รายงานการวิจัย

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต
(พีเอชเอ) จากมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย

SELECTION OF BACTERIA FOR THE POTENTIAL PRODUCTION
OF POLYHYDROXYALKANOATES (PHAs) FROM
CASSAVA STARCH AND SUGAR CANE

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์กาญจน์ รอดทอง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เรือง ศิริประเสริฐกุล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิธินาถ อุณหกมุงคุ

อาจารย์ ดร. นาโนชญ์ สุจิรวัฒนานนท์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิวะศักดิ์ เลิศศิริไพบูลย์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ผลงานวิจัยจากการดำเนินงานปีที่ 1 ตามแผนการวิจัย 2 ปี

สิงหาคม พ.ศ. 2551

รายงานการวิจัย

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย

SELECTION OF BACTERIA FOR THE POTENTIAL PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES (PHAs) FROM CASSAVA STARCH AND SUGAR CANE

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทิมา ดีประเสริฐกุล

สาขาวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิธินาถ ศุภกาญจน์

สาขาวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์

อาจารย์ ดร. มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ เลิศสิริโยธิน

สาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลกเพื่อคุณภาพชีวิต สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550

ผลงานวิจัยจากการดำเนินงานปีที่ 1 ตามแผนการวิจัย 2 ปี

สิงหาคม พ.ศ. 2551

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย "การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย" ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลกเพื่อคุณภาพชีวิต ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2550 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนด้านเครื่องมือและห้องปฏิบัติการในการดำเนินการวิจัย บุคลากรมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเฉพาะอย่างยิ่งบุคลากรสังกัดศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่มีส่วนช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน และนักศึกษาบัณฑิตศึกษาสาขาวิชาจุลชีววิทยา วิศวกรรมพอลิเมอร์ เทคโนโลยีอาหาร และชีววิทยาสิ่งแวดล้อม ที่ได้ร่วมเรียนรู้ระหว่างการดำเนินงานบางขั้นตอนของโครงการ โครงการวิจัยนี้มี นางสาวสุภาวดี ส่งศรีโรจน์ และ นางสาวอัยรา พันอนุ เป็นผู้ช่วยนักวิจัย ที่มีส่วนช่วยให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

บทคัดย่อ

โครงการวิจัย การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย

Selection of bacteria for the potential production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from cassava starch and sugar from sugar cane

คณะผู้วิจัย นางสาวสุรีลักษณ์ รอดทอง[1]

นางจันทิมา ดีประเสริฐกุล[2]

นางสาวนิธินาถ ศุภกาญจน์[3]

นายมาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์[4]

นายวีระศักดิ์ เลิศสิริโยธิน[5]

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2550 จำนวนเงิน 830,000.00 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี (จากแผนการดำเนินงาน 2 ปี) ตั้งแต่ วันที่ 7 สิงหาคม พ.ศ. 2550 ถึง วันที่ 6 สิงหาคม พ.ศ. 2551

สารพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ, PHAs) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพกลุ่มหนึ่งที่สะสมในรูปสารไม่ละลายน้ำภายในเซลล์จุลินทรีย์หลายชนิด จากการทดสอบความสามารถในการผลิต PHAs ของแบคทีเรียในกลุ่มที่ได้อาหารจากสารอินทรีย์ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย จำนวน 312 ไอโซเลท (สายพันธุ์) พบว่ามีแบคทีเรีย 48 ไอโซเลท สะสม PHAs ภายในเซลล์มากกว่า 50% ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเซลล์ที่ตรวจพบจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อเจริญบนอาหารแข็งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากแบคทีเรีย 48 ไอโซเลท พบ 43 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดี และทุกไอโซเลทเจริญได้ดีบนอาหารแข็งที่เติมน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิต PHAs และผ่านการทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก มาระบุชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานและสมบัติทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมีหลายชนิดในสกุล *Aeromonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Chryseobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* และ *Staphylococcus* มีแบคทีเรียอีกหลายไอโซเลทที่ยังไม่สามารถระบุสกุลและ/หรือชนิดได้จากข้อมูลที่ได้ศึกษาแล้วเมื่อเปรียบกับชนิดและสกุลของแบคทีเรียอ้างอิง ไอโซเลทเหล่านี้อาจเป็นสกุลและ/หรือชนิดใหม่ เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียมาเลี้ยงให้ผลิต PHAs ในถังหมักปริมาตรอาหาร 5 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสารซึ่งช่วยในการคัดเลือกเชื้อ แบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ผลิต PHAs ที่สะสมอยู่ในเซลล์ปริมาณสูงสุดโดยเฉลี่ย 22% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สามารถสกัดสารพอลิเมอร์ดังกล่าวออกจากเซลล์ได้ง่าย และสารที่ได้ประกอบด้วยโครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอทชนิดพอลิ-3ไฮดรอกซีบิวทิเรท [P(3HB)] และพอลิ-4ไฮดรอกซีบิวทิเรท [P(4HB)] มีจุดหลอมเหลว

สูงถึง 167.7 องศาเซลเซียส มีสมบัติที่สามารถทำฟิล์มและขึ้นรูปได้ดี ผลการศึกษานี้แสดงถึงศักยภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกในการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีสมบัติดีในการใช้ประโยชน์ จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อยซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูก

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are a group of bio-polymers synthesized and stored in the cell cytoplasm as water-insoluble inclusions by various microorganisms. Three hundred and twelve heterotrophic bacterial strains isolated from their natural habitats in Thailand, were tested for PHA accumulation in their cells. Forty eight isolates were found to accumulate PHAs at approximately more than 50% of their cell area observed under fluorescence microscope when cultured on agar medium for 48 hours. Forty three out of 48 isolates were found to be starch-utilizing strains. All isolates grew very well on the agar medium containing food grade sucrose as a sole carbon source. The bacterial isolates capable of accumulating high PHA contents, and utilizing cassava starch and food grade sucrose, were selected. These isolates were then identified using their morphological and biochemical characteristics. They belonged to several species in the genera *Aeromonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Chryseobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus*, and *Staphylococcus*. There are several isolates that could not be identified according to their morphological and biochemical characteristics compared to reference genera and species. These isolates could be novel genera and/or novel species. When tested for PHAs production in a bioreactor containing 5 liters of broth medium and cultivated for 48 hours, two selected isolates were found to accumulate the highest content of PHAs at approximately 22% of their cellular dry weight. The PHAs produced were easily extracted from the bacterial cells. The bio-polymers from the bacterial strains composed of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] and poly(4-hydroxybutyrate) [P(4HB)], and exhibited the melting temperature (T_m) at 167.7 degree Celsius. The polymers also had good mechanical properties, which could be fabricated into film and be used for moulding. This preliminary study prevails that the selected bacterial strains have their potential for the production of PHAs having high quality for application, from the cheap carbon sources, cassava starch and sugar from sugar cane.

1, ปริญญาเอก สังกัดสาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
โทรศัพท์ 044-22 4297, 044-22 4633 โทรสาร 044-22 4633
2, ปริญญาเอก สังกัดสาขาวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
โทรศัพท์ 044-22 4434 โทรสาร 044-22 4605
3, ปริญญาเอก สังกัดสาขาวิชาวิศวกรรมพอลิเมอร์ สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
โทรศัพท์ 044-22 4439 โทรสาร 044-22 4605
4, ปริญญาเอก สังกัดสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
โทรศัพท์ 044-22 4230 โทรสาร 044-22 4150
5, ปริญญาเอก สังกัดสาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
โทรศัพท์ 044-22 4417 โทรสาร 044-22 4605

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง..... 2
วัตถุประสงค์ของโครงการ..... 10
ขอบเขตของการวิจัย 10
ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย..... 10
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 11
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย
2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารพีเอชเอ (PHAs) จากการใช้
วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย..... 12
2.1.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรีย
เพื่อการคัดเลือกเชื้อ..... 12
2.1.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรีย
ที่คัดเลือกในอาหารเหลว..... 14
2.1.3 การศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHAs ที่ผลิตได้
เพื่อช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรีย..... 14
2.1.4 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิต PHAs..... 15
2.2 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสาร PHAs ด้วยวิธีการทางกายภาพ
และทางเคมี..... 18
2.2.1 ศึกษากรรมวิธีการสกัดสาร PHAs จากข้อมูลวิจัย..... 18
2.2.2 การทดลองสกัดสาร PHAs จากเซลล์แบคทีเรีย..... 18
บทที่ 3 ผลการวิจัย
3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารพีเอชเอ (PHAs) จากการใช้
วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย..... 19

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.1. การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรีย
เพื่อการคัดเลือกเชื้อ..... 19
3.1.2 การศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHAs ที่ผลิตได้
เพื่อช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรีย..... 47
3.1.3 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสาร PHAs..... 57
3.2 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสาร PHAs ด้วยวิธีการทางกายภาพ
และทางเคมี..... 69
3.2.1 การศึกษากรรมวิธีการสกัดสาร PHAs จากข้อมูลวิจัย..... 69
3.2.2 การทดลองสกัดสาร PHAs จากเซลล์แบคทีเรีย..... 75
บทที่ 4 บทสรุป
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย..... 81
ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย..... 84
บรรณานุกรม 85
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก สีย้อมจุลินทรีย์..... 90
ภาคผนวก ข น้ำยาเคมีและวิธีการวิเคราะห์..... 90
ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์..... 91

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 การผลิตและสะสม PHAs ในเซลล์แบคทีเรียบางชนิด..... 8

ตารางที่ 3.1 จำนวนแบคทีเรียที่นำมาทดสอบและผลการทดสอบศักยภาพการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียโดยใช้อาหารแข็ง (Agar medium) จากนั้นย้อมสีเซลล์ด้วย 1% Nile blue A และตรวจดูสีของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์..... 21

ตารางที่ 3.2 ประมาณการสะสมสาร PHAs ของแบคทีเรียโดยการย้อมสีเซลล์ด้วย 1% Nile blue A และตรวจดูสีของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์..... 24

ตารางที่ 3.3 ผลการทดสอบการใช้แป้งมันสำปะหลัง และการเจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลทรายและกลูโคสของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกจากความสามารถในการผลิต PHAs โดยใช้อาหารแข็ง..... 33

ตารางที่ 3.4 จำนวนเซลล์แบคทีเรียใน Minimal medium จากการเลี้ยงเชื้อแบบ Batch culture เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 40

ตารางที่ 3.5 การเจริญของแบคทีเรียและปริมาณสารอาหารใน Complex medium ที่ 0-48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ..... 41

ตารางที่ 3.6 จำนวนเซลล์แบคทีเรียจากการเลี้ยงเชื้อแบบ Fed-batch culture เป็นเวลา 48-96 ชั่วโมง..... 42

ตารางที่ 3.7 ตำแหน่งโปรตอนจากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-NZT6..... 48

ตารางที่ 3.8 ตำแหน่งคาร์บอนจากสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-NZT6..... 49

ตารางที่ 3.9 ตำแหน่งโปรตอนจากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-S2-3-2..... 50

ตารางที่ 3.10 ตำแหน่งคาร์บอนจากสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-S2-3-2..... 51

ตารางที่ 3.11 ตำแหน่งโปรตอนจากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-NZK11..... 52

ตารางที่ 3.12 ตำแหน่งคาร์บอนจากสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-NZK11..... 53

ตารางที่ 3.13 ลักษณะเฉพาะของ PHAs ที่ผลิตได้..... 56

ตารางที่ 3.14 ผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ที่มีศักยภาพในการผลิต PHAs..... 64

ตารางที่ 3.15 ผลการระบุชนิดของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกศึกษาความสามารถในการสร้าง PHAs..... 68

ตารางที่ 3.16 การเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์โดยวิธีทางชีวภาพและวิธีทางเคมี..... 70

ตารางที่ 3.17 ชนิดของจุลินทรีย์และลักษณะของ Copolymer ที่ได้..... 71

ตารางที่ 3.18 อุณหภูมิและเวลาในการแช่เยือกแข็งตะกอนเซลล์แบคทีเรีย..... 78

ตารางที่ 3.19 ปริมาณ PHAs เมื่อนำมาสกัดโดยใช้สาร 1,2-Dichloroethan..... 78

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 วิถีของการสังเคราะห์ PHAs ทางชีวภาพ 6

รูปที่ 3.1 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียต่างไอโซเลท (สายพันธุ์) เจริญบนอาหาร Trypticase soy agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นไอโซเลทที่เลือกมาทดสอบความสามารถในการสร้าง PHAs..... 22

รูปที่ 3.2 ตัวอย่างรูปร่างและการเรืองแสงสีส้มเหลืองของเซลล์แบคทีเรียที่มีการผลิตและสะสม PHAs (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย 1% Nile blue A และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า)..... 25

รูปที่ 3.3 ตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่มีการผลิตและสะสม PHAs (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย 1% Nile blue A และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า)... 28

รูปที่ 3.4 ตัวอย่างรูปร่างและการเรืองแสงสีส้มเหลืองของเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับจากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็น Positive control (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย 1% Nile blue A และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า)..... 29

รูปที่ 3.5 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในกลุ่มที่มีศักยภาพในการสร้าง PHAs ที่เจริญบนอาหาร Mineral salt medium (MSM) ที่เติม Nile Red เป็นเวลา 4 วัน..... 30

รูปที่ 3.6 ตัวอย่างรูปร่างและการสะสม PHAs ภายในเซลล์ (เซลล์ที่เรืองแสงสีส้มเหลือง) ของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MSM ที่เติม Nile Red เมื่อย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสีย้อม 1% Nile blue A และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า..... 31

รูปที่ 3.7 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในกลุ่มที่นำมาทดสอบความสามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง โคโลนีเจริญบนอาหาร Starch agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และหยดทับด้วย Iodine solution..... 36

รูปที่ 3.8 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในกลุ่มที่นำมาทดสอบความสามารถใช้น้ำตาลจากอ้อย โคโลนีเจริญบนอาหาร Starch base agar ที่เติมน้ำตาลทราย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 37

รูปที่ 3.9 การทดลองเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อผลิตสาร PHAs ในระบบถังหมักที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 ลิตร..... 45

รูปที่ 3.10 ตัวอย่างการสะสม PHAs ภายในเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลท NZT6 เมื่อเลี้ยงใน Minimal mediumในถังหมักแบบ Fed-batch culture (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย 1% Nile blue A และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า)..... 46

รูปที่ 3.11 ตัวอย่างลักษณะของผลึก PHAs ที่สกัดได้จากเซลล์แห้งของแบคทีเรียและฟิล์ม PHAs ที่ได้..... 47

รูปที่ 3.12 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-NZT6..... 48

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.13 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-NZT6 49
รูปที่ 3.14 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-S2-3-2 50
รูปที่ 3.15 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-S2-3-2 51
รูปที่ 3.16 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-NZK11 52
รูปที่ 3.17 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-NZK11 53
รูปที่ 3.18 เทอร์โมแกรม DSC ของ PHA-NZT6 ที่ผ่าน (a) การให้ความร้อนครั้งที่ 1 (first run) (b) การทำให้เย็นตัว และ (c) การให้ความร้อนครั้งที่ 2 (second run) 55
รูปที่ 3.19 เทอร์โมแกรม DSC ของ PHA-S2-3-2 ที่ผ่าน (a) การให้ความร้อนครั้งที่ 1 (first run) (b) การทำให้เย็นตัว และ (c) การให้ความร้อนครั้งที่ 2 (second run) 55
รูปที่ 3.20 ตัวอย่างรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ของแบคทีเรียที่ผลิต PHAs (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียแบบ Gram stain และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1,000 เท่า) 58
รูปที่ 3.21 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MacConkey agar จากการวิเคราะห์ชนิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสาร PHAs 62
รูปที่ 3.22 ตัวอย่างผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีตามระบบ API 50CH/CHB (bioMérieux) ของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสาร PHAs ผลบวกสังเกตจากสีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ยกเว้นหลอดที่ 25 เปลี่ยนเป็นสีดำ 63
รูปที่ 3.23 ตัวอย่างผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเซลล์เป็นท่อนชนิดที่สามารถสร้างสาร PHAs ด้วยระบบ API 20E (bioMérieux) 66
รูปที่ 3.24 ตัวอย่างผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียชนิดที่สามารถสร้างสาร PHAs ด้วยระบบ API 20NE (bioMérieux) 66
รูปที่ 3.25 ตัวอย่างผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์กลมชนิดที่สามารถสร้างสาร PHAs ด้วยระบบ API STAPH (bioMérieux) 67
รูปที่ 3.26 โครงสร้างทั่วไปของ PHAs 69
รูปที่ 3.27 แผนผังแสดงภาพรวมของกระบวนการสกัด PHAs 74
รูปที่ 3.28 ขั้นตอนวิธีการสกัดสาร PHAs 76
รูปที่ 3.29 วิธีการแยกสาร PHAs ออกจากสารทำละลายอินทรีย์ 77
รูปที่ 3.30 ตัวอย่างลักษณะของตะกอนเซลล์แห้งของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบการสกัดสาร PHAs (ก) สารสกัด PHAs (ข) และผลึก PHAs (ค) ที่ได้จากการทดสอบสกัด และตัวอย่างพอลิเมอร์ชนิด PHV ทางการค้า (ง) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ 79
รูปที่ 3.31 ตัวอย่างลักษณะผลึก PHAs ก่อน (ก) และหลังการตกตะกอนซ้ำ (ข) 80

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

CFU	Colony forming unit
CMC	Carboxy methyl cellulose sodium salt
DSC	Differential scanning calorimetry
GPC	Gel permeation chromatography
h	Hour
HAs	Hydroxyalkanoic acids
mcl-PHAs	Medium chain length PHAs
$\overline{M}_w$	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก
$\overline{M}_n$	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน
$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล
MSM	Mineral salt medium
NMR	Nuclear magnetic resonance
O-F test	Oxidation-fermentation test
PBS	Phosphate buffer saline
PHAs	Polyhydroxyalkanoates
P(3HB)	Poly(3-hydroxybutyrate)
P(3HV)	Poly(3-Hydroxyvalerate)
P(HH)	Poly-β-hydrohexanoate
PP	Polypropylenes
ppm	Part per million
scl-PHAs	Short chain length PHAs
TSA	Trypticase soy agar
TSB	Trypticase soy broth
TMS	Tetramethyl silane
T_m	Melting point
T_c	Crystallization temperature
T_g	Glass-transition temperature

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

พลาสติกเป็นวัสดุที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากมีคุณภาพด้านความแข็งแรง ความคงทน น้ำหนักเบา และไม่เสื่อมสลายง่าย สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ช่วยเพิ่มคุณภาพและความสะดวกสบายในชีวิต แต่คุณภาพที่ดีของพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพเหล่านี้ได้ก่อปัญหาขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากการสะสมของพลาสติกที่ผ่านการใช้แล้วมีจำนวนมากทั่วโลก และการแก้ปัญหาขยะพลาสติกก็นำมาซึ่งปัญหาสิ่งแวดล้อมอื่น (Ojumu and Solomon, 2004) ขณะเดียวกันปัจจุบันมีความตื่นตัวในหลายประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในทวีปยุโรปด้านการใช้พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ประกอบกับแนวโน้มการขาดแคลนวัตถุดิบจากน้ำมันปิโตรเลียมหรือเชื้อเพลิงจากฟอสซิลที่นำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติกมีปริมาณจำกัดและคาดว่าจะหมดไปในอีกประมาณ 90 ปีข้างหน้า จึงเป็นแรงผลักดันในการค้นหาแหล่งวัตถุดิบทดแทน

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) จัดเป็นพอลิเอสเทอร์ชนิดหนึ่งได้จากกระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์ (Byrom, 1994; Kung *et al.* 2007) PHAs นี้ทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารและพลังงานของเซลล์จุลินทรีย์ จุลินทรีย์ชนิดเด่นที่มีรายงานถึงความสามารถในการสร้าง PHAs เป็นแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแกรมลบในสกุล *Alcaligenes, Ralstonia* และ *Pseudomonas* (Kunioka *et al.*, 1989; Doi *et al.*, 1990; Lee, 1996; Ojumu and Solomon, 2004; Khanna and Srivastava, 2005; Verlinden *et al.,* 2007) PHAs เป็นพอลิเมอร์กึ่งผลึก (Semi-crystalline polymer) ทำให้ทนความร้อนได้ดี ซึ่งดีกว่าพอลิแล็กติกแอซิด [Poly(lactic acid), PLA] ซึ่งเป็นพอลิเมอร์อสัณฐาน จึงสามารถใช้ผลิตบรรจุภัณฑ์ชนิดบรรจุร้อน (Hot-fill packaging) และใช้บรรจุอาหารร้อนได้ เนื่องจาก PHAs เป็นพลาสติกที่ถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable plastics) และมีสมบัติที่ใกล้เคียงกับ Polypropylene หรือ Polyethylene ซึ่งเป็นพลาสติกที่มีการใช้งานกันทั่วไป (Commodity plastics) สามารถนำมาอัดขึ้นรูป ปั่นเป็นเส้นใย ทำเป็นฟิล์ม และใช้ผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นเป็นพอลิเมอร์ผสมได้ จึงได้รับความสนใจศึกษากันอย่างกว้างขวางทั้งในด้านกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ การตรวจสอบโครงสร้างและองค์ประกอบ การศึกษาและปรับปรุงสมบัติ การนำมาใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์และบรรจุภัณฑ์ เป็นต้น

ถึงแม้ว่า PHAs จะเป็นพลาสติกที่มีศักยภาพต่อการนำมาใช้ประโยชน์ ต้นทุนในการผลิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งราคาวัตถุดิบและกระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตยังสูงมาก ทำให้ PHAs มีราคาแพงเมื่อเทียบกับพลาสติกที่ใช้งานทั่วไป โดยมีราคาสูงกว่า ~4 เท่า และคาดว่าเมื่อโรงงานผลิต PHAs เชิงพาณิชย์มีความพร้อม ราคาของ PHAs จะอยู่ที่ประมาณกิโลกรัมละ $1.50 หากมีการปรับปรุงเทคโนโลยีการผลิต

ได้ดีขึ้น ราคาจะลดลงมาที่กิโลกรัมละ $1.00 (Mapleston, 2005) ปัจจุบันการผลิต PHAs ในทางการค้ายังถูกจำกัดเพียงเพื่อใช้ประโยชน์บางประการเท่านั้น ดังนั้นแนวทางการปรับปรุงกระบวนการผลิตเริ่มตั้งแต่การใช้ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิต PHAs การใช้วัตถุดิบที่เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีมูลค่าต่ำ เช่น แป้งและน้ำตาล และการปรับปรุงกระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตเพื่อให้มีต้นทุนการผลิต PHAs ที่ต่ำลงจนสามารถแข่งขันกับราคาของพลาสติกที่ใช้งานทั่วไปจึงมีความจำเป็นสูง โครงการวิจัย "การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอทจากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย" นี้มีผลในการสร้างเทคโนโลยีที่สำคัญสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพ (Bio-plastics) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะช่วยตอบสนองความต้องการของประเทศและของโลกในด้านการผลิตพอลิเมอร์สำหรับการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ช่วยเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบซึ่งเป็นผลผลิตจากทางการเกษตร และช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อม อีกทั้งมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีมีห้องปฏิบัติการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ที่ได้เก็บรักษาแบคทีเรียที่มีชีวิตไว้เป็นจำนวนนับหลายร้อยสายพันธุ์ที่พร้อมนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิต PHAs และคณะผู้วิจัยของโครงการมีความพร้อมทั้งทางด้านจุลชีววิทยา เคมี และพอลิเมอร์ และมีศักยภาพที่จะดำเนินงานของโครงการนี้

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates, PHAs)

PHAs เป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพประเภทหนึ่งในสามประเภท (Khanna and Srivastava, 2005) และเป็นพอลิเมอร์ชนิดเดียวที่ถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ (Steinbüchel, 1991; Sudesh *et al.*, 2000) พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพประเภทที่สอง คือ พอลิเมอร์สังเคราะห์ทางเคมี เช่น Poly(glycolic acid), Poly(lactic acid), Poly(ε-caprolactone), Polyvinyl alcohol, Poly(ethylene oxide) สารสังเคราะห์ทางเคมีเหล่านี้สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์หรือโดยจุลินทรีย์ แต่ยังขาดสมบัติบางประการที่ต้องการเพื่อการใช้งาน ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลาสติกในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างสมบูรณ์ และพลาสติกชีวภาพประเภทที่สามเป็นชนิดที่ผสมแป้ง พลาสติกชนิดนี้ใช้แป้งผสมเป็นสารเติมเต็มหรือสารที่ก่อให้เกิดโครงสร้างร่างแห เช่น Starch-polyethylene จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในดินสามารถย่อยสลายแป้งได้ ทำให้โครงสร้างพลาสติกบางส่วนสลายตัวไปด้วย ช่วยลดเวลาการสลายตัวของพลาสติก แต่ยังคงมีส่วนของพลาสติกที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ตกค้างอยู่ในสภาพแวดล้อมเป็นเวลานานเช่นพลาสติกทั่วไป

PHAs เป็นพอลิเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดไฮดรอกซีแอลคาโนอิก (Hydroxyalkanoic acids, HAs) หลายชนิดมารวมตัวกัน สังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์หลายชนิด เพื่อเก็บไว้เป็นแหล่งอาหารสำรองในสภาวะที่สารอาหารไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสมีจำนวนจำกัด แต่มีคาร์บอนเกินความต้องการ (Kojima *et al.*, 2004; Russell *et al.*, 2006) พอลิเมอร์ชนิดนี้มีสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ทั่วไปหลายชนิด เช่น Polypropylene ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ทดแทนกันได้ เมื่อย่อยสลายจะ

เปลี่ยนเป็นน้ำและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน และเปลี่ยนเป็นมีเทนเมื่อย่อยสลายในสภาวะปราศจากออกซิเจนโดยจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในดินและน้ำ ทั้งน้ำทะเล น้ำจืด และน้ำเสีย

Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] และ PHAs อื่นๆ โดยส่วนใหญ่ ประกอบด้วย Short-chain-length (SCL, C_4-C_5) HAs ($PHAs_{SCL}$) มีลักษณะแข็ง (Rigid) และแตกเมื่อดึง อย่างไรก็ตามสมบัติดังกล่าวสามารถปรับปรุงได้โดยการ Annealing ซึ่งช่วยเพิ่มระยะยืดที่จุดขาดได้ถึง 30% (De Koing, 1993) (ซึ่งถือว่าน้อยเมื่อเทียบกับยางธรรมชาติ) และการทำ Co-polymer ระหว่าง 3HB กับ HA_{SCL} หรือ $3HA_{MCL}$ (Medium-chain-length, C_6-C_{14}) เช่น 3-Hydroxybutyrate (3HB)/3-Hydroxyvalerate (3HV), 3HB/3-Hydroxy-4-pentenoic acid, 3HB/4HB, 3HB/4HV และ 3HB/$3HA_{MCL}$ ได้ Co-polymer ที่มีความยืดหยุ่น (Flexible) เพิ่มขึ้น และเปราะน้อยลง (Asrar and Gruys, 2002; Doi *et al.*, 1995; Shimamura *et al.*, 1994; Matsusaki *et al.*, 2000)

$PHAs_{MCL}$ แสดงสมบัติเทอร์โมพลาสติกอีลาสโตเมอร์ (Thermoplastic elastomer, TPE) และคล้ายยางธรรมชาติ ซึ่งยืดหยุ่นและมีความเครียด ณ จุดขาดมากกว่า 1000% แต่พบสมบัติดังกล่าวในช่วงอุณหภูมิแคบๆ เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจาก $PHAs_{MCL}$ มีอุณหภูมิหลอมต่ำ (40-60 องศาเซลเซียส) อัตราการเกิดผลึกที่ต่ำ หากเกิดผลึก ปริมาณผลึกที่ได้ก็ต่ำ ซึ่งผลึกเหล่านี้จะเป็นเสมือนร่างแหทางกายภาพ (Physical cross-links) อย่างไรก็ตาม ที่อุณหภูมิใช้งาน $PHAs_{MCL}$ ไม่สามารถหดกลับได้ภายหลังการปล่อยแรงดึง ทำให้มีการพัฒนาอนุพันธ์ของ $PHAs_{MCL}$ เพื่อให้สามารถเกิดร่างแหทางเคมี ซึ่งจะทำให้หดกลับได้เหมือนยาง (Steinbüchel, 2003)

Agus *et al.* (2006) ได้สังเคราะห์ P(3HB) โดย Genetically engineered strains ของ *Escherichia coli* ซึ่งมี PHA synthases หลายชนิด (Types I–IV) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) ขึ้นกับลักษณะเฉพาะของ Synthase ที่มีบทบาทโดยที่ *Delftia acidovorans* PHA synthase (Type I enzyme) สามารถผลิต P(3HB) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (M_n = 4.0x10^6) และการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลแคบ (M_w/M_n = 1.6; M_w และ M_n คือ Mass และ Number average relative molecular masses ตามลำดับ) โดยที่สภาวะที่เลี้ยงแบคทีเรีย เช่น ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดของแหล่งคาร์บอน และการเปลี่ยนแปลงของ pH ระหว่างการเลี้ยงเชื้อมีผลน้อยมากต่อน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) ที่สังเคราะห์ด้วย Type I synthase แต่อุณหภูมิมีผลมาก และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าที่ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาความเข้ากันได้ระหว่าง Host strain และ PHA synthase รวมทั้ง Elongation rate *in vivo* ที่เป็นหนึ่งในหลายปัจจัยที่กำหนดน้ำหนักโมเลกุลของ P(3HB) อีกด้วย P(3HB) มีความเป็นผลึกสูงและเป็นวัสดุที่แข็ง ทำให้เปราะและยืดหยุ่นไม่ดี การปรับปรุงสมบัติของ P(3HB) สามารถทำโดยเตรียมให้เป็น P(3HB) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมาก (Ultra-high-molecular-weight, UHMW) จากที่มีการศึกษาโดยใช้กลูโคส ทำให้ได้ M_w = 0.4-7x10^7 (Kusaka *et al.*, 1999; Kusaka *et al.*, 1997; Kahar *et al.*, 2004; 2005) ซึ่งสามารถนำมาทำเป็นฟิล์มหรือ

เส้นใยที่แข็งแรงด้วยกระบวนการ Hot หรือ Cold-drawing ในกระบวนการดังกล่าวฟิล์มหรือเส้นใยจะมีปริมาณผลึกเพิ่มขึ้นและมีการจัดเรียงตัวของผลึกในแนวแรงดึง ทำให้แข็งแรงยิ่งขึ้น

Lee (1996) รายงานสมบัติของ PHAs ที่จะนำไปใช้เป็นพลาสติก PHAs สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญ แต่ที่สำคัญไม่น้อยกว่ากันคือ สมบัติทางกายภาพในการนำ PHAs ไปใช้ประโยชน์ ข้อมูลทางกายภาพส่วนใหญ่ของ PHAs จะเน้นที่สาร PHB (3HB) และพลาสติกผสมระหว่าง PHB กับ PHV (3HB-co-3HV) ซึ่งพลาสติก PHB (มี PHB เป็นองค์ประกอบ 100%) จะมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 175 องศาเซลเซียส มีสมบัติหลายอย่างที่เป็นประโยชน์ เช่น กันความชื้นได้ดี เป็นฉนวนกันไฟฟ้า แต่ PHB มีข้อเสียคือ เปราะง่าย จึงได้มีการคิดค้นวิธีแก้ไขโดยนำ PHV มาผสมด้วย เมื่อมีการผสมของ PHV ทำให้พลาสติกผสมนี้มีความยืดหยุ่นดีกว่า PHB เพียงอย่างเดียว และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายแนวทางมากขึ้น โดยไม่ส่งผลต่อสมบัติในการย่อยสลายของ PHB

2.2 จุลินทรีย์ที่ผลิต PHAs

จุลินทรีย์สังเคราะห์ PHAs เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงานของเซลล์ โดยปกติ PHAs สะสมอยู่ในลักษณะของ Inclusion หรือ Granule ที่ไม่ละลายน้ำมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-1 ไมโครเมตร (Foster *et al.*, 2005) จุลินทรีย์ที่สามารถสร้าง PHAs ชนิดแรกที่มีการรายงานเป็นแบคทีเรียในสกุล *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Azotobacter* และ *Pseudomonas* (Kunioka *et al.*, 1989; Doi *et al.*, 1990; Lee, 1996; Ojumu and Solomon, 2004; Khanna and Srivastava, 2005) แบคทีเรียมากกว่า 300 species ที่พบว่าสามารถสะสม PHAs โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Cupriavidus necator* (เดิมคือ *Ralstonia eutropha* หรือ *Alcaligenes eutrophus*), *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas oleovorans* และ *Pseudomonas putida* แบคทีเรียสามารถสะสม PHAs ได้มากถึงราว 80% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Poirier *et al.*, 2002) ปริมาณ PHAs ที่ผลิตได้มากกว่า 80 กรัมต่อลิตร และมีค่า Productivity มากกว่า 2 กรัมต่อกรัม ลิตร ชั่วโมง ในระดับห้องปฏิบัติการ

$PHAs_{MCL}$ ประกอบด้วย $3HA_{MCL}$ หลายชนิดซึ่งสังเคราะห์โดย *Pseudomonas* หลาย species ส่วนมากพบใน *P. oleovorans* (De Smet *et al.*, 1983; Westhues *et al.*, 2001) การสังเคราะห์สารขึ้นกับแหล่งคาร์บอน (C-source) ที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ ซึ่งส่งผลต่อโครงสร้างเคมีของ $PHAs_{MCL}$ ที่ได้ ถ้าใช้ Octanoic acid (OA) หรือ Alkanoic acid หรือ Alkanes เลี้ยงจุลินทรีย์จะได้ $PHAs_{MCL}$ ที่มี 3HOA หรือ 3HAs เป็นหลัก หากใช้คาร์โบไฮเดรทหรือคาร์บอนชนิดอื่นจะได้ $PHAs_{MCL}$ ที่มี 3-Hydroxydecanoic acid เป็นหลัก PHAs ที่สร้างจากแบคทีเรียมักประกอบด้วย (R)-3Hydroxyalkanoic acids (HA) ที่เป็น Monomer units ซึ่ง R configuration นั้นขึ้นกับ Stereospecificity ของ PHA synthase (PhaC) ซึ่งเป็น Polymerizing enzyme

Poly(3-hydroxybutaric acid) [P(3HB)] ประกอบด้วยหน่วยซ้ำของ (R)-3HB เป็นชนิดของ PHAs ที่สร้างโดยแบคทีเรียที่เป็นที่รู้จักกันดี และเป็นพอลิเมอร์ที่อาจมีน้ำหนักโมเลกุลสูงในช่วง

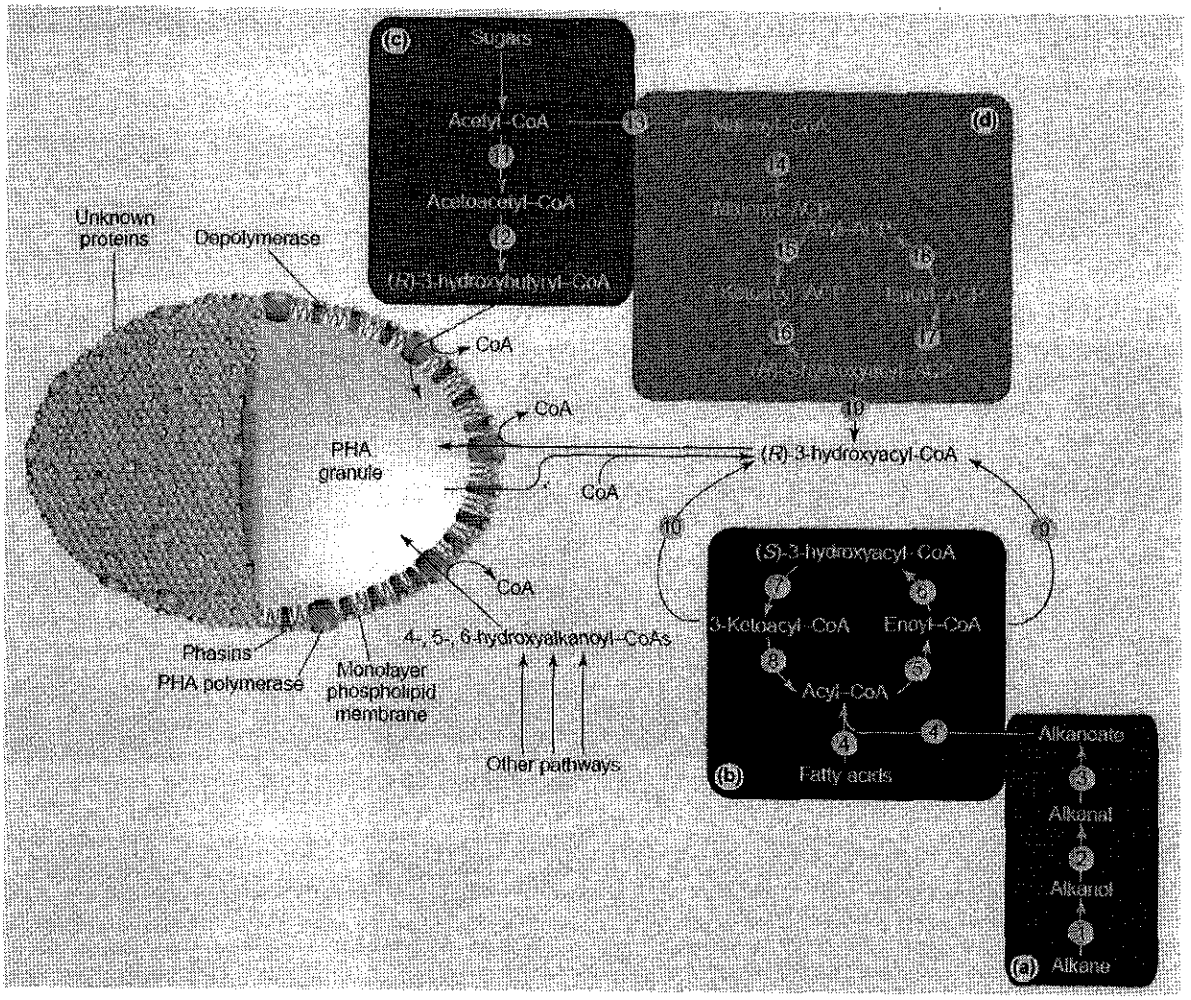
200,000 ถึง 3,000,000 daltons (Da) ขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียที่สร้างและสภาวะที่แบคทีเรียเจริญ (Sudesh *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003) แบคทีเรียที่สร้าง P(3HB) มีหลายสกุล ได้แก่ *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Chlorogloea*, *Chromatium*, *Chromobacterium*, *Derxia*, *Ferrobacillus*, *Hyphomicrobium*, *Lampropaedia*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Sphaerotilus*, *Spirillum*, *Streptomyces*, *Vibrio* และ *Zoogloea* (Byrom, 1987; Luengo *et al.*, 2003)

2.3 การผลิต PHAs โดยจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ได้ จำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารจำเป็นในปริมาณที่จำกัด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือซัลเฟอร์ สำหรับการสังเคราะห์ PHAs และมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Alcaligenes eutrophus, Protomonas extorquens* และ *Pseudomonas oleovorans* และกลุ่มที่สองเป็นแบคทีเรียไม่ต้องการสารอาหารสำหรับการสังเคราะห์ PHAs และสามารถสะสมพอลิเมอร์ในระหว่างการเจริญได้ ได้แก่ *Alcaligenes latus*, Mutant stain *Azotobacter vinelandii*, Recombinant *Escherichia coli* (Khanna and Srivastava, 2005)

Pathways และเอนไซม์ รวมทั้ง Gene encoding ของ Key enzymes ที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ PHAs ทางชีวภาพ มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย (Taguchi *et al.*, 2001; Steinbüchel, 2001; Luengo *et al.*, 2003) PHA syntheses ที่พบสามารถจำแนกได้ 3 ชนิด ตามโครงสร้างพื้นฐานและความจำเพาะต่อ Substrate (Sudesh *et al.*, 2000) ชนิดแรกคือ β-Ketothiolase (PhaA) ซึ่งเป็น Homotetrameric ทำให้เกิด Reversible condensation ของโมเลกุลของ Acetyl-CoA 2 โมเลกุล เกิดเป็น Acetoacetyl-CoA และ CoASH ในขั้นแรกของ P(3HB) biosynthesis pathway ในขั้นตอนต่อมาของการสังเคราะห์ P(3HB) มี NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) เป็น Homotetrameric enzyme ที่ทำให้เกิด reduction ของ Acetoacetyl-CoA เป็น (D)-3-Hydroxybutyryl-CoA จากนั้น PhaC ซึ่งเป็น Key enzyme ในกระบวนการสังเคราะห์ PHAs ช่วย Polymerize ส่วน Hydroxyacyl-CoA thioesters ซึ่งได้จากหลายวิธีเพื่อสังเคราะห์ PHA (รูปที่ 1.1) นอกจากนั้นยังมี PhaP (Phasin) เป็น Structural protein เด่นที่สร้างในชั้น (layer) ที่หุ้ม PHA granule ทำให้เกิดขนาดและจำนวนของ Granule ในแต่ละเซลล์ PhaR เป็น Regulatory protein ที่จับกับ Upstream region ของ *pha*P gene เพื่อควบคุมการแสดงออกของ Phasin นอกจากนี้ยังมี PhaZ เป็น Depolymerase enzyme ที่ย่อย PHAs เป็น Monomer (Kojima *et al.*, 2004)

