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนน้อย จะช่วยส่งเสริมให้เกิดการสะสม PHAs ภายในเซลล์ได้มากขึ้น (Repaske และ Repaske, 1976) ทั้งนี้มีรายงานว่ากลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนส่วนใหญ่มีความสามารถในการผลิต PHAs ได้ (Wang และ Bakken, 1998; Yaman et al., 2017)

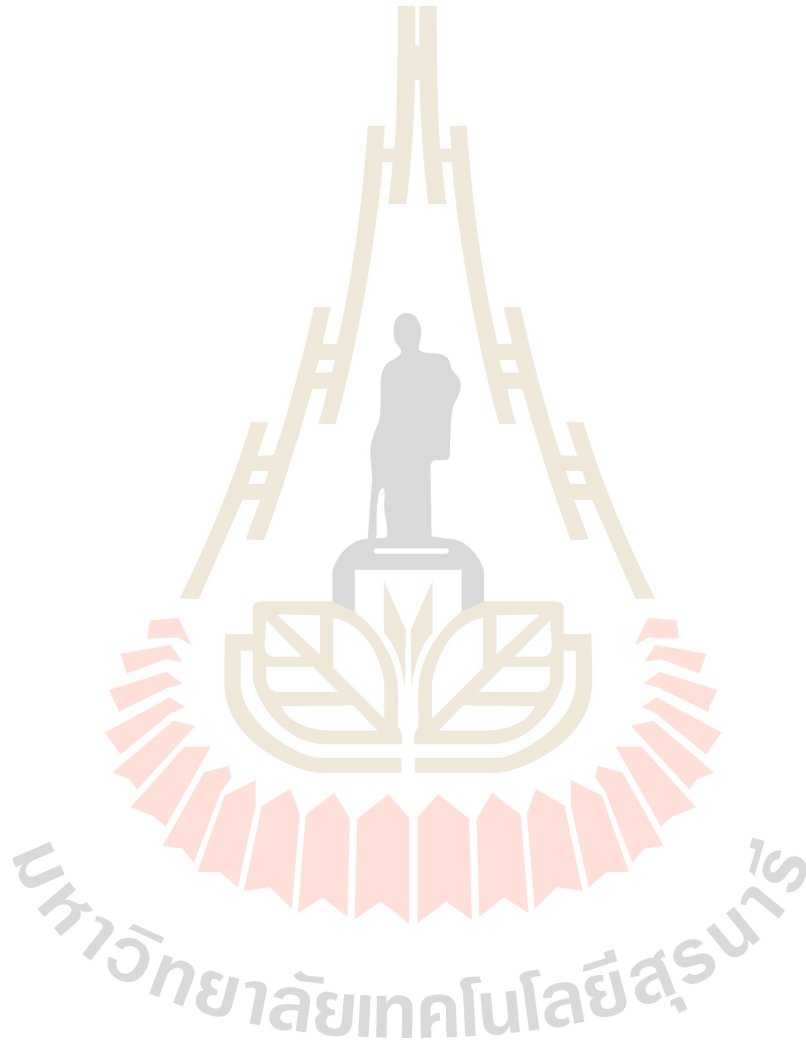
การย้อม PHAs granule ด้วยสารเรืองแสง Nile red เป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายในขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต PHAs เบื้องต้นได้ (Penkhrue et al., 2020; Wu et al., 2003; Spiekermann et al., 1999) เนื่องจากสามารถสังเกตเห็นการเรืองแสงได้ง่ายและใช้อุปกรณ์น้อย นอกจากนี้ยังสามารถปรับใช้ได้กับอุปกรณ์หลายอย่าง เช่น กล้องจุลทรรศน์ เครื่องส่องเจล เครื่อง Spectrophotometer และหลอด UV มาตรฐาน เป็นต้น อย่างไรก็ตามสี Nile red ยังสามารถทำปฏิกิริยาและย้อมติดลิปิดชนิดอื่นที่สะสมอยู่ในเซลล์ได้ (Revelo et al., 2007) ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas chromatography ร่วมด้วย ซึ่งเป็นการวัดสารที่เป็นหน่วยย่อยของพอลิเมอร์ PHAs ที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับสาร Methyl ester เพื่อใช้เป็น Internal standard และคำนวณเป็นปริมาณ PHAs ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (Lageveen et al., 1988) ซึ่งวิธีนี้ทำให้การตรวจวัดสารในเชิงปริมาณและคุณภาพมีความถูกต้อง แม่นยำ จำเพาะเจาะจงและมีความไวต่อสารได้ดียิ่งขึ้น (Gumel et al., 2012)

จากการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียคัดเลือก พบว่า จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 1 ไอโซเลทและแกรมบวก 4 ไอโซเลท (รวมแอกติโนแบคทีเรีย 1 ไอโซเลท) โดยแบคทีเรียที่สามารถสะสม PHV ได้สูงที่สุดคือ ไอโซเลท WP45-2 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1511<sup>T</sup> ซึ่งผลการวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Mahishi และคณะ (2003) ที่ทำการศึกษการผลิต PHB จาก *Streptomyces aureofaciens* รวมทั้งงานวิจัยอื่น ๆ หลายงานวิจัยที่ศึกษาในจีนัส *Streptomyces* เช่นกัน (Mann et al., 1999; Yashchuck et al., 2014) จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาการผลิต PHAs จากแบคทีเรียคัดเลือกต่อไป

### 5.3 ข้อเสนอแนะ

หากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต PHAs ของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและการผลิต

รวมทั้งการศึกษาในส่วนของการควบคุมการส่งออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ PHAs เพื่อให้ทราบถึงวิถีของการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น (กากน้ำตาล) เปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ (PHAs) ซึ่งเป็นอีกหนึ่งเครื่องมือที่จะทำให้ประสิทธิภาพการผลิต PHAs ของจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้นได้



## บรรณานุกรม

- สุชาติา จันทร์ประทีป. 2539. การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดย *Alcaligenes* sp. A-04 วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธนาวดี ลี้จากภัย. (2549). พลาสติกย่อยสลายได้เพื่อสิ่งแวดล้อม. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, กรุงเทพมหานคร.
- Boatman, E. S. (1964). Observations on the fine structure of spheroplasts of *Rhodospirillum rubrum*. *The Journal of Cell Biology*, 20(2), 297-311.
- Brandi, H., Bachofen, R., Mayer, J., & Wintermantel, E. (1995). Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(13), 143-153.
- Burdon, K. L. (1946). Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. *Journal of Bacteriology*, 52(6), 665-678.
- Castro-Sowinski, S., Burdman, S., Matan, O., & Okon, Y. (2010). Natural functions of bacterial polyhydroxyalkanoates. In *Plastics from Bacteria* (pp. 39-61). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 621-632.
- Chen, G. Q., & Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26(33), 6565-6578.
- Chien, C. C., Chen, C. C., Choi, M. H., Kung, S. S., & Wei, Y. H. (2007). Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment. *Journal of Biotechnology*, 132(3), 259-263.
- De Koning, G. J. M., & Maxwell, I. A. (1993). Biosynthesis of poly-(R)-3-hydroxyalkanoate: an emulsion polymerization. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1(3), 223-226.
- Garrido-Oter, R., Nakano, R. T., Dombrowski, N., Ma, K. W., Team, T. A., McHardy, A. C., & Schulze-Lefert, P. (2018). Modular traits of the Rhizobiales root microbiota and their evolutionary relationship with symbiotic rhizobia. *Cell Host & Microbe*, 24(1), 155-167.

- Gogolewski, S., Jovanovic, M., Perren, S. M., Dillon, J. G., & Hughes, M. K. (1993). Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly (3-hydroxybutyrate)(PHB), and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHB/VA). *Journal of Biomedical Materials Research*, 27(9), 1135-1148.
- Griebel, R. J., & Merrick, J. M. (1971). Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: effect of mild alkaline extraction on native poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules. *Journal of Bacteriology*, 108(2), 782-789.
- Griebel, R., Smith, Z., & Merrick, J. M. (1968). Metabolism of poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate). I. Purification, composition, and properties of native poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry*, 7(10), 3676-3681.
- Gumel, A. M., Annuar, M. S. M., & Heidelberg, T. (2012). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates copolymers produced by *Pseudomonas putida* Bet001 isolated from palm oil mill effluent. *PLoSOne*, 10.1371/journal.pone.0045214
- Jendrossek, D., & Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 403-432.
- Jendrossek, D., Selchow, O., & Hoppert, M. (2007). Poly (3-hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane in *Caryophanon latum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(2), 586-593.
- Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 321-326.
- Khanna, S. , & Srivastava, A. K. (2005) . Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607-619.
- Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, A., & Braunege, G. (2010). Microbial PHA production from waste raw materials. In *Plastics from Bacteria* (pp. 85-119). Springer, Berlin, Heidelberg.<sup>a</sup>
- Koller, M., Gasser, I., Schmid, F., & Berg, G. (2011). Linking ecology with economy: Insights into polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms. *Engineering in Life Sciences*, 11(3), 222-237.



