

รัตนา เทินสะเกษ : การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตโดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพ (ISOLATION OF POLYHYDROXYALKANOATE-PRODUCING BACTERIA BY UTILIZING CASSAVA PULP AS A SUBSTRATE FOR BIODEGRADABLE PLASTIC PRODUCTION)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิราภรณ์ โพธิ์วิชยานนท์, 213 หน้า

พลาสติกชีวภาพเป็นพลาสติกทางเลือกชนิดหนึ่ง ที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการทางชีวภาพด้วยจุลินทรีย์ ในรูปของพอลิเมอร์ภายในไซโตพลาซึมของเซลล์จุลินทรีย์ อันเนื่องมาจากสภาวะที่ไม่สมดุลของสารอาหาร การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoate : PHA) โดยใช้ น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะเงื่อนไขที่เหมาะสมต่อการผลิต รวมถึงศึกษาคุณลักษณะของพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดผลิตได้ ผลการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำทิ้งระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal medium ที่มีการเติมสีย้อม Nile red เพื่อเป็นการตรวจวัดการสังเคราะห์ PHA เบื้องต้น พบว่า โคโลนีของจุลินทรีย์ SUTR 1 และ SUTS 1 เป็นจุลินทรีย์ที่ให้ผลบวกกับสีย้อม Nile red ผลการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ด้วยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ ระบุว่า SUTR 1 คือ *Candida rugosa* จัดอยู่ในกลุ่มของยีสต์และ SUTS 1 จัดเป็นแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* เมื่อตรวจสอบการสะสมของพอลิเมอร์ชีวภาพภายในเซลล์จุลินทรีย์ด้วยการย้อมสี Nile blue A พบว่า *Candida rugosa* SUTR 1 มีแนวโน้มสะสมพอลิเมอร์ภายในเซลล์ได้ดีกว่า *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1 โดยตรวจวัดจากการปรากฏแกรนูลสีส้มแดงภายในเซลล์เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติมกากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการสกัดพอลิเมอร์ออกจากเซลล์ พบว่ามีปริมาณพอลิเมอร์สะสมภายในเซลล์ยีสต์ *Candida rugosa* SUTR 1 และแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1 สูงสุด 0.1367 และ 0.0727 กรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเมอร์ของยีสต์ *Candida rugosa* SUTR 1 โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 2 กรัมต่อลิตร และปริมาณกากมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณพอลิเมอร์สะสมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 0.3912 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สูงสุด 10^9 CFU/ml ในชั่วโมงที่ 36 ของการศึกษา นอกจากนี้การทดสอบคุณสมบัติของสารประกอบของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่จุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มผลิตได้ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) พบว่าสเปกตรัมของพอลิเมอร์มีความคล้ายคลึงกับพอลิเมอร์มาตรฐาน

พอลิไฮดรอกซีบิวทีเรต [Poly-3-hydroxybutyrate : P(3HB)] ดังนั้นพอลิเมอร์ชนิดนี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นแผ่นฟิล์มหรือขึ้นรูปบรรจุภัณฑ์เพื่อนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่ผลิตจากกระบวนการปิโตรเคมีได้



สาขาวิชามลพิษสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัย
ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนักศึกษา รัฐาน

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ปิ่น ๒.

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิชัย คุ้ม

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ๒.