ด้านการศึกษาการผลิต PHA โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ Wang and Lee (1997) ได้ทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ภายใต้สภาวะจำกัดไนโตรเจน พบว่าจุลินทรีย์มีการสะสมสาร PHB เพิ่มมากขึ้นถึง 88%



รูปที่ 1.1 วิถีของการสังเคราะห์ PHAs ทางชีวภาพ ประกอบด้วย

(a) Alkane oxidation pathway: (1) Alkane 1-monooxygenase, (2) alcohol dehydrogenase, (3) aldehyde dehydrogenase

(b) Fatty-acid β-oxidation: (4) acyl-CoA ligase, (5) acyl-CoA dehydrogenase, (6) enoyl-CoA hydratase, (7) 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, (8) 3-ketothiolase, (9) (*R*) enoyl-CoA hydratase, (10) 3-ketoacyl-CoA reductase

(c) Biosynthesis จากสารประกอบคาร์โบไฮเดรท: (11) β-ketothiolase, (12) NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase

(d) De novo fatty acid synthesis: (13) acetyl-CoA carboxylase, (14) ACP-malonyltransferase, (15) 3-ketoacyl-ACP synthase, (16) 3-ketoacyl-ACP reductase, (17) 3-hydroxyacyl-ACP reductase, (18) enoyl-ACP reductase, (19) 3-hydroxyacyl-ACP-CoA transacylase

ที่มา: Luengo *et al.* (2003)

Sudiana *et al.* (1999) ได้ทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีการจำกัดฟอสฟอรัส และสภาวะที่ไม่จำกัดฟอสฟอรัส พบว่าในสภาวะที่มีการจำกัดฟอสฟอรัสจุลินทรีย์จะมีการสะสม Glycogen ในเซลล์สูงกว่าสภาวะที่ไม่จำกัดฟอสฟอรัส แสดงให้เห็นว่าสภาวะจำกัดฟอสฟอรัสมีผลต่อประเภทของจุลินทรีย์ที่มีอิทธิพลต่อระบบ ซึ่งจะส่งผลต่อการสะสม PHAs ของจุลินทรีย์ด้วย

ชนิดของแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการผลิต PHAs ของจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น Hollender *et al.* (2002) ได้ศึกษาผลของอะซิเตท (Acetate) ชนิดเดียว อะซิเตทและกลูโคส และกลูโคสชนิดเดียวต่อการผลิต PHAs ภายใต้ Anaerobic–aerobic conditions ใน Sequential batch reactor (SBR) โดยใช้จุลินทรีย์ผสม (Mixed cultures) พบว่ามีการใช้กลูโคสอย่างรวดเร็วและให้ผลผลิตที่สูงกว่าอะซิเตท แต่การใช้อะซิเตททำให้เกิด Co-polymer ของ Hydroxybutyrate (HB) และ Hydroxyvalerate (HV) ทำนองเดียวกับที่ Lemos *et al.* (1998) ได้รายงานถึงสัดส่วน 69-100% HB และ 0-31% HV

Satoh *et al.* (1998) ได้เลี้ยง Sludge ด้วยระบบ Sequential batch reactor (SBR) 2 แบบ คือ Anaerobic-Aerobic SBR (A-A) และ Microaerophilic-Aerobic SBR (M-A: มีการเติมอากาศเล็กน้อยในสภาวะ Anaerobic) แล้วนำ Sludge จากทั้ง 2 ระบบ มาทดสอบหาปริมาณ PHAs ใน Batch process โดยกำหนดสภาวะไว้ 2 รูปแบบคือ แบบที่ไม่มีการเติมออกซิเจน และแบบที่มีการเติมออกซิเจนในปริมาณจำกัด พบว่า Sludge จากระบบ (A-A) ในสภาวะที่มีออกซิเจนมีการสังเคราะห์ PHAs สูงกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยพบ PHAs ใน Sludge 33% และ 22% ตามลำดับ ส่วนใน Sludge จากระบบ M-A สามารถสังเคราะห์ PHAs ได้ถึง 62%

Warankana and Randall (1999) รายงานถึงการเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะ Microaerophilic-Aerobic activated sludge รวมทั้งสภาวะที่จำกัดธาตุอาหาร โดยวัดปริมาณ PHAs ที่สะสมในเซลล์ของระบบ SBR แบบต่อเนื่อง พบว่าในสภาวะที่มีการจำกัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส จุลินทรีย์มีการสะสม PHAs 45% TSS และเมื่อจำกัดไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว พบว่ามีการสะสม PHAs 36% TSS แต่เมื่อเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวต่อไป พบว่า จุลินทรีย์ในระบบค่อย ๆ ลดจำนวนลงจนถึงไม่พบการสะสม PHAs

อุณหภูมิมีผลต่อการสะสม PHB ของจุลินทรีย์ มีรายงานการเลี้ยง Activated sludge แบบ SBR ด้วยอะซิเตท ภายใต้สภาวะการจำกัดอะซิเตท โดยอัตราการสร้าง PHB จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจากการเพิ่มของอัตรา Anabolic ที่อุณหภูมิสูงกว่า (Krishna and Van Loosdrecht, 1999)

แบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs จากวัตถุดิบเริ่มต้นหลายชนิด (ตัวอย่างในตารางที่ 1.1) และการสะสมมีตั้งแต่ <10% ถึง >80% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์

จำนวน PHA granule ต่อเซลล์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น *Ralstonia eutropha* สะสม 8-12 Granules ที่มีขนาดแตกต่างกันในขณะที่ *Pseudomonas oleovorans* มีประมาณ 1 หรือ 2 Granules ที่มีขนาดใหญ่ (Zinn *et al.*, 2001) PHA granule ที่อยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียสามารถตรวจหาได้จากการย้อมด้วยสี Sudan black B หรือสีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ เช่น Nile blue และ Nile red

ตารางที่ 1.1 การผลิตและสะสม PHAs ในเซลล์แบคทีเรียบางชนิด

Bacterial genus	Group	PHA content (% dry weight)	Substrate for PHA production
Azospirillum	Gram-negative, anaerobic, straight, curved, and helical rods	57	3-Hydroxybutyrate
Axobacter	Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria	73	Glucose
Bacillus	Nonphotosynthetic, Gram-positive rods	25	Glucose
Beggiatoa	Aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid Gram-negative bacteria	57	Acetate
Beijerinckia	Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria	38	Glucose
Caulobacter	Aerobic/microaerophilic, Gram-negative rods and cocci	36	Glucose/glutamate/yeast extract
Chlorogloea	Cyanobacteria	10	Acetate, carbon dioxide
Chromatium	Spirochetes	20	Acetate
Chromobacterium	Anaerobic Gram-negative cocci	37	Glucose/peptone
Clostridium	Anaerobic Gram-negative rods	13	Tryptone/peptone/glucose
Derxia	Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria	26	Glucose
Halobacterium	Halophilic rods or cocci archaebacteria	38	Glucose
Leptothrix	Non-motile (or rarely motile), Gram-negative curved bacteria	67	Pyruvate
Methylobacterium	Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria	47	Methanol
Methylosinus	Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria	25	Methane
Micrococcus	Gram-negative cocci	28	Peptone/tryptone
Nocardia	Gram-negative rods	14	Butane
Pseudomonas	Gram-negative rods	67	Methanol
Ralstronia	Gram-negative rods	96	Glucose
Rhizobium	Gram-negative rods	57	Methanol
Rhodobacter	Spirochetes	60	Acetate
Rhodospirillum	Spirochetes	47	Acetate
Sphaerotilus	Non-motile (or rarely motile), Gram-negative curved bacteria	45	Glucose/peptone
Spirillum	Gram-negative, anaerobic, straight, curved, and helical rods	40	Lactate
Spirulina	Cyanobacteria	6	Carbon dioxide
Streptomyces	Gram-positive, branching filamentous structure bacteria	4	Glucose

ที่มา: Kim and Lenz (2001)

แสดงให้เห็นถึงสมบัติที่เป็นไขมันโดยธรรมชาติ (Sudesh *et al.*, 2000; Zinn *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตาม สีย้อมสามารถติดที่ส่วนประกอบของเซลล์ที่เป็นไขมันส่วนอื่นด้วย (Ciesielski *et al.*, 2006) วิธีการตรวจหาแบคทีเรียจึงอาจใช้วิธีที่จำเพาะขึ้นด้วยการตรวจหา Gene ซึ่งมีถึง 4 กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHAs คือ Gene กลุ่มแรกเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHAs ใน *pha*CAB operon ที่ประกอบด้วย *pha*C, *pha*A และ *pha*B พบใน *Ralstonia eutropha* Gene กลุ่มที่ 2 เป็น Synthase genes (*pha*C1 และ *pha*C2) ของระบบที่สังเคราะห์ PHAs ของ *Pseudomonas* sp. Gene กลุ่มที่ 3 บ่งการการสร้าง Synthase enzyme ซึ่งประกอบด้วย 2 Enzyme subunits ที่สร้างโดย *pha*E และ *pha*C genes พบใน *Chromatium vinosum* และ *Synechocystis* sp. และ Gene กลุ่มที่ 4 เกี่ยวข้องกับ *pha*C1ZC2 operon ที่ประกอบด้วย *pha*C1/*phaZ*/*pha*C2 genes ซึ่งพบใน *Pseudomonas* sp. วิธีการตรวจหาที่อาศัย PHA Synthase genes นี้มีทั้ง Homologous และ heterologous gene probes, Short consensus oligonucleotides hybridization หรือ Polymerase chain reaction (PCR) techniques (Ciesielski *et al.*, 2006)

2.4 การสกัดและแยก PHAs จากเซลล์แบคทีเรีย

วิธีการสกัดและแยกสาร PHAs ออกจากเซลล์ของแบคทีเรียตามที่รายงานการศึกษา แบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ การปรับสภาพชีวมวล (Biomass pretreatment) การสกัดสาร (Solvent extraction) และการทำให้บริสุทธิ์ (Polymer purification) ในขั้นตอนของการปรับสภาพชีวมวลจำเป็นต้องมีการใช้เอนไซม์ เพื่อย่อยโมเลกุลของโปรตีนและ DNA มีการให้ความร้อนเพื่อสลายสารโมเลกุลขนาดใหญ่ จากนั้นใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactant) เพื่อกำจัดไขมัน และใช้เมทานอลเพื่อกำจัดสารต่างๆ ภายในเซลล์ สำหรับขั้นตอนการสกัด PHAs ที่ใช้กันมากที่สุด คือการสกัดโดยใช้สารทำละลายอินทรีย์กลุ่ม Halogenated hydrocarbon solvents เช่น คลอโรฟอร์ม, Dichloroethane, Dichloromethane และ Dichloropropane เป็นต้น และสารทำละลายอินทรีย์กลุ่ม Halogenated hydrocarbon solvents ที่ให้ผลการทดสอบสกัดที่ดีที่สุด คือ 1,2-Dichloroethane และ 1,1,2-Trichloroethane (Vanlautem and Gilain, 1980) สำหรับวิธีการสกัดเริ่มจากการทำแห้งเซลล์ของจุลินทรีย์ที่สะสม PHAs ด้วย Spay dryer หรือ Freeze dryer จากนั้นสกัด PHAs โดยใช้ Halogenated solvents และตกตะกอน PHAs แล้วจึงแยกเอา PHAs ออกด้วย poor solvent เช่น เมทานอล และเฮกเซน (Noda and Schechtman, 1999; Senior *et al.*, 1982; Blauhut *et al.*, 1993; Narasimhan *et al.*, 2006; Vanlautem and Gilain, 1980) แต่เนื่องจากสารประเภท Halogenated solvents เป็นสารที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมจึงมีข้อจำกัดในการใช้ และไม่สามารถใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ต่อมามีการใช้ Non-halogen solvents ได้แก่ แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ เอไมด์ และคีโตน เป็นต้น แทนการใช้ Halogenated solvents แต่มีข้อจำกัดที่ว่า PHAs สามารถละลายใน Non-halogen solvents ได้น้อยที่อุณหภูมิห้อง (Kurdikar *et al.*, 2000) จึงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงในการสกัดเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของ PHAs (Kurdikar *et al.*, 2000; Liddell, 1999) ทำให้เกิดปัญหาที่ตามมา คืออุณหภูมิสูงมีแนวโน้มทำให้มวลโมเลกุลของ PHAs ลดลงตามระยะเวลาที่สกัด ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยลดระยะเวลาในการสกัดลง (Lafferty and Heinzle, 1978; Kurdikar *et al.*, 2000;

Liddell, 1999) และขั้นตอนสุดท้าย คือ ทำการแยกสารสกัดออกโดยการระเหย การปั่นหวี่ยง หรือการกรอง (Jiang *et al.*, 2006)

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์ของโครงการตามแผนการวิจัยที่มีระยะเวลาการดำเนินการ 2 ปี มีดังนี้

1) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอช, PHAs) ได้จากการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย

2) เพื่อศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHAs จากวัตถุดิบมูลค่าต่ำโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก ในระดับห้องปฏิบัติการ

3) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสาร PHAs จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาได้ด้วยวิธีการทางกายภาพและทางเคมี

4) เพื่อตรวจสอบสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของ PHAs ที่ผลิตได้ เพื่อคัดเลือก PHAs ที่เหมาะสมต่อการใช้งาน

4. ขอบเขตของการวิจัย

คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสาร PHAs ได้จากการใช้วัตถุดิบที่เป็นผลิตผลจากการเกษตรของประเทศไทย คือเน้นแป้งมันสำปะหลัง และน้ำตาลจากอ้อย จากจำนวนแบคทีเรียไม่น้อยกว่า 100 สายพันธุ์ ทั้งที่เก็บรักษาอยู่ ณ ห้องปฏิบัติการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และที่แยกได้เพิ่มเติมจากแหล่งธรรมชาติ ศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHAs ในระดับห้องปฏิบัติการ จากวัตถุดิบมูลค่าต่ำโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกอย่างน้อย 2 สายพันธุ์ ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสาร PHAs จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ด้วยวิธีการทางกายภาพและทางเคมี และตรวจสอบสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของ PHAs ที่ผลิตได้ เพื่อคัดเลือก PHAs ที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้งานด้านต่างๆ

5. ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (PHAs) จัดเป็นพอลิเอสเทอร์ชนิดหนึ่ง ได้จากกระบวนการทางชีวภาพของจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย สาร PHAs เป็นพอลิเมอร์กึ่งผลึกที่ทนความร้อนได้ดี และยังถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีสมบัติที่ใกล้เคียงกับ Polypropylene หรือ Polyethylene ซึ่งเป็นปิโตรพลาสติกที่มีการใช้งานกันทั่วไป สามารถนำมาอัดขึ้นรูป ปั่นเป็นเส้นใย ทำเป็นฟิล์ม และใช้ผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นเป็นพอลิเมอร์ผสมได้ ดังที่ได้กล่าวแล้วในข้างต้น อย่างไรก็ตามการผลิต PHAs ยังมีข้อจำกัดด้านกระบวนการผลิตและวัตถุดิบส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูง ดังนั้นจึงเป็นโอกาสในการวิจัยและพัฒนาที่นำไปสู่การผลิต PHAs ที่มีต้นทุนต่ำลงได้ ประเทศไทยมีข้อได้เปรียบด้าน

วัตถุดิบที่เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีมูลค่าต่ำ และทรัพยากรจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทั้งชนิดและปริมาณ นำไปสู่ทางเลือกให้ได้มาซึ่งจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิต PHAs จากวัตถุดิบที่มีมูลค่าต่ำ

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เมื่อเสร็จสิ้นโครงการวิจัย คือ

1) กรรมวิธีการผลิตสาร PHAs ที่มีประสิทธิภาพหรือกระบวนในการผลิต PHAs ที่มีสมบัติตรงตามความต้องการของภาคอุตสาหกรรม จากวัตถุดิบที่ต่างกัน 2 ประเภท คือแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อยในระดับห้องปฏิบัติการที่สามารถใช้ขยายผลสู่การผลิตระดับนำร่อง

2) แบคทีเรียสายพันธุ์เฉพาะที่มีศักยภาพในการผลิต PHAs จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย อย่างน้อย 2 สายพันธุ์

3) กรรมวิธีการสกัดสาร PHAs ที่มีประสิทธิภาพ

4) องค์ความรู้สหวิทยาการของจุลชีววิทยา เคมี และพอลิเมอร์ จากการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต PHAs และการผลิต PHAs ชนิดที่ตรงตามความต้องการ จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย

5) ผลงานวิจัยส่วนที่สามารถเปิดเผยได้เผยแพร่ในที่ประชุมวิชาการและตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ และ

6) นักวิจัยรุ่นใหม่จากการเป็นผู้ช่วยนักวิจัย

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยของโครงการ "การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย" ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2550 ประกอบด้วยขั้นตอน ดังต่อไปนี้

2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารพีเอชเอ (PHAs) จากการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย

2.1.1. การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียเพื่อการคัดเลือกเชื้อ

ทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียจากการใช้วัตถุดิบมูลค่าต่ำที่เป็นผลิตผลจากการเกษตรของประเทศไทย คือแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย จากจำนวนแบคทีเรียไม่น้อยกว่า 100 สายพันธุ์ ที่เก็บรักษาอยู่ ณ ห้องปฏิบัติการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทในอาหารสมบูรณ์หรือ Complex medium (ภาคผนวก ค1 และ ค2) สำหรับการเจริญและเลี้ยงต่อใน Minimal medium (ภาคผนวก ค7 และ ค8) เพื่อการสะสมสารพอลิเมอร์ (Kunioka *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1996; Khanna and Srivastava, 2005) อาหารที่ใช้มีส่วนประกอบที่ดัดแปลงจาก Atlas (2004), Kunioka *et al.* (1989), Luengo *et al.* (2003) และ Pederson *et al.* (2006) การดำเนินการในขั้นตอนนี้มีวิธีการดังนี้

2.1.1.1 การเตรียมแบคทีเรียเพื่อทดสอบศักยภาพการผลิตสาร PHAs

นำแบคทีเรียในกลุ่ม Heterotrophs ที่เก็บรักษาในลักษณะเชื้อแห้งและแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงให้ได้ระยะการเจริญของเซลล์ที่เป็น Vegetative cells ที่ว่องไวโดยใช้อาหาร Trypticase soy broth (TSB, ภาคผนวก ค18) และ Trypticase soy agar (TSA, ภาคผนวก ค17) ในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตามความจำเป็นของแต่ละสายพันธุ์ ตรวจสอบสภาพของเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ด้วยวิธี Streak plate จากนั้นใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ในการศึกษาในขั้นการทดสอบความสามารถในการสกัดสาร PHAs และสมบัติบางประการของแบคทีเรียเพื่อการคัดเลือกเชื้อต่อไป

2.1.1.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียโดยใช้อาหารแข็งเพื่อการคัดกรองขั้นต้น

ในการทดลองช่วงคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิต PHAs นี้ใช้การเลี้ยงเชื้อบนผิวหน้าอาหาร Complex agar (ภาคผนวก ค1) ในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(ดัดแปลงมาจาก Berlanga *et al.*, 2006) ตามความจำเป็นของแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน Minimal agar medium (ภาคผนวก ค7) บ่มเชื้อต่ออีก 48 ชั่วโมง พร้อมทั้งใช้แบคทีเรียจากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์ 3 สายพันธุ์ของชนิด (species) ที่มีการอ้างว่าสามารถสร้าง PHAs เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ที่ให้ผลบวกของการทดสอบ (Positive result) คือ *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095, *Alcaligenes latus* TISTR 1403 และ *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321

2.1.1.3 การตรวจหาสาร PHAs ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย

ตรวจสอบ PHAs ที่สะสมในเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ตาม Sudesh *et al.* (2000) ที่มีการดัดแปลงในบางขั้นตอน โดยเตรียมรอย smear เชื้อที่ได้จากโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Minimal medium (ข้อ 2.1.1.2) บนแผ่นสไลด์ หยด 1% Nile blue A (ภาคผนวก ก2) ลงบนรอย smear ทิ้งไว้ 10 นาที ปิดทับด้วย cover slip ตรวจดูการติดสีของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope; Olympus Model BX51TRF, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร ด้วย Objective กำลังขยาย 100 เท่า สังเกตและบันทึกผลโดยเซลล์แบคทีเรียที่มีการผลิตและสะสมสาร PHAs จะปรากฏ Granules สีส้มเหลืองภายในเซลล์ (Ostle and Holt, 1982)

2.1.1.4 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังและการเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก

คัดเลือกไอโซเลทของแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบว่าสามารถสะสม PHAs ภายในเซลล์มาทดสอบดังต่อไปนี้

ก. การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ต้องการทดสอบมาใส่เชื้อแบบ point inoculation โดยใช้เข็มเขี่ยปลายตรง (needle) ลงบนผิวอาหาร Starch agar (Cassava starch) (ภาคผนวก ค16) ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งโดยหยด Iodine solution (ภาคผนวก ข4) ลงบนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร Starch agar อ่านผลภายใน 2 นาที จากบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อ เนื่องจากแป้งถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรีย พร้อมทั้งตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone คัดเลือกไอโซเลทที่มี Clear zone กว้าง ซึ่งแสดงถึงศักยภาพในการย่อยแป้งมันสำปะหลังของแบคทีเรีย

ข. การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารที่มีน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน

ดำเนินการเช่นเดียวกันกับการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง ใช้อาหาร Starch agar (ภาคผนวก ค16) ที่เติมน้ำตาลทราย 1% (ตรามิตรผล, บริษัท น้ำตาลทรายมิตรผล จำกัด, ประเทศไทย)

แทนแป้งมันสำปะหลัง จากนั้นตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหารแข็งนั้น โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

2.1.1.5 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก

เนื่องจากแบคทีเรียหลายชนิดที่มีความสามารถในการก่อโรคแก่คนและสัตว์เลือดอุ่นหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดที่มีรูปร่างเซลล์กลม สามารถย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ดังนั้นในการคัดเลือกแบคทีเรียในครั้งนี้จึงได้ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ต้องการทดสอบมา Cross-streak ลงบนผิวอาหาร Sheep blood agar (5% Sheep blood (ภาคผนวก ค15) บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจากรอบโคโลนีของเชื้อซึ่งเกิดบริเวณการย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดง (Hemolysis zone) 3 รูปแบบคือ β-Hemolysis เป็นการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงหมดจนเกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของแบคทีเรีย α-Hemolysis เป็นลักณะของการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงไม่หมดจึงเกิด Green zone รอบโคโลนีของแบคทีเรีย และ γ-Hemolysis (Non-hemolysis) ไม่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

2.1.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหารเหลว

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่คัดเลือกจากผลการทดสอบในอาหารแข็งโดยใช้อาหารเหลว Complex medium (ภาคผนวก ค2) ปริมาตรเริ่มต้นที่ 10 มิลลิลิตร บ่มให้แบคทีเรียเจริญเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ตามความเหมาะสมของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือก จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall RC 5C plus superspeed centrifuge; Beckman, American laboratory trading, U.S.A.) ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อลงใน Minimal medium (ภาคผนวก ค8) ปริมาตรเท่ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นแยกล้างตะกอนเซลล์ 1 ครั้งด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัดสาร PHAs

2.1.3 การศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHAs ที่ผลิตได้เพื่อช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรีย

ศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHAs ที่ผลิตได้เพื่อช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรีย โดยตรวจสอบชนิดของ PHAs ตาม Kim *et al.* (1996) และ Khanna and Srivastava (2005) ตามวิธีการดังนี้

2.1.3.1 การวิเคราะห์โครงสร้างเคมีด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

ละลายพอลิเมอร์ใน $CDCl_3$ ทำการวัดที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่อง ^{1}H NMR spectrometer (INOVA, VARIAN, 300 MHz) ^{13}C NMR spectrometer (VARIAN, 75 MHz) โดยใช้เตตระเมทิลไซเลน (TMS) เป็นสารมาตรฐานภายใน

2.1.3.2 การวิเคราะห์ทางความร้อนด้วยเทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งคาโลริเมตรี (DSC)

สมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์ศึกษาด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) (Diamond, PerkinElmer, U.S.A.) ใส่พอลิเมอร์ปริมาณ 1-5 มิลลิกรัม ลงในแพนอะลูมินั่ม (aluminum pan) ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ให้ความร้อนจาก -20 ถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (first run) ทำให้เย็นลงถึง -20 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นให้ความร้อนจาก -20 ถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (second run) อ่านค่าอุณหภูมิหลอม (T_m) หรืออุณหภูมิการเกิดผลึก (T_c) ที่ตำแหน่งยอดของพีค

2.1.3.3. การวิเคราะห์ทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราฟวิเมตรี (TGA)

สมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์ศึกษาด้วยเครื่อง TGA (TA Instrument) ใส่พอลิเมอร์ปริมาณ 5-15 มิลลิกรัม ลงในแพนอะลูมินั่ม (aluminum pan) ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ให้ความร้อนจากอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (first run) ทำให้เย็นลงด้วยอากาศ จากนั้นให้ความร้อนจาก 30 องศาเซลเซียส ถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (second run) บันทึกน้ำหนักของสารที่สูญเสีย (weight loss)

2.1.3.4 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลและการกระจายตัวด้วยเทคนิคเจลเพอมีเอเบิลโครมาโตกราฟฟี (GPC)

ละลายพอลิเมอร์ปริมาณ 0.25 กรัม ในคลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นประมาณ 0.5%) ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GPC (Waters Corporation, Milford, MA 01757, U.S.A.) ผ่านคอลัมน์สไตราเจล 2 คอลัมน์ โดยใช้ $CHCl_3$ เป็นสารตัวชะ ทำการวัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บันทึกการอ่านค่าโดยใช้เครื่องตรวจวัดค่าดัชนีหักเห ทั้งนี้สร้าง calibration curve ด้วยพอลิสไตรีนมาตรฐาน (ช่วงน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย $1.3x10^3$-$1.96x10^6$ กรัมต่อโมล)

2.1.4 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิต PHAs

วิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกจากความสามารถในการผลิต PHAs และความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังและ/หรือเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน กรณีที่แบคทีเรียที่คัดเลือกได้เป็นไอโซเลทที่ยังไม่ได้ระบุชนิด การระบุชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี ตาม Holt *et al.* (1994) และ AOAC International (1998) พร้อมทั้งทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยระบบ API (bioMérieus; bioMérieux, Inc., France) เปรียบเทียบผลการทดสอบกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีในฐานข้อมูลของระบบ API (API 20E, API 20NE, API 50CHB/E และ API STAPH; bioMérieux) ตามวิธีการดังนี้

ก. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย

ศึกษาลักษณะ รูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีย้อมแบบแกรม (Gram stain) ของเซลล์แบคทีเรีย โดยเตรียมรอย smear ของแบคทีเรียอายุ 18-24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหาร TSA บนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด ตรึงเซลล์ให้ติดแผ่นแก้วสไลด์ด้วยความร้อน หยดสี Crystal violet (ภาคผนวก ก1) ให้ท่วมรอย smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำเบา ๆ หยด Gram's iodine (ภาคผนวก ข3) ให้ท่วมรอย smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างรอย smear ด้วย 95% Ethyl alcohol ประมาณ 5 วินาที ล้างด้วยน้ำทันที ย้อมทับรอย smear ด้วยสี Safranin (ภาคผนวก ก3) เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้ง ตรวจดูรูปร่าง โครงสร้าง และการเรียงตัวของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) (Olympus Model BX51TRF, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)

ข. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Catalase

ใช้ Loop เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร TSA เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ป้ายบนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลาย Hydrogen peroxide (3%) (ภาคผนวก ข2) ลงบนเชื้อที่ป้ายไว้บนแผ่นแก้วสไลด์ ตรวจดูการเกิดฟองแก๊ส ซึ่งเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ Catalase

ค. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Oxidase

วางแผ่นกระดาษกรองลงในจานเลี้ยงเชื้อเปล่าที่สะอาด หยดสารละลาย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%) (ภาคผนวก ข5) ลงบนกระดาษกรองให้พอเปียก ใช้ Loop เขี่ยแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร TSA เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ป้ายลงบนกระดาษกรองที่เปียกสารละลายสำหรับทดสอบ โดยขีดลากให้เป็นเส้นยาวประมาณ 3 เซนติเมตร ตรวจดูการเปลี่ยนสีของเชื้อที่ป้ายบนกระดาษกรอง ซึ่งถ้าเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ Oxidase เชื้อที่ป้ายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที

ง. การทดสอบ Oxidation-Fermentation (O-F) test

ทดสอบ Oxidation-Fermentation (O-F) test โดยใช้ Glucose O-F medium (ภาคผนวก ค14) บรรจุในหลอดทดสอบ และทดลองควบคู่ทั้งหลอดที่ปิดทับผิวหน้าอาหารด้วย Mineral oil ปลอดเชื้อและไม่ปิดทับผิวหน้าอาหาร ภายหลังการใส่เชื้อ (Inoculate) โดยใช้เข็มเขี่ยปลายตรง (Needle) เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์อายุ 18-24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหาร TSA แล้วแทง (Stab) ลงในอาหาร บ่มให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเปลี่ยนสีของอาหารและการเกิดแก๊สภายหลังการเจริญ ผลบวกสีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและอาจเกิดแก๊ส

จ. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะชนิด

ศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อนสั้นบนอาหาร MacConkey agar (ภาคผนวก ค4) โดยวิธี Cross streak เชื้อบริสุทธิ์อายุ 18-24 ชั่วโมง บนผิวหน้าอาหาร MacConkey agar ที่บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม Enterobacteriaceae สามารถเจริญบน MacConky agar ซึ่ง

ถ้าเป็นชนิดที่เฟอร์เมนท์น้ำตาลแล็กโทสจะมีโคโลนีที่มีสีชมพู แต่ถ้าเป็นชนิดที่ไม่สามารถเฟอร์เมนท์น้ำตาลแล็กโทสจะมีโคโลนีที่ไม่มีสี และแบคทีเรียแกรมบวกไม่สามารถเจริญบน MacConkey agar เนื่องจากถูกยับยั้งด้วย Bile salts และ Crystal violet

ฉ. การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test)

ทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียโดยใช้ Motility test medium (ภาคผนวก ค10) โดยใช้เข็มเขี่ยปลายตรงเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์อายุ 18-24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหาร TSA แล้วแทงลงในอาหาร บ่มให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการกระจายของเชื้อจากรอยที่ใส่เชื้อลงในอาหาร

ช. การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ

ทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบของ API Identification System (bioMérieux) ตามกลุ่มหลักของแบคทีเรีย ซึ่งชุดทดสอบประกอบด้วย

(1) API 20E (bioMérieux) ทดสอบโดยเตรียมเชื้อบริสุทธิ์อายุ 18-24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหาร TSA จำนวน 1 โคโลนี ในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร ให้มีความขุ่นของ Suspension ของเซลล์เท่ากับ McFarland Standard Scale 5 (ภาคผนวก ข6) แล้วใส่ Suspension ของเชื้อนั้นลงในแต่ละ Microtube ใน API 20E strip ซึ่งมี 20 Microtubes และดำเนินการตามข้อแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ

(2) API 20NE (bioMérieux) ทดสอบโดยเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ในน้ำเกลือปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร ให้มีความขุ่นของ Suspension ของเซลล์เท่ากับ McFarland Standard Scale 5 เช่นเดียวกับการเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบด้วย API 20E ใส่ Suspension ของเชื้อนั้นลงในแต่ละ Microtube ใน API 20NE strip ซึ่งมี 20 Microtubes และดำเนินการตามข้อแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ

(3) API 50CHB/E medium (bioMérieux) ทดสอบโดยเตรียมเชื้อบริสุทธิ์อายุ 24-48 ชั่วโมง ที่เจริญบน TSA ใส่ลงใน API 50CHB/E medium 10 มิลลิลิตร ให้มีความขุ่นของ Suspension ของเซลล์เท่ากับ McFarland Standard Scale 2 (ภาคผนวก ข6) แล้วใส่ Suspension ของเชื้อนั้นลงในแต่ละ Microtube ใน API 50CHB/E medium strip ซึ่งมี 50 Microtubes และดำเนินการตามข้อแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ

(4) API STAPH (bioMérieux) ทดสอบโดยเตรียมเซลล์ของเชื้อบริสุทธิ์อายุ 18-24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหาร TSA ใน API STAPH medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้มีความขุ่นของ Suspension ของเซลล์เท่ากับ McFarland Standard Scale 0.5 (ภาคผนวก ข6) แล้วใส่ Suspension ของเชื้อนั้นลงในแต่ละ Microtube ใน API STAPH strip ซึ่งมี 20 Microtubes และดำเนินการตามข้อแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบ

2.2 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสาร PHAs ด้วยวิธีการทางกายภาพและทางเคมี

2.2.1 การศึกษากรรมวิธีการสกัดสาร PHAs จากข้อมูลวิจัย

ศึกษาข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญต่อการสกัดสาร PHAs จากข้อมูลวิจัยที่ผ่านมาในวารสารวิชาการ และสืบค้นข้อมูลวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการสกัดสาร PHAs ในสิทธิบัตรที่ยื่นจดไว้แล้วในประเทศและในต่างประเทศ

2.2.2 การทดลองสกัดสาร PHAs จากเซลล์แบคทีเรีย

ทดสอบการสกัดสาร PHAs โดยใช้สารเคมีตามกรรมวิธีที่ดัดแปลงขึ้นมาใหม่โดยใช้ความรู้จากงานวิจัยที่มีอยู่ก่อนแล้ว ขั้นตอนการสกัดสารที่ทดลองเป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Vanlautem and Gilain (1982) และขั้นตอนการแยกตะกอนผลึก PHAs ออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Noda (1998) ดังนี้

1) แยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall RC 5C plus superspeed centrifuge) ที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2) เทอาหารส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายเกลือ 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ

3) นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปทำแห้งโดยวิธีการ Freeze drying และชั่งน้ำหนักของเซลล์แห้ง

4) ล้างตะกอนเซลล์แห้งด้วยเมทานอล 200 มิลลิลิตร โดยการเทเมทานอลผ่านเซลล์แห้งบนกระดาษกรอง เพื่อล้างไขมันออก

5) นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อระเหยเมทานอลออก

6) ผสมตะกอนเซลล์แห้งกับสารสกัด 1,2-Dichloroethane ในอัตราส่วน 1 กรัม : 20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ที่มีฝาปิด นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่า (Sheldon Model 1245 PC, Manufacturing, Inc., U.S.A.) เป็นเวลา 30 นาที

7) กรองสารสกัดขณะร้อนผ่านสำลี และนำสารสกัดที่ได้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนสารละลายเกิดเป็นตะกอนลักษณะคล้ายเจล

8) นำสารละลายสกัดในข้อ 7 ไประเหยแยกตัวทำละลายอินทรีย์ 1,2-Dichloroethane ออกจากผลึก PHAs โดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (A Büchi Rotavapor R-200, BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 300 mbar

9) ชั่งน้ำหนักผลึกแห้งของ PHAs ที่ได้

บทที่ 3
ผลการวิจัย

การวิจัยที่ได้ดำเนินการในปีที่ 1 จากแผนการดำเนินงาน 2 ปี ของโครงการ "การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย" ได้ผลดังนี้

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารพีเอชเอ (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) จากการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย

3.1.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียเพื่อการคัดเลือกเชื้อ

ได้เลือกแบคทีเรียในกลุ่ม Heterotrophs ที่เก็บรักษาอยู่ ณ ห้องปฏิบัติการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตามลักษณะทางสัณฐานประกอบกับข้อมูลที่ระบุถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิต PHAs จากเอกสารอ้างอิง แบคทีเรียที่เลือกมาทดสอบแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ คือ ดิน น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลัง และมูลสัตว์ จำนวนทั้งสิ้น 312 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1) นำเชื้อที่เก็บในสภาพแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB, ภาคผนวก ค18) และ Trypticase soy agar (TSA, ภาคผนวก ค17) ในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ตามความจำเป็นของแต่ละสายพันธุ์ ตรวจสอบสภาพของเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ด้วยวิธี Streak plate ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงเพื่อการศึกษาครั้งนี้ดังแสดงในรูปที่ 3.1

3.1.1.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียโดยใช้อาหารแข็งเพื่อการคัดกรองขั้นต้น

ได้ทดลองเลี้ยงแบคทีเรียที่เลือกแต่ละไอโซเลทในอาหารสมบูรณ์ที่เป็นอาหารแข็ง (Complex agar medium, ภาคผนวก ค1) ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อคัดกรองเชื้อก่อนการทดสอบโดยใช้อาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลทรายที่ผลิตเป็นการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อบน Complex agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายเชื้อลงเลี้ยงต่อใน Minimal agar medium (ภาคผนวก ค7) ในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มการสะสมสารพอลิเมอร์ ตรวจหา PHAs ที่สะสมในเซลล์แบคทีเรียจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ภายหลังการย้อมโดยย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม Nile blue A

สูตรอาหาร Complex medium และ Minimal medium ที่นำมาใช้ทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียได้ดัดแปลงมาจากสูตรอาหาร Nutrient rich medium (ภาคผนวก ค12) ตาม Kunioka *et al.* (1989) ที่ใช้ศึกษา *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17699 สูตรอาหาร Mineral salts

medium (ภาคผนวก ค6) ตาม Ramsay *et al.* (1989) ที่ใช้ศึกษา *Pseudomonas cepacia* ATCC 17697 สูตรอาหาร Glucose medium (ภาคผนวก ค3) และ Nutrient broth (ภาคผนวก ค11) ตาม Ramsay *et al.* (1990) ที่ใช้ทดสอบกับแบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ATCC 29714, *A. eutrophus* DSM 545, *Bacillus cereus* NRC 9008, *Pseudomonas pseudoflava* ATCC 33668, *P. cepacia* ATCC 17697 และ *Micrococcus halodenitrificans* NRC 14024 และสูตรอาหารตาม Lee *et al.* (1994) ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 คือ Nutrient rich medium (ภาคผนวก ค13) และ Minimal medium (Fermentation medium) (ภาคผนวก ค9)

จากสูตรอาหารดัดแปลงทั้ง Complex medium และ Minimal medium (ภาคผนวก ค1 และ ค7) นี้ได้ผ่านการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียที่นำมาศึกษาจำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งมีสมบัติของเชื้อแตกต่างกัน และเลือกเพื่อเป็นตัวแทนเชื้อในการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถใช้คัดกรองเชื้อส่วนใหญ่ของโครงการวิจัยนี้ได้ จากนั้นได้ทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาจำนวนทั้งสิ้น 312 ไอโซเลท พบว่าแต่ละไอโซเลทของแบคทีเรียมีและไม่มีการสะสม PHAs ในลักษณะของ Granule ที่ติดสีย้อมภายในเซลล์ได้แตกต่างกันมาก จึงได้พัฒนาเกณฑ์ในการจัดกลุ่มแบคทีเรียเพื่อการคัดเลือกในขั้นตอนนี้ โดยหาพื้นที่ของ PHA granule เทียบกับพื้นที่ของเซลล์ทั้งหมดโดยอาศัยโปรแกรม Image-Pro Plus Version 6.0.0.260: 1993-2006 (Media Cybernetics, Inc., Japan) ที่ต่อกับระบบกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus Model BX51TRF) (ตารางที่ 3.2) แล้วจัดแบ่งกลุ่มโดยใช้ข้อมูลทั้งพื้นที่ของ Granule และระดับความเข้มของการเรืองแสงสีส้มเหลืองทำให้สามารถแบ่งระดับความเข้มของการเรืองแสงสีส้มเหลืองเป็น 5 ระดับ โดยใช้เครื่องหมายบวก ซึ่ง +5 มีความเข้มของสีส้มเหลืองมากที่สุด และลดลงตามจำนวน + ที่ลดลง จนถึง 0 ซึ่งไม่พบสีเหลืองส้มภายในเซลล์ที่เชื่อมโยงกับ PHAs (%) ที่สะสมภายในเซลล์เมื่อเทียบกับพื้นที่ทั้งหมดของเซลล์ >85%, 71-85%, 56-70%, 40-55% และ < 40% ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1 และ 3.2)