- Koller, M. , Salerno, A. , Dias, M. , Reiterer, A. , & Braunege, G. ( 2010) . Modern biotechnological polymer synthesis: a review. *Food Technol Biotechnol*, 48(3), 255-269.<sup>b</sup>
- Kosior, E. , Braganca, R. M. , & Fowler, P. ( 2006) . Lightweight compostable packaging: literature review. *The Waste & Resources Action Programme*, 26, 1-48.
- Lauzier, C. A., Monasterios, C. J., Saracovan, I., Marchessault, R. H., & Ramsay, B. A. (1993). Film formation and paper coating with poly ([beta]-hydroxyalkanoate), a biodegradable latex. *Tappi Journal;(United States)*, 76(5).
- Lemoigne, M. (1926). Products of dehydration and polymerization of beta-oxybutic acid. *Bulletin De La Societe Chimique De Biology (Paris)*, 8: 770-782.
- Li, R. , Zhang, H. , & Qi, Q. ( 2007) . The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 98(12), 2313-2320.
- Lin, H., Liu, C., Li, B., & Dong, Y. (2021). *Trifolium repens* L. regulated phytoremediation of heavy metal contaminated soil by promoting soil enzyme activities and beneficial rhizosphere associated microorganisms. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123829.
- López, N. I., Ruiz, J. A., & Mendez, B. S. ( 1998) . Survival of poly-3-hydroxybutyrate-producing bacteria in soil microcosms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(5), 681-684.
- Lu, J., Tappel, R. C., & Nomura, C. T. ( 2009) . Mini- review: biosynthesis of poly (hydroxyalkanoates). *Journal of Macromolecular Science®*, Part C: Polymer Reviews, 49(3), 226-248.
- Lundgren, D. G., Pfister, R. M., & Merrick, J. M. (1964). Structure of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid granules. *Microbiology*, 34(3), 441-446.
- 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.
- Mahishi, L. H., Tripathi, G., & Rawal, S. K. (2003). Poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: effect of various carbon and nitrogen sources. *Microbiological Rresearch*, 158(1), 19-27.

- Manna, A., Banerjee, R., & Paul, A. K. (1999). Accumulation of poly (3-hydroxybutyric acid) by some soil *Streptomyces*. *Current microbiology*, 39(3), 153-158.
- Matsumura, S. (2005). 14-Mechanism of biodegradation. In: R. Smith Ed., *Biodegradable Polymers for Industrial Applications*. Woodhead Publishing (pp. 357-410).
- Mayer, F., & Hoppert, M. (1997). Determination of the thickness of the boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies, and implications for models describing the molecular architecture of this layer. *Journal of Basic Microbiology*, 37(1), 45-52.
- Nuccio, E. E., Starr, E., Karaoz, U., Brodie, E. L., Zhou, J., Tringe, S. G., ... & Pett-Ridge, J. (2020). Niche differentiation is spatially and temporally regulated in the rhizosphere. *The ISME journal*, 14(4), 999-1014.
- Nwachukwu, B. C., Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2021). Elucidating the rhizosphere associated bacteria for environmental sustainability. *Agriculture*, 11(1), 75.
- Nzeugang, A. N., Tsozué, D., Pagna, B. K., Madi, A. B., Deumeni, A. F., Ngos, S., ... & Fagel, N. (2021). Clayey soils from Boulgou (North Cameroon): geotechnical, mineralogical, chemical characteristics and properties of their fired products. *SN Applied Sciences*, 3(5), 1-14.
- Osaigbovo, A. U., Orhue, E. R., & Popor, U. (2021). Effects of palm oil mill effluent on some soil chemical properties and the growth of maize (*Zea mays* L.). *African Journal of General Agriculture*, 3(1), 43-48.
- Park, S. J., Kim, T. W., Kim, M. K., Lee, S. Y., & Lim, S. C. (2012). Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1196-1206.
- Penkhrue, W., Jendrossek, D., Khanongnuch, C., Pathom-Aree, W., Aizawa, T., Behrens, R. L., & Lumyong, S. (2020). Response surface method for polyhydroxybutyrate (PHB) bioplastic accumulation in *Bacillus drentensis* BP17 using pineapple peel. *PloS one*, 15(3), e0230443.
- Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of chemical technology & biotechnology: International research in process, Environmental & Clean Technology*, 82(3), 233-247.