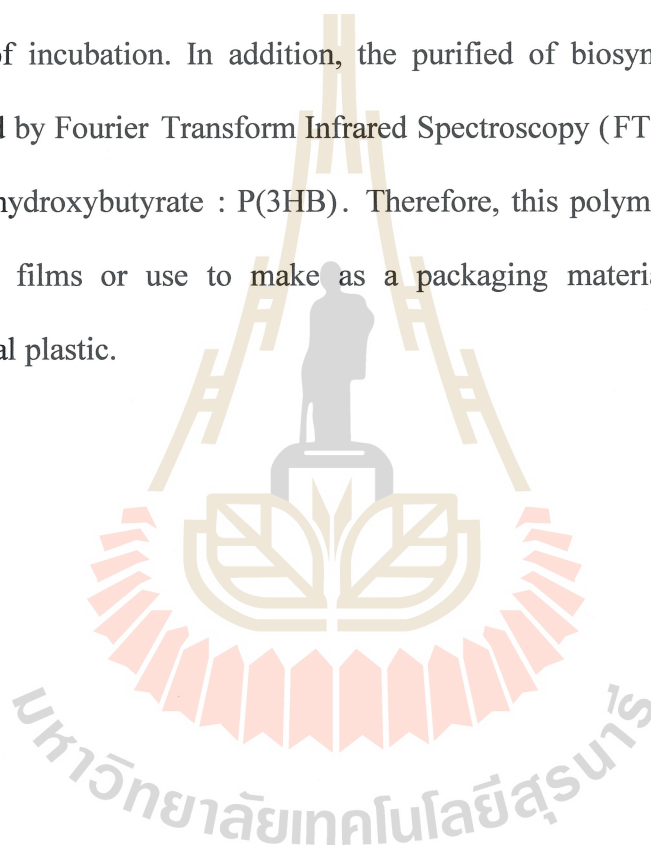
RATTANA TOENSAKES : ISOLATION OF POLYHYDROXYALKANOATE-
PRODUCING BACTERIA BY UTILIZING CASSAVA PULP AS A SUBSTRATE
FOR BIODEGRADABLE PLASTIC PRODUCTION.

THESIS ADVISOR : ASST.PROF.SIRAPORN POTVICHAYANON, Ph.D. 213 PP.

POLYHYDROXYALKANOATE/ BIODEGRADABLE PLASTIC/ PHA-PRODUCING
STRAIN/ CASSAVA PULP/NILE RED/ NILE BLUE A/ FOURIER TRANSFORM
INFRARED SPECTROSCOPY (FT-IR)

Polyhydroxyalkanoate (PHA) is one of the biodegradable polymers and promising alternative materials to synthetic plastics that can be produced by microorganisms and accumulated as inclusion in the cytoplasm under the imbalance of nutrient for cell growth. The aims of this study were to screen of PHA-producing strains by utilizing cassava pulp as a substrate for PHA production and optimize of process parameters for higher production and identification of this polymer. The primary screening of PHA-producing strains using Nile red dyeing technique with directly growing colonies on minimal medium agar was showed 2 isolates, SUTR 1 and SUTS 1, were positive colonies. The SUTR 1 was yeast *Candida rugosa* and SUTS 1 was bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Both isolates presented the spherical bright orange fluorescence granules inside the cells with Nile blue A staining under the fluorescence microscope at excitation wavelength 546 nm. However, SUTR 1 presented these granules more than that of SUTS 1. Quantification of PHA yield from *Candida rugosa* SUTR 1 and *Agrobacterium tumefaciens* SUTS 1 were cultivated in nitrogen limitation as ammonium sulfate 1.0 g/L and cassava pulp 50 g/L as a sole carbon source.

The results revealed that the maximum PHA production by SUTR 1 and SUTS 1 were 0.1367 and 0.0727 g/L, respectively. Moreover, the optimum conditions for PHA production by *Candida rugosa* SUTR 1 were examined including concentration of ammonium sulfate and agitation speed. It was found that the agitation speed at 150 rpm and ammonium sulfate at 2 g/L with 50 g/L of cassava pulp exhibited the maximum PHA production increased to 0.3912 g/L with the maximum cells growth at 10^9 CFU/ml after 36 h of incubation. In addition, the purified of biosynthesized polymer was characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and indicated that was Poly-3-hydroxybutyrate : P(3HB). Therefore, this polymer might be developed into coating films or use to make as a packaging material for replacement of petrochemical plastic.



School of Environmental Pollution and Safety

Academic Year 2017

Student's Signature อริศรา

Advisor's Signature วิไล

Co-Advisor's Signature ปิยะ

Co-Advisor's Signature วิไล