จากแบคทีเรีย 312 ไอโซเลท พบจำนวน 274 ไอโซเลท ที่สะสม PHAs โดยมีจำนวน 42, 45, 53, 77, และ 57 ไอโซเลท ที่ให้ผล +5 จนถึง +1 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1) มีแบคทีเรียที่ทดสอบจำนวน 38 ไอโซเลท ที่ไม่พบการสะสม PHAs ในสภาวะที่เลี้ยงเชื้อ ลักษณะการเรืองแสงสีส้มเหลืองดังรูปที่ 3.2 และ 3.3 เปรียบเทียบการสะสมของสารจากการเลี้ยงแบคทีเรียที่มีการรายงานการผลิต PHAs ได้สูง 3 ไอโซเลท คือ *Alcaligenes eutrophus* TISTR 1095, *Alcaligenes latus* TISTR 1403, และ *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 (รูปที่ 3.4) และในการทดลองขั้นตอนนี้ได้ทดลองตรวจหาการสะสมของสาร PHAs โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม Nile red ตามวิธีของ Berlanga *et al.* (2006) เปรียบเทียบกับการใช้ Nile blue A ที่ย้อมเซลล์โดยตรง ทั้งนี้เพื่อให้ได้มาซึ่งวิธีการที่น่าเชื่อถือและรวดเร็วในการตรวจหาสาร PHAs ที่สะสมในเซลล์แบคทีเรียซึ่งมีความหลากหลายของชนิด จากการทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยใช้ Nile red นี้ ได้ทดลองกับแบคทีเรีย 24 ไอโซเลท ที่ให้ผลการสะสม PHAs จากการเลี้ยงบนอาหารแข็ง Complex และ Minimal medium ตามระบุข้างต้น

แล้วย้อมสีเซลล์ด้วย Nile blue A เอาแบคทีเรียทั้ง 24 ไอโซเลทมา Streak บน Complex agar (ภาคผนวก ค1) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้ายเชื้อที่เจริญลงเลี้ยงบนอาหารแข็ง Mineral salt medium (MSM) ที่เติม Nile red (ภาคผนวก ค5) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน สังเกตผลบวกจากโคโลนีสีส้มที่ปรากฏ ในขณะที่โคโลนีซึ่งเซลล์ไม่สะสม PHAs จะมีลักษณะปกติ คือโดยส่วนใหญ่มีสีขาวขุ่น จากนั้นได้ยืนยันผลด้วยการย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม 1% Nile blue A ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร สังเกตและบันทึกผลบวกที่มีการสะสม PHAs ภายในเซลล์แบคทีเรียจากสีส้มเหลืองของ Granules พบว่าไม่มีไอโซเลทใดเลยที่มีโคโลนีสีส้ม (รูปที่ 3.5) แต่เมื่อยืนยันผลโดยย้อมเซลล์ด้วย 1% Nile blue A พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลท สะสม PHAs ในเซลล์ สรุปได้ในขั้นต้นว่าวิธีตรวจหาสาร PHAs ที่สะสมภายในเซลล์ด้วย Nile red มีความไวและประสิทธิภาพต่ำกว่าการย้อมเซลล์แบคทีเรียด้วย Nile blue A แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์โดยตรง (รูปที่ 3.6)

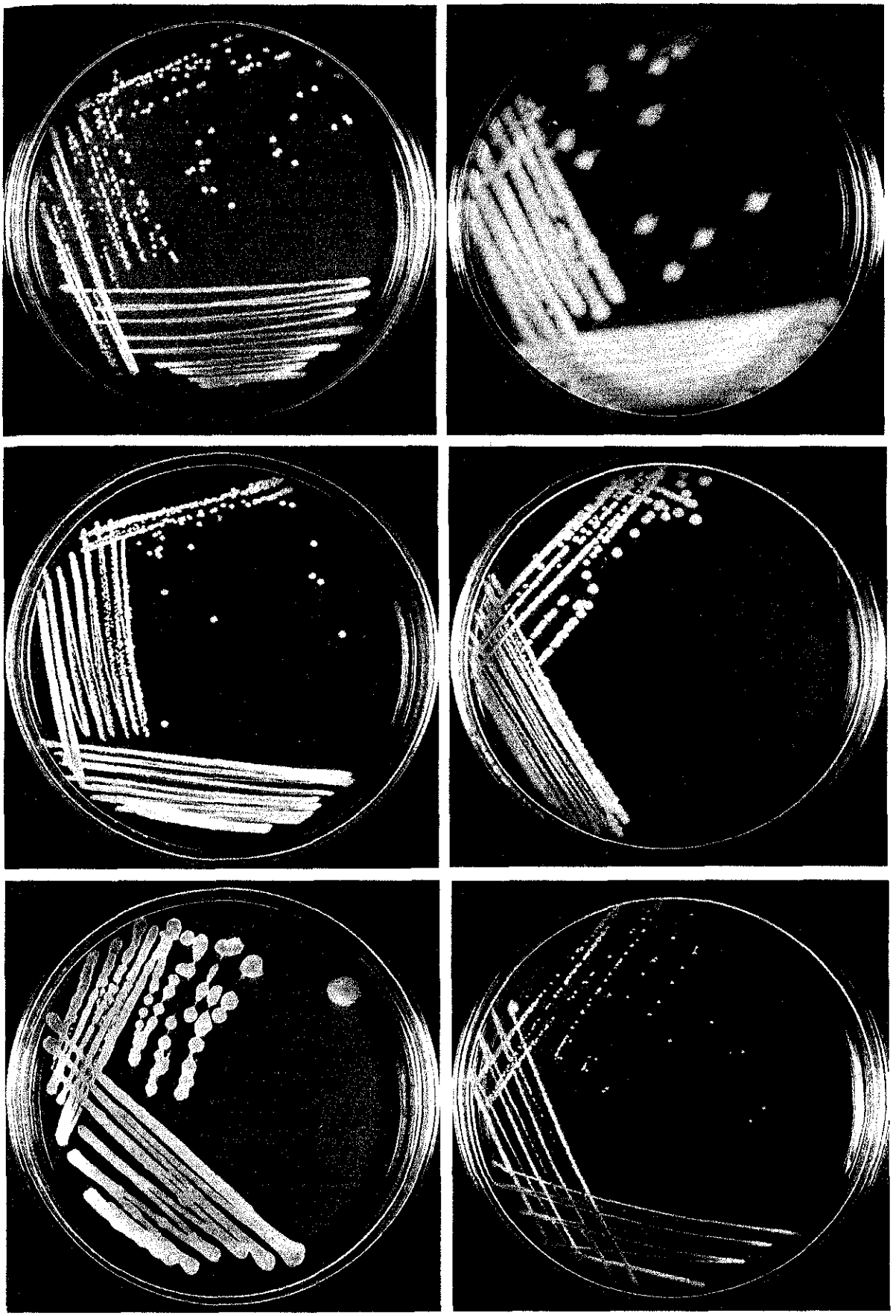
ตารางที่ 3.1 จำนวนแบคทีเรียที่นำมาทดสอบและผลการทดสอบศักยภาพการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียโดยใช้อาหารแข็ง (Agar medium) จากนั้นย้อมสีเซลล์ด้วย 1% Nile blue A และตรวจดูสีของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท						
	เชื้อที่ทดสอบ	ผลการทดสอบการสร้างสาร PHAs[a]					
		+5	+4	+3	+2	+1	0
มูลสัตว์ (NZF, NZK,NZT, NZR, CZC, CZG, CZM และ CZW)	143	14	10	21	25	49	24
กากมันสำปะหลัง (CAS)	38	11	12	7	7	1	-
ดิน (S)	114	12	21	21	43	3	14
น้ำเสีย (SWI)	17	5	2	4	2	4	-
รวม	**312**	**42**	**45**	**53**	**77**	**57**	**38**

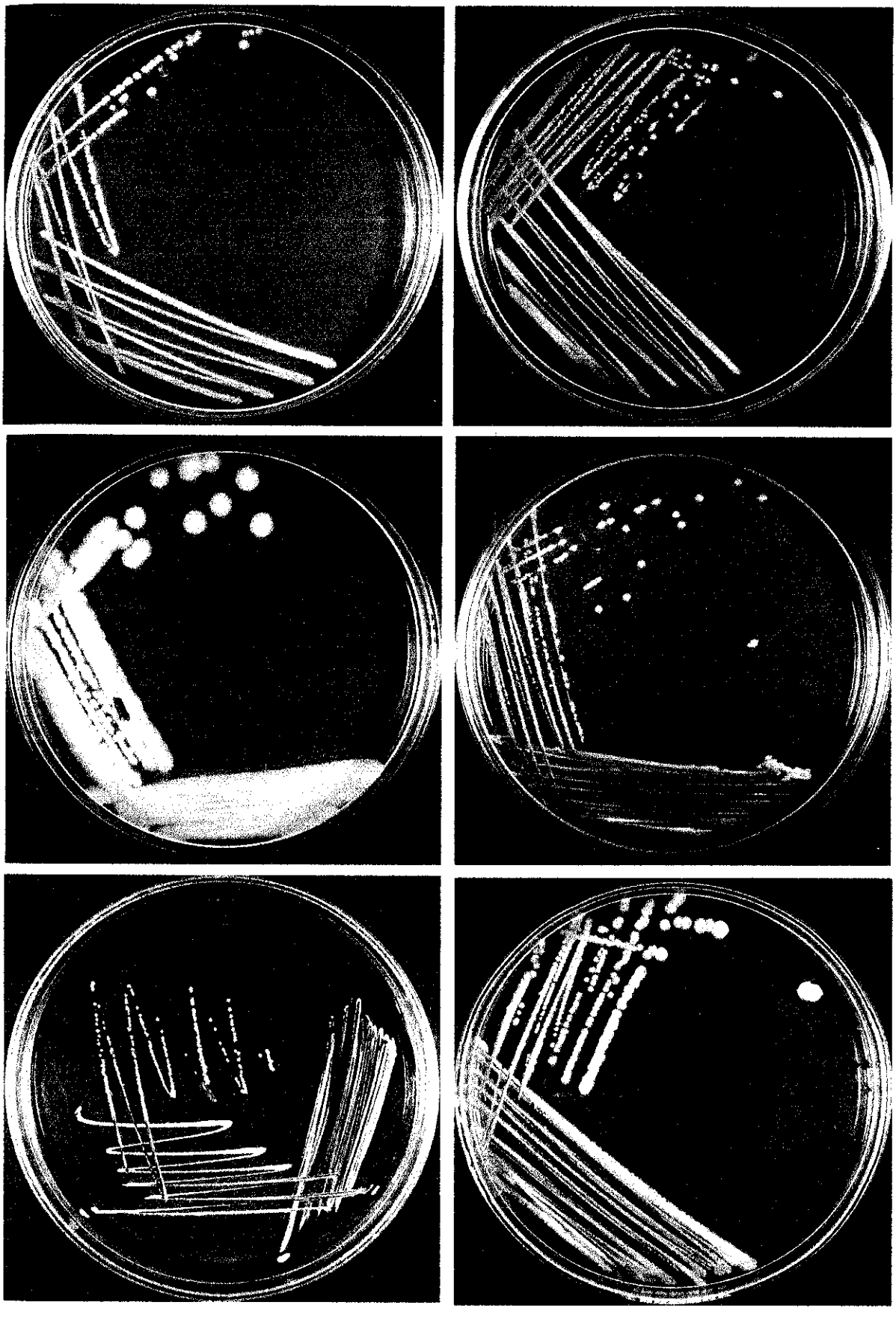
[a] จำนวนบวกแสดงถึงความเข้มของสาร PHA และพื้นที่ PHAs (%) (ตารางที่3.1) ที่สะสมภายในเซลล์ จากการย้อมด้วย Nile blue A

+5, ความเข้มมากที่สุดของสีส้มเหลืองของ PHA granules และลดลงตามจำนวนเครื่องหมาย + ที่ลดลงที่เชื่อมโยงกับพื้นที่ PHAs (%) ที่สะสมภายในเซลล์ในช่วง >85%, 71-85%, 56-70%, 40-55% และ < 40% ตามลำดับ

0, ไม่พบสีส้มเหลืองของ PHA granules



รูปที่ 3.1 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียต่างไอโซเลท (สายพันธุ์) เจริญบนอาหาร Trypticase soy agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นไอโซเลทที่เลือกมาทดสอบความสามารถในการสร้าง PHAs



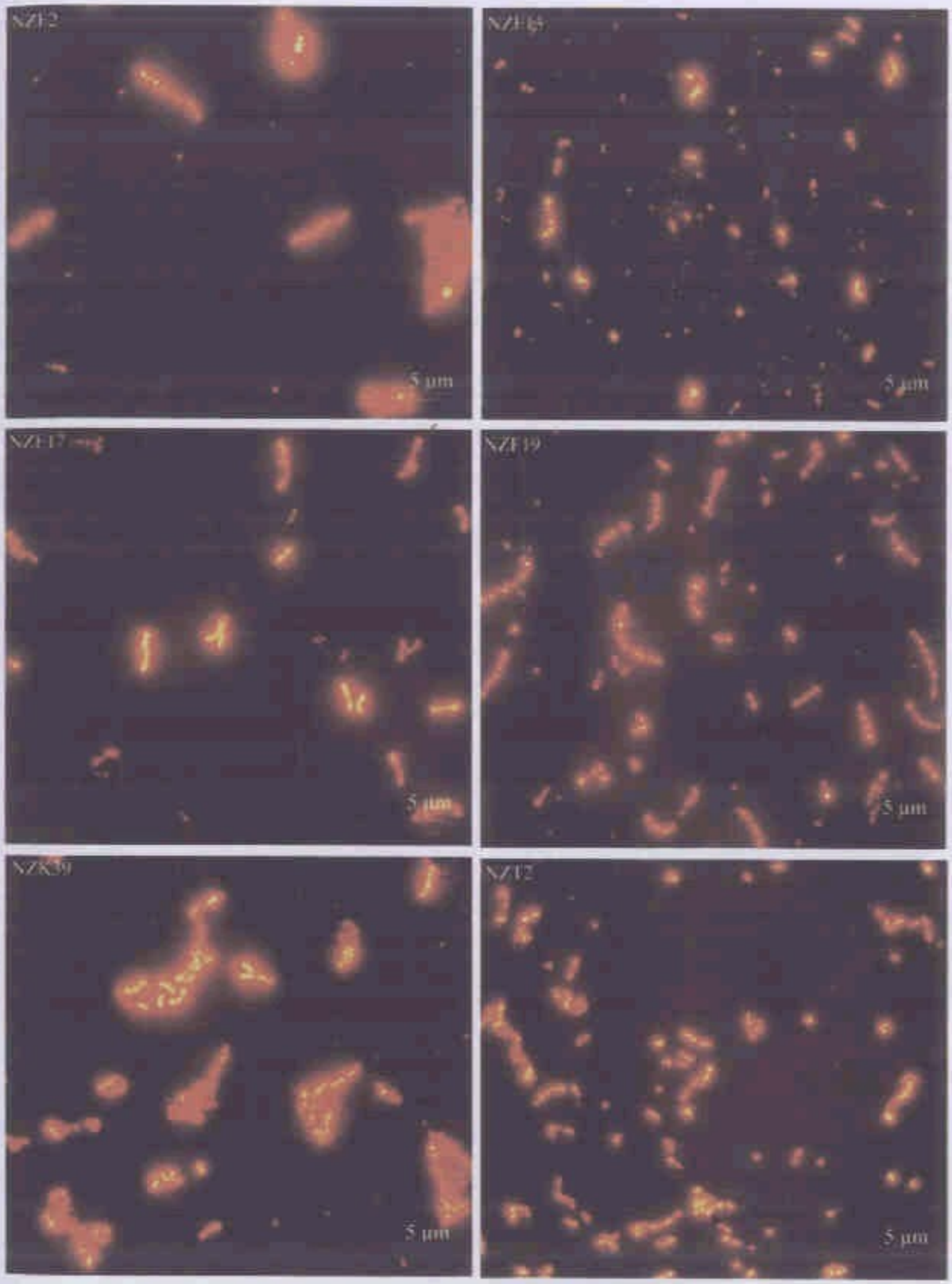
รูปที่ 3.1 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียต่างไอโซเลท (สายพันธุ์) เจริญบนอาหาร Trypticase soy (ต่อ) agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นไอโซเลทที่เลือกมาทดสอบความสามารถในการสร้าง PHAs

ตารางที่ 3.2 ประมาณการสะสมสาร PHAs ของแบคทีเรียโดยการย้อมสีเซลล์ด้วย 1% Nile blue A และตรวจดูสีของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

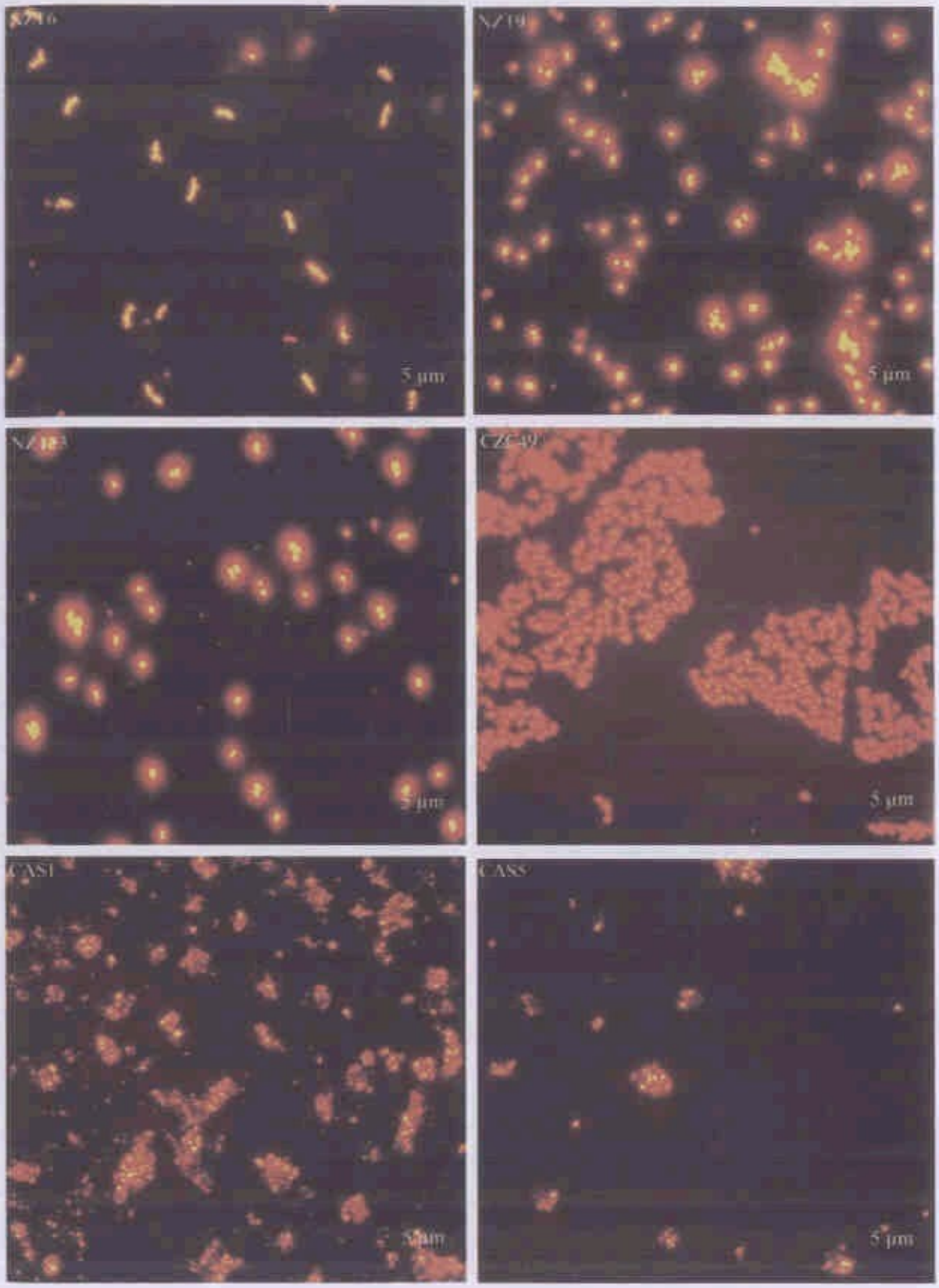
รหัสไอโซเลท	พื้นที่ (ตารางไมครอน) [a]		PHAs ที่สะสมในเซลล์เทียบกับพื้นที่ทั้งหมดของเซลล์ (%)	ระดับความเข้มของสาร PHAs สะสมภายในเซลล์ที่ติดสีย้อม Nile blue A [b]
	เซลล์แบคทีเรียทั้งหมด	PHA granule ในเซลล์		
Gram-negative rods				
NZF1	549.60	379.00	68.96	+3
NZF13	873.80	589.60	67.48	+3
NZT6	711.40	681.60	95.81	+5
NZT7	1,273.80	1,163.80	91.36	+5
NZT9	980.40	904.00	92.21	+5
NZT13	845.40	775.60	91.74	+5
CZG10-1	612.20	415.40	67.85	+3
Gram-positive rods				
NZF17	2,149.20	1,926.20	89.62	+5
NZF19-2	932.80	640.55	68.67	+3
NZF20	1,878.80	1,546.73	82.33	+4
NZK11	806.00	645.20	80.05	+4
NZK39	1,175.40	1,052.00	89.50	+5
NZR4	383.00	81.60	21.31	+1
NZT1	627.00	557.10	88.85	+5
NZT2	1,209.20	1,066.20	88.17	+5
CZW8	718.20	595.60	82.93	+4
CAS5	824.60	568.00	68.88	+3
CAS23	1,044.80	705.80	67.55	+3
S2-3-2	1,395.00	1,259.20	90.27	+5
S2-12	663.60	540.20	81.40	+4
S2-20	1,291.60	1,167.40	90.38	+5
S2-24	690.80	551.60	79.85	+4
S3-13	2,430.60	1,976.80	81.33	+4
Gram-positive cocci				
NZK12	1,155.00	1,011.00	87.53	+5
CZC49	1,136.80	773.20	68.02	+3
CAS1	949.00	621.20	65.46	+3

[a] อาศัยโปรแกรม Image-Pro Plus Version 6.0.0.260: 1993-2006 (Media Cybernetics, Inc., Japan) ที่ต่อกับระบบกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus Model BX51TRF, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)

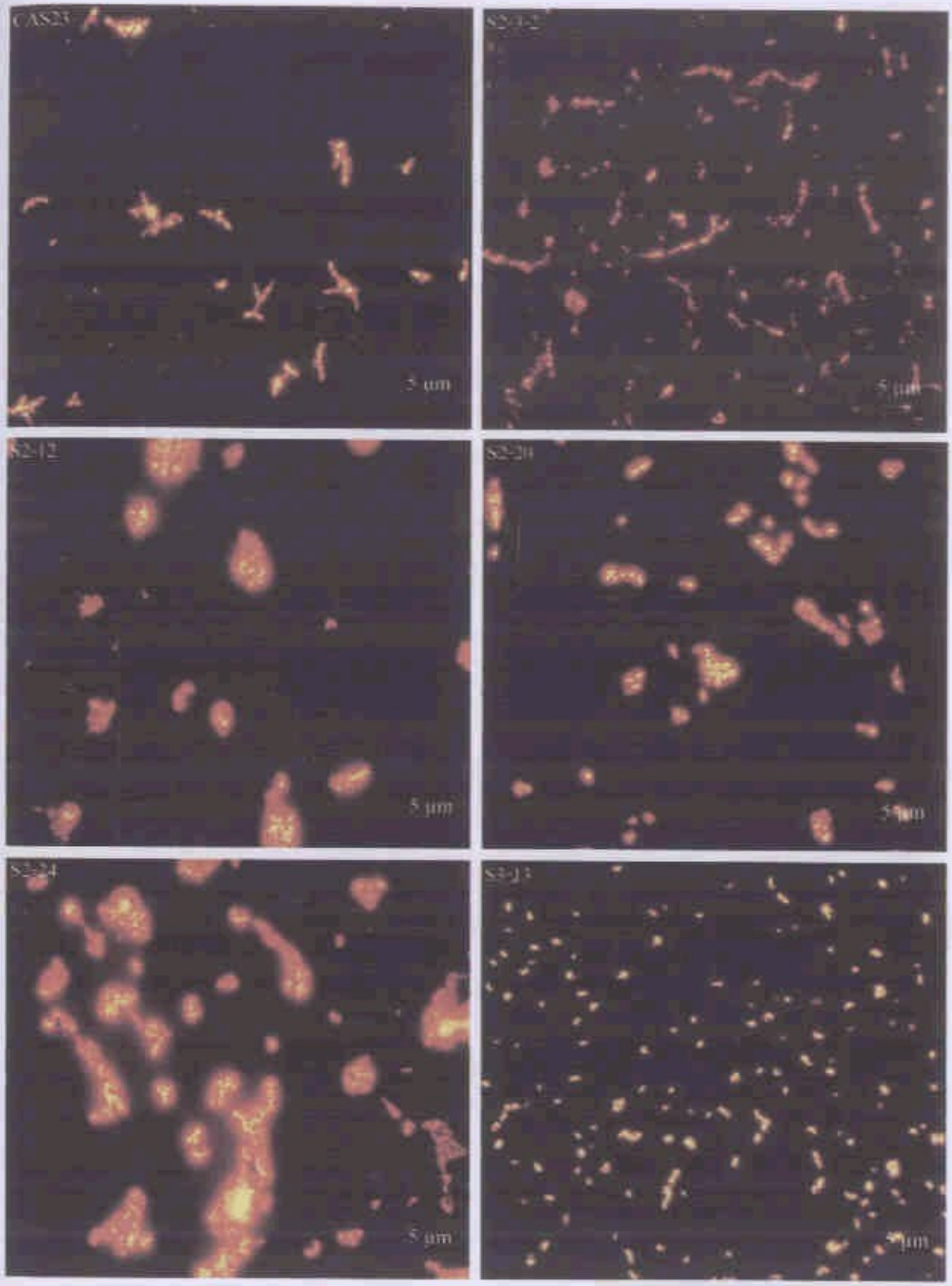
[b] +5, ความเข้มมากที่สุดของสีส้มเหลืองของ PHA granules และลดลงตามจำนวนเครื่องหมาย + ที่ลดลงที่เชื่อมโยงกับพื้นที่ PHAs (%) ที่สะสมภายในเซลล์ในช่วง >85%, 71-85%, 56-70%, 40-55% และ < 40% ตามลำดับ



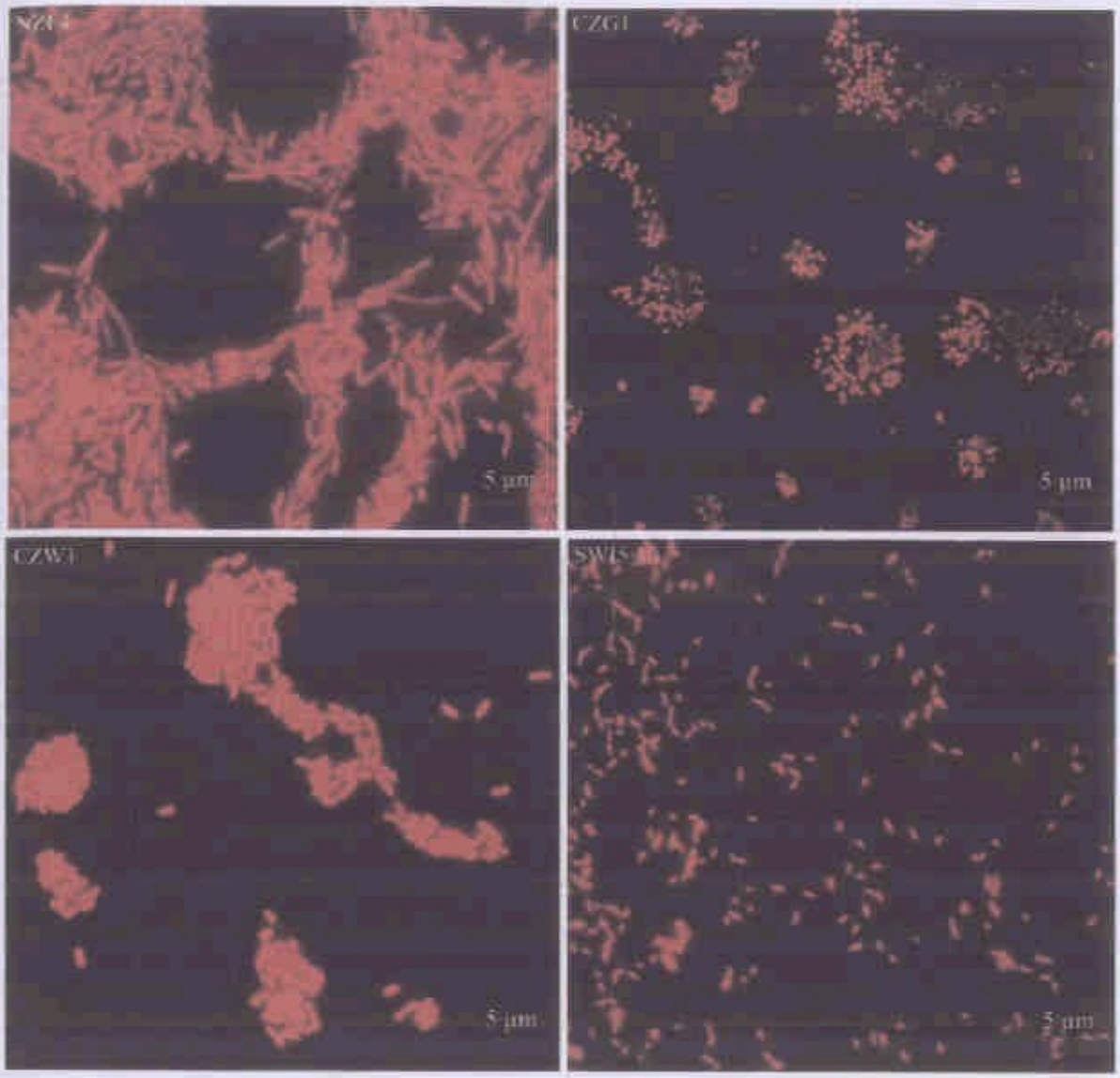
รูปที่ 3.2 ตัวอย่างรูปร่างและการเรืองแสงสีส้มแหลืองของเซลล์แบคทีเรียที่มีการผลิตและสะสม PHAs (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย 1% Nile blue A และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า)



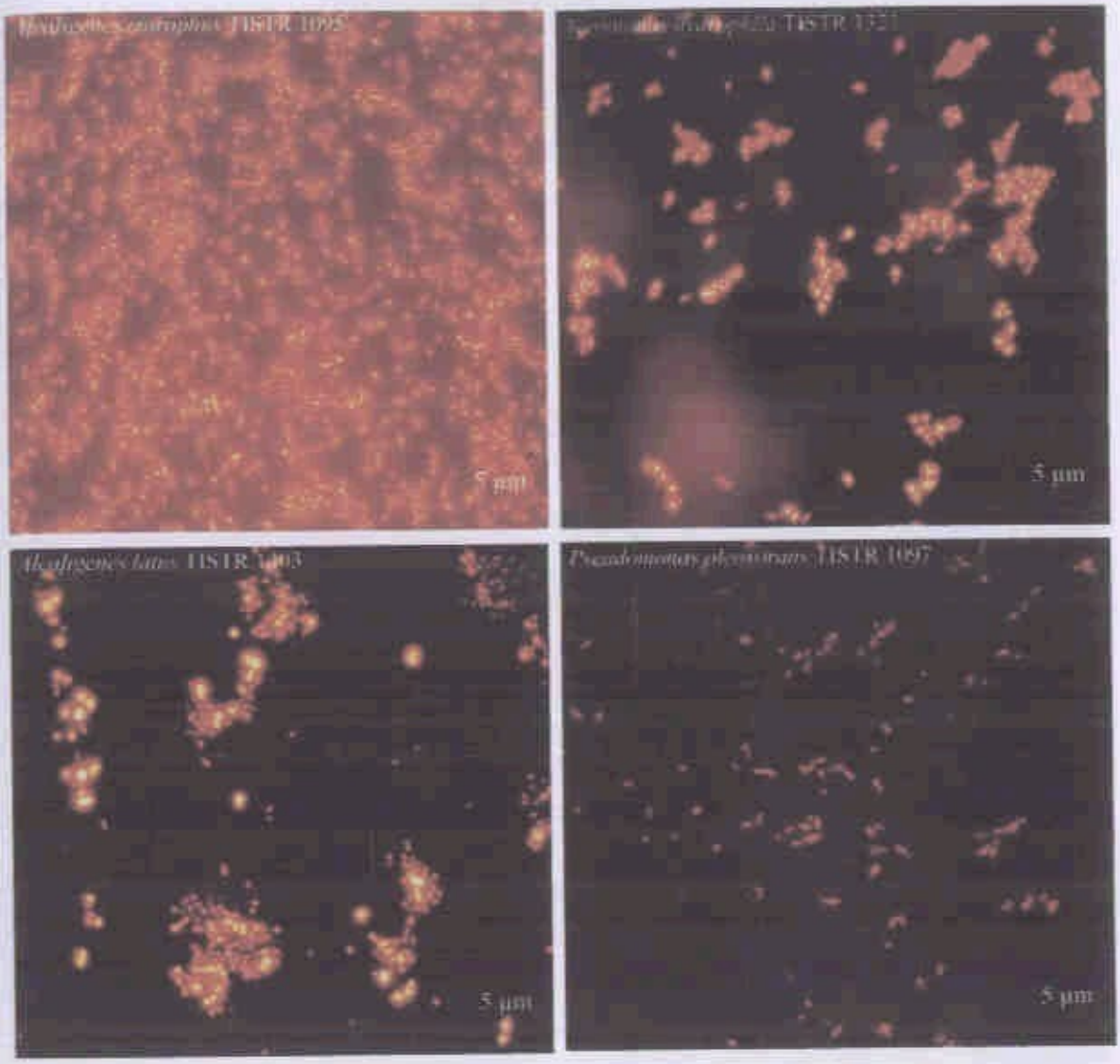
รูปที่ 3.2 ตัวอย่างรูปร่างและการเรืองแสงสีส้มเหลืองของเซลล์แบคทีเรียที่มีการผลิตและสะสม PHAs (ต่อ) (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย 1% Nile blue A และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า)



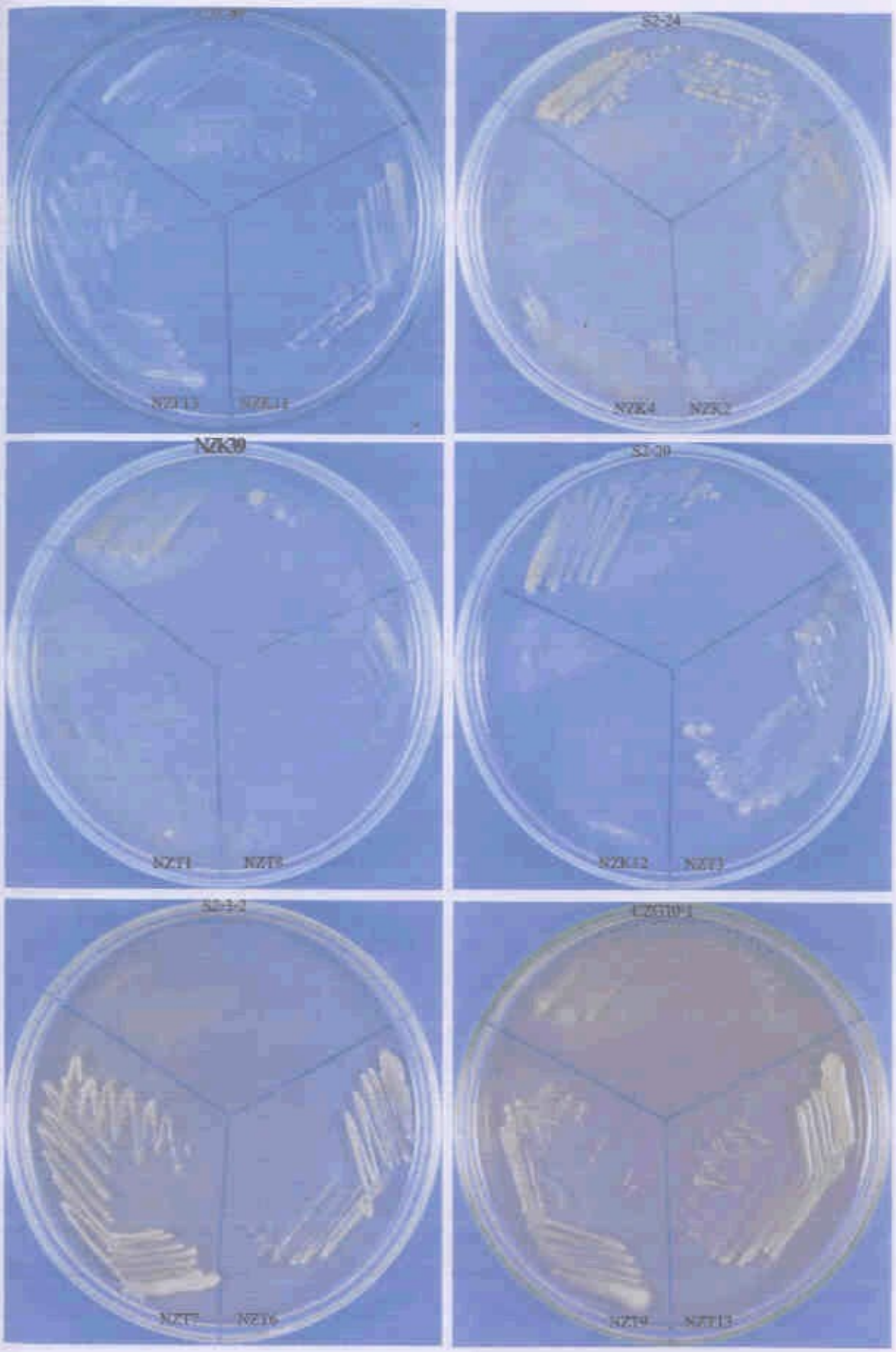
รูปที่ 3.2 ตัวอย่างรูปร่างและการเรืองแสงสีส้มเหลืองของเซลล์แบคทีเรียที่มีการผลิตและสะสม PHAs (ต่อ) (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย 1% Nile blue A และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า)



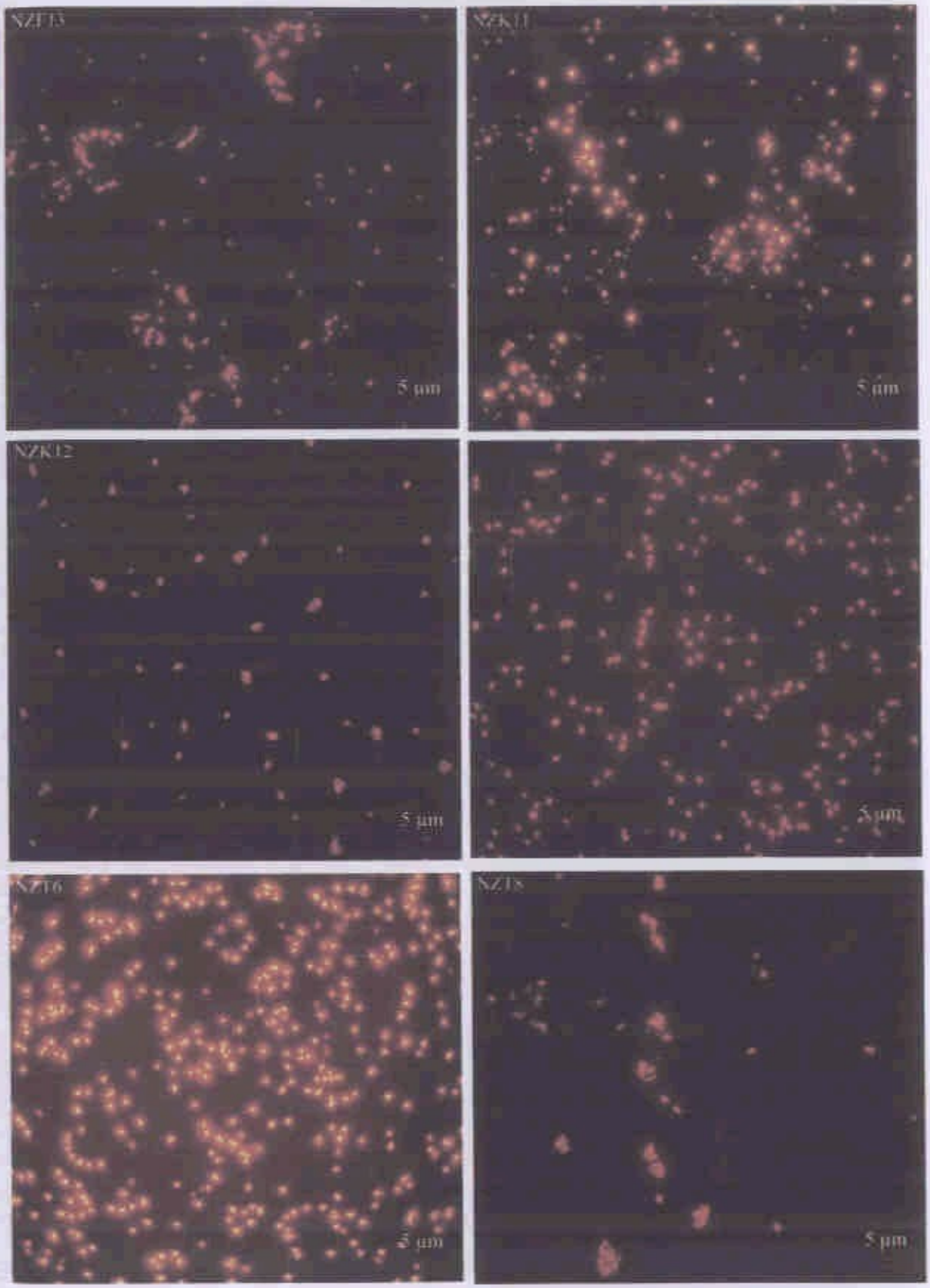
รูปที่ 3.3 ตัวอย่างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่มีการผลิตและสะสม PHAs (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย 1% Nile blue A และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า)