- Poirier, Y. (2002). Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, 41(2), 131-155.
- Poirier, Y., Nawrath, C., & Somerville, C. (1995). Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Bio/technology*, 13(2), 142-150.
- Pötter, M., & Steinbüchel, A. (2006). Biogenesis and structure of polyhydroxyalkanoate granules. In *Inclusions in Prokaryotes* (pp. 109-136). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Reddy, C. S. K., Ghai, R., & Kalia, V. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87(2), 137-146.
- Rehm, B. H. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 578-592.
- Repaske, R., & Repaske, A. C. (1976). Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(4), 585-591.
- Revelo Romo, D. M., Grosso, M. V., Moreno Solano, N. C., & Montoya Castaño, D. (2007). A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(3), 348-357.
- Reynolds, S. G. (1970). The gravimetric method of soil moisture determination Part IA study of equipment, and methodological problems. *Journal of Hydrology*, 11(3), 258-273.
- Salem, R., Soliman, M., Fergala, A., Audette, G. F., & ElDyasti, A. (2021). Screening for methane utilizing mixed communities with high polyhydroxybutyrate (Phb) production capacity using different design approaches. *Polymers*, 13(10), 1579.
- Sevastianov, V. I., Perova, N. V., Shishatskaya, E. I., Kalacheva, G. S., & Volova, T. G. (2003). Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 14(10), 1029-1042.

- Spiekermann, P., Rehm, B. H., Kalscheuer, R., Baumeister, D., & Steinbüchel, A. (1999). A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology*, 171(2), 73-80.
- Steinbüchel, A., & Valentin, H. E. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, 128(3), 219-228.
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503-1555.
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants—a review. *Biotechnology Advances*, 25(2), 148-175.
- Tanaka, Y., Saito, T., FUKUI, T., TANIO, T., & TOMITA, K. (1981). Purification and properties of d (-)-3-hydroxybutyrate-dimer hydrolase from *Zoogloea ramigera* I-16-M. *European Journal of Biochemistry*, 118(1), 177-182.
- Tokiwa, Y., & Calabia, B. P. (2004). Review degradation of microbial polyesters. *Biotechnology letters*, 26(15), 1181-1189.
- Tokiwa, Y., & Suzuki, T. (1977). Hydrolysis of polyesters by lipases. *Nature*, 270(5632), 76-78.
- Trakunjae, C., Boondaeng, A., Apiwatanapiwat, W., Kosugi, A., Arai, T., Sudesh, K., & Vaithanomsat, P. (2021). Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production by newly isolated rare actinomycetes *Rhodococcus* sp. strain BSRT1-1 using response surface methodology. *Scientific Reports*, 11(1), 1-14.
- Valappil, S. P., Boccaccini, A. R., Bucke, C., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91(1), 1-17.
- Wang, J. G., & Bakken, L. R. (1998). Screening of soil bacteria for poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. *Microbial Ecology*, 35(1), 94-101.
- William, S.F. and Martin, D.P. 2003. *Biopolymer*. Wiley-VCH: Weinheim, Germany.