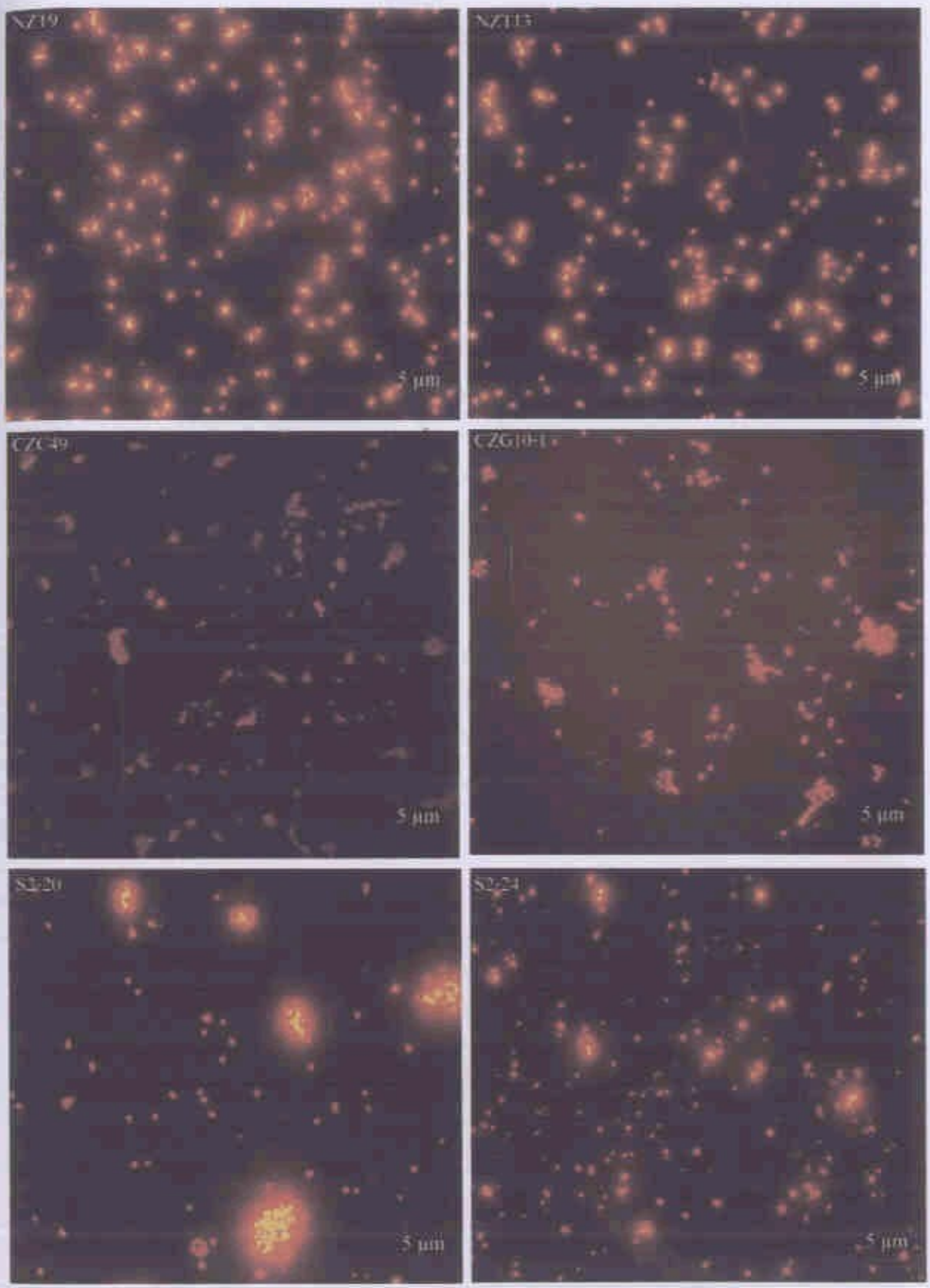
รูปที่ 3.4 ตัวอย่างรูปร่างและการเรืองแสงสีส้มเหลืองของเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับจากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็น Positive control (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย 1% Nile blue A และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า)



รูปที่ 3.5 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในกลุ่มที่มีศักยภาพในการสร้าง PHAs ที่เจริญบนอาหาร Mineral salt medium (MSM) ที่เติม Nile Red เป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 3.6 ตัวอย่างรูปร่างและการสะสม PHAs ภายในเซลล์ (เซลล์ที่เรืองแสงสีส้มเหลือง) ของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MSM ที่เติม Nile Red เมื่อย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสีย้อม 1% Nile blue A และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 3.6 ตัวอย่างรูปร่างและการสะสม PHAs ภายในเซลล์ (เซลล์ที่เรืองแสงสีส้มเหลือง) ของแบคทีเรีย (ต่อ) ที่เจริญบนอาหาร MSM ที่เติม Nile Red เมื่อย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วยสีย้อม 1% Nile blue A และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.1.1.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังและการเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก

เมื่อทดสอบแบคทีเรียที่คัดเลือกจากผลบวกของการสะสม PHAs ในขั้นตอนคัดกรองโดยใช้อาหารแข็ง จำนวน 60 ไอโซเลท ด้านความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังและการเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าทุกไอโซเลทเจริญได้ดีบนอาหารที่เติมน้ำตาลทราย (น้ำตาลทราย ตรามิตรผล) พบแบคทีเรียจำนวน 34 ไอโซเลท ที่เจริญบนอาหารที่เติมน้ำตาลทรายดีกว่าอาหารที่เติมกลูโคส (ตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.8) และ 43 ไอโซเลทสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดี (ตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.7) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 4 ไอโซเลท (NZF1, CSG10-1, CZG12 และ CZW15 แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์เป็นท่อน 35 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.3) และแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์กลม 4 ไอโซเลท (NZK12, NZR1, CZC49 และ CZC54)

ตารางที่ 3.3 ผลการทดสอบการใช้แป้งมันสำปะหลัง และการเจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลทรายและกลูโคสของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกจากความสามารถในการผลิต PHAs โดยใช้อาหารแข็ง

รหัสไอโซเลท	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีที่เจริญบนอาหาร (เซนติเมตร)			เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส[a] (เซนติเมตร)
	กลูโคส	น้ำตาลทราย	แป้งมันสำปะหลัง	
Gram-negative rods				
NZF1	1.25	1.00	0.40	0.70
NZF9	0.73	0.90	0.45	-
NZF13	0.38	0.50	0.63	-
NZK37	0.45	0.60	0.75	-
NZK38	0.60	0.53	0.65	-
NZT3	0.48	0.70	0.53	-
NZT6	0.28	0.30	0.40	-
NZT7	0.4	0.35	0.275	-
NZT9	0.30	0.48	0.48	-
NZT13	0.25	0.40	0.50	-
NZT14	0.65	0.65	0.65	-
CZG10-1	0.98	1.05	0.68	1.70
CZG12	0.73	0.70	0.75	1.65
CZW15	0.20	0.70	0.45	1.15

ตารางที่ 3.3 (ต่อ) ผลการทดสอบการใช้แป้งมันสำปะหลัง และการเจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลทรายและกลูโคสของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกจากความสามารถในการผลิต PHAs โดยใช้อาหารแข็ง

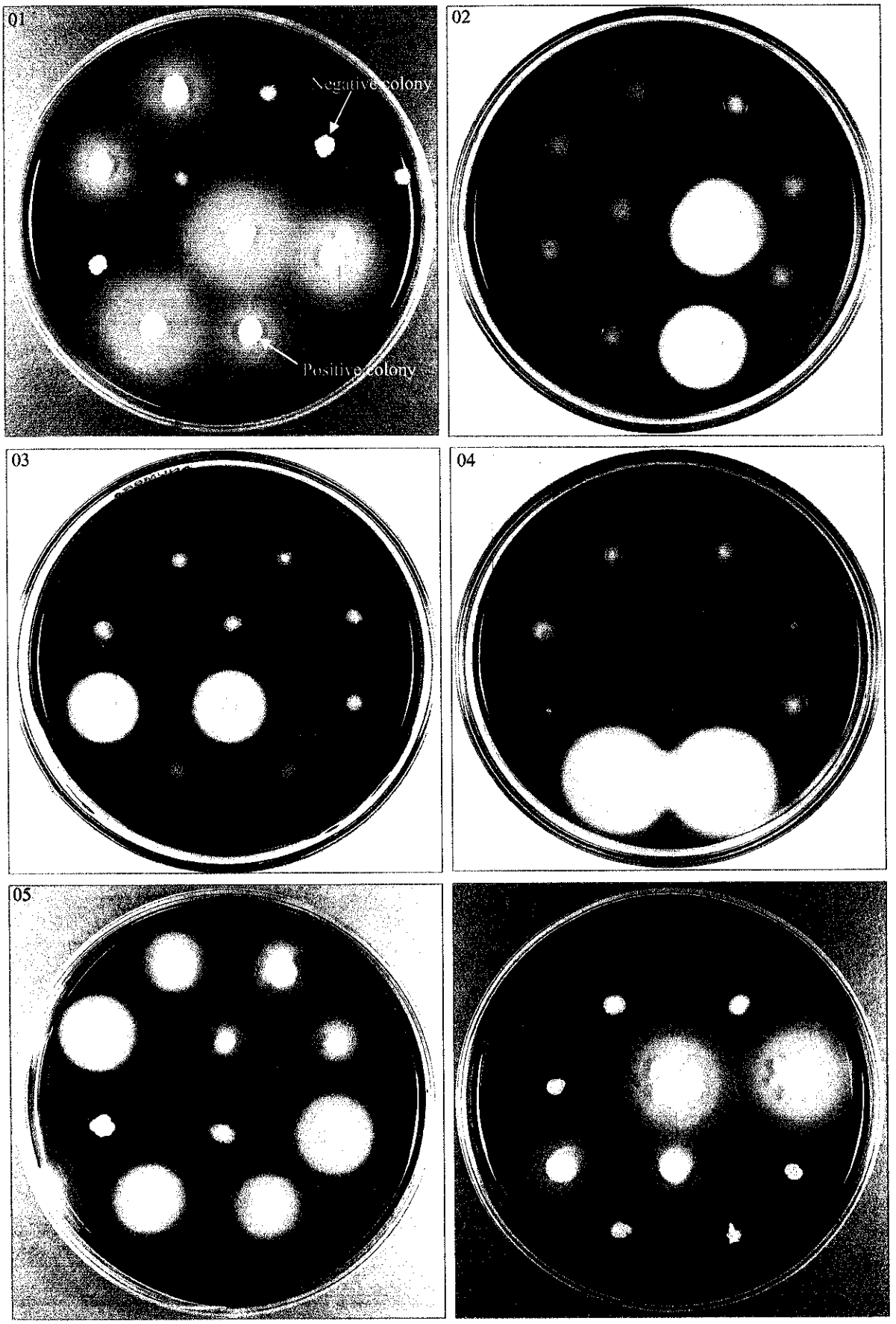
รหัสไอโซเลท	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีที่เจริญบนอาหาร (เซนติเมตร)			เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส[a] (เซนติเมตร)
	กลูโคส	น้ำตาลทราย	แป้งมันสำปะหลัง	
Gram-positive rods				
NZF17	0.40	0.58	1.33	2.40
NZF18	0.60	0.58	1.40	2.60
NZF19-2	0.53	0.60	1.30	2.15
NZF20	0.73	0.70	0.70	1.80
NZK1	0.83	2.25	1.00	3.50
NZK2	1.65	1.60	0.95	5.00
NZK3	1.20	1.80	1.25	3.35
NZK5	1.15	1.50	1.55	4.60
NZK6	1.90	2.25	0.63	4.00
NZK8	0.55	1.40	1.15	4.00
NZK11	1.00	0.85	0.80	1.40
NZK39	0.88	0.70	0.68	2.05
NZT1	1.55	1.90	0.70	3.50
NZT5	0.25	0.40	0.48	2.35
NZT8	1.25	2.25	1.80	4.90
NZR4	1.00	1.65	1.00	4.00
NZR8	0.90	1.45	2.05	4.00
NZR14	0.95	1.55	1.30	4.00
CZG13	0.18	0.93	0.65	2.80
CZC59-1	0.38	0.75	0.83	3.45
CZC68	1.55	3.10	1.20	4.50
CZC70-1	0.53	0.55	0.43	2.80
CZG13	0.20	0.93	0.65	2.80
CZM3-1	0.90	2.95	1.30	5.00

ตารางที่ 3.3 (ต่อ) ผลการทดสอบการใช้แป้งมันสำปะหลัง และการเจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลทรายและกลูโคสของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกจากความสามารถในการผลิต PHAs โดยใช้อาหารแข็ง

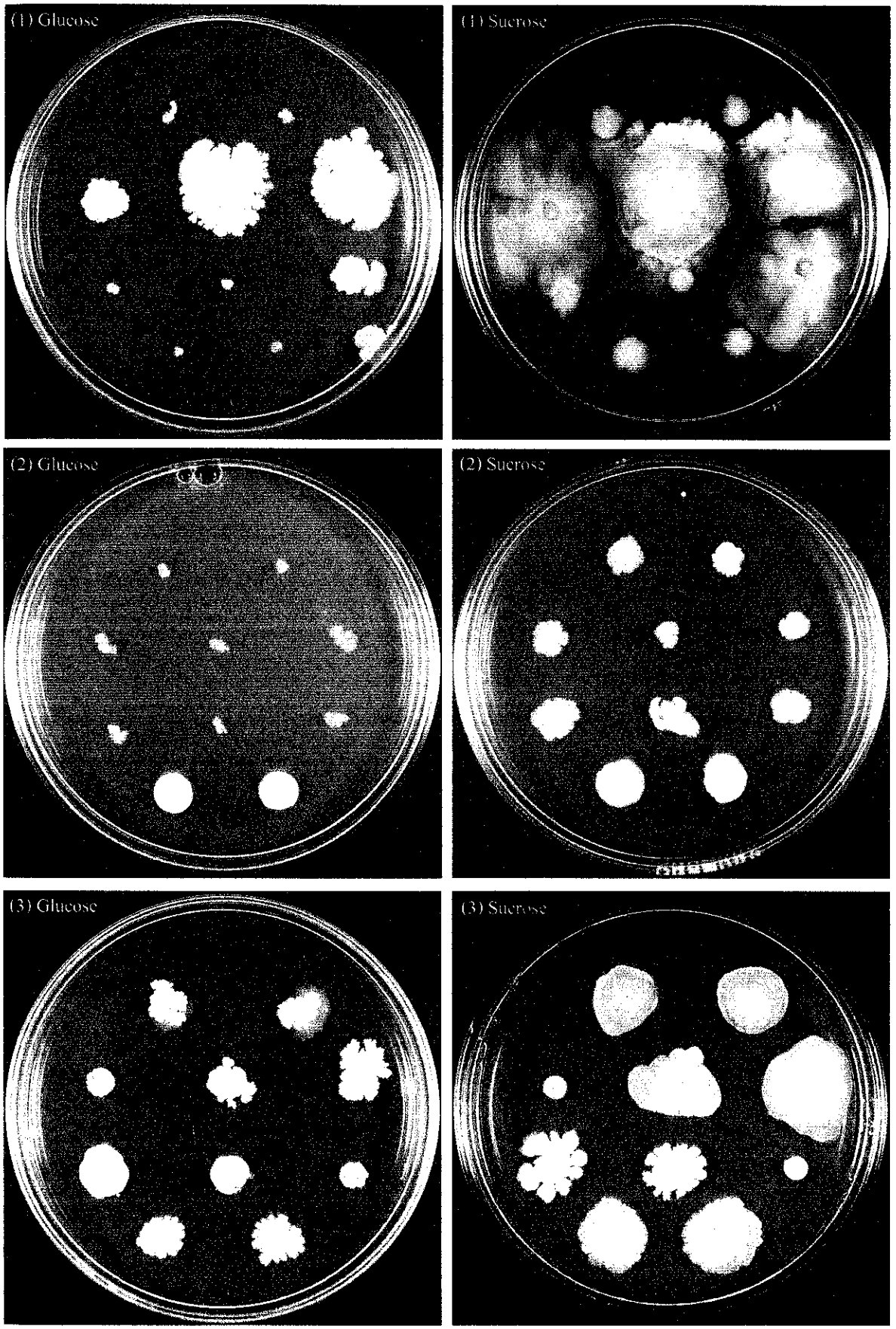
รหัสไอโซเลท	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีที่เจริญบนอาหาร (เซนติเมตร)			เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส[a] (เซนติเมตร)
	กลูโคส	น้ำตาลทราย	แป้งมันปะหลัง	
Gram-positive rods (ต่อ)				
CZM3-2	1.93	2.65	1.15	5.10
CZM5	1.05	2.45	1.70	5.00
CZM16	0.23	1.05	0.63	-
CZW1	0.15	0.60	0.35	5.00
CZW2	0.53	2.75	0.60	-
CZW8	0.70	1.40	2.10	4.40
CAS5	0.20	0.20	0.20	-
CAS23	0.70	2.85	1.65	3.35
S1-8	0.40	0.38	0.75	1.65
S2-3-2	0.20	0.20	0.40	1.20
S2-12	0.80	1.40	0.75	1.95
S2-20	0.85	0.78	0.70	1.85
S2-24	0.63	0.70	0.65	1.55
S3-13	0.60	0.55	1.85	3.00
Gram-positive cocci				
NZF10	0.30	0.50	0.40	-
NZK12	0.55	0.60	0.50	1.60
NZR1	1.75	2.25	1.05	4.00
CZC49	0.20	0.80	0.60	2.00
CZC53	0.25	0.38	0.63	-
CZC54	0.60	0.38	0.30	1.25
CZG18	0.20	0.40	0.28	-
CAS1	0.40	0.48	0.45	-

[a] เส้นผ่าศูนย์กลางของ Clear zone จากการทดสอบการใช้แป้งมันสำปะหลังโดยหยด Iodine solution ลงบนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร Starch agar

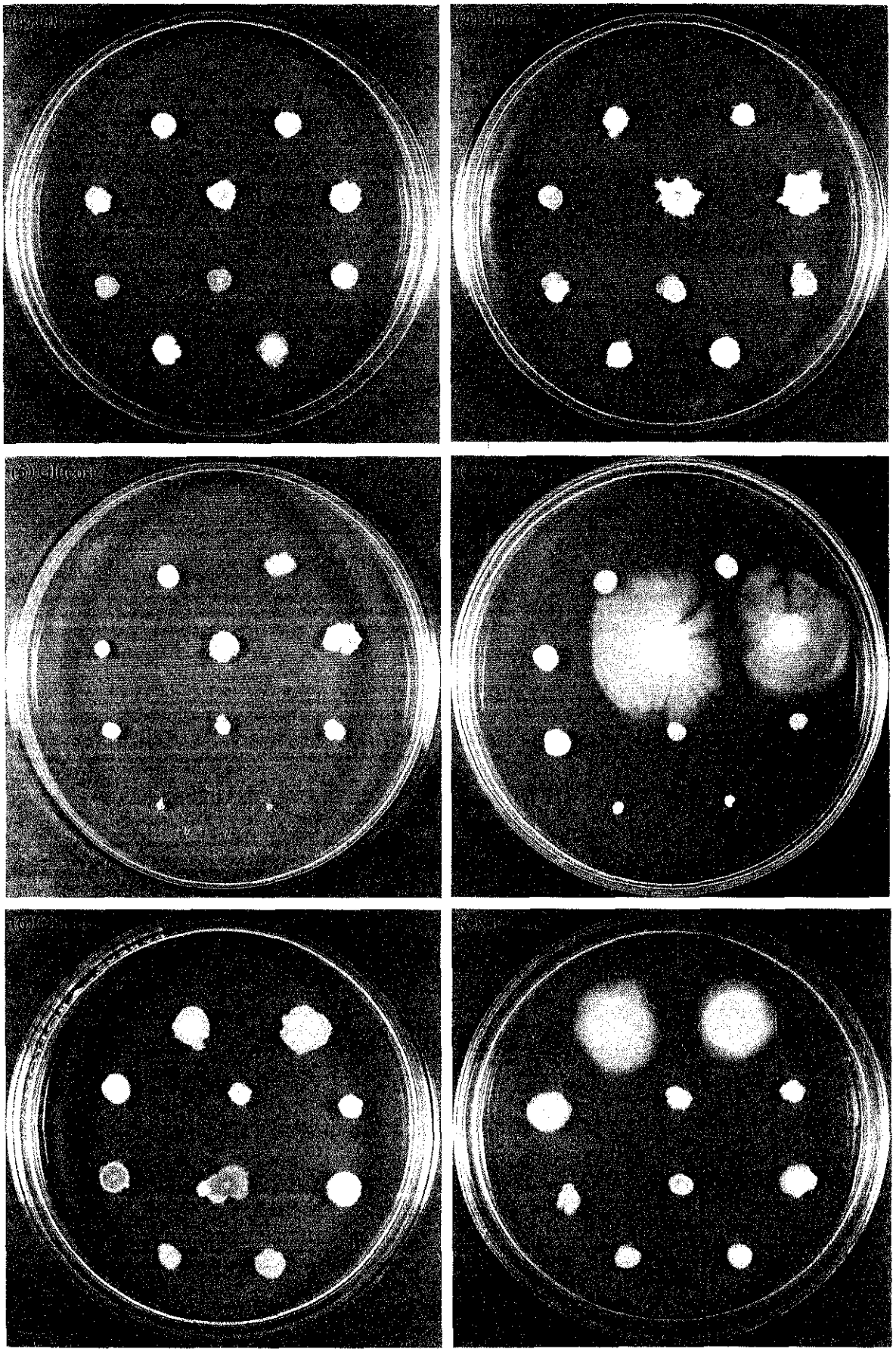
- = ผลลบจากการทดสอบ (Negative result)



รูปที่ 3.7 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในกลุ่มที่นำมาทดสอบความสามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง โคโลนีเจริญบนอาหาร Starch agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และหยดทับด้วย Iodine solution



รูปที่ 3.8 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในกลุ่มที่นำมาทดสอบความสามารถใช้น้ำตาลจากอ้อย โคโลนีเจริญบนอาหาร Starch base agar ที่เติมน้ำตาลทราย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 3.8 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในกลุ่มที่นำมาทดสอบความสามารถใช้น้ำตาลจาก

(ต่อ) อ้อย โคโลนีเจริญบนอาหาร Starch base agar ที่เติมน้ำตาลทราย เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.1.1.3 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

จากการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ของแบคทีเรียที่คัดเลือกจากผลบวกของการสะสม PHAs ในขั้นตอนคัดกรอง โดยใช้อาหารแข็งจำนวน 60 ไอโซเลท เช่นเดียวกับที่ทดสอบในข้อ 3.1.1.2 พบว่า เชื้อทุกไอโซเลทให้ผลการย่อยแบบ Non-hemolysis

3.1.1.4 การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียในอาหารเหลว

จากที่ได้ทดสอบเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยผ่านการคัดกรองในขั้นต้นว่ามีศักยภาพในการผลิต PHAs และย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ และ/หรือเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลทรายจำนวน 16 ไอโซเลท คือ NZF1, NZF13, NZF17, NZK11, NZK12, NZK39, NZT6, NZT9, NZT13, CZC49, CZG10-1, CZW15, CAS5, S2-3-2, S2-20 และ S3-13 ในอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร พบว่าได้ตะกอนเซลล์ในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการสกัดสาร PHAs เพื่อศึกษาสมบัติในเบื้องต้นเพื่อการคัดเลือกเชื้อ จึงเพิ่มปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 50 มิลลิลิตร - 5 ลิตร และตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรียที่ทุกๆ 24 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเซลล์ ด้วยเทคนิค Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น บันทึกผล หาค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFUต่อมิลลิลิตร) พบว่าการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ยังไม่ได้ศึกษาให้ให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกจำเป็นต้องเลี้ยงเชื้อในปริมาตร 5 ลิตร จึงจะสามารถสกัดสาร PHAs ได้ในปริมาณที่เพียงพอต่อการศึกษาคุณลักษณะของสาร การเลี้ยงเชื้อด้วยปริมาตร 5 ลิตรนี้ได้เริ่มทดลองเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือก 3 ไอโซเลท คือ แบคทีเรียที่คัดเลือก 3 ไอโซเลท คือ NZF17 และ NZT6 ซึ่งแยกได้จากมูลสัตว์ และ S2-3-2 แยกได้จากดิน โดยใช้ระบบถังหมักแบบ Batch culture โดยเลี้ยงเชื้อตามขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียที่คัดเลือกอายุ 18-24 ชั่วโมง ใน Complex medium broth (ภาคผนวก ค2) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^6-10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งพร้อมจะเติมลงในถังหมัก

2) การเลี้ยงเชื้อในระบบถังหมัก

2.1) เตรียมอาหาร Minimal medium broth (ภาคผนวก ค8) ปริมาตร 5 ลิตร บรรจุลงในถังหมักที่ต่อกับระบบถังหมัก (ถังปฏิกรณ์; Biostat® Bplus, Type 8843414, Sartorius BBI Systems GmbH, Germany) และเติมกล้าเชื้อที่เตรียมตามข้างต้นปริมาณ (Inoculum size) 2% โดยปริมาตร เลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยให้อากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที กวนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตั้งค่า pH เท่ากับ 7.0 (ปรับ pH ด้วย 3N NaOH และ 3N HCl) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.2) ปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall RC 5C plus superspeed centrifuge American Laboratory Trading, U.S.A.) ความเร็ว 8,000-10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทน้ำส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ

2.3) นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัดสาร PHAs

จากที่ได้เลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ดังกล่าวข้างต้น พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทให้ปริมาณเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงในอาหาร Minimal medium (10^{11}-10^{14} CFUต่อมิลลิลิตร) เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 จำนวนเซลล์แบคทีเรียใน Minimal medium จากการเลี้ยงเชื้อแบบ Batch culture เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

รหัสไอโซเลท	ระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU ต่อมิลลิลิตร)
NZF17	0	$3.00x10^{6}$
	24	$1.35x10^{12}$
	48	$8.03x10^{14}$
NZT6	0	$4.00x10^{7}$
	24	$2.00x10^{9}$
	48	$2.98x10^{11}$
S2-3-2	0	$7.50x10^{8}$
	24	$1.11x10^{10}$
	48	$2.15x10^{12}$

อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงเชื้อตามขั้นตอนที่ได้ปฏิบัติประกอบด้วยหลายขั้นตอนที่ใช้เวลา ประกอบกับยังคงมีแบคทีเรียที่คัดเลือกอีก 13 ไอโซเลท ที่ต้องการทราบคุณสมบัติเบื้องต้นของสารเพื่อการคัดเลือกเชื้อ จึงได้พัฒนาวิธีการเลี้ยงเชื้อสำหรับไอโซเลทที่คัดเลือกที่เหลืออีก 13 ไอโซเลท เป็นแบบ Fed-batch culture โดยเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารอาหารเป็นช่วงหลังจากที่ใส่เชื้อเริ่มต้นแล้ว โดยไม่มีการถ่ายออก ปริมาตรอาหารในการหมักแบบ Fed-batch culture จึงเพิ่มขึ้น ในขั้นตอนนี้ได้ทดลองหาความเข้มข้นของสารอาหารที่เหลือใน Complex medium broth หลังจากการเลี้ยงแบคทีเรียก่อนที่จะเติม Minimal medium ลงในถังหมัก โดยเลือกไอโซเลท NZT1 (Gram-) และ NZT13 (Gram-) มาศึกษา พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 24-48 ชั่วโมง มีแหล่งคาร์บอนคงเหลือราว 0.2-0.9% น้ำหนักต่อปริมาตร และแหล่งไนโตรเจนเมื่อวิเคราะห์ในรูปของโปรตีนทั้งหมดคงเหลือ 0.05-0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3.5) จึงใช้ข้อมูลนี้เพื่อประมาณปริมาณของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนของ Minimal medium ที่ใช้เพื่อเติมในถังหมัก ภายหลังการเลี้ยงเชื้อใน Complex medium (ตารางที่ 3.5)

ตารางที่ 3.5 การเจริญของแบคทีเรียและปริมาณสารอาหารใน Complex medium ที่ 0-48 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ

รหัสไอโซเลท	ระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (CFU ต่อมิลลิลิตร)	pH	ปริมาณ Reducing sugar [a]		โปรตีน [b] (mg/ml)
				กรัมต่อลิตร	%(w/v)	
NZT1	0	$7.34x10^{7}$	6.6300	13.0171	1.3017	0.1024
	8	$5.34x10^{8}$	5.3600	10.7992	1.0799	0.0782
	12	$9.86x10^{8}$	5.2100	9.9172	0.9917	0.0517
	24	$1.73x10^{9}$	4.8700	9.8005	0.9800	0.0427
	30	$3.242x10^{9}$	4.9600	9.4633	0.9463	0.0529
	36	$1.73x10^{10}$	6.0150	7.4010	0.7401	0.0840
	48	$2.45x10^{11}$	5.8250	5.4685	0.5469	0.0569
NZT13	0	$3.15x10^{7}$	6.0550	7.7629	0.7763	0.1024
	8	$1.64x10^{9}$	5.4750	2.1780	0.2178	0.1014
	12	$1.97x10^{10}$	5.4550	2.3259	0.2326	0.0896
	24	$7.70x10^{10}$	5.4200	2.0535	0.2053	0.0894
	30	$1.45x10^{11}$	5.3950	2.0846	0.2085	0.0767
	36	$3.41x10^{12}$	5.2300	2.1080	0.2108	0.0831
	48	$1.65x10^{13}$	5.4900	2.2428	0.2243	0.0802

[a] วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์และน้ำตาลทั้งหมดในน้ำหมักที่ระยะต่าง ๆ ของการหมักตามวิธี Dinitrosalicylic colorimetric method (Miller, 1959)

[b] วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดในน้ำหมักที่ระยะต่าง ๆ ของการหมักตามวิธี Bradford (Bradford, 1976)

การเลี้ยงเชื้อแบบ Fed-batch ในการศึกษาครั้งนี้เป็นไปตามขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียที่ใน Complex medium เช่นเดียวกับการเตรียมกล้าเชื้อเพื่อเลี้ยงในถังหมักแบบ Batch culture

2) การเลี้ยงเชื้อในระบบถังหมัก

2.1) เตรียมอาหาร Complex medium ปลอดเชื้อ ปริมาตร 2.4 ลิตร บรรจุในถังหมัก (Biostat® Bplus) เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกปริมาณ 100 มิลลิลิตร (2% Inoculum size โดยปริมาตร) กวนผสมรวมกันในถังหมักที่ต่อกับระบบหมักปฏิกรณ์ เลี้ยงแบคทีเรียเช่นเดียวกับการเลี้ยงแบบ Batch culture เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2) เติม Minimal medium ปริมาตร 2.5 ลิตร ที่ปรับปริมาตรสารอาหารเพื่อให้ความ

เข้มข้นสุดท้ายเท่ากับส่วนประกอบตามสูตรอาหาร (ภาคผนวก ค8) ลงในถังหมัก และเลี้ยงในสภาวะเช่นเดียวกันกับข้างต้น เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง การปรับส่วนประกอบของอาหารนี้มีแนวทางจากการทดลองเลี้ยงเชื้อใน Complex medium (ตารางที่ 3.5)

2.3) ปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Sorvall RC 5C plus superspeed centrifuge) ความเร็ว 8,000-10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.4) ล้างตะกอนเซลล์ 1 ครั้ง ด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัดสาร PHAs

จากการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 13 ไอโซเลท พบว่าทุกไอโซเลทให้ปริมาณเซลล์ต่อความเข้มข้นสูงในอาหาร Minimal medium (10^{13}-10^{14} CFU ต่อมิลลิลิตร) เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.6, รูปที่ 3.9) และมีการสะสม PHA granule เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 3.10)

ตารางที่ 3.6 จำนวนเซลล์แบคทีเรียจากการเลี้ยงเชื้อแบบ Fed-batch culture เป็นเวลา 48-96 ชั่วโมง

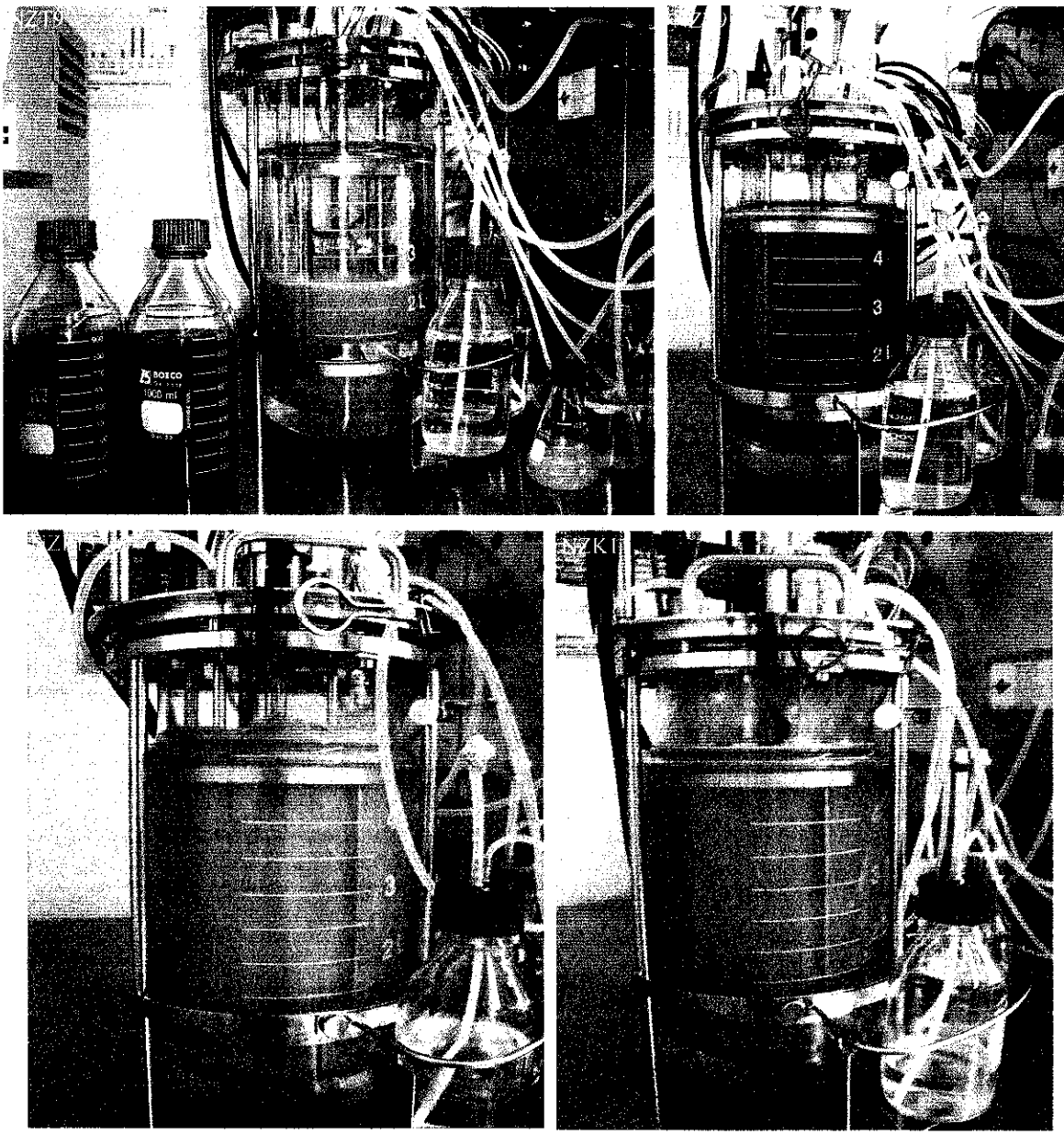
รหัสไอโซเลท	ระยะของการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย (CFU ต่อมิลลิลิตร)
NZF1	0	Complex medium	9.20×10^{8}
	24	"	4.95×10^{12}
	24	เติม Minimal medium ในอัตราส่วน 1:1	3.04×10^{10}
	48	Minimal medium	4.52×10^{13}
NZF13	0	Complex medium	8.80×10^{9}
	24	"	3.07×10^{12}
	24	เติม Minimal medium ในอัตราส่วน 1:1	5.43×10^{9}
	48	Minimal medium	6.68×10^{13}
NZK11	0	Complex medium	1.41×10^{8}
	24	"	1.55×10^{10}
	24	เติม Minimal medium ในอัตราส่วน 1:1	1.57×10^{8}
	48	Minimal medium	3.98×10^{13}
NZK12	0	Complex medium	8.95×10^{6}
	24	"	1.20×10^{12}
	24	เติม Minimal medium ในอัตราส่วน 1:1	3.25×10^{7}
	48	Minimal medium	8.50×10^{13}

ตารางที่ 3.6 จำนวนเซลล์แบคทีเรียจากการเลี้ยงเชื้อแบบ Fed-batch culture เป็นเวลา 48-96 ชั่วโมง (ต่อ)

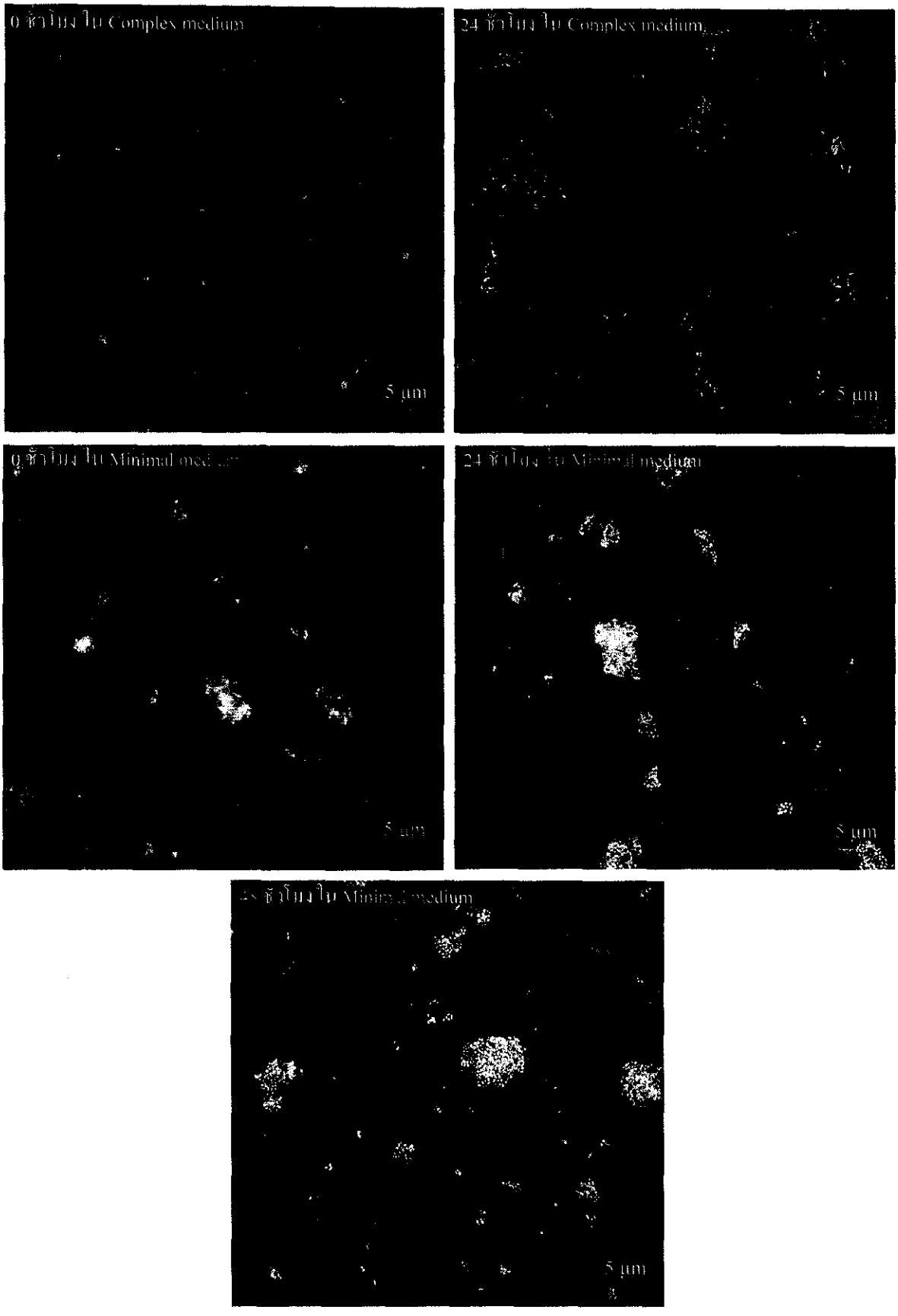
รหัสไอโซเลท	ระยะของการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย (CFU ต่อมิลลิลิตร)
NZK39	0	Complex medium	$1.70x10^{8}$
	24	"	$1.40x10^{11}$
	24	เติม Minimal medium ในอัตราส่วน 1:1	$7.16x10^{10}$
	48	Minimal medium	$7.73x10^{14}$
NZT9	0	Complex medium	$5.30x10^{9}$
	24	"	$2.34x10^{13}$
	24	เติม Minimal medium ในอัตราส่วน 1:1	$1.68x10^{11}$
	48	Minimal medium	$3.70x10^{14}$
NZT13	0	Complex medium	$1.10x10^{10}$
	24	"	$4.91x10^{12}$
	24	เติม Minimal medium ในอัตราส่วน 1:1	$7.82x10^{11}$
	48	Minimal medium	$1.40x10^{13}$
CZC49	0	Complex medium	$4.65x10^{8}$
	24	"	$5.80x10^{10}$
	24	เติม Minimal medium ในอัตราส่วน 1:1	$9.75x10^{9}$
	48	Minimal medium	$1.73x10^{13}$
CZG10-1	0	Complex medium	$1.29x10^{9}$
	24	"	$8.35x10^{11}$
	24	เติม Minimal medium ในอัตราส่วน 1:1	$1.97x10^{9}$
	48	Minimal medium	$1.05x10^{11}$
CZW15	0	Complex medium	$6.14x10^{8}$
	24	"	$4.40x10^{9}$
	24	เติม Minimal medium ในอัตราส่วน 1:1	$2.31x10^{9}$
	48	Minimal medium	$6.60x10^{12}$

ตารางที่ 3.6 จำนวนเซลล์แบคทีเรียจากการเลี้ยงเชื้อแบบ Fed-batch culture เป็นเวลา 48-96 ชั่วโมง (ต่อ)

รหัสไอโซเลท	ระยะของการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย (CFU ต่อมิลลิลิตร)
CAS5	0	Complex medium	4.55×10^{9}
	24	"	7.15×10^{11}
	24	เติม Minimal medium ในอัตราส่วน 1:1	8.55×10^{9}
	48	Minimal medium	8.70×10^{12}
S2-20	0	Complex medium	6.36×10^{9}
	24	"	8.26×10^{12}
	24	เติม Minimal medium ในอัตราส่วน 1:1	8.42×10^{9}
	48	Minimal medium	5.80×10^{13}
S3-13	0	Complex medium	6.86×10^{9}
	24	"	6.65×10^{11}
	24	เติม Minimal medium ในอัตราส่วน 1:1	7.82×10^{10}
	48	Minimal medium	4.18×10^{13}



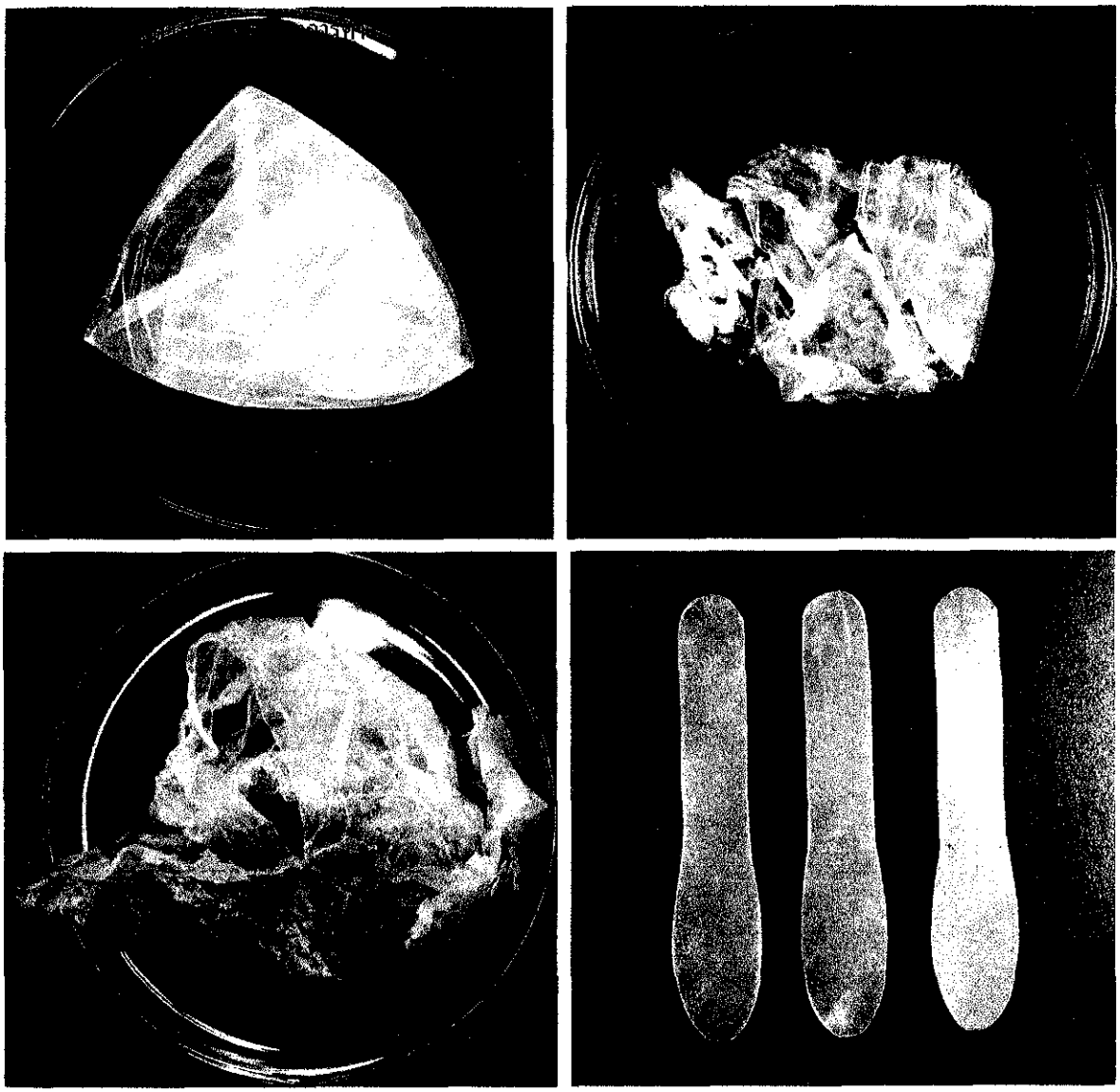
รูปที่ 3.9 การทดลองเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกเพื่อผลิตสาร PHAs ในระบบถังหมักที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 ลิตร



รูปที่ 3.10 ตัวอย่างการสะสม PHAs ภายในเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลท NZT6 เมื่อเลี้ยงใน Complex medium และ Minimal medium ในถังหมักแบบ Fed-batch culture (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียด้วย 1% Nile blue A และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 1,000 เท่า)

3.1.2 การศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHAs ที่ผลิตได้เพื่อช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรีย

ศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHAs ที่ผลิตได้เพื่อช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรีย โดยตรวจสอบชนิดของ PHAs ตาม Kim *et al.* (1996) และ Khanna and Srivastava (2005) ในขั้นตอนนี้มีสารสกัด 9 ตัวอย่างที่ผลิตจากแบคทีเรีย 9 ไอโซเลท คือ NZT6, S2-3-2, NZK11, NZK12, NZK19, NZF1, NZF17, NZT9, NZT13 และ CZW15 พบคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHAs มีลักษณะผลึกภายหลังการสกัดจากเซลล์แบคทีเรียที่มีแนวโน้มการนำไปใช้ประโยชน์ได้ดีจำนวน 2 ตัวอย่าง (รูปที่ 3.11) จากแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท คือ NZT6 และ NZT9

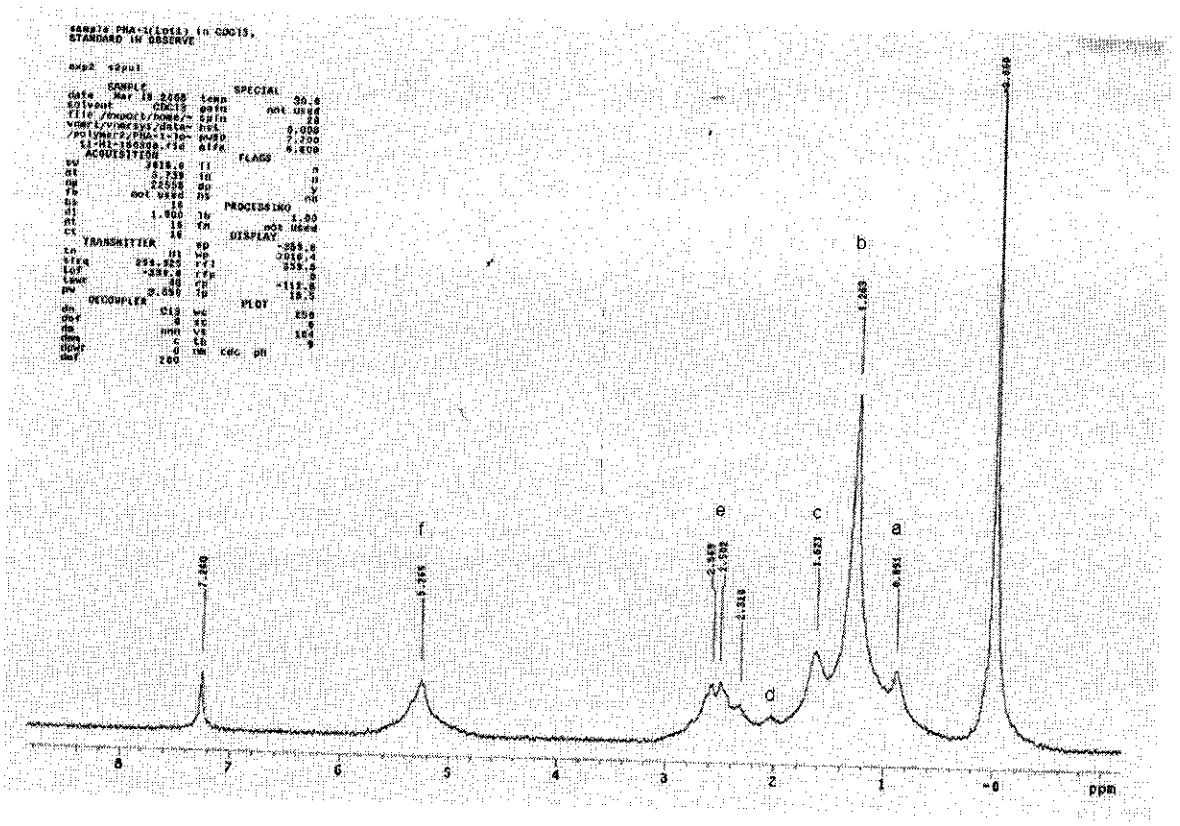


รูปที่ 3.11 ตัวอย่างลักษณะของผลึก PHAs ที่สกัดได้จากเซลล์แห้งของแบคทีเรีย และฟิล์ม PHAs ที่ได้

3.1.2.1 การตรวจสอบโครงสร้างเคมี

ก. ตัวอย่าง PHA-NZT6

สเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-NZT6 แสดงในรูปที่ 3.12 โดยพบพีคที่ chemical shift ต่าง ๆ ดังรวบรวมในตารางที่ 3.7

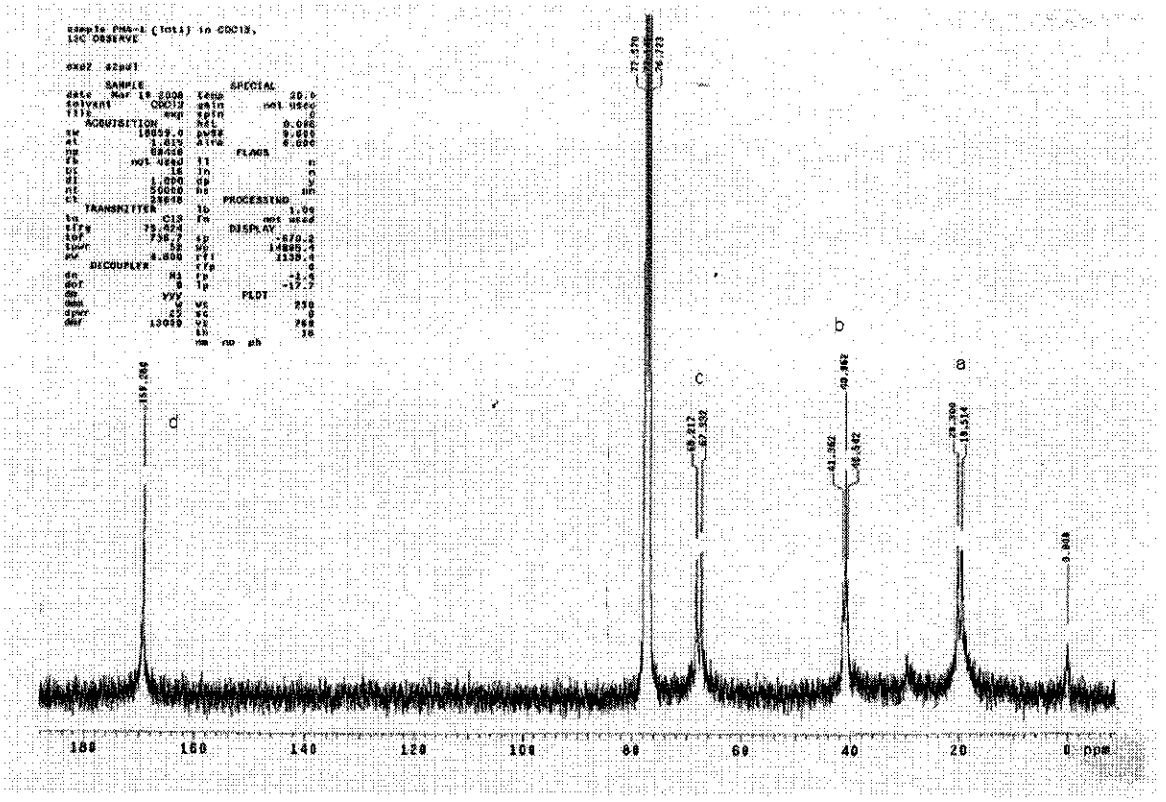


รูปที่ 3.12 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-NZT6

ตารางที่ 3.7 ตำแหน่งโปรตอนจากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-NZT6

พีค	Chemical shift (ppm)	ตำแหน่งโปรตอนของหมู่
a	0.89	$-CH_3$ (ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2$-)
b	1.26	$-CH_3$ (ที่ต่อกับหมู่ -CH-)
c	1.62	$-CH_2$- (ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2$- และ$-CH_3$)
d	2.00	$-CH_2$-(ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2$- และ$-CH_2$)
e	2.5	$-CH_2$- (ที่ต่อกับหมู่ –CH- และ–C=O)
f	5.27	–CH- (ที่ต่อกับหมู่ -O)

สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-NZT6 แสดงในรูปที่ 3.13 โดยพบพีคที่ chemical shift ต่าง ๆ ดังรวบรวมในตารางที่ 3.8



รูปที่ 3.13 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-NZT6

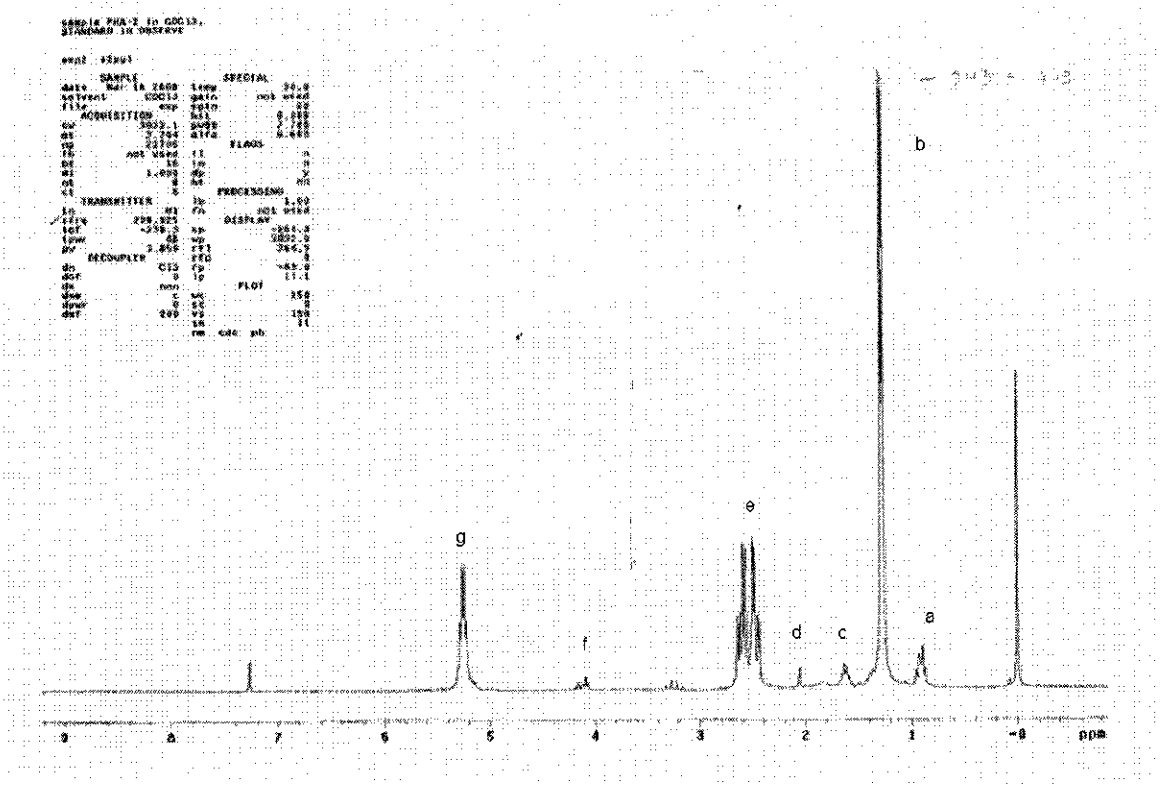
ตารางที่ 3.8 ตำแหน่งคาร์บอนจากสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-NZT6

พีค	Chemical shift (ppm)	ตำแหน่งคาร์บอนของหมู่
a	20	$-CH_3$
b	40	$-CH_2-$
c	67	CH
d	169	-COO-

จาก Chemical shift ที่พบใน PHA-NZT6 นี้ สามารถบอกได้ว่าตัวอย่างนี้มีโครงสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทชนิดพอลิ-3ไฮดรอกซีบิวทิเรท P(3HB) และพอลิ-4ไฮดรอกซีบิวทิเรท P(4HB) อยู่

ข. ตัวอย่าง PHA-S2-3-2

สเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-S2-3-2 แสดงในรูปที่ 3.14 โดยพบพีคที่ chemical shift ต่างๆ ดังรวบรวมในตารางที่ 3.9

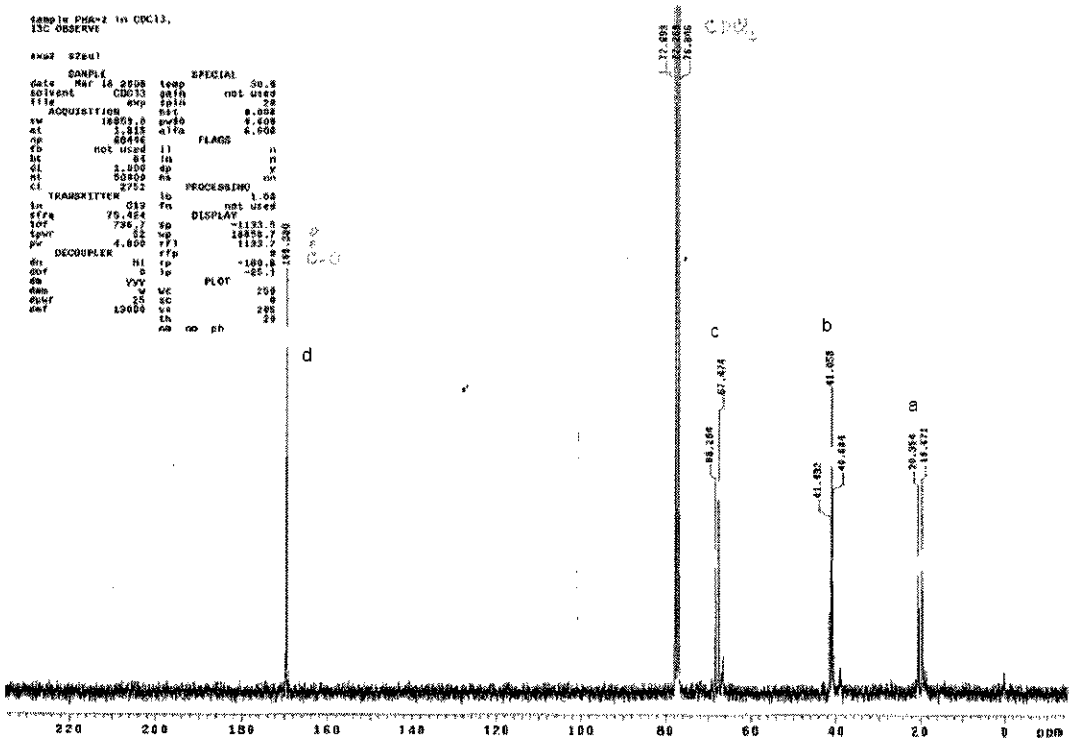


รูปที่ 3.14 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-S2-3-2

ตารางที่ 3.9 ตำแหน่งโปรตอนจากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-S2-3-2

พีค	Chemical shift (ppm)	ตำแหน่งโปรตอนของหมู่
a	0.89	$-CH_3$ (ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2$-)
b	1.26	$-CH_3$ (ที่ต่อกับหมู่ –CH-)
c	1.62	$-CH_2$- (ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2$- และ$-CH_3$)
d	2.00	$-CH_2$-(ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2$- และ$-CH_2$)
e	2.56	$-CH_2$-(ที่ต่อกับหมู่ –CH- และ–C=O)
f	4.08	$-CH_2$-(ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2$- และ -O)
g	5.27	–CH- (ที่ต่อกับหมู่ -O)

สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-S2-3-2 แสดงในรูปที่ 3.15 โดยพบพีคที่ chemical shift ต่าง ๆ ดังรวบรวมในตารางที่ 3.10



รูปที่ 3.15 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-S2-3-2

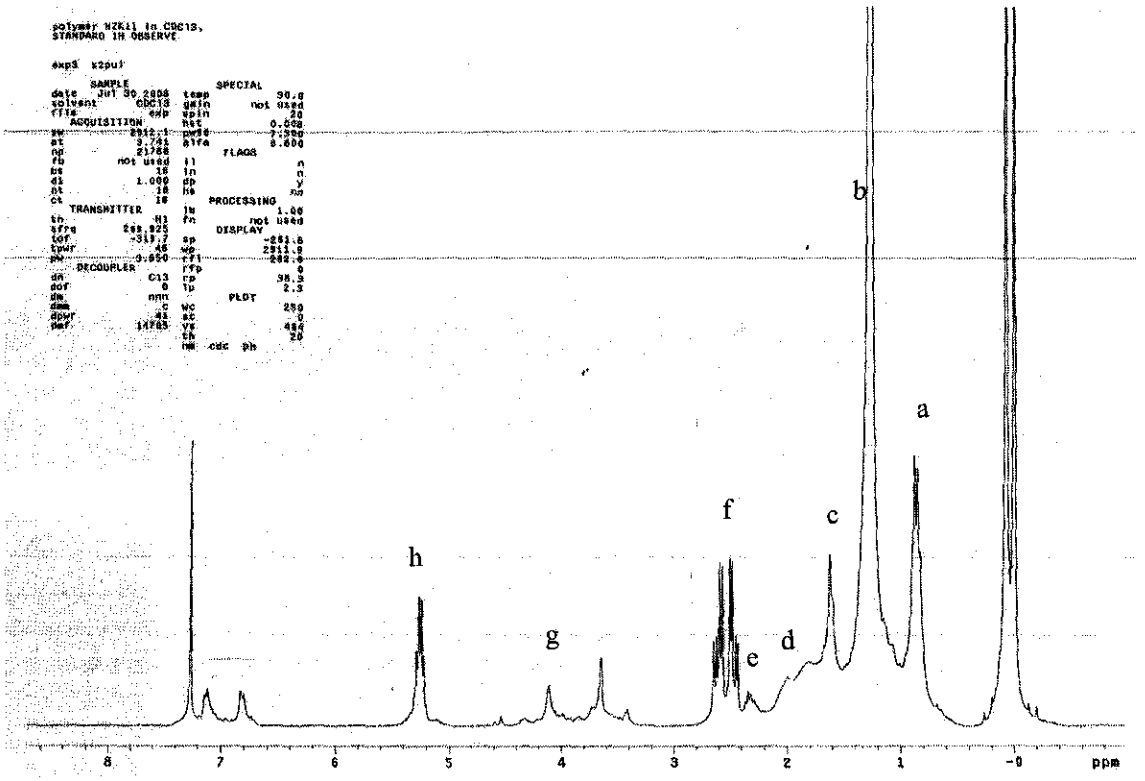
ตารางที่ 3.10 ตำแหน่งคาร์บอนจากสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-S2-3-2

พีค	Chemical shift (ppm)	ตำแหน่งคาร์บอนของหมู่
a	20	$-CH_3$
b	40	$-CH_2-$
c	67	CH
d	169	-COO-

จาก chemical shift ที่พบใน PHA-S2-3-2 นี้ สามารถบอกได้ว่าตัวอย่างนี้มีโครงสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทชนิดพอลิ-3ไฮดรอกซีบิวทิเรท P(3HB) และพอลิไฮดรอกเฮกซาโนเอท P(HH) อยู่

ค. ตัวอย่าง PHA-NZK11

สเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-NZK11 แสดงในรูปที่ 3.16 โดยพบพีคที่ chemical shift ต่าง ๆ ดังรวบรวมในตารางที่ 3.11

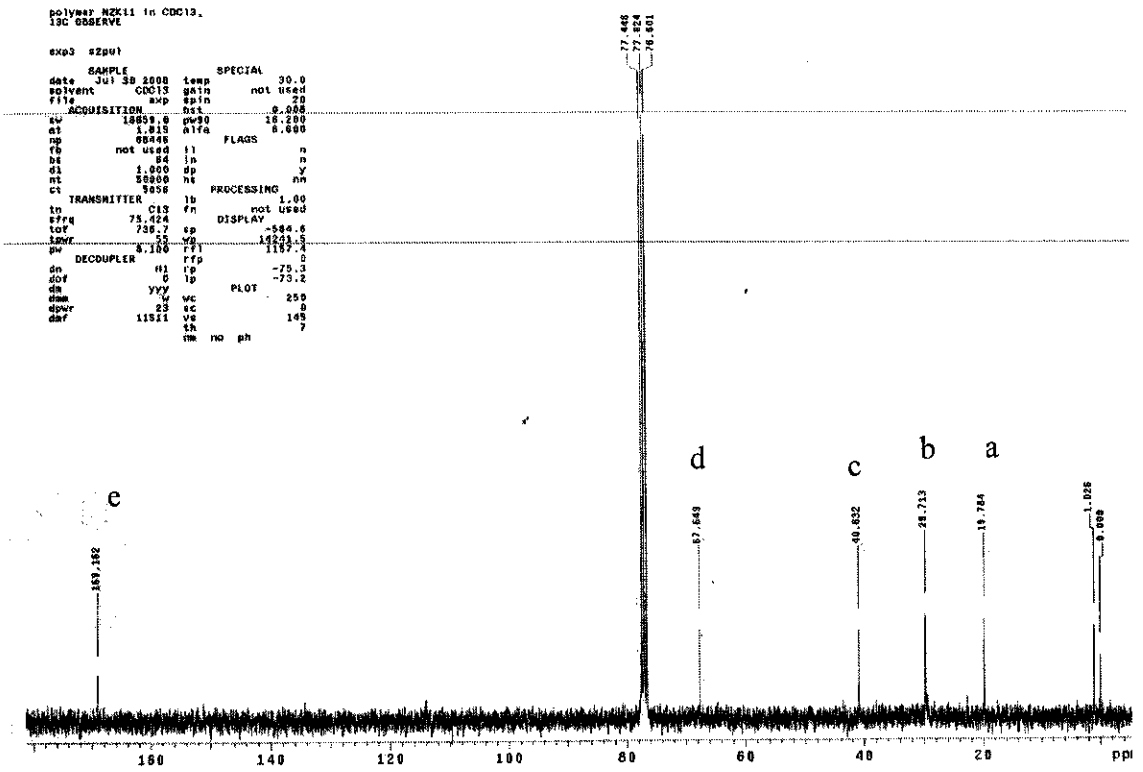


รูปที่ 3.16 สเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-NZK11

ตารางที่ 3.11 ตำแหน่งโปรตอนจากสเปกตรัม ^{1}H NMR ของ PHA-NZK11

พีค	Chemical shift (ppm)	ตำแหน่งโปรตอนของหมู่
a	0.85	$-CH_3$ (ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2$-)
b	1.26	$-CH_3$ (ที่ต่อกับหมู่ –CH-)
c	1.62	$-CH_2$- (ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2$- และ$-CH_3$)
d	2.00	$-CH_2$-(ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2$- และ$-CH_2$)
e	2.2	$-CH_2$-(ที่ต่อกับหมู่ –CH- และ–C=O)
f	2.5	$-CH_2$- (ที่ต่อกับหมู่ –CH- และ–C=O)
g	4.08	$-CH_2$-(ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2$- และ -O-)
h	5.27	–CH- (ที่ต่อกับหมู่ –O-)

สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-NZK11 แสดงในรูปที่ 3.17 โดยพบพีคที่ chemical shift ต่างๆ ดังรวบรวมในตารางที่ 3.12



รูปที่ 3.17 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-NZK11

ตารางที่ 3.12 ตำแหน่งคาร์บอนจากสเปกตรัม ^{13}C NMR ของ PHA-NZK11

พีค	Chemical shift (ppm)	ตำแหน่งคาร์บอนของหมู่
a	20	$-CH_3$
b	29	$-CH_2$-(ที่ต่อกับหมู่ $-CH_2$- และ$-CH_2$)
c	40	$-CH_2$-
d	67	- CH -
e	169	-COO-

จาก chemical shift ที่พบใน PHA-NZK11 นี้ สามารถบอกได้ว่าตัวอย่างนี้มีโครงสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทชนิดพอลิ-3ไฮดรอกซีบิวทิเรท P(3HB) และพอลิ-4ไฮดรอกซีบิวทิเรท P(4HB) อยู่

ง. ตัวอย่าง PHA-NZF17

จากสเปกตรัม ^{1}H NMR และสเปกตรัม ^{13}C NMR แสดง chemical shift ที่บ่งบอกว่าตัวอย่างนี้มีโครงสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทชนิดพอลิ-3ไฮดรอกซีบิวทิเรท P(3HB) และพอลิ-4ไฮดรอกซีบิวทิเรท P(4HB) อยู่

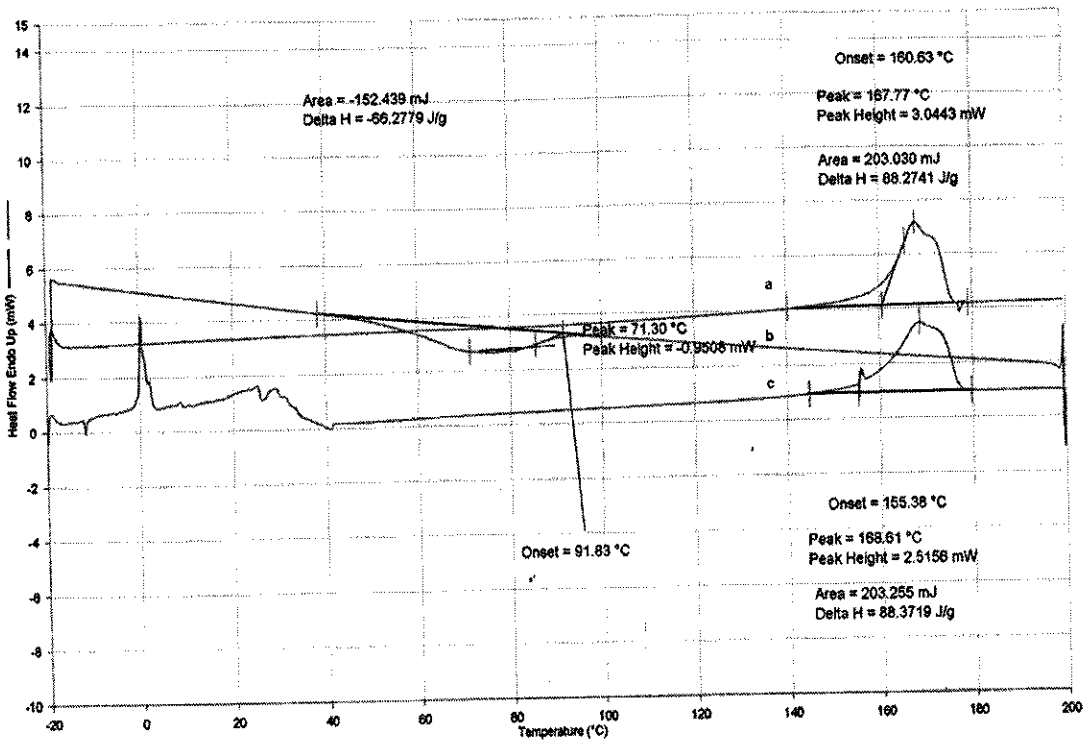
3.1.2.2 สมบัติทางความร้อนของพอลิเมอร์

เทอร์โมแกรม DSC ของ PHA-NZT6 แสดงดังรูปที่ 3.18 เมื่อให้ความร้อน first run พบพีค endotherm ที่กว้าง ซึ่งแสดงถึงอุณหภูมิหลอม (T_m) ของผลึกพอลิเมอร์ โดยแสดงตำแหน่งยอดของพีคที่ 167.7 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ไม่พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่บ่งบอกถึงอุณหภูมิทรานสิชันแก้ว (T_g) เมื่อทำให้เย็นลง พบพีค exotherm ที่กว้างเช่นกัน ซึ่งแสดงถึงอุณหภูมิการเกิดผลึก (T_c) ของพอลิเมอร์โดยแสดงตำแหน่งยอดของพีคที่ 71.3 องศาเซลเซียส เมื่อให้ความร้อนอีกครั้ง (second run) พบ T_m เป็นช่วงกว้างโดยมียอดของพีคที่ 168.6 องศาเซลเซียส โดยเป็นช่วงเดียวกับ first run เป็นการยืนยันอุณหภูมิหลอมของ PHA-NZT6

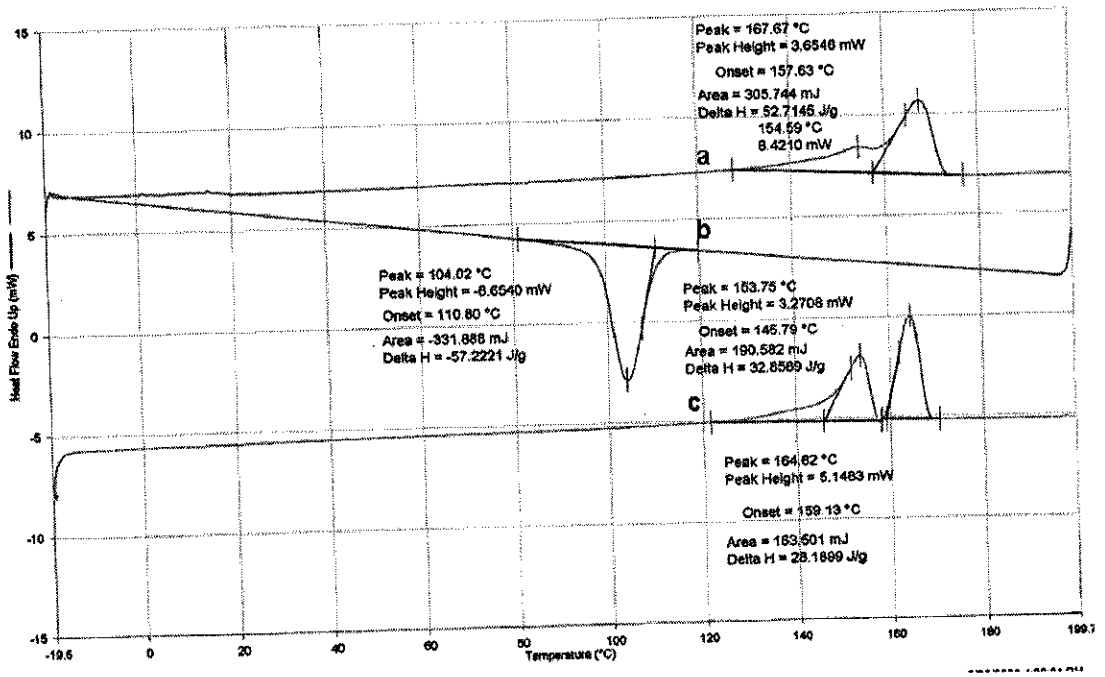
รูปที่ 3.19 แสดงเทอร์โมแกรม DSC ของ PHA-S2-3-2 เมื่อให้ความร้อน first run พบพีค endotherm ที่มีไหล่พีค ซึ่งแสดงถึงอุณหภูมิหลอม (T_m) ของผลึกพอลิเมอร์ โดยแสดงตำแหน่งไหล่พีคที่ 154.6 องศาเซลเซียส และยอดของพีคที่ 167.7 องศาเซลเซียส โดยไม่พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่บ่งบอกถึงอุณหภูมิทรานสิชันแก้ว (T_g) เมื่อทำให้เย็นลง พบพีค exotherm ที่กว้างเช่นกัน ซึ่งแสดงถึงอุณหภูมิการเกิดผลึก (T_c) ของพอลิเมอร์โดยแสดงตำแหน่งยอดของพีคที่ 104.0 องศาเซลเซียส เมื่อให้ความร้อน second run พบพีค endotherm สองพีค โดยมียอดของพีคที่ 153.8 องศาเซลเซียส และ 164.6 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ first run ชี้ให้เห็นว่า พอลิเมอร์นี้มีอุณหภูมิหลอมสองค่าซึ่งภายใต้การให้ความร้อนและการเกิดผลึก ทำให้ผลึกมีความสมบูรณ์ขึ้นจนแยกเป็นสองพีคอย่างชัดเจน

ผลการทดสอบด้วยเทคนิค DSC ของ PHAs ที่เตรียม ถูกรวบรวมในตารางที่ 3.13 จะเห็นได้ว่า PHAs ที่เตรียมจากจุลินทรีย์ต่างๆ กัน มีสมบัติทางความร้อนแตกต่างกัน โดย PHAs ที่เตรียมได้มีจุดหลอมเหลวที่สูงใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลวของพอลิเอทิลีน ~139 องศาเซลเซียส และพอลิโพรพิลีนชนิดไอโซแทกติก ~171 องศาเซลเซียส (Sperling, 1992) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากปิโตรเคมีที่มีการใช้งานอยู่ทั่วไป และจากงานวิจัยที่มีมาก่อน จุดหลอมเหลวของ P(3HB) มีค่าเท่ากับ 165 องศาเซลเซียส (Xie and Chen, 2008)