- Williams, S. F., Martin, D. P., Horowitz, D. M., & Peoples, O. P. (1999). PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *International journal of Biological Macromolecules*, 25(1-3), 111-121.
- Williamson, D. H., & Wilkinson, J. F. (1958). The isolation and estimation of the poly- $\beta$ -hydroxy-butyrate inclusions of *Bacillus* species. *Microbiology*, 19(1), 198-209.
- Wu, H. A., Sheu, D. S., & Lee, C. Y. (2003). Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry. *Journal of Microbiological Methods*, 53(1), 131-135.
- Yaman, F., Aktaş, B., Touray, M., Çoban, E. P., & BIYIK, H. H. (2017). Biodiversity of bacteria isolated from different soils. *International Journal of Secondary Metabolite*, 4(1), 27-34.
- Yashchuk, O., Miyazaki, S. S., & Hermida, E. B. (2014). PHB-degrading *Streptomyces* sp. SSM 5670: isolation, characterization and PHB-accumulation. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8(4), 2823-2830.

ภาคผนวก  
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

**Nutrient Agar (NA)**

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

The pH of the medium was adjusted to 7.2

**Tryptic Soy Broth (TSB)**

Tryptone	17.0	กรัม
Soytone	3.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

The pH of the medium was adjusted to 7.3

**Minimal Salt Medium (MSM) (Ramsay et al., 1989)**

Mollases	10.0	กรัม
NaHPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6.7	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	กรัม
Ferrous ammonium citrate	60	มิลลิกรัม
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10	มิลลิกรัม
Trace element solution	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

The pH of the medium was adjusted to 7.0.

The trace element solution contained (1 L): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.3 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.2 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 30 mg, NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 30 mg, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10 mg and CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 10 mg.



**ISP-2: Yeast malt extract (YM) agar** (Shirling and Gottlieb, 1966)

Yeast extract	4.0	กรัม
Malt extract	10.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

The pH of the medium was adjusted to 7.3



## ภาคผนวก ข สารเคมี

### Nile red dye (10 µg/mL)

Nile red dye	1	กรัม
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	100	มิลลิลิตร