อย่างไรก็ตาม สารที่เตรียมได้จากจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ เช่น NZF1, NZK12 และ CZC49 ไม่แสดงอุณหภูมิ T_m และ T_g ในช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา เมื่อนำสารจากเชื้อทั้งสามนี้ทดสอบด้วยเทคนิค TGA พบว่าน้ำหนักของสารลดลง (weight loss) โดยเริ่มลดลงตั้งแต่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส บ่งชี้ว่าสารมีการเสื่อมสลาย (degrade) ซึ่งอาจเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่า T_m จึงไม่พบ T_m เมื่อทดสอบ DSC



รูปที่ 3.18 เทอร์โมแกรม DSC ของ PHA-NZT6 ที่ผ่าน (a) การให้ความร้อนครั้งที่ 1 (first run) (b) การทำให้เย็นตัว และ (c) การให้ความร้อนครั้งที่ 2 (second run)



รูปที่ 3.19 เทอร์โมแกรม DSC ของ PHA-S2-3-2 ที่ผ่าน (a) การให้ความร้อนครั้งที่ 1 (first run) (b) การทำให้เย็นตัว และ (c) การให้ความร้อนครั้งที่ 2 (second run)

ตารางที่ 3.13 ลักษณะเฉพาะของ PHAs ที่ผลิตได้

PHAs	$\overline{M}_w$ (x10^{5}g/mol)	$\overline{M}_n$ (x10^{5}g/mol)	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	T_g (°C)	1st run T_m (°C)	2nd run T_m (°C)	T_c (°C)
NZT6	2.98	0.83	3.59	-	167.7	168.6	71.3
S2-3-2	15.38	0.06	13.17	-	154.6, 167.7	153.8, 164.6	104.0
NZF1	<0.01	-	-	-	-	-	N/A
NZF17	<0.01	-	-	~58	-	156.1, 165.4	80.0
NZT9	>19.60	-	-	-	171.07	167.55	60.59
NZT13	-	-	-	~58	หลายพีค ช่วงกว้าง ~110-170	-	-
NZK12	8.13	7.35	1.11	-	-	-	N/A
NZK39	3.39	2.02	1.68	29.12	-	150.99	-
CZW15	<0.01	-	-	-	-	-	-

N/A: ทำการเย็นตัวแบบธรรมชาติ

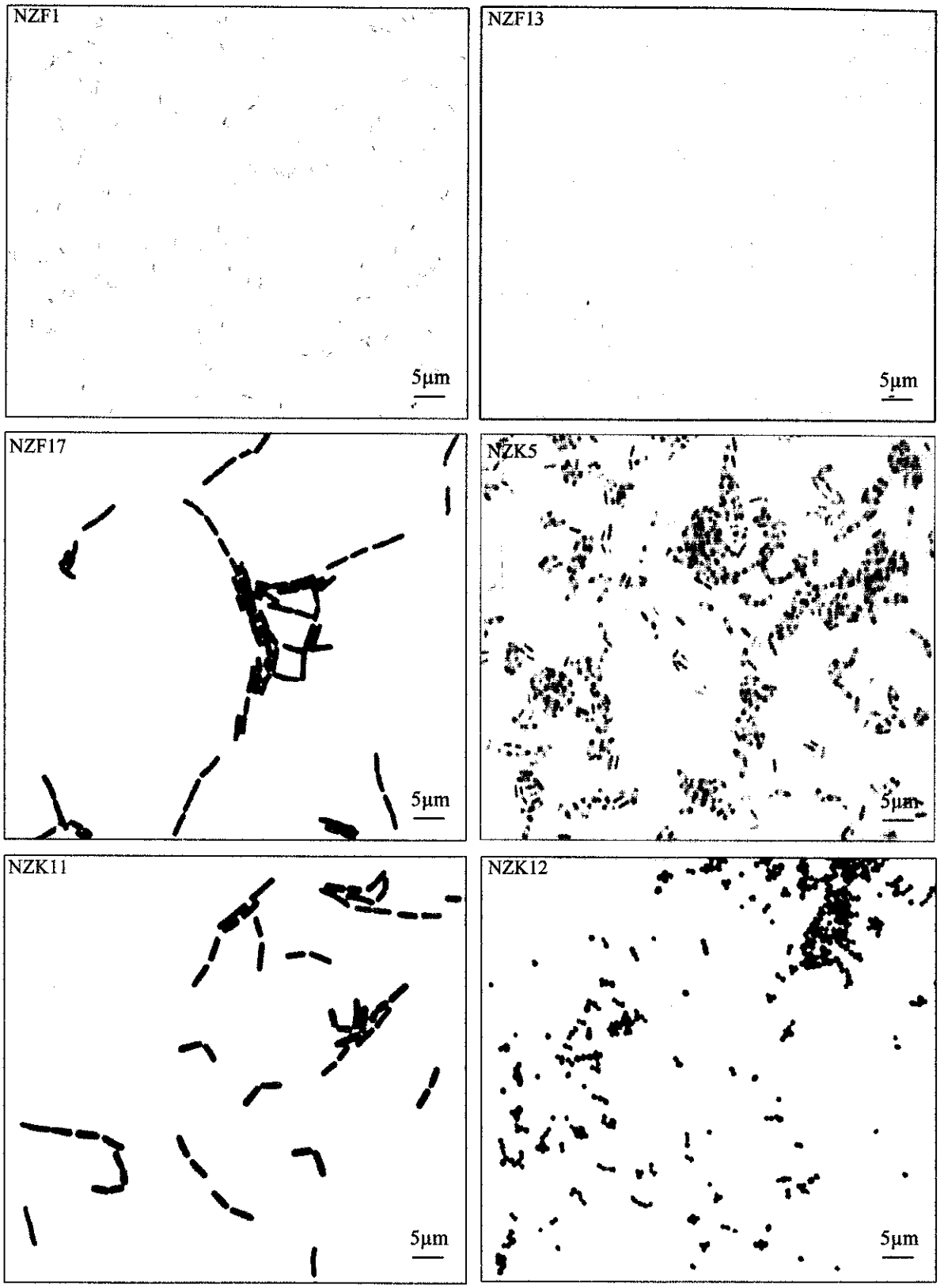
- : ปริมาณสารน้อยไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ในขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อ

3.1.2.3 น้ำหนักโมเลกุลและการกระจายตัว

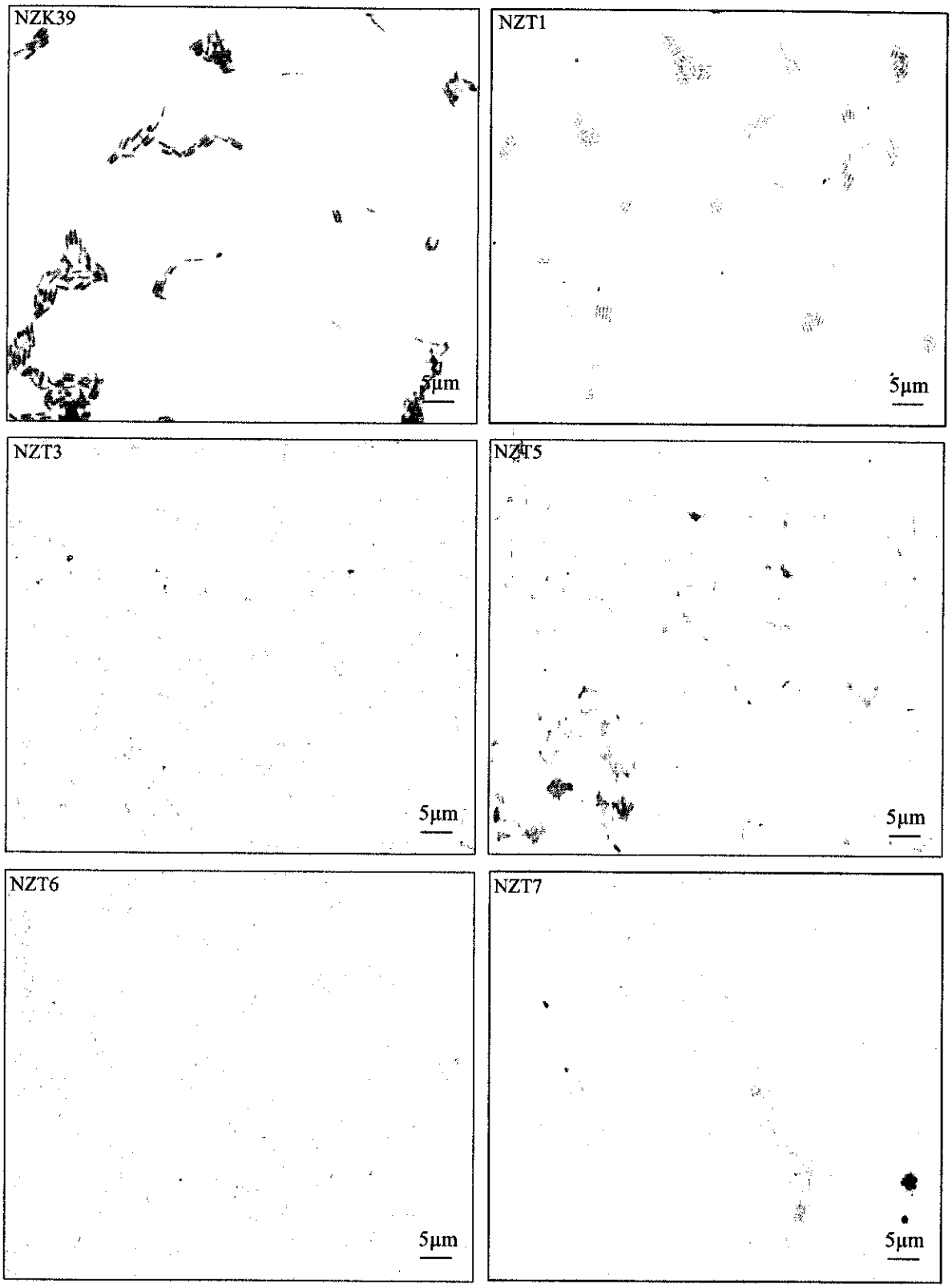
จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GPC สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก ($\overline{M}_w$) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน ($\overline{M}_n$) และการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$) ของ PHA ที่เตรียมได้ ดังรวบรวมในตารางที่ 3.13 อย่างไรก็ตาม จาก GPC โครมาโตแกรมที่ได้ พบช่วงพีคที่แสดงว่ามีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 19.6×10^5 กรัมต่อโมล ในหลายตัวอย่างโดยไม่ได้นำมาใช้คำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย ทั้งนี้เพราะอยู่นอกขอบเขตความน่าเชื่อถือและลักษณะการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลมีค่าเป็นช่วง (bimodal, trimodal เป็นต้น) ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวคาดว่าสัมพันธ์กับกลไกการพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization) และการดีพอลิเมอไรเซชัน (Depolymerization) ของจุลินทรีย์

3.1.3 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสาร PHAs

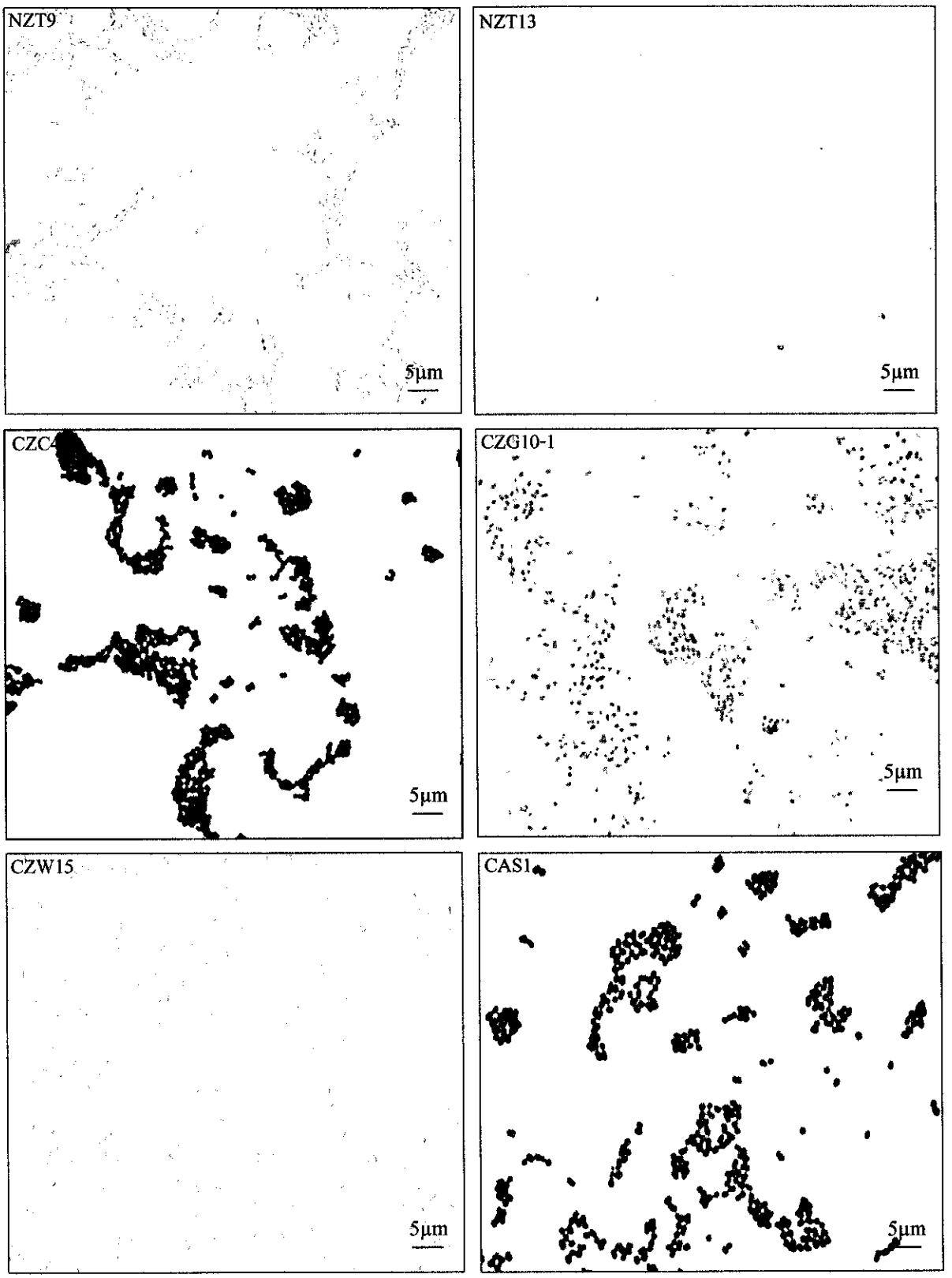
จากที่ได้ทดสอบความสามารถในการใช้แป้งและน้ำตาลจากอ้อยของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสาร PHAs ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่ยังไม่ได้ระบุชนิดที่แน่นอนมาวิเคราะห์ชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานและสมบัติทางชีวเคมีพร้อมทั้งใช้ชุดทดสอบ API Identification System (bioMérieux) จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเซลล์ด้วยการย้อมสีเซลล์แบบแกรม แบคทีเรียที่คัดเลือกมีทั้งแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเซลล์เป็นท่อน และแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์เป็นท่อนและรูปร่างเซลล์กลม (รูปที่ 3.20 และตารางที่ 3.15) มีสมบัติทางชีวเคมีที่สามารถระบุชนิดได้ดังผลการทดสอบที่แสดงในรูปที่ 3.21-3.25 และ ตารางที่ 3.14 ผลการวิเคราะห์ชนิดด้วยลักษณะและสมบัติดังกล่าวข้างต้นพบว่าแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิต PHAs ที่คัดเลือกได้ จัดอยู่ในสกุลต่างๆ (ตารางที่ 3.15) โดยสรุปดังนี้ *Aeromonas* (แนวโน้มเป็น *Aeromonas hydrophila* หลายสายพันธุ์), *Bacillus (Bacillus cereus* และ *Bacillus megaterium*), *Enterobacter* (แนวโน้มเป็น *Enterobacter cloacae*), *Escherichia* (*Escherichia coli* หลายสายพันธุ์), *Chryseobacterium* (*Chryseobacterium luteola* และ *Chryseobacterium* sp.), *Klebsiella* (แนวโน้มเป็น *Klebsiella planticola*), *Proteus* และ *Staphylococcus* (*Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus* sp. และ *Staphylococcus xylosus*) ไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดเลือกที่สามารถระบุสกุลได้เหล่านี้หลายไอโซเลทโดยเฉพาะอย่างยิ่ง NZT3, NZT6, NZT7 และ NZT9 (ตารางที่ 3.15) ที่ยังคงต้องศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยาและเคมีเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลของชื่อสกุลที่ระบุ และควรศึกษาในเชิงลึกถึงสารพันธุกรรมเพื่อให้สามารถระบุชนิดและ/หรือสายพันธุ์ที่แน่นอนได้ นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอีกหลายไอโซเลทที่ยังไม่สามารถระบุสกุลได้จากข้อมูลที่ได้ศึกษาแล้ว (ตารางที่ 3.14) ได้แก่ ไอโซเลท NZF17, NZF20, NZK5, NZK39, NZT1, NZT5, CZW8, S2-24, S2-12, S2-3-2 และ CAS23 เป็นต้น จำเป็นต้องมีการศึกษาในเชิงลึกถึงสารพันธุกรรมและสมบัติทางสรีรวิทยาและเคมีเพิ่มเติมต่อไป แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งของเชื้อตามธรรมชาติในประเทศไทยไอโซเลทเหล่านี้อาจเป็นสกุลและ/หรือชนิดใหม่



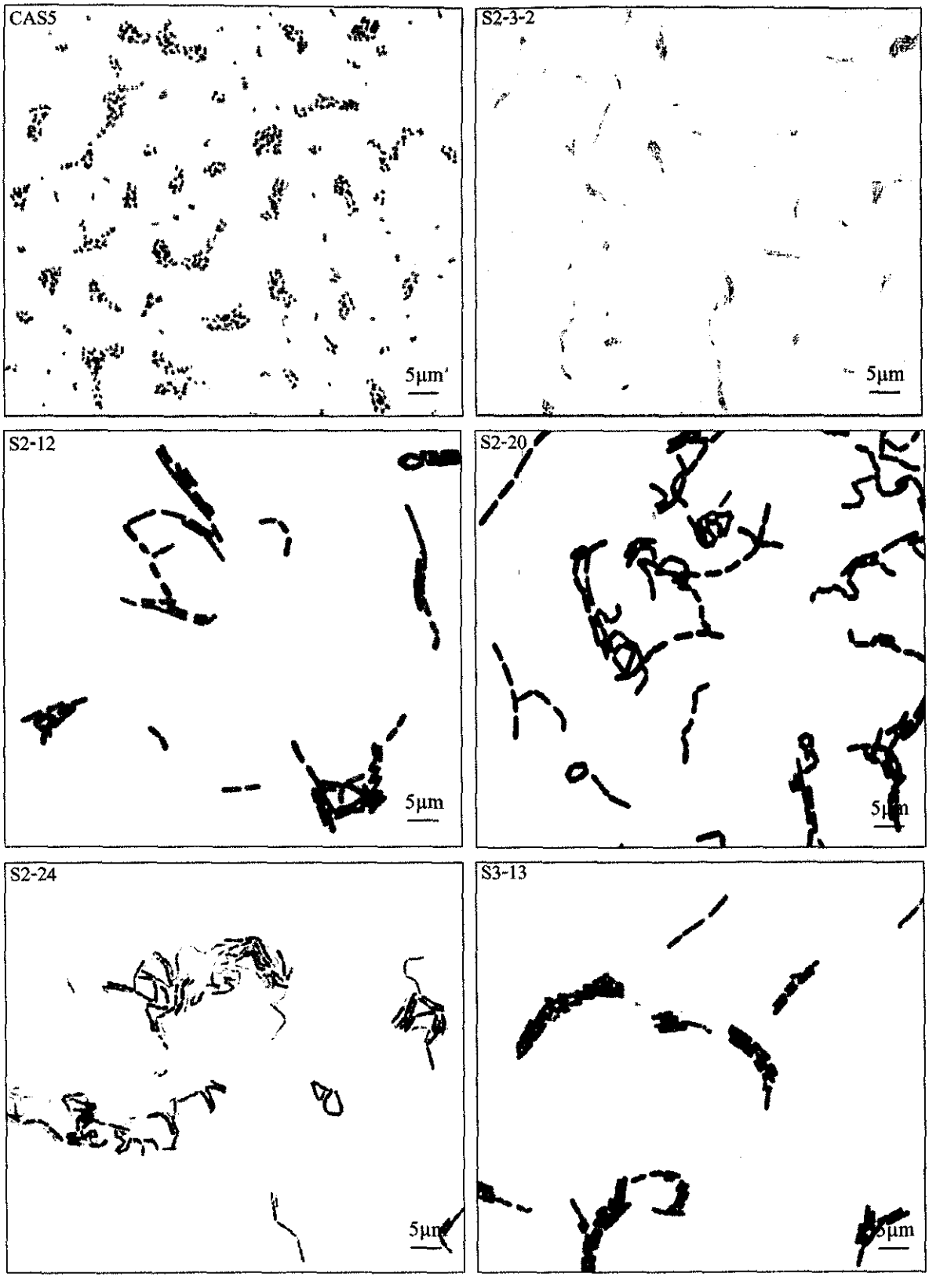
รูปที่ 3.20 ตัวอย่างรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ของแบคทีเรียที่ผลิต PHAs (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียแบบ Gram stain และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1,000 เท่า)



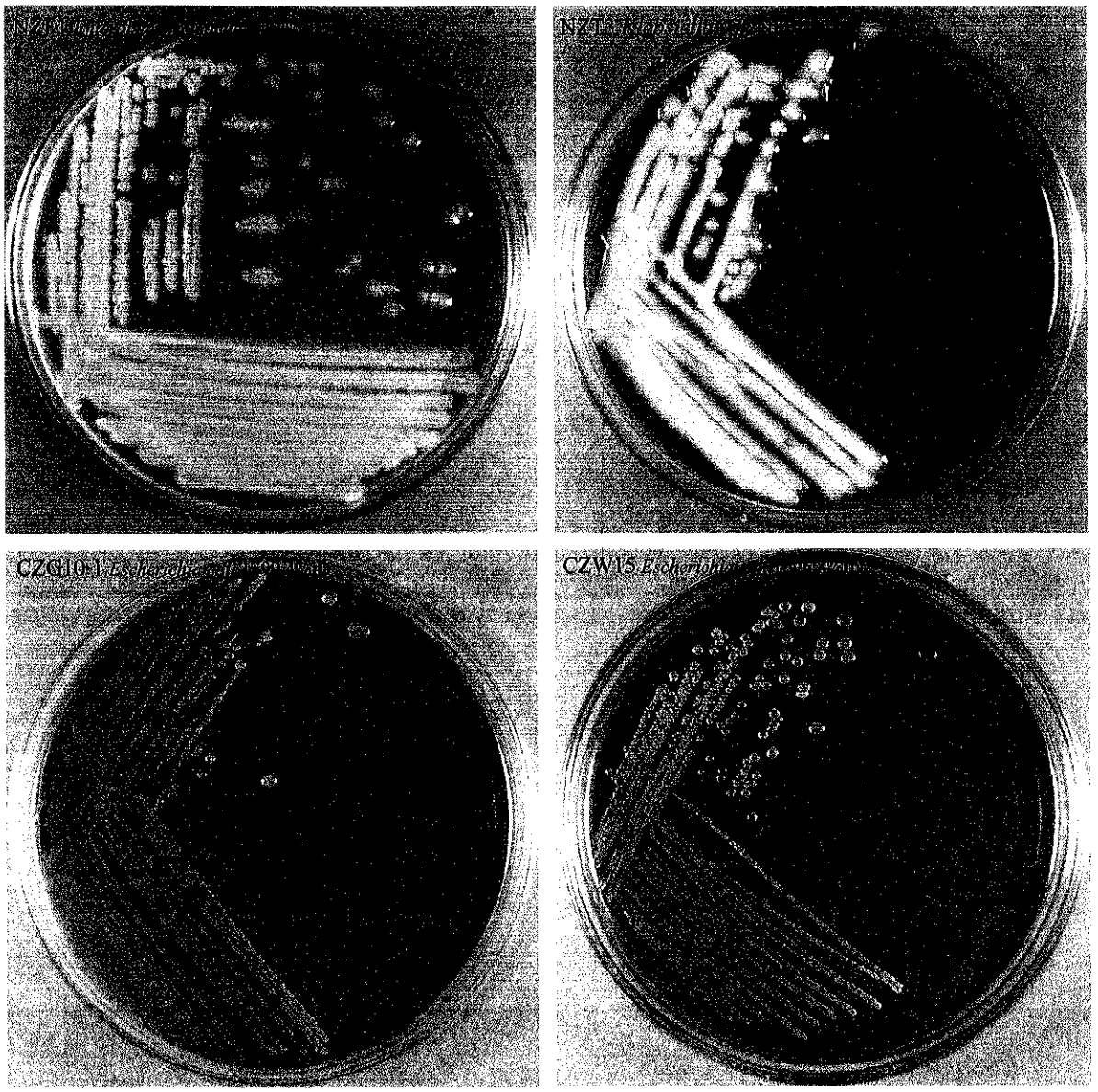
รูปที่ 3.20 ตัวอย่างรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ของแบคทีเรียที่ผลิต PHAs (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรีย (ต่อ) แบบ Gram stain และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1,000 เท่า)



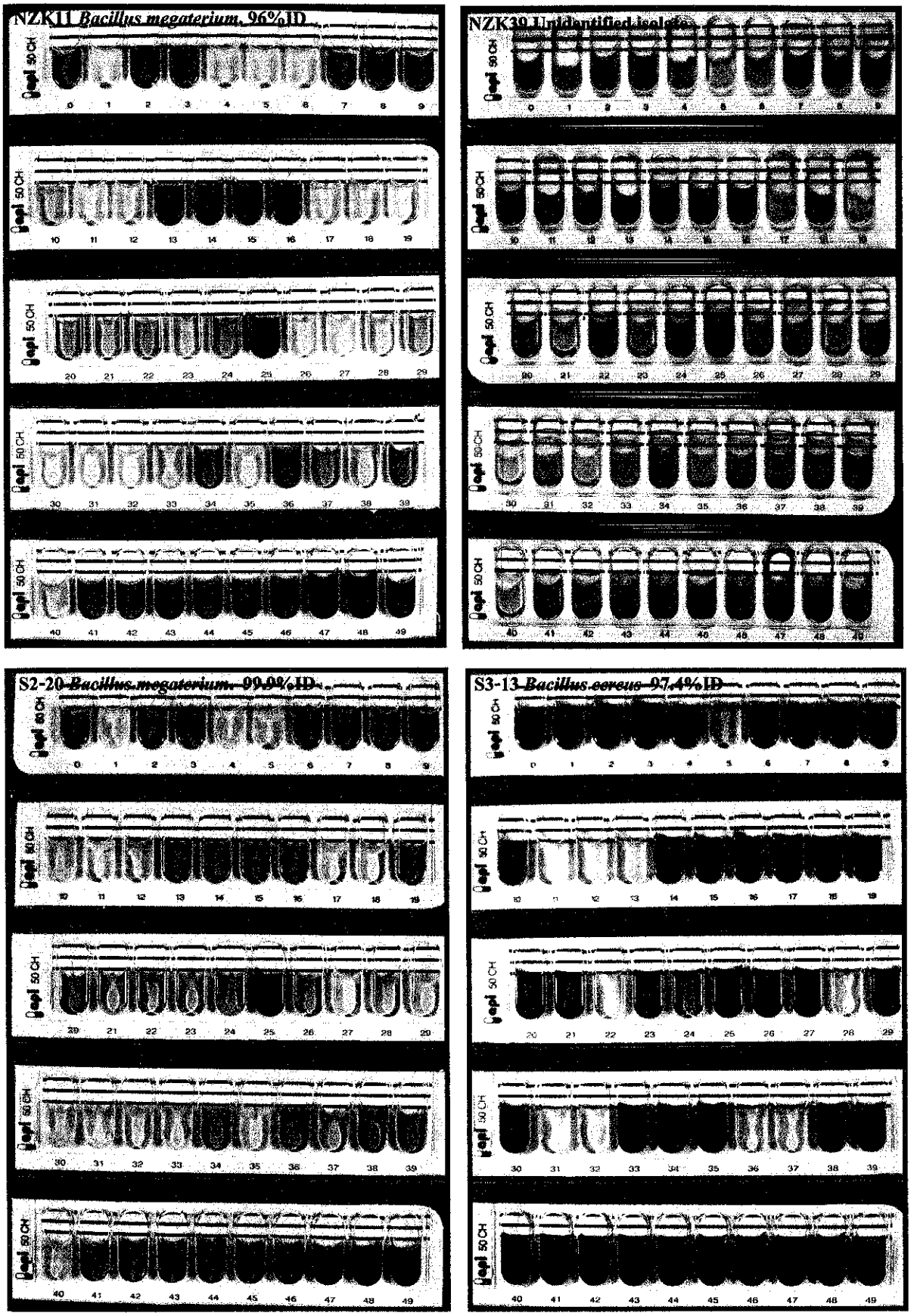
รูปที่ 3.20 ตัวอย่างรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ของแบคทีเรียที่ผลิต PHAs (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรีย (ต่อ) แบบ Gram stain และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1,000 เท่า)



รูปที่ 3.20 ตัวอย่างรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ของแบคทีเรียที่ผลิต PHAs (ย้อมสีเซลล์แบคทีเรีย (ต่อ) แบบ Gram stain และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1,000 เท่า)



รูปที่ 3.21 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MacConkey agar จากการวิเคราะห์ชนิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสาร PHAs



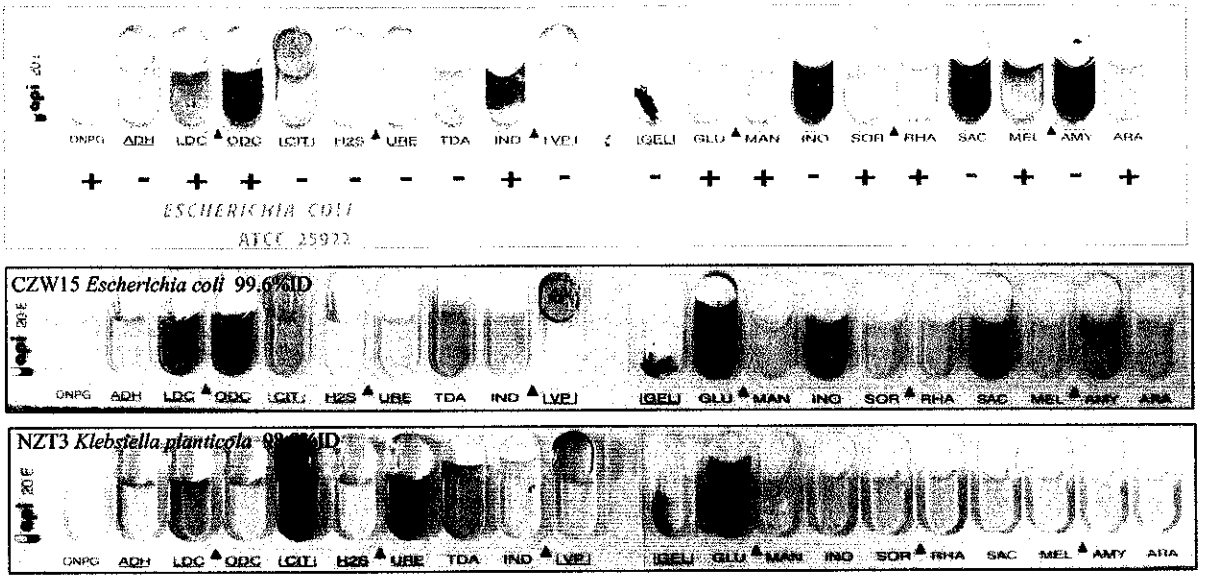
รูปที่ 3.22 ตัวอย่างผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีตามระบบ API 50CH/CHB (bioMérieux) ของแบคทีเรียที่สามารถสร้างสาร PHAs ผลบวกสังเกตจากสีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ยกเว้นหลอดที่ 25 เปลี่ยนเป็นสีดำ

ตารางที่ 3.14 ผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ที่มีศักยภาพในการผลิต PHAs เปรียบเทียบไอโซเลทของแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์เป็นท่อนที่สามารถระบุชนิดได้ 1 ไอโซเลท และไม่สามารถระบุสกุลและชนิดได้ 3 ไอโซเลท

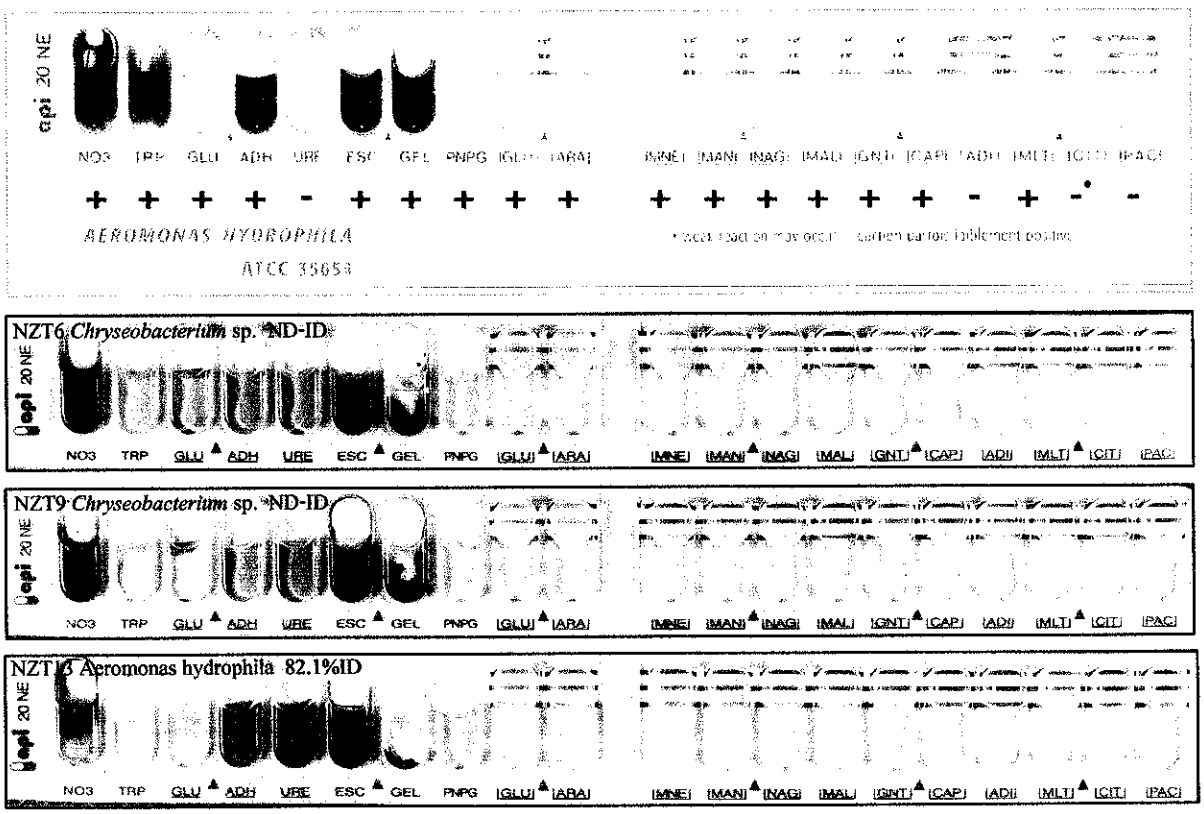
การใช้สารอาหาร/น้ำตาล	ผลการทดสอบแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือก			
	NZF17 (Unidentified)	**NZK11** (*Bacillus megaterium*)	**NZK39** (Unidentified)	**NZT1** (Unidentified)
Glycerol	-	-	+	-
Erythritol	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-
L-Arabinose	-	+	+	-
D-Ribose	+	-	+	+
D-Xylose	-	+	-	-
L-Xylose	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-
Methyl-βD-xylopyranoside	-	-	-	-
D-Galactose	-	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	-
D-Fructose	+	+	+	-
D-Mannose	-	-	+	-
L-Sorbose	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	+	-
D-Manitol	-	+	+	-
D-Sorbitol	-	+	+	-
Methyl-αD-mannopyranoside	-	-	-	-
Methyl-αD-glucopyranoside	-	-	-	+
N-Acetylglucosamine	+	+	-	-
Amygdalin	-	-	-	+
Arbutin	+	+	-	-
Esculin ferric citrate	+	+	+	+
Salicin	+	+	-	+

ตารางที่ 3.14 (ต่อ) ผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ที่มีศักยภาพในการผลิต PHAs เปรียบเทียบไอโซเลทของแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์เป็นท่อนที่สามารถระบุชนิดได้ 1 ไอโซเลท และไม่สามารถระบุสกุลและชนิดได้ 3 ไอโซเลท

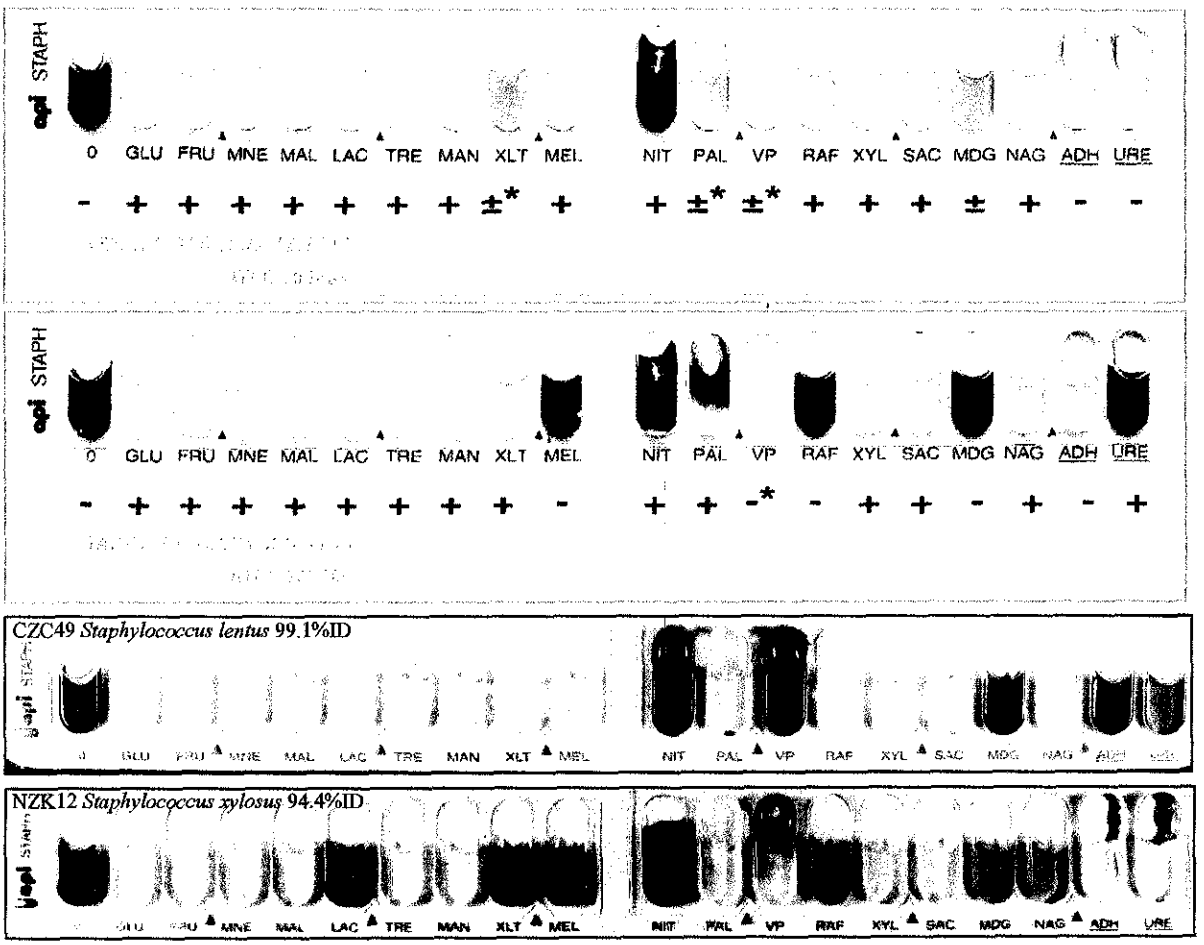
การใช้สารอาหาร/น้ำตาล	ผลการทดสอบแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือก			
	NZF17 (Unidentified)	**NZK11** (*Bacillus megaterium*)	**NZK39** (Unidentified)	**NZT1** (Unidentified)
D-Cellobiose	-	-	+	-
D-maltose	+	+	+	+
D-Lactose (Bovine origin)	-	-	-	-
D-Melibiose	-	+	-	+
D-Saccharose (Sucrose)	+	+	+	+
D-Treharose	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	+
D-Melizitose	-	-	-	-
D-Raffinose	-	+	+	+
Amidon (Starch)	+	+	+	-
Glycogen	+	+	+	+
Xylitol	-	-	-	-
Gentiobiose	-	+	-	-
D-Turanose	-	-	-	+
D-Lyxose	-	-	-	-
D-Tagalose	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-
Potassium gluconate	-	-	-	-
Potassium 2-ketogluconate	-	-	-	-
Potassium 5-ketoGluconate	-	-	-	-



รูปที่ 3.23 ตัวอย่างผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ชนิดที่สามารถสร้างสาร PHAs ด้วยระบบ API 20E (bioMérieux)



รูปที่ 3.24 ตัวอย่างผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียชนิดที่สามารถสร้างสาร PHAs ด้วยระบบ API 20NE (bioMérieux)



รูปที่ 3.25 ตัวอย่างผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์กลม ชนิดที่สามารถสร้างสาร PHAs ด้วยระบบ API STAPH (bioMérieux)

ตารางที่ 3.15 ผลการระบุชนิดของแบคทีเรียไอโซเลทที่คัดเลือกเพื่อศึกษาความสามารถในการสร้าง PHAs

รหัสไอโซเลท	ผลการระบุชนิด	API Database (bioMérieux)		
		% ความเหมือน	สายพันธุ์อ้างอิง	Significant texa
Gram-negative rods				
NZF1	*Enterobacter* sp.	63.7	*Enterobacter cloacae*	Good identification
NZF13	*Chryseomonas luteola*	99.7	*Chryseomonas luteola*	Good identification
NZT3	*Klebsiella* sp.	98.0	*Klebsiella planticola*	Doubtful profile
NZT6	*Chryseobacterium* sp.	ND	*Chryseobacterium indologenes*	Unacceptable profile
NZT7	*Proteus* sp.	ND	*Proteus mirabilis*	Unacceptable profile
NZT9	*Chryseobacterium* sp.	ND	*Chryseobacterium indologenes*	Unacceptable profile
NZT13	*Aeromonas* sp.	82.1	*Aeromonas hydrophila*	Low discrimination
CZG10-1	*Escherichia coli*	99.4	*Escherichia coli* 1	Doubtful profile
CZW15	*Escherichia coli*	99.6	*Escherichia coli* 1	Very good identification
Gram-positive rods				
NZK11	*Bacillus megaterium*	99.6	*Bacillus megaterium* 2	Very good identification
S2-20	*Bacillus megaterium*	99.9	*Bacillus megaterium* 2	Very good identification
S3-13	*Bacillus cereus*	97.4	*Bacillus cereus* 1	Good identification
Gram-positive cocci				
NZK12	*Staphylococcus xylosus*	94.4	*Staphylococcus xylosus*	Good identification
NZR1	*Staphylococcus* sp.	85.3	*Staphylococcus simulans*	Acceptable identification
CZC49	*Staphylococcus lentus*	99.1	*Staphylococcus lentus*	Doubtful profile
		86.7	*Staphylococcus xylosus*	Acceptable profile
CAS1	*Micrococcus* sp.	ND	*Micrococcus* sp.	Unacceptable profile
CAS5	*Staphylococcus lentus*	97.5	*Staphylococcus lentus*	Good identification

ND = ไม่มีข้อมูลแสดง (No data shown) จาก API Database (bioMérieux)

3.2. การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสาร PHAs ด้วยวิธีการทางกายภาพและทางเคมี

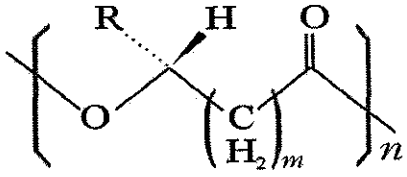
3.2.1 การศึกษากรรมวิธีการสกัดสาร PHAs จากข้อมูลวิจัย

ศึกษากรรมวิธีการสกัดสาร PHAs จากข้อมูลวิจัยที่ผ่านมาทั้งในวารสารวิชาการและสิทธิบัตรที่ยื่นจดไว้แล้วทั้งภายในประเทศและในต่างประเทศ ซึ่งผลการศึกษาประกอบด้วยข้อมูลหลักดังต่อไปนี้

3.2.1.1 ข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญต่อการสกัดสาร PHAs

ก. ชนิดของพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates, PHAs)

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates; PHAs) คือ สารที่เกิดจากกรดไฮดรอกซีแอลคาโนอิก (Hydroxyalkanoic acid; HA) หลายโมเลกุลมาต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเอสเทอร์ ถูกผลิตขึ้น และเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งสะสมไว้ในไซโตพลาสซึมของเซลล์โดยที่ PHAs นี้ทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารและพลังงานของเซลล์ ซึ่ง PHAs ในทางธรรมชาติได้จากกระบวนการหมัก โดยอาศัยแหล่งอาหารที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ เช่น น้ำตาล กรดอินทรีย์ น้ำมันจากพืช และคาร์บอนไดออกไซด์ (Tsuge, 2002) โครงสร้างทั่วไปของ PHAs ดังแสดงในรูปที่ 3.26



โดยที่ n มีตั้งแต่ 100 -30,000 โมโนเมอร์

m = 1	R = hydrogen	poly (-3-hydroxypropionate)
	R = methyl	poly (-3-hydroxybutyrate)
	R = ethyl	poly (3-horoxyvalerate)
	R = propyl	poly (-3-hydroxyhexanoate)
	R = pentyl	poly (-3-hydroxyoctanoate)
	R = nonyl	poly (-3-hydroxydodecanoate)
m = 2	R = hydrogen	poly (-4-hydroxybutyrate)
m = 3	R = hydrogen	poly (-5-hydroxyvalerate)

รูปที่ 3.26 โครงสร้างทั่วไปของ PHAs

ที่มา: Park *et al.* (2007); Ojumu *et al.* (2004)

สมบัติทางกล (Mechanical properties) ของ PHAs ขึ้นอยู่กับชนิดของมอนอเมอร์ และน้ำหนักของโมเลกุล โครงสร้างทั่วไปของ PHAs คือ R-3-Hydroxybutyrate [P(3HB)] ซึ่งเป็นสาร PHAs ที่ค้นพบเป็นชนิดแรก พบการสะสมอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียบางชนิดมากกว่า 80% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และสามารถนำมาอัดขึ้นรูป ปั่นเป็นเส้นใย ทำเป็นฟิล์ม และใช้ผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นเป็นพอลิเมอร์ผสมได้ อีกทั้ง P(3HB) ดังกล่าวมีความแข็ง และเป็นผลึกสูง ทำให้ทนความร้อนได้ดี จึงสามารถใช้ทำบรรจุภัณฑ์ชนิดบรรจุร้อน และใช้ใส่อาหารร้อนได้ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวคล้ายกับพอลิโพรพิลีน (Polypropylenes; PP) แต่อย่างไรก็ตาม P(3HB) มีจุดหลอมเหลวสูงถึง 177 องศาเซลเซียส ในขณะที่ PP มีจุดหลอมเหลวประมาณ 130-160 องศาเซลเซียส ทำให้ P(3HB) ยากต่อการแปรรูป สมบัติของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์โดยวิธีทางชีวภาพเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์โดยวิธีทางเคมี แสดงในตารางที่ 3.16

ตารางที่ 3.16 การเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์โดยวิธีทางชีวภาพและวิธีทางเคมี

Polymer	T_m [a] (°C)	T_g [b] (°C)	**Crystallinity (%)**	**Tensile strength (MPa)**	**Extension to break (%)**
P(3HB)	177	4	60	43	5
Ultra-high-molecular-weight P(3HB) (stretched)	185	4	80	400	35
P(3HB-co-20 mol% 3HV)	145	-1	56	20	50
P(3HB-co- 16 mol% 4HB)	150	-7	45	26	444
P(3HB-co-10 mol% 3HHx)	127	-1	34	21	400
P(3HB-co-6 mol% 3HA)	133	-8	45	17	680
Polypropylene	130-	-10	50-70	38	400
Low-density polyethylene (LDPE)	160 130	-36	20-50	10	620

หมายเหตุ: [a] melting temperature และ [b] glass-transition temperature

ที่มา: Tsuge (2002)

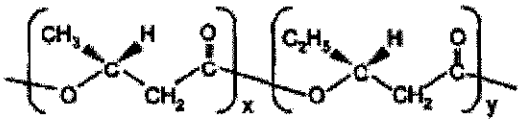
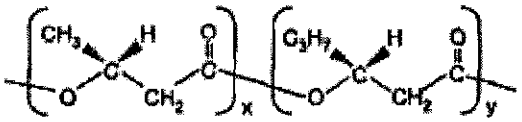
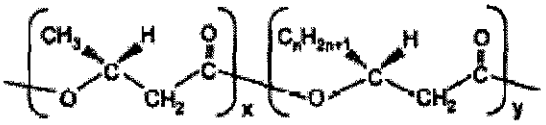
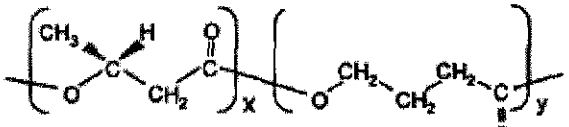
PHAs แบ่งได้ออกเป็น 3 ชนิดหลัก ตามโครงสร้างของมอนอเมอร์ คือ

(1) Short chain length PHAs (scl-PHAs) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยมอนอเมอร์ที่มีจำนวนคาร์บอน 3-5 อะตอม

(2) Medium chain length PHAs (mcl-PHAs) ประกอบด้วยหน่วยมอนอเมอร์ที่มีจำนวนคาร์บอน 6-14 อะตอม

(3) Copolymer ของ scl-Ha และ mcl-HA มอนอเมอร์เป็นการแก้ไขสมบัติทางกายภาพของ P(3HB) เป็นการรวมหน่วยของ HA ต่างๆ เข้ากับ P(3HB) จนกลายเป็น PHA copolymer โดยจุลินทรีย์ที่สามารถรวม copolymer ได้นั้นมีหลายชนิด ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียเช่นกัน ดังตารางที่ 3.17 Copolymer ของ 3-Hydroxybutyrate และ 3-Hydroxyhexanoate (PHB-HH_x) เป็นพอลิเมอร์ที่ถูกสังเคราะห์โดย *Aeromonas cavie* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแรกที่พบว่าสามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ชนิด PHB-HH_x จาก Alkanoic acid และ น้ำมัน (Lu *et al.*, 2003)

ตารางที่ 3.17 ชนิดของจุลินทรีย์และลักษณะของ Copolymer ที่ได้

Bacterial strain	Carbon substrate	Random copolymer
Ralstonia eutropha	**Propionic acid** **Pentatonic acid**	 ***(R)*-3HB** ***(R)*-3HV**
Aeromonas caviae	**Plant oil** **Fatty acid**	 ***(R)*-3HB** ***(R)*-3HHx**
***Pseudomonas* sp. 61-3**	**Sugar**	 ***(R)*-3HB** ***(R)*-3HA (n-3~9)**
Ralstonia eutropha ***Alcaligines latus*** ***Comamonas acidvorans***	**4-Hydroxybutyric acid** **γ-Butyrolactone** **1,4-Butanediol** **1,6-Hexanediol**	 ***(R)*-3HB** **4HB**

ที่มา : Tsuge (2002)

จุลินทรีย์ชนิดเด่นที่มีการรายงานถึงความสามารถในการสร้าง PHAs เป็นแบคทีเรียในสกุล *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Azotobacter* และ *Pseudomonas* (Kunioka *et al.*, 1989; Doi *et al.*, 1990; Lee, 1996; Ojumu and Solomon, 2004; Khanna and Srivastava, 2005) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans* และยังรวมถึง Recombinant *Alcaligenes*

eutrophus (*Ralstoni eutrophus*) และ Recombinant *Escherichia coli* (Lee and Choi, 1998; Groth *et al.*, 1999; Groth and Chisti, 2000) ซึ่งแบคทีเรียที่ผลิต PHAs แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

(1) แบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการสารอาหารที่จำเป็นอื่นๆ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม หรือ กำมะถัน ในการสังเคราะห์ PHAs นอกจากแหล่งคาร์บอน เช่น *Ralstonia eutrophus, Protomonas extorquens* และ *Protomonas oleovorans* เป็นต้น

(2) แบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ต้องการสารอาหารจำเป็นอื่น ๆ นอกจากแหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์ PHAs เนื่องจากมีการสะสม PHAs ในระหว่างการเจริญของเซลล์อยู่แล้ว เช่น *Alcalgenes latus*, *Azotobacter vinelandii* ที่ผ่านการปรับเปลี่ยนพันธุกรรม และ Recombinant *Escherichia coli* (Khanna and Srivastava, 2005)

ข. แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต PHAs โดยแบคทีเรีย

Tsuge (2002) รายงานว่าปัจจุบันมีบริษัทที่ผลิต PHAs ในระดับกลาง โดยใช้แหล่งอาหารคาร์บอน คือ กลูโคส และโพรพิโอเนท อยู่ 2 บริษัท คือ Zeneca Bioproduct และ Monsanto ซึ่งโดยทั่วไปการผลิต PHAs ด้วยวิธีการทางชีวภาพจะมีต้นทุนสูงกว่าการผลิตในทางเคมี แต่ต้นทุนของ PHAs ที่ผลิตด้วยวิธีทางชีวภาพมีแนวโน้มลดลง เมื่อมีการใช้แหล่งอาหารคาร์บอนที่มีราคาถูก ได้แก่

(1) น้ำมันพืช หรือ กรดไขมัน

น้ำมันพืช หรือ กรดไขมัน เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีในการผลิต PHAs เนื่องจากมีราคาถูก ซึ่งเมื่อใช้ butyric acid ในการผลิต ให้ผลผลิตของ PHAs ประมาณ 0.65-0.98 กิโลกรัม/กิโลกรัม ของ butyric acid ซึ่งให้ผลผลิตมากกว่าการใช้กลูโคส ซึ่งได้ PHAs ประมาณ 0.32-0.48 กิโลกรัม/กิโลกรัม ของกลูโคส อย่างไรก็ตามการใช้กรดไขมัน ส่งผลให้อัตราการเจริญของเซลล์อยู่ในระดับต่ำ ทำให้ใช้ระยะเวลาในการหมักที่ยาวนาน

(2) ของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร หรือการเกษตร

ของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร หรือการเกษตรสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และแหล่งอาหารไนโตรเจนที่ราคาถูกได้ เนื่องจากมีสารจำพวกไซโลส แต่การผลิต PHAs จากไซโลสนั้นเกิดได้ช้า เนื่องจากแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs สามารถย่อยไซโลสได้ต่ำ แต่อย่างไรก็ตามไซโลสสามารถเปลี่ยนเป็นกรดแล็กติก และกรดอะซิติก ได้โดยกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศของแบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) จากนั้นกรดแล็กติกและกรดอะซิติกจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHAs ต่อไป ที่เป็นเช่นนี้เพราะแบคทีเรียที่ผลิต PHAs สามารถใช้กรดแล็กติกและกรดอะซิติก ได้ในอัตราที่เร็ว เช่น *Ralstonia eutropha* สามารถที่จะผลิต P(3HB) ได้สูง คือ ประมาณ 1.1-1.3 กรัม/ลิตร ชั่วโมง

(3) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

แบคทีเรียจำพวก Cyanobacteria และ Photosynthetic bacteria สามารถใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศให้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เช่น แบคทีเรีย *Synechococus* sp. MA19 สามารถที่จะผลิต PHAs ได้สูงถึงร้อยละ 55 โดยน้ำหนักของ P(3HB)

3.2.1.2 ศึกษากรรมวิธีการสกัดสาร PHAs จากข้อมูลวิจัย

กรรมวิธีการสกัดสาร PHAs จากข้อมูลวิจัยที่ผ่านมาทั้งในวารสารวิชาการและสิทธิบัตรที่ยื่นจดไว้แล้วในต่างประเทศเมื่อประมวลข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการสกัด PHAs จากเซลล์แบคทีเรียที่สืบค้นได้ สรุปได้ว่าการสกัด PHAs จากเซลล์แบคทีเรียสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

(1) การใช้สารละลายอินทรีย์ในการสกัด กล่าวคือ PHAs เป็นสารที่ละลายในคลอโรฟอร์ม แต่ไม่ละลายในเมทานอล หรือ เฮกเซน (Kessler *et al.*, 2001) ดังนั้นสารจำพวกไขมันหรือสารที่ไม่มีขั้วที่อยู่ในเซลล์ของแบคทีเรียจะถูกแยกออกโดยการใช้ เมทานอล หรือ เฮกเซน

(2) การใช้เอนไซม์หลายชนิดในการสกัด PHAs โดยเอนไซม์ที่ใช้ ได้แก่ โปรตีเอส (Protease) นิวคลิเอส (Nuclease) และไลโซไซม์ (Lysozyme) จากนั้นใช้สารซักล้าง เพื่อทำการแยกสารที่ไม่บริสุทธิ์ต่างๆ เช่น โปรตีน กรดนิวคลิอิก และผนังเซลล์ออกโดยที่ PHAs ยังคงอยู่ (Suriyamongkol *et al.*, 2007)

การสกัดและการแยกสาร PHAs ออกจากเซลล์ของแบคทีเรียนั้น วิธีการที่ใช้กันมากที่สุด คือ การสกัด PHAs โดยใช้สารสารละลายอินทรีย์กลุ่ม Halogenated hydrocarbon solvents เช่น 1,2-Dichloroethane; 1,1,2-Trichloroethane; 1,1,2,2-Tetrachloroethane; 1,2,3-Trichloropropane และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น สำหรับวิธีการสกัดเริ่มจากการทำแห้งเซลล์ของจุลินทรีย์ที่สะสม PHAs ภายในเซลล์ โดยการทำแห้งด้วยเครื่อง Spay dryer หรือ Freeze dryer เป็นต้น จากนั้นสกัด PHAs โดยใช้ Halogenated hydrocarbon solvents แล้วจึงนำไปผสมกับ Poor solvent เช่น เมทานอล และเฮกเซน เพื่อทำให้ PHAs ตกตะกอน จากนั้นจึงแยกเอา PHAs ออก (Noda and Schechtman, 1999; Senior *et al.*, 1982; Blauhut *et al.*, 1993; Narasimhan *et al.*, 2006; Vanlautem *et al.*, 1982) แต่เนื่องจากสารประเภท Halogenated solvent เป็นสารที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมจึงมีข้อจำกัดในการใช้ และไม่สามารถใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ต่อมามีการใช้ Non-halogen solvent ซึ่งมีจำนวนมาก เช่น แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ เอไมด์ และคีโตน เป็นต้น แทนการใช้ Halogenated solvent แต่ PHAs สามารถละลายใน Non-halogen solvent ได้น้อยที่อุณหภูมิห้อง (Kurdikar *et al.*, 2000) จึงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงในการสกัดเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของ PHAs (Kurdikar *et al.*, 2000; Liddell, 1999) แต่ปัญหาที่ตามมา คือ อุณหภูมิที่สูงมีแนวโน้มทำให้มวลโมเลกุลของ PHAs ลดลงตามระยะเวลาที่สกัด แต่ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้ระยะเวลาในการสกัดที่สั้น (Lafferty *et al.*, 1978; Kurdikar *et al.*, 2000; Liddell, 1999)

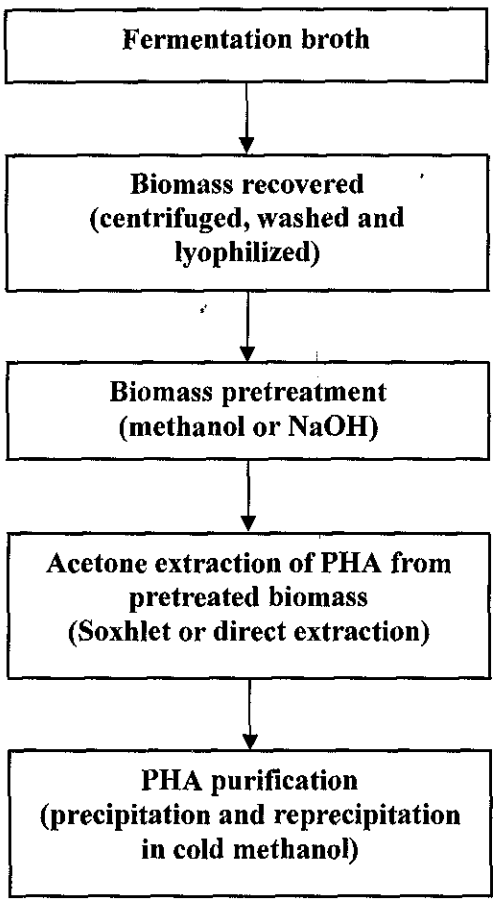
โดยทั่วไปวิธีการสกัด PHAs สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ

(1) การปรับสภาพชีวมวล (Biomass pretreatment)

(2) การสกัดสาร (Solvent extraction)

(3) การทำให้บริสุทธิ์ (Polymer purification)

และสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 3.27



รูปที่ 3.27 แผนผังแสดงภาพรวมของกระบวนการสกัด PHAs

ที่มา: Jiang *et al.* (2006)

ในขั้นตอนของการปรับสภาพชีวมวลจำเป็นต้องมีการใช้เอนไซม์ เพื่อย่อยโมเลกุลของโปรตีนและ DNA มีการให้ความร้อนเพื่อสลายโมเลกุลขนาดใหญ่ จากนั้นใช้สารลดแรงตึงผิว (Surfactant) เพื่อกำจัดไขมัน และใช้เมทานอลเพื่อกำจัดสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ เนื่องจากภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มีสารอื่นๆ ที่ไม่ใช่ PHAs เช่น เอนไซม์ ผนังเซลล์ไซโตพลาสมิค (Cytoplasmic membrane) ผนังเซลล์ (cell membrane) ไขมัน กรดนิวคลิอิก และโปรตีน เป็นต้น ขั้นตอนต่อไปจึงทำการสกัด PHAs โดยใช้สารสกัดดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งอาจใช้สาร Halogenated hydrocarbon solvents เช่น Chloroform, 1,2-Dichloroethane 1,1,2-Trichloroethane และ 1,1,2,2-Tetrachloroethane เป็นต้น หรืออาจใช้สาร Non-halogen solvent เช่น แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ เอไมด์ และคีโตน เป็นต้น และขั้นตอนสุดท้าย คือ ทำการแยกสารสกัดออกโดยการระเหย การปั่นเหวี่ยง หรือการกรอง (Jiang *et al.*, 2006)

3.2.1.3 ข้อมูลสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับการสกัด PHAs จากเซลล์แบคทีเรีย

จากการสืบค้นข้อมูลวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการสกัดสาร PHAs ในสิทธิบัตรที่ยื่นจดไว้แล้วในต่างประเทศ มีจำนวน 11 รายการคือ

(1) Cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-beta-hydroxybutyric acid, United States Patent no. 4,101,533 (Lafferty and Heinzle, 1978)

(2) Extraction process, United States Patent no. 4,324,907 (Senior *et al.*, 1982)

(3) Process for separating poly-beta-hydroxybutyrates from a biomass, United States Patent no. 4,310,684 (Vanlautem and Gilain, 1982)

(4) Process for obtaining a polyhydroxyalkanoate from the cell material of a microorganism, United States Patent no. 5,213,976 (Blauhut *et al.*, 1993)

(5) Process for the recovery of polyhydroxyalkanoic acid, United States Patent no. 5,894,062 (Liddell, 1999)

(6) Solvent extraction of polyhydroxyalkanoates from biomass, United States Patent no. 5,942,597 (Noda and Schechtman, 1999)

(7) High temperature PHA extraction using PHA-poor solvents, United States Patent no. 6,087,471 (Kurdikar *et al.*, 2000)

(8) Methods of PHA extraction and recovery using non-halogenated solvents, United States Patent no. 6,043,063 (Kurdikar *et al.*, 2000)

(9) Process for the extraction of polyhydroxyalkanoate from biomass, United States patent: 20050239998 (Karunakaran *et al.*, 2005)

(10) Process for the extraction of polyhydroxyalkanoates from biomass, United States patent: 7118897 (Narasimhan, 2006)

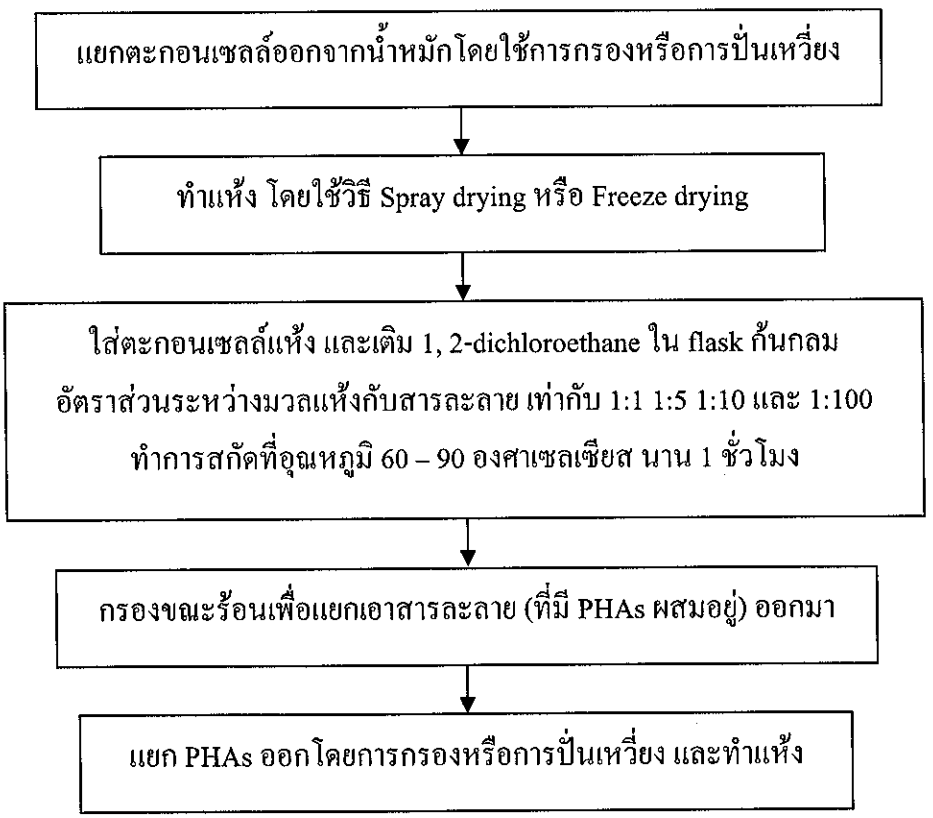
(11) A method for separating, extracting and purifing poly beta hydroxyalkanoates (PHAs) directly from bacterial fermentation broth, United States patent: 20070072276 (Chen, 2007)

3.2.2 การทดลองสกัดสาร PHAs จากเซลล์แบคทีเรีย

ทดลองสกัดสาร PHAs โดยใช้ตะกอนเซลล์แห้งของแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ทั้งชนิดแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบที่ได้จากการคัดเลือกตามข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จากวิธีการสกัดและแยกสาร PHAs ออกจากเซลล์ของแบคทีเรียตามที่รายงานการศึกษา แบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ การปรับสภาพชีวมวล (Biomass pretreatment) การสกัดสาร (Solvent extraction) และการทำให้บริสุทธิ์ (Polymer purification) ในขั้นตอนของการปรับสภาพชีวมวลได้ทดลองแช่เยือกแข็งตะกอนเซลล์เปียกของแบคทีเรียที่อุณหภูมิเยือกแข็งต่างกัน คือ 0, -20, -80 องศาเซลเซียส ในตู้แช่เยือกแข็ง และ -196

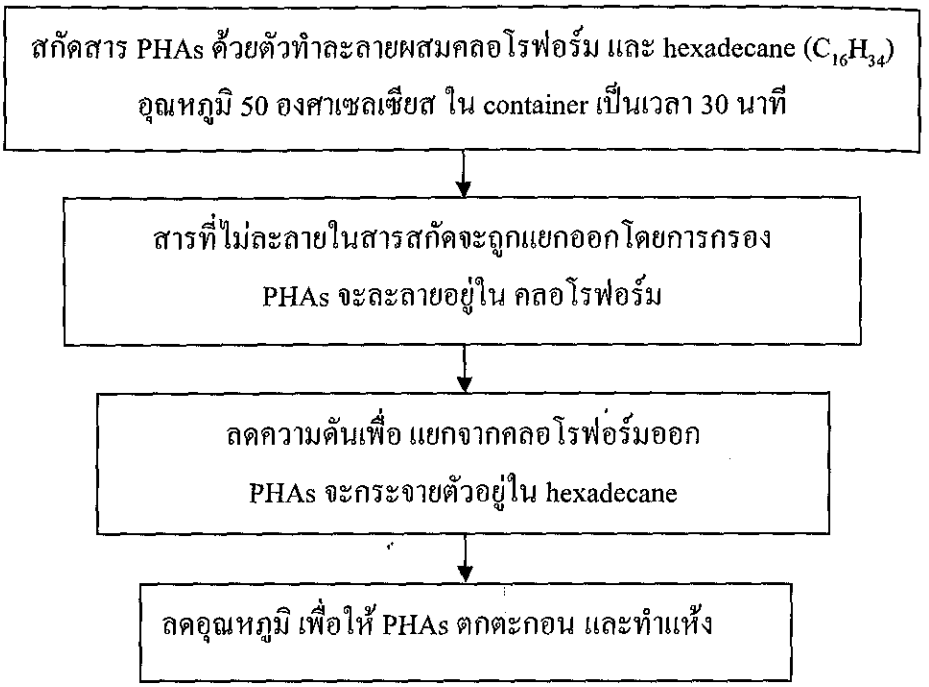
องศาเซลเซียส ด้วยไนโตรเจนเหลว เพื่อทดสอบปัจจัยทางกายภาพด้านอุณหภูมิแช่เยือกแข็งในกระบวนการทำแห้งด้วยวิธี Freez drying ต่อการแตกของผนังเซลล์แบคทีเรีย บันทึกระยะเวลาที่ใช้สำหรับการเยือกแข็งของตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่อุณหภูมิทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 3.18 เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการแช่เยือกแข็งมาตรวจสอบลักษณะผนังเซลล์ และ PHAs ที่สะสมในเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ตามวิธีที่ระบุในข้อ 2.1.1.3 พบว่าเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิทดสอบทุกอุณหภูมิมีลักษณะปกติ ไม่พบการแตกของผนังเซลล์

สำหรับขั้นตอนการสกัด PHAs ที่ใช้ในการศึกษาทดลองนี้ สกัดแบบใช้สารเคมีตามกรรมวิธีที่ดัดแปลงขึ้นมาใหม่โดยใช้ความรู้จากงานวิจัยที่มีอยู่ก่อนแล้ว โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Vanlautem (1982) ซึ่งสกัด PHAs จากเซลล์แบคทีเรีย *Alcaligenes eutrophus* โดยใช้สารทำละลายอินทรีย์กลุ่ม Halogenated hydrocarbon solvents (1,2-Dichloroethane และ 1,1,2-Trichloroethane) ตามขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 3.28) และขั้นตอนการแยกตะกอนผลึก PHAs ออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Noda (1998) ซึ่งสกัด PHAs จากเซลล์แบคทีเรีย *Aeromonas cavie* และแยกผลึก PHAs ที่สกัดได้ตามขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 3.29



รูปที่ 3.28 ขั้นตอนวิธีการสกัดสาร PHAs

ที่มา: Vanlautem (1982)



รูปที่ 3.29 วิธีการแยกสาร PHAs ออกจากสารทำละลายอินทรีย์

ที่มา: Noda (1998)

ดังนั้นทดสอบการสกัดสาร PHAs ที่ดัดแปลงขึ้นมาใหม่โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Vanlautem (1982) และ Noda (1998) นี้จึงประกอบด้วยขั้นตอนโดยสรุปคือ การแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยง และล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายเกลือ 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ทำแห้งตะกอนเซลล์ที่ได้โดยวิธีการ Freeze drying และสกัดสาร PHAs ออกจากเซลล์โดยผสมตะกอนเซลล์แห้งกับสารสกัด 1,2-Dichloroethane ในอัตราส่วน 1 กรัม : 20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ที่มีฝาปิด นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที และกรองสารสกัดขณะร้อนผ่านสำลี จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนสารละลายเกิดตะกอนลักษณะคล้ายเจล จึงนำไประเหยแยกตัวทำละลายอินทรีย์ 1,2-Dichloroethane ออกจากผลึก PHAs โดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 300 mbar ซึ่งผลการทดสอบสกัดได้ผลึก PHAs ดังแสดงในตารางที่ 3.17 และรูปที่ 3.30

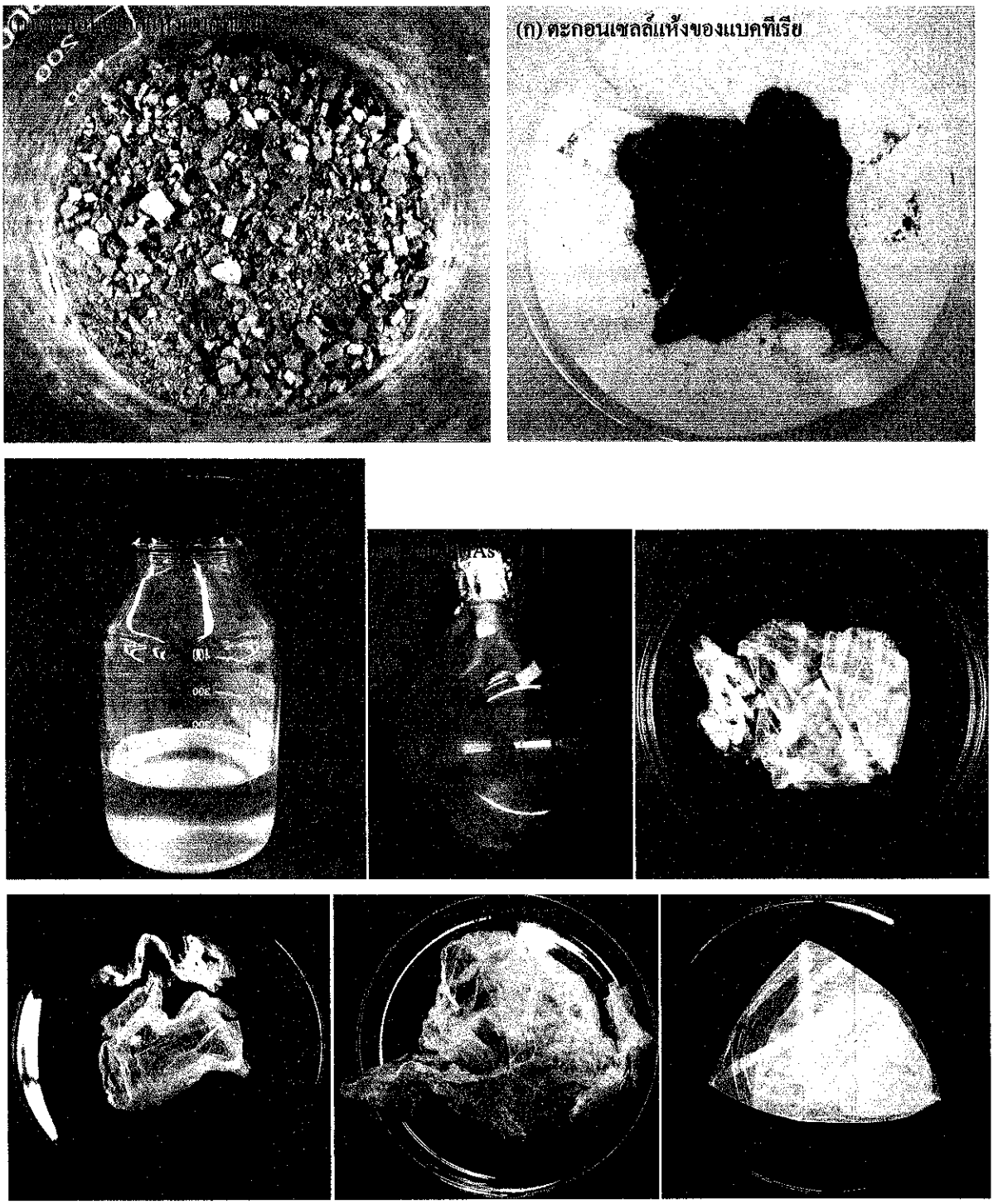
ตารางที่ 3.18 อุณหภูมิและเวลาในการแช่เยือกแข็งตะกอนเซลล์แบคทีเรีย

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักเซลล์ (กรัม)	เวลา *	ลักษณะเซลล์แบคทีเรีย
0	1.094	ไม่แข็งตัว	เซลล์ปกติ ไม่แตก
-20	1.083	2 ชั่วโมง	เซลล์ปกติ ไม่แตก
-80	1.097	1 ชั่วโมง	เซลล์ปกติ ไม่แตก
-86	1.236	3 นาที	เซลล์ปกติ ไม่แตก

หมายเหตุ: *ระยะเวลาในการเยือกแข็งของตะกอนเซลล์แบคทีเรีย

ตารางที่ 3.19 ปริมาณ PHAs เมื่อนำมาสกัดโดยใช้สาร 1,2-Dichloroethane

รหัสเชื้อ	น้ำหนักตะกอนเซลล์แห้ง (กรัม)	น้ำหนัก PHAs (กรัม)	ปริมาณ PHAs ที่ผลิต (%)	ลักษณะปรากฏของพอลิเมอร์ที่ได้
NZF1	5.401	0.077	1.43	ผงสีเหลือง ไม่เกาะตัว
NZF17	8.34	0.86	10.31	นิ่ม หยุ่น สีน้ำตาลแดง เมื่อกดรอยแยกเป็นสีขาว
NZK11	11.37	0.048	0.42	สีน้ำตาลเข้ม เกาะตัวกันเป็นแผ่น
NZK12	7.264	0.139	1.91	ผงสีเหลืองเข้ม เกาะตัวกันเล็กน้อย
NZK39	4.79	1.09	22.76	เหนียว สีน้ำตาลแดง
NZT6	7.04	1.19	18.18	ทำฟิล์มได้ สีน้ำตาลอมเหลือง
NZT9	4.55	0.98	21.60	ทำฟิล์มได้ สีเหลืองอมน้ำตาล
NZT13	9.42	0.21	2.23	เหนียว สีน้ำตาลแดง
CZC49	10.583	0.021	0.20	ผงสีน้ำตาลอ่อนแห้ง ไม่เกาะตัว
CZG10-1	9.876	0.1314	1.33	ผงสีน้ำตาลอ่อนแห้ง ไม่เกาะตัว
CZW15	7.915	0.115	1.45	ผงแห้งสีเปลือกไข่ ไม่เกาะตัว
S2-3-2	10.05	2.25	22.39	แข็ง กรอบ สีน้ำตาลอมเหลือง
S2-20	3.829	0.012	0.31	ผงสีน้ำตาลอ่อน เกาะตัวกัน



รูปที่ 3.30 ตัวอย่างลักษณะของตะกอนเซลล์แห้งของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบการสกัดสาร PHAs (ก) สารสกัด PHAs (ข) และผลึก PHAs (ค) ที่ได้จากการทดสอบสกัด และตัวอย่างพอลิเมอร์ชนิด PHV ทางการค้า (ง) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ

เนื่องจากผลการทดสอบการสกัด PHAs ในช่วงแรกพบว่าผลึก PHAs ที่ได้มีลักษณะเป็นสีน้ำตาล ซึ่งอาจเกิดจากตะกอนเซลล์แห้งไม่สะอาดมีการปนเปื้อนของสารอื่นๆ หรือขั้นตอนการระเหยแห้งความร้อนอาจไม่สม่ำเสมอ ทำให้ไหม้ ดังนั้นในการทดสอบสกัดต่อมาจึงเพิ่มขั้นตอนการล้างตะกอนเซลล์แห้งด้วยเมทานอลก่อนขั้นตอนการสกัด และในขั้นตอนของการระเหยแห้งใช้ความเร็วรอบในการหมุนเพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มการกระจายตัวของตัวอย่างทำให้ตัวอย่างได้รับความร้อนอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งพบว่าผลึก PHAs ที่สกัดได้ไม่เกิดลักษณะสีน้ำตาลเข้ม

ผลึก PHAs ที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียบางไอโซเลทนอกจากมีสีน้ำตาลเข้มแล้วยังพบว่ามีกลิ่นไม่พึงประสงค์ จึงได้ทำความสะอาดผลึก PHAs ที่สกัดได้ซ้ำ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