### Sudan Black B dye

Sudan Black B powder	0.3	กรัม
70% (v/v) ethanol	100	มิลลิลิตร

### Agarose gel

Agarose	1.6	กรัม
1x TAE buffer	200	มิลลิลิตร

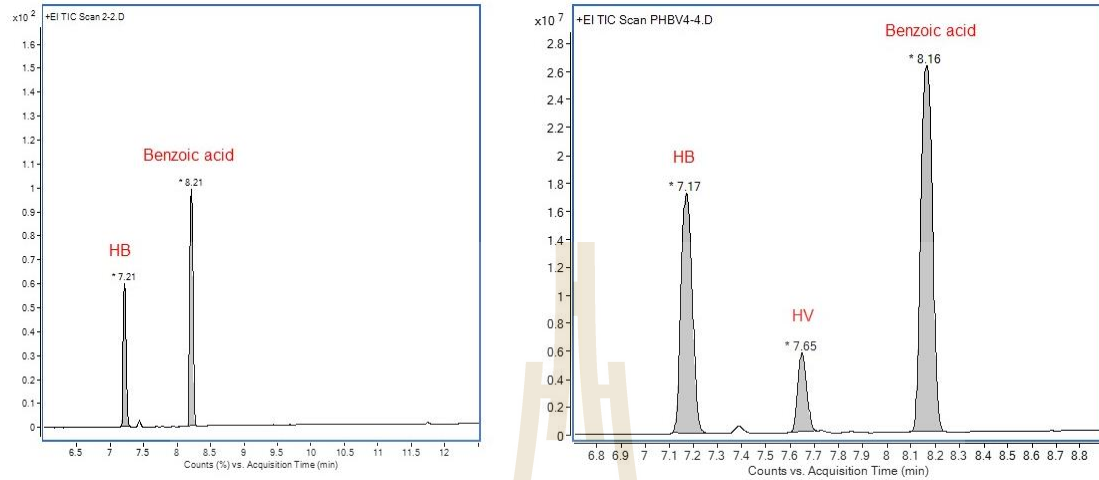
### 0.85% (v/v) Sodium chloride

NaCl	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

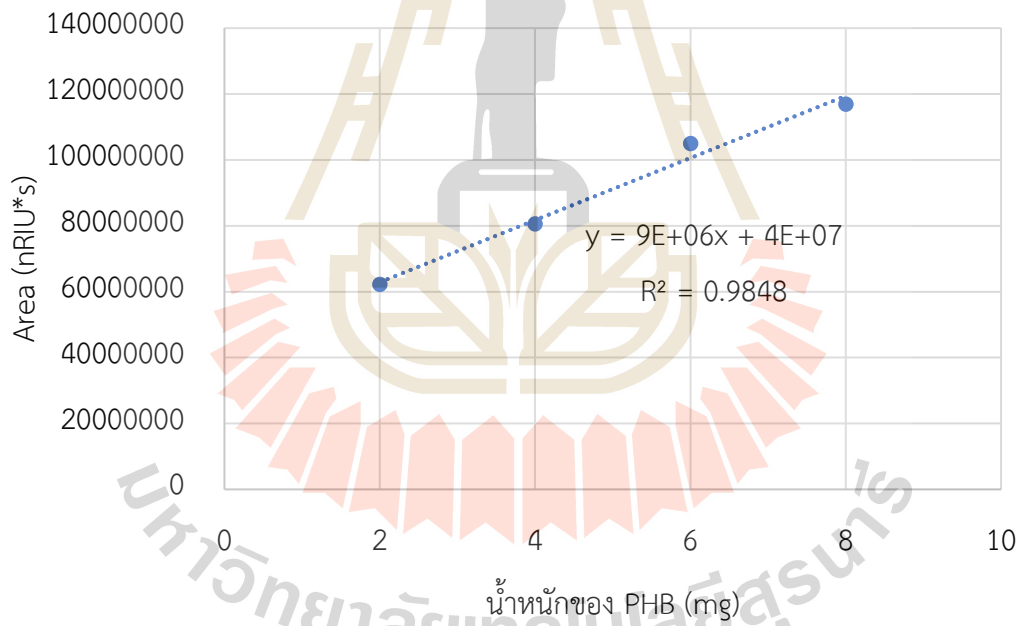
### 20% (v/v) Glycerol

Glycerol	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

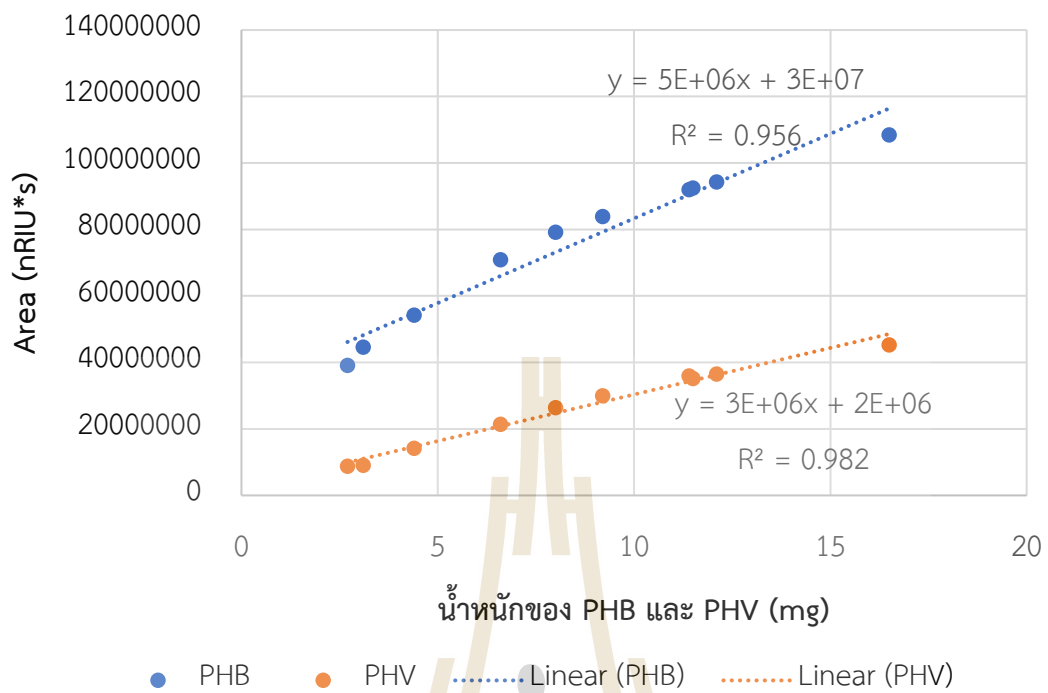
### ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน



Peak มอนอเมอร์ของ PHB และ PHBV เมื่อวิเคราะห์ด้วย Gas chromatography



กราฟมาตรฐานของ Polyhydroxybutyrate (PHB)



กราฟมาตรฐานของ Polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV)

## ประวัติผู้วิจัย



- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาววาสนา เป็นเครือ  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Watsana Penkhruie
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ดร.
- หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อ สาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง  
นครราชสีมา  
จังหวัดนครราชสีมา 30000  
โทรศัพท์ 044-223-707, 044-224-673  
โทรสาร 044-224-185  
โทรศัพท์มือถือ 064-447-9651  
E-mail: [watsana.p@sut.ac.th](mailto:watsana.p@sut.ac.th)
- ประวัติการศึกษา  
ปริญญาเอก Ph.D (Applied Microbiology)  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2560  
ปริญญาตรี วท.บ. (จุลชีววิทยา)  
เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2554
- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Enzyme technology, Microbial Diversity
- งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและทำเสร็จแล้ว : (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ ย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)
  - 1) Tanruean K, **Penkhruie W**, Kumla J, Suwannarach N, Lumyong S. (2021). Valorization of lignocellulosic wastes to produce to phytase and cellulolytic enzymes from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus* SL16W, under semi-solid state fermentation. *Journal of Fungi*. 7(4), 286 (Impact Factor = 5.816)
  - 2) Chanthasena P, **Penkhruie W**, Khowangklang P, Sritangos P, Nantapong N. (2021). Antimicrobial potential of fungi isolated from soils of dry dipterocarp forest in northeast Thailand. *Chiang Mai Journal of Science*. 48(3), 793-807 (Impact Factor = 0.523)
  - 3) Kumla J, Suwannarach N, Sujarit K, **Penkhruie W**, Kakumyan P, Jatuwong K, Vadthananarat S, Lumyong S. (2020). Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production through the utilization of agro-industrial

- waste. *Molecules*. 25, 2811. doi: 10.3390/molecules25122811 (Impact Factor = 3.267)
- 4) **Penkhrue W**, Jendrossek D, Khanongnuch C, Pathom-aree W, Aizawa T, Behrens RL, Lumyong S. (2020). Response surface method for polyhydroxybutyrate (PHB) bioplastic accumulation in *Bacillus drentensis* BP17 using pineapple peel. *PLOS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0230443 (Impact Factor = 2.776)
  - 5) Jatuwong K, Suwannarach N, Kumla J, **Penkhrue W**, Kakumyan, Lumyong S. (2020). Bioprocess for production, characteristics, and biotechnological applications of fungal phytases. *Frontiers in Microbiology*, 11(188). doi: 10.3389/fmicb.2020.00188 (Impact Factor = 4.259)
  - 6) Nguyen KA, Kumla J, Suwannarach N, **Penkhrue W**, Lumyong S. (2019). Optimization of high endoglucanase yields production from polypore fungus, *Microporus xanthopus* strain KA038 under solid-state fermentation using green tea waste. *Biology Open*, 8(11). doi: 10.1242/bio.047183 (Impact Factor = 1.962)
  - 7) Hyde KD, Xu J, Rapior S, Jeewon R, Lumyong S, **Penkhrue W**, Niego AGT, ... & Chaiyasen A (2019) The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, 1-136. (Impact Factor = 15.596)
  - 8) **Penkhrue W**, Sujarit K, Kudo T, Ohkuma M, Masaki K, Aizawa T, Pathom-aree W, Khanongnuch C, Lumyong S (2017) *Amycolatopsis oliviviridis* sp. nov., a novel polylactic acid (PLA)-bioplastic degrading actinomycete isolated from paddy soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68: 1448-1454 (Impact Factor = 2.134)
  - 9) **Penkhrue W**, Kanpiengjai A, Khanongnuch C, Masaki K, Pathom-aree W, Punyodom W, Lumyong S (2017) Effective enhancement of polylactic acid-degrading enzyme production by *Amycolatopsis* sp. strain SCM\_MK2-4 using statistical and one-factor-at-a-time approaches. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47: 730-738. (Impact Factor = 1.36)