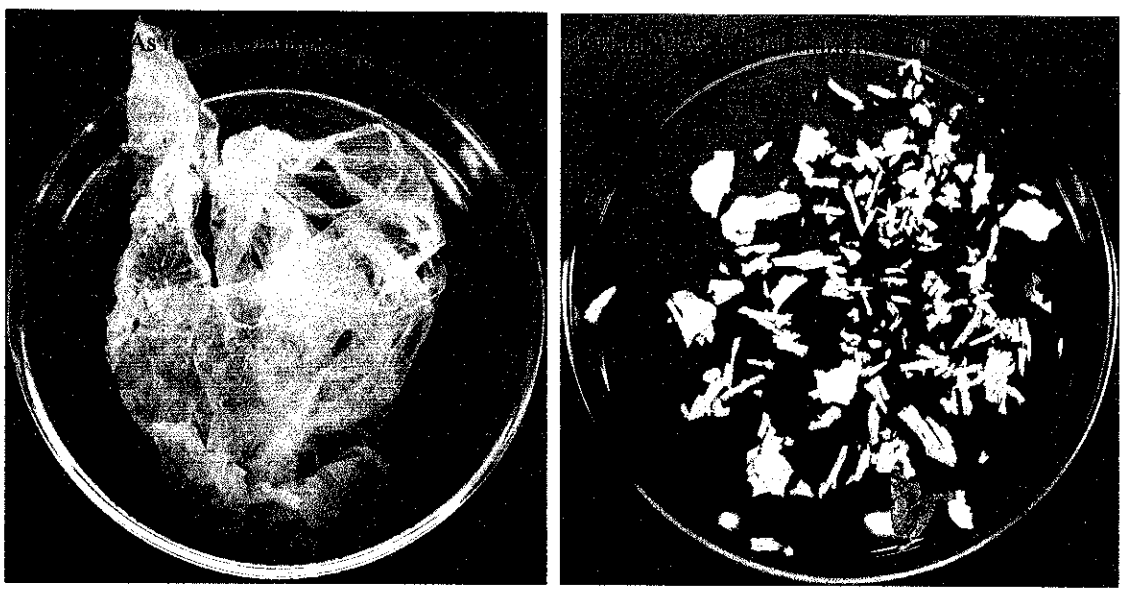
1. หลังจากระเหยแบบสุญญากาศจนได้ผลึกแห้งของ PHAs แล้ว ละลายผลึกแห้งของ PHAs ในคลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) โดยค่อย ๆ หยด $CHCl_3$ ลงไปจนผลึกแห้งของ PHAs ละลายหมดพอดี

2. ตกตะกอนในเมทานอล โดยค่อย ๆ หยดสารที่ได้ในข้อ 1 ลงในเมทานอลพร้อมทั้งเขย่าอย่างแรง จนกระทั่งเห็นสารที่หยดลงไปเป็นตะกอน ถ้าไม่เห็นเป็นตะกอนให้เพิ่มปริมาณเมทานอลลงไปอีก

3. กรองตะกอนด้วยกระดาษกรอง ทิ้งส่วนของเหลวที่ผ่านกระดาษกรองไป

4. นำผลึกของแข็งที่อยู่บนกระดาษกรองไปอบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

ทั้งนี้พบว่าผลึก PHAs ที่ได้มีสีขาวขึ้นดังแสดงในรูปที่ 3.31 และด้วยวิธีการตกตะกอนซ้ำนี้สามารถกำจัดกลิ่นไม่พึงประสงค์ของสาร PHAs ได้



รูปที่ 3.31 ตัวอย่างลักษณะผลึก PHAs ก่อน (ก) และหลังการตกตะกอนซ้ำ (ข)

บทที่ 4
อภิปราย สรุป และข้อเสนอแนะ

1. อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

โครงการวิจัย "การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอท (พีเอชเอ) จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย" มีระยะเวลาการดำเนินการ 2 ปี เพื่อดำเนินการตามวัตถุประสงค์ คือ คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารพีเอชเอ (PHAs) จากการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย ศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHAs จากวัตถุดิบมูลค่าต่ำโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสาร PHAs จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ด้วยวิธีการทางกายภาพและทางเคมี และตรวจสอบสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของ PHAs ที่ผลิตได้ เพื่อคัดเลือก PHAs ที่เหมาะสมต่อการใช้งาน

จากที่ได้คัดเลือกแบคทีเรียกลุ่ม Heterotrophs ที่สามารถผลิตสาร PHAs จากแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 312 ไอโซเลท (สายพันธุ์) ที่เก็บรักษาอยู่ ณ ห้องปฏิบัติการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แบคทีเรียที่เลือกมาทดสอบแยกได้จากดิน น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลัง และมูลสัตว์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทใน Complex medium เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์จากการเจริญและเลี้ยงต่อใน Minimal medium เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อการสะสมสารพอลิเมอร์ ส่วนประกอบของอาหารทั้ง 2 ชนิด ได้ดัดแปลงขึ้นโดยอาศัยข้อมูลจากแหล่งอ้างอิง (Kunioka *et al.*, 1989; Ramsay *et al.*, 1989; Lee et al., 1994; Luengo *et al.*, 2003; Atlas, 2004; Pederson *et al.*, 2006) คัดเลือกเชื้อตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Kunioka *et al.* (1989), Kim *et al.* (1996) และ Khanna and Srivastava (2005) จากการทดสอบความสามารถในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรีย 312 ไอโซเลท โดยใช้อาหารสูตรดัดแปลงดังกล่าวข้างต้น พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทมีและไม่มีการสะสม PHAs ในลักษณะของ Granule ที่ติดสีย้อมภายในเซลล์ได้แตกต่างกันมาก จึงได้พัฒนาเกณฑ์ในการจัดกลุ่มแบคทีเรียเพื่อการคัดเลือกในขั้นตอนนี้ ด้วยการหาพื้นที่ของ PHA granule เทียบกับพื้นที่ของเซลล์ทั้งหมด โดยอาศัยโปรแกรม Image-Pro Plus Version 6.0.0.260 (Media Cybernetics, Inc.) ที่ต่อกับระบบกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus Model BX51TRF) แล้วจัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียที่สะสม PHAs ภายในเซลล์โดยใช้ข้อมูลทั้งพื้นที่ของ PHA granule และระดับความเข้มของการเรืองแสงสีส้มเหลืองของสาร PHAs สามารถแบ่งระดับความเข้มของการเรืองแสงสีส้มเหลืองเป็น 5 ระดับ โดยใช้เครื่องหมายบวก คือ +5 มีความเข้มของสีส้มเหลืองมากที่สุดและลดลงตามจำนวน + ที่ลดลง จนถึง 0 ซึ่งไม่พบสีเหลืองส้มภายในเซลล์ ที่เชื่อมโยงกับ PHAs (%) ที่สะสมภายในเซลล์เมื่อเทียบกับพื้นที่ทั้งหมดของเซลล์ คือ >85%, 71-85%, 56-70%, 40-55%, < 40% และ 0 ตามลำดับ สามารถคัดเลือกแบคทีเรียจากผลบวกของการสะสม PHAs ในขั้นตอนคัดกรองโดยใช้อาหารแข็งสูตรดัดแปลงได้จำนวน 60 ไอโซเลท ซึ่งมีแบคทีเรีย 48 ไอโซเลท ที่สะสม PHAs ภายใน

เซลล์ในความเข้มสูงมากกว่า 50% ของพื้นที่ภายในเซลล์ เมื่อทดสอบแบคทีเรียที่คัดเลือกจากผลบวกของการสะสม PHAs ด้านความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังและการเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า 43 ไอโซเลทสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ และทุกไอโซเลทเจริญได้ดีบนอาหารที่เติมน้ำตาลทราย พบแบคทีเรียจำนวน 34 ไอโซเลท ที่เจริญบนอาหารที่เติมน้ำตาลทรายดีกว่าอาหารที่เติมกลูโคส และเมื่อศึกษาเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิต PHAs และผ่านการทดสอบความสามารถดังระบุข้างต้น ด้วยลักษณะทางสัณฐานและสมบัติทางชีวเคมีพร้อมทั้งใช้ชุดทดสอบ API Identification System (bioMérieux) พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จัดอยู่ในสกุลต่างๆ โดยสรุปดังนี้ *Aeromonas* (แนวโน้มเป็น *Aeromonas hydrophila* หลายสายพันธุ์), *Bacillus (Bacillus cereus* และ *Bacillus megaterium*), *Enterobacter* (แนวโน้มเป็น *Enterobacter cloacae*), *Escherichia* (*Escherichia coli* หลายสายพันธุ์), *Chryseobacterium* (*Chryseobacterium luteola* และ *Chryseobacterium* sp.), *Klebsiella* (แนวโน้มเป็น *Klebsiella planticola*), *Proteus* และ *Staphylococcus* (*Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus* sp. และ *Staphylococcus xylosus*) ไอโซเลทที่สามารถระบุสกุลได้เหล่านี้หลายไอโซเลทโดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซเลท NZT3, NZT6, NZT7, NZT9, NZF17 และ S2-3-2 ที่ยังคงต้องศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยาและเคมีเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลของชื่อสกุลที่ระบุ และควรศึกษาในเชิงลึกถึงสารพันธุกรรมเพื่อให้สามารถระบุชนิดและ/หรือสายพันธุ์ที่แน่นอนได้ นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอีกหลายไอโซเลทที่ยังไม่สามารถระบุสกุลได้จากข้อมูลที่ได้ศึกษาแล้ว จำเป็นต้องมีการศึกษาในเชิงลึกถึงสารพันธุกรรมและสมบัติทางสรีรวิทยา และองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์แบคทีเรียเพิ่มเติมต่อไป แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งของเชื้อตามธรรมชาติในประเทศไทยไอโซเลทเหล่านี้อาจเป็นสกุลและ/หรือชนิดใหม่

จากนั้นได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิต PHAs จำนวน 13 ไอโซเลท เพื่อผลิตสารโดยเลี้ยงในถังหมักปริมาตรอาหาร 5 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และสกัด PHAs ออกจากเซลล์แบคทีเรียเพื่อศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHAs ที่ผลิต ซึ่งช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรีย พบว่าสามารถสกัดสารได้จากเซลล์แบคทีเรีย 9 ไอโซเลท (NZT6, S2-3-2, NZK11, NZK12, NZK19, NZF1, NZF17, NZT9, NZT13 และ CZW15) และพบว่ามีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท ที่ผลิตสาร PHAs ที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ที่ดี ผลผลิต PHAs สูงสุดที่สะสมอยู่ในเซลล์โดยเฉลี่ย 22% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งใกล้เคียงกับที่มีรายงานตาม Satoh *et al.* (1998) อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะในการผลิตสาร PHAs ของแบคทีเรียที่คัดเลือกตามแผนการศึกษาในปีที่ 2 มีเป้าหมายที่จะเพิ่มผลผลิตให้ได้อีก 4 เท่า

จากการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHAs ที่ผลิตได้เพื่อช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรีย พบว่าโครงสร้างทางเคมีของ PHAs ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท NZT6 มีโครงสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทชนิดพอลิ-3ไฮดรอกซีบิวทิเรท [Poly(3-hydroxybutyrate, P(3HB)] และพอลิ-4ไฮดรอกซีบิวทิเรท [Poly(4-hydroxybutyrate, P(4HB)] อุณหภูมิหลอม (T_m) ของผลึกพอลิเมอร์ที่ 167.7 องศาเซลเซียส ผลึกพอลิเมอร์มีความเหนียวสามารถทำฟิล์มและขึ้นรูปได้

PHAs ที่ผลิตจากแบคทีเรียจากไอโซเลท S2-3-2 มีโครงสร้างพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทชนิดพอลิ-3ไฮดรอกซีบิวทิเรท P(3HB) และพอลิไฮดรอกเฮกซาโนเอท [Poly-β-hydrohexanoate, P(HH)] เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย อุณหภูมิหลอมของผลึกพอลิเมอร์ที่ 167.7 องศาเซลเซียส ผลึกพอลิเมอร์มีความแข็งและกรอบ และ PHAs ที่ผลิตจากแบคทีเรียจากไอโซเลท NZF17 และ NZK11 มีโครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอทชนิดพอลิ-3ไฮดรอกซีบิวทิเรท P(3HB) และพอลิ-4ไฮดรอกซีบิวทิเรท P(4HB) ผลึกพอลิเมอร์มีความหยุ่นและนิ่ม อาจสามารถใช้ผสมกับพอลิเมอร์ชนิดที่แข็งและกรอบ ทำให้ได้ส่วนผสมที่ใช้ประโยชน์ตามต้องการได้

PHAs ที่เตรียมจากแบคทีเรียต่างไอโซเลทกัน มีสมบัติทางความร้อนที่แตกต่างกัน โดย PHAs ที่เตรียมได้มีจุดหลอมเหลวที่สูงใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลวของพอลิเอทิลีน (Polyethylene) ~139 องศาเซลเซียส และพอลิโพรพิลีนชนิดไอโซแทกติก (Isotactic polypropylene) ~171 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากปิโตรเคมีที่มีการใช้งานอยู่ทั่วไป และจากงานวิจัยที่มีมาก่อน (Xie and Chen, 2008) จุดหลอมเหลวของ P(3HB) มีค่าเท่ากับ 165 องศาเซลเซียส

สำหรับกรรมวิธีการสกัดสาร PHAs จากข้อมูลวิจัยที่ผ่านมาทั้งในวารสารวิชาการและสิทธิบัตรที่มีการยื่นจดไว้แล้ว ได้ทดลองสกัดสารจากเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกตามกรรมวิธีที่ดัดแปลงขึ้น โดยเริ่มพัฒนาขั้นตอนการสกัดสารและขั้นตอนการแยกตะกอน แยกผลึก PHAs ออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ โดยแยกตะกอนเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการปั่นเหวี่ยง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85% NaCl) ปลอดเชื้อ ทำแห้งตะกอนเซลล์โดย Freeze drying ล้างตะกอนเซลล์แห้งด้วยเมทานอล อบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็น 30 นาที ผสมตะกอนเซลล์แห้งกับสารสกัด 1,2-Dichloroethane ในอัตราส่วน 1 กรัม : 20 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองสารสกัดขณะร้อน และนำสารสกัดที่ได้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนสารละลายเกิดเป็นตะกอนลักษณะคล้ายเจล (ใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง) จากนั้นนำสารละลายสกัดไประเหยแยกตัวทำละลายอินทรีย์ออกจากผลึก PHAs ด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส วิธีการสกัดสาร PHAs จากเซลล์แบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้มีผลสำเร็จโดยสามารถสกัดได้สารที่เพียงพอต่อการศึกษาสมบัติขั้นต้นของสาร แต่ผลึก PHAs ที่ได้มีสีน้ำตาล อาจเกิดจากตะกอนเซลล์แห้งมีการปนเปื้อนของสารจากอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือขั้นตอนการระเหยแห้งความร้อนอาจไม่สม่ำเสมอ ทำให้บริเวณของสารที่ได้รับสัมผัสความร้อนนานเกิดสีเข้ม จึงเพิ่มขั้นตอนการล้างตะกอนเซลล์แห้งด้วยเมทานอลก่อนการสกัด และเพิ่มความเร็วรอบของการหมุนของเครื่องเครื่องระเหยแบบสุญญากาศในขั้นตอนการแยกตัวทำละลายอินทรีย์ออกจากผลึก PHAs เพื่อเพิ่มการกระจายตัวของตัวอย่างให้ได้รับความร้อนอย่างสม่ำเสมอ พบว่าผลึก PHAs ที่สกัดได้มีสีอ่อนลง

ยังมีขั้นตอนที่ต้องดำเนินการในปีที่ 2 ของโครงการ คือ การศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในผลิตสาร PHAs จากวัตถุดิบมูลค่าต่ำโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ การศึกษาในขั้นตอนนี้ จึงมุ่งหวังให้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้การเจริญและการสะสมสารพอลิเมอร์ที่ดีที่สุดของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เลือก และอาหารมีส่วนประกอบที่เตรียมง่ายและต้นทุนต่ำ การศึกษาปัจจัยทาง

เคมีด้านสารอาหาร พร้อมศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHAs ที่ผลิตได้ทั้งความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน การศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิต PHAs พร้อมตรวจสอบคุณลักษณะเบื้องต้นของสาร PHAs ที่ผลิตได้ ปัจจัยสำคัญที่จะศึกษาคือ อุณหภูมิและปริมาณออกซิเจน และการตรวจสอบสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของ PHAs ที่ผลิตได้ ด้านสมบัติทางความร้อน การหาน้ำหนักโมเลกุล และการวัดความหนืดในตัว

2. ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

สายพันธุ์แบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิต PHAs จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อย ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย ตามที่คัดเลือกได้จากโครงการนี้หลายไอโซเลท (สายพันธุ์) ที่บางสายพันธุ์มีแนวโน้มเป็นชนิดใหม่จากที่ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี จึงควรศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและสารพันธุกรรมของแบคทีเรียเพิ่มเติม อีกทั้งยังพบสารพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ยังเหนียว มีสมบัติที่สามารถทำฟิล์มและขึ้นรูปได้ และมีจุดหลอมเหลวที่สูงถึง ~168 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลวของ Polyethylene (~139 องศาเซลเซียส) และ Polypropylene ชนิด Isotactic polypropylene (~171 องศาเซลเซียส) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากปิโตรเคมีที่มีการใช้งานอยู่ทั่วไป จึงควรมีการศึกษาต่อเพื่อพัฒนาเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิต วิธีการสกัดสาร และเพิ่มกำลังการผลิตในระดับการผลิตที่สูงขึ้นต่อไป

บรรณานุกรม

Agus, J., Kahar, P., Abe, H., Doi, Y., and Tsue, T. 2006. Molecular weight characterization of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*. *Polymer Degradation and Stability*. 91: 1138-1146.

AOAC International. 1998. *Food and Drug Administration: Bacteriological Analysis Manual*, 8th Edition, Revision A. AOAC International, Gaithersburg, MD, U.S.A.

Asrar, J., and Gruys, K. 2002. Biodegradable polymer (Biopol ®). *In* Doi, Y., and Steinbüchel, A. (eds.). *Biopolymers-Biology, Chemistry, Biotechnology, Applications*, Vol. 4 (Polyesters III), 1st Edition. Weinheim: Wiley-VCH, pp. 53-90.

Atlas, R.M. 2004. *Handbook of Microbiological Media*. Boca Raton: CRC Press.

Berlanga, M., Montero, M.T., Hernandez-Borrell, J., and Guerrero, R. 2006. Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. *International microbiology*. 9: 95-102.

Blauhut, W., Gierlinger, W., and Strempfl, F. 1993. Process for obtaining a polyhydroxyalkanoate from the cell material of a microorganism. *United States Patent no. 5213976.*

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Brenner, D.J., Krieg, N.R., and Staley, J.T. (eds.). 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. Springer, New York.

Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends in Biotechnology*. 5: 246-250.

Byrom, D. 1994. Polyhydroxyalkanoates. *In* Mobley D.P. (ed.). *Plastics from Microbes: Microbial Synthesis of Polymers and Polymer Precursors*. Munich: Hanser, pp. 5-33.

Chen, X. 2007. A method for separating, extracting and purifing poly beta hydroxyalkanoates (PHAs) directly from bacterial fermentation broth. *United States patent no. 20070072276.*

Ciesielski, S., Cydzik-Kwiatkowska, A., Pokoj, T., and Klimiuk, E. 2006. Molecular detection and diversity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates-producing bacteria enriched from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology*. 101: 190-199.

De Koning, G.J.M. 1993. Prospects of bacterial poly[(R)-3-hydroxyalkanoates]. Ph.D. Thesis, Technische Universiteit Eindhoven.

De Smet, M.J., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J., and Wynberg, H. 1983. Characterization of the inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *Journal of Bacteriology*. 154: 870-878.

Doi, Y., Kitamura, S., and Abe, H. 1995. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*. 28: 4822-4828.

Doi, Y., Segawa, A., and Kunioka, M. 1990. Biosynthesis and characterization of poly-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 12: 101-111.

Foster, L. J. R., Sanguanchaipaiwong, V., Gabelisha, C. L., Hookc, J., and Stenzel, M. 2005. A natural-synthetic hybrid copolymer of polyhydroxyoctanoate-diethylene glycol: *biosynthesis and properties. Polymer*. 46: 6587-6594.

Groth, E., Moo-young, M., and Chisti, Y. 1999. Fermentation optimization for the production of poly(β-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme Microbiology Technology*. 25: 132-141.

Groth, E., and Chisti, Y. 2000. Poly(β-hydroxybutyric acid) thermoplastic production by *Alcaligenes latus*: behavior of fed-batch cultures. *Bioprocess Engineering*. 22: 441-449.

Hollender, J., Van der Krol, D., Gierden, E., Kornberger, L., and Dott, W. 2002. Effect of different carbon sources on the enhanced biological phosphorus-removal process in sequencing batch reactors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18: 355-360.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition. Baltimore: Williams&Wilkins.

Jiang, X., Ramsay, J.A., and Ramsay, B.A. 2006. Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Microbiological Methods*. 67: 212-219.

Kahar, P., Agus, J., Kikkawa, Y., Taguchi, K., Doi, Y., and Tsuge, T. 2005. Effective production and kinetic characterization of ultra-high-molecular-weight poly(R)-3-hydroxybutyrate in recombinant *Escherichia coli*. *Polymer Degradation and Stability*. 87: 161-169.

Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K., and Doi, Y. 2004. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability*. 83: 79-86.

Karunakaran, N., Noda, I., Satkowski, M.M., Cearley, A.C., Gibson, M.S., and Welling, S.J. 2005. Process for the extraction of polyhydroxyalkanoate from biomass. *United States patent no. 7118897*.

Kessler, B., Ren, Q., de Roo, G., Prieto, M.A., and Witholt, B. 2001. Engineering of biological system for the synthesis of tailor-made polyhydroxyalkanoates, a class of versatile polymers. *CHIMIA International Journal for Chemistry*. 55: 119-122.

Khanna, S., and Srivastava, A.K. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 40: 607-619.

Kim, Y.B., and Lenz, R.W. 2001. Polyesters from microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71: 51-79.

Kim, Y.B., Rhee, Y.H., Han, S.-H., Heo, G.H., and Kim, J.S. 1996. Poly-3-hydroxyalkanoates produced from *Pseudomonas oleovorans* grown with ω-phenoxyalkanoates. *Macromolecules*. 29: 3432-3435.

Kojima, T., Nishiyama, T., Maehara, A., Ueda, S., Nakano, H., and Yamane, T. 2004. Expression profiles of polyhydroxyalkanoate synthesis-related genes in *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 97: 45-53.

Krishna, C., and Van Loosdrecht, M.C.M. 1999. Effect of temperature on storage polymers and settle ability of activated sludge. *Water Research*. 33: 2374-2382.

Kung, S.-S., Chuang, Y.-C., Chen, C.-H., and Chien, C.-C. 2007. Isolation of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria using a combination of phenotypic and genotypic approach. Letters in Applied Microbiology. 44: 364-371.

Kunioka, M., Kawaguchi, Y., and Doi, Y. 1989. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 30: 569-573.

Kurdikar, D.L., Strauser, F.E., Solodar, A.J., and Paster, M.D. 2000. High temperature PHA extraction using PHA-poor solvents. *United States Patent no. 6087471*.

Kurdikar, D.L., Strauser, F.E., Solodar A.J., Paster, M.D., and Asrar, J. 2000. Methods of PHA extraction and recovery using non-halogenated solvents. *United States Patent no. 6043063.*

Kusaka, S., Abe, H., Lee, S.Y., and Doi, Y. 1997. Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli. Applied Microbiology and Biotechnology.* 47: 140-143.

Kusaka, S., Iwata, T., and Doi, Y. 1999. Properties and biodegradability of ultra-high-molecular-weight poly[(*R*)-hydroxybutyrate] produced by a recombinant *Escherichia coli. International Journal of Biological Macromolecules.* 25: 87-94.

Lafferty, R.M., and Heinzle, E. 1978. Cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-β-hydroxybutyric acid. *United States Patent no. 4101533.*

Lee, S.Y. 1996. Plastic bacterial progress and prospects for polyhydroxyalkanoates production in bacteria. *Trends in Biotechnology.* 14: 431-438.

Lee, S.Y., and Choi, J. 1998. Effect of fermentation performance on the economics of poly-(3-hydroxybutyrate) production by *Alcagenes latus. Polymer Degradation and Stability.* 59: 387-93.

Lee,Y., Kim, M.K., Chang, H.N., and Park, Y.H. 1994. Effects of propionate on accumulation of poly(β-hydroxybutyrate-co-β-hydroxyvalerate) and excretion of pyruvate in *Alcaligenes eutrophus. Biotechnology letters.* 16(6): 611-616.

Lemos, C., Viana, C., Sagueiro, E.N., Rmas, A.M., Crespo, S.G., and Reis, M.A.M. 1998. Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates by a phosphate accumulating mixed culture. *Enzyme Microbiology and Technology.* 22: 662-71.

Liddell, M.J. 1999. Process for the recovery of polyhydroxyalkanoic acid. *United States Patent no. 5894062.*

Lu, X., Zhang, J., Wu, Q., and Chen, G.Q. 2003. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid L-oxidation pathway in *E. coli. Journal of FEMS Microbiology Letters.* 221: 97-101.

Luengo, J.M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., and Olivera, E.R. 2003. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology.* 6: 251-260.

Mapleston, P. 2005. Pretty plastics perform: DuPont aims to boost the functionality of decorated plastics. *Design News*: June 6, 2005.

Matsusaki, H., Abe, H., and Doi, Y. 2000. Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-63. *Biomacromolecules.* 1: 17-22.

Miller, L.G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.* 31: 426-428.

Narasimhan, K., Noda, I., Satkowski, M.M., Cearley, A.C., Gibson, M.S., and Welling, S.J. 2006. Process for the extraction of polyhydroxyalkanoates from biomass. *United States Patent no. 7118897.*

Noda, I., and Schechtman, L.A. 1999. Solvent extraction of polyhydroxyalkanoates from biomass. *United States Patent no. 5942597.*

Noda, I. 1998. Solvent extraction of polyhydroxy-alkanoates from biomass facilitated by the use of marginal nonsolvent. *United States Patent no. 5821299.*

Ojumu, T.V., and Solomon, B.O. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology.* 3: 18-24.

Ojumu, T.V., Yu, J., and Solomon, B.O. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. *African Journal of Biotechnology*. 3(1): 18-24.

Ostle, A.G., and Holt, J.G. 1982. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-β-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*. 44: 238-241.

Park, S.J., Lee, S.H., Park, J.P., and Song, A.J. 2007. Polyhydroxyalkanoates (PHAs): [online]. Available: http://www.apbiot.com/research/phas.htm

Pederson, E.N., McChalicher, C.W.J., and Srienc, F. 2006. Bacterial synthesis of PHA block copolymers. *Biomacromolecules*. 7: 1904-1911.

Poirier, Y., Erard, N., and Petetot, M. D.-C. J. 2002. Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Letters*. 207: 97-102.

Ramsay, B.A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dubé, B., Bataille, P., and Ramsay, J.A. 1990. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. *Appl Environ Microbiol*. 56(7): 2093–2098.

Ramsay, B.A., Ramsay, J.A., and Cooper, D.G. 1989. Production of poly-β-hydroxyalkanoic acid by *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(3): 584-589.

Russell, R. A., Holden, P. J., Garvey, C. J., Wilde, K. L., Hammerton, K. M., and Foster, L. J. 2006. Investigation of the phase morphology of bacterial PHA inclusion bodies by contrast variation SANS. *Physica B*. 385-386: 859-861.

Satoh, H., Iwamoto, Y., Mino, T., and Matsuo, T. 1998. Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. *Water Science Technology*. 38(2): 103-109.

Senior, P.J., Wright, L.F., and Alderson, B. 1982. Extraction process. *United States Patent no. 4324907.*

Shimamura, E., Kasuya, K., Kobayashi, G., Shiotani, T., Shima, Y., and Doi, Y. 1994. Physical properties and biodegradability of microbial poly(3-hydroxybutyrate-*co*co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*. 27: 878-880.

Sperling, L.H. 1992. *Introduction to Physical Polymer Science*, 2nd ed., John Wiley&Sons, New York.

Steinbüchel, A. 1991. Polyhydroxyalkanoic acids. *In* Byrom D. (ed.). *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources*. New York: Stockton, pp. 124-213.

Steinbüchel, A. 2001. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromolecular Bioscience*. 1: 1-24.

Steinbüchel, A. 2003. Production of rubber-like polymers by microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*. 6: 261-270.

Sudesh, K., Abe, H., and Doi, Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 25: 1503-1555.

Sudiana, I.M., Mino, T., Satoh, H., Nakamura, K., and Matsuo, T. 1999. Metabolism of enhanced biological phosphorus removal activated sludge with acetate and glucose as carbon source. *Water Science and Technology*. 39(6): 29-35.

Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., and Shah, S. 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. *Journal of Biotechnology Advance*. 25: 148-175.

Taguchi, K., Taguchi, S., Sudesh, K., Maehara, A., Tsuge, T., and Doi, Y. 2001. Metabolic pathways and engineering of PHA biosynthesis. *In* Doi, Y., and Steinbüchel, A. (eds.). *Biopolymers-*

Biology, Chemistry, Biotechnology, Applications, vol 3A (Polyesters I), ed 1. Weinheim: Wiley-VCH, pp. 217-247.

Tsuge,T. 2002. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94(6): 579-584.

Vanlautem, N., and Gilain, J. 1980. Process for separating poly-β-hydroxybutyrates from a biomass. *United States Patent no. 4310684*.

Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., and Radecka, I. 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 102: 1437-1449.

Wang, F., and Lee, S.Y. 1997. Poly(3-hydroxybutyrates) production with high polymer content by fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3703-3706.

Warankana, P., and Randall, C.W. 1999. Factors affecting the production and storage of polyhydroxyalkanoates in activated sludge biomass. Department of Civil and Environmental Engineering, Virginia Polytechnic Institute and State University Blackburg, VA 24061, USA.

Westhues, R.A, Kessler, B., Dielissen, M.P.M., Witholt, B., and Eggink, G. 2001. Fermentative production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate). *In* Doi, Y., and Steinbuchel A. (eds.). *Biopolymers-Biology, Chemistry, Biotechnology, Applications*, vol 3A (Polyesters I), ed 1. Weinheim: Wiley-VCH, pp. 291-316.

Xie, W.P., and Chen, G-Q. 2008. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *phaPCJ*. *Biochemical Engineering Journal*. 38(3): 384-389.

Zinn, M., Witholt, B., and Eglia, T. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 53: 5-21.

ภาคผนวก

ก. สีย้อมจุลินทรีย์

1. Crystal violet (Gram stain)

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol (95%)	20.0	มิลลิลิตร
ละลายให้เข้ากัน แล้วจึงเติม		
Ammonium oxalate (1% Aqueous solution)	80.0	มิลลิลิตร

2. Nile blue A

Nile blue A	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง		

3. Safranin (Gram stain)

Safranin O (2.5% solution ใน 95% Ethanol)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90.0	มิลลิลิตร
ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง		

ข. สารละลายและน้ำยาเคมี

1. Acetone alcohol

Alcohol (95%)	700.0	มิลลิลิตร
Acetone	300.0	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากัน		

2. Hydrogen peroxide (3% solution)

Hydrogen peroxide (30% Solution)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90.0	มิลลิลิตร

3. Iodine solution (Gram's iodine)

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม

ละลายสารทั้งสองชนิดในน้ำ โดยค่อยๆ เติมน้ำทีละน้อยจนกระทั่ง Iodine ละลายหมด

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 300.0 มิลลิลิตร

เก็บไว้ในขวดสีชา

4. Iodine solution (ทดสอบการย่อยแป้ง)

Iodine 1.0 กรัม

Potassium iodide 2.0 กรัม

ละลายสารทั้งสองชนิดในน้ำ โดยค่อยๆ เติมน้ำทีละน้อยจนกระทั่ง Iodine ละลายหมด

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 200.0 มิลลิลิตร

เก็บไว้ในขวดสีชา

5. Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%)

Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1.0 กรัม

น้ำกลั่น 100.0 มิลลิลิตร

ละลาย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตรใน Volumetric flask เก็บไว้ในขวดสีชา

6. Turbidity standard (Buller, 2004)

1% Barium chloride

1% Sulfuric acid

เตรียม McFarland nephelometer scale ดังนี้

McFarland tube no.	Sulfuric acid 1% aqueous solution (มิลลิลิตร)	Barium chloride 1% aqueous solution (มิลลิลิตร)	Corresponding density of bacteria (10^6)
0.5	9.95	0.05	150
1	9.90	0.1	300
2	9.80	0.2	600
5	9.50	0.5	1500

ค. อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

ตาม Atlas (2000), AOAC International (2000) และบริษัทผู้ผลิตและจำหน่ายอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์สำเร็จ

1. Complex medium (agar) ดัดแปลงจาก Kunioka *et al.* (1989); Kim *et al.* (1996); Khanna and Srivastava (2005); Luengo *et al.* (2003) และ Pederson *et al.* (2006)

Yeast extract	5.0	กรัม
Tryptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันและหลอม Agar ให้ความร้อน ปรับ pH เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

2. Complex medium (broth)

เตรียมตามส่วนประกอบ Complex medium agar ยกเว้นไม่ต้องเติม agar ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

3. Glucose medium (Ramsay *et al.*, 1990)

สำหรับเลี้ยง *Alcaligenes latus* ATCC 29714, *A. eutrophus* DSM 545, *Bacillus cereus* NRC 9008, *Pseudomonas pseudoflava* ATCC 33668, *P. cepacia* ATCC 17697 และ *Micrococcus halodenitrificans* NRC 14024 ประกอบด้วย

3.1 Mineral salts medium

$Na_2HPO_4.7H_2O$	6.7	กรัม
KH_2PO_4	1.5	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Ferrous ammonium citrate	0.06	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม
Trace element solution	1.0	มิลลิลิตร
Glucose solution หรือ Sucrose solution	50.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันให้ความร้อน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

Trace element solution ประกอบด้วย H_3BO_3 0.3 กรัม, $CoCl_2.6H_2O$ 0.2 กรัม, $ZnSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม, $MnCl_2.4H_2O$ 0.03 กรัม, $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.03 กรัม, $NiCl_2.6H_2O$ 0.02 กรัม และ $CuSO_4.5H_2O$ 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3.2 Glucose solution หรือ Sucrose solution

Glucose หรือ Sucrose	500.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ทำให้สารละลายปลอดเชื้อโดยการกรอง

4. MacConkey Agar

Proteose peptone (Difco) หรือ Polypeptone (BBL)	3.0	กรัม
Peptone (Difco) หรือ Gelysate (BBL)	17.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Bile salts No. 3 (หรือ Bile salts mixture)	1.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.001	กรัม
Agar	13.5	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดแล้วนำไปให้ความร้อน กวนให้สารละลายเข้ากันเป็นเวลา 1-2 นาที ปรับ pH สุดท้ายเท่ากับ 7.6± 0.2 และทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่ 118 องศาเซลเซียส (10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

5. Mineral salt medium (MSM) containing Nile red

Agar	15.0	กรัม
$Na_2HPO_4.7H_2O$	6.7	กรัม
Sodium chloride	10.0	กรัม
KH_2PO_4	1.5	กรัม
NH_4Cl	0.1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2$	0.01	กรัม
Ferrous ammonium citrate	0.06	กรัม
Trace elements	1.0	มิลลิลิตร
Glucose	5.0	กรัม
Nile red (ละลายใน Dimethylsulfoxide)	0.5	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมและหลอม Agar ให้ความร้อน จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

6. Mineral salts medium (Ramsay *et al.*, 1989) สำหรับเลี้ยง *Pseudomonas cepacia* ATCC 17697

Glucose	10.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	4.0	กรัม
KH_2PO_4	2.0	กรัม
$Na_2HPO_4.7H_2O$	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2$	0.02	กรัม
$(CH_3COO)_2Zn.2H_2O$	1.6	มิลลิกรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.3	มิลลิกรัม
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.6	มิลลิกรัม
H_3BO_3	0.6	มิลลิกรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้ความร้อน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

7. Minimal medium (agar) ดัดแปลงจาก Kunioka *et al.* (1989); Kim *et al.* (1996); Khanna and Srivastava (2005); Luengo *et al.* (2003) และ Pederson *et al.* (2006)

Glucose	10.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
$Na_2HPO_4.12H_2O$	3.32	กรัม
KH_2PO_4	0.83	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.02	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม
Trace element solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมและหลอม Agar ให้ความร้อน จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

Trace element solution ประกอบด้วย H_3BO_3 0.3 กรัม, $CoCl_2.6H_2O$ 0.2 กรัม, $ZnSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม, $MnCl_2.4H_2O$ 0.03 กรัม, $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.03 กรัม, $NiCl_2.6H_2O$ 0.02 กรัม และ $CuSO_4.5H_2O$ 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

8. Minimal medium (broth)

เตรียมตามส่วนประกอบ Minimal medium agar ยกเว้นไม่ต้องเติม agar ละลายส่วนผสมให้ความร้อน ปรับ pH เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

9. Minimal medium (Fermentation medium) (Lee *et al.*, 1994) สำหรับเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599

Glucose	10.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
$Na_2HPO_4.12H_2O$	3.32	กรัม
KH_2PO_4	0.83	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.02	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม
Trace element solution	1.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้ความร้อน จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

Trace element solution ประกอบด้วย H_3BO_3 0.3 กรัม, $CoCl_2.6H_2O$ 0.2 กรัม, $ZnSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม, $MnCl_2.4H_2O$ 0.03 กรัม, $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.03 กรัม, $NiCl_2.6H_2O$ 0.02 กรัม และ $CuSO_4.5H_2O$ 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

10. Motility test medium

Pancreatic digest of gelatin	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride solution	10.0	มิลลิลิตร
Agar	4.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดยกเว้น 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride solution ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 995 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปให้ความร้อนเพื่อให้ Agar ละลาย จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เติม 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride solution ปลอดเชื้อ (เตรียมโดยเติมละลาย 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride solution 0.1 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ

ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองโดยใช้เครื่องกรองที่ปลอดเชื้อ) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่ในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อ

11. Nutrient broth (Ramsay *et al.*, 1990)

สำหรับเลี้ยง *Alcaligenes latus* ATCC 29714, *A. eutrophus* DSM 545, *Bacillus cereus* NRC 9008, *Pseudomonas pseudoflava* ATCC 33668, *P. cepacia* ATCC 17697 และ *Micrococcus halodenitrificans* NRC 14024 ประกอบด้วย

Glucose or Sucrose	1.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

12. Nutrient rich medium (Kunioka *et al.*, 1989) สำหรับเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17699

Yeast extract	10.0	กรัม
Polypeptone	10.0	กรัม
meat extract	5.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

13. Nutrient rich medium (Lee *et al.*, 1994) สำหรับเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599

Yeast extract	5.0	กรัม
Tryptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

14. Oxidation and fermentation (O-F) test medium

Sodium chloride	5.0	กรัม
Pancreatic digest of casein	2.0	กรัม

di-Potassium hydrogen phosphate	0.3	กรัม
Bromthymol Blue	0.03	กรัม
Agar	2.5	กรัม
Glucose solution	100.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดยกเว้น Carbohydrate solution เข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้ Agar หลอมละลาย จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ใช้เทคนิคปลอดเชื้อเติม Sterile glucose solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (เตรียมโดยเติม Glucose 10 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองโดยใช้เครื่องกรองที่ปลอดเชื้อ) ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งบรรจุในหลอดทดลองปลอดเชื้อ

15. Sheep blood agar

Heart extract	10.0	กรัม
peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมและให้ความร้อนเพื่อหลอม Agar ปรับ pH เท่ากับ 7.3±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส จึงเติม Sterile sheep blood ในอัตราส่วน 5% ของปริมาตรอาหารที่เตรียม เขย่าเบาๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

16. Starch agar (Cassava starch)

Yeast extract	3.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Cassava starch	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดแล้วนำไปให้ความร้อน กวนให้สารละลายเข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 7.0±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

17. Trypticase soy agar (TSA)

Trypticase หรือ Tryptose (Pancreatic digest of casein)	17.0	กรัม
Phytone (Papaic digest of soya meal)	3.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมและหลอม Agar ให้ความร้อน ปรับ pH เท่ากับ 7.3±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

18. Trypticase (tryptic) soy broth (TSB)

เตรียมตามส่วนประกอบ TSA ยกเว้นไม่ต้องเติม Agar ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH เท่ากับ 7.3±0.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที