



## รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทีเรท  
เพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพ

Isolation and screening of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) producing bacteria  
for bioplastic production

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2553

จำนวน 220,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

นางสาวสมคิด ดิจริง

ผู้ร่วมโครงการ

นางสาวพีรกานต์ บรรเจิดกิจ

นางสาวอรุณี คงดี

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

19 กันยายน 2554

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซี-บิวทีเรทเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพ (Isolation and screening of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) producing bacteria for bioplastic production) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2553 ผู้วิจัย ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์สถานที่ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการ ดำเนินการวิจัยให้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ และขอขอบคุณ นางสาววราภรณ์ ลวงสวาส ที่มีส่วนทำให้ งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2554

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
การตรวจเอกสาร	8
อุปกรณ์และวิธีการ	21
ผลการวิจัย	30
วิจารณ์ผลการวิจัย	37
สรุปผลการวิจัย	44
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก	50

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	คุณสมบัติการละลายของ PHB ในสารละลายต่าง ๆ	10
ตารางที่ 2	แสดงคุณสมบัติของ PHB เทียบกับ โพลีโพรพิลีน	11
ตารางที่ 3	การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์และความบริสุทธิ์ของ PHB เมื่อพรีทรีทด้วยไฮโปคลอไรท์	20
ตารางที่ 4	จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ	30
ตารางที่ 5	ความเข้มข้นของ PHB ที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรีย เมื่อสกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ	31
ตารางที่ 6	การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย WT24	35
ตารางที่ 7	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน PHB	53

## สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	โครงสร้างทางเคมีของ PHB และ PHV	11
ภาพที่ 2	วิธีการสังเคราะห์ PHB	18
ภาพที่ 3	ผลของสภาพแวดล้อมต่อการสังเคราะห์ PHB	18
ภาพที่ 4	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เรืองแสงภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร บนอาหาร NA+Nile red ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	31
ภาพที่ 5	ความเข้มข้นของ PHB ที่สกัดด้วยวิธีการที่ 2 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ ในอาหาร Nutrient broth บ่มบนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	32
ภาพที่ 6	การเจริญและการผลิต PHB ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของ <i>Micrococcus luteus</i> ในอาหาร Nutrient broth บ่มบนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	33
ภาพที่ 7	การเจริญและการผลิต PHB ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรีย WT 24 ในอาหาร Nutrient broth บ่มบนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	33
ภาพที่ 8	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย WT24 บนอาหาร Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	34
ภาพที่ 9	ลักษณะของแบคทีเรีย WT24 เมื่อขย้อมสีแบบแกรมและส่องดู ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1000 เท่า	34
ภาพที่ 10	ลำดับคู่เบสของเชื้อ <i>Exiguobacterium</i> sp. WT24 GQ503330.1	35
ภาพที่ 11	Accession number GQ503330.1 ของเชื้อ <i>Exiguobacterium</i> sp. ที่มีความเหมือนกับ WT24 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์	36
ภาพที่ 12	กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ PHB	53
ภาพที่ 13	ลักษณะโคโลนีของ ก) <i>Exiguobacterium</i> sp. ข) <i>Micrococcus luteus</i> บนอาหาร Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	55

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ 14

ลักษณะเซลล์แบคทีเรีย ก) *Exiguobacterium* sp.  
ข) *Micrococcus luteus* เมื่อข้อมสีแบบแกรมส่องดูภายใต้  
กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1,000 เท่า

หน้า

55



การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต  
พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพ  
Isolation and screening of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB)  
producing bacteria for bioplastic production

สมคิด ดีจิง<sup>1</sup> พีรภานต์ บรรเจิดกิจ<sup>2</sup> และอรุณี คงดี<sup>3</sup>

Somkid Deejing,<sup>1</sup> Peerakarn Banjerdkij,<sup>2</sup> and Arunee Kongdee<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup> คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ แยกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทจากแหล่งต่าง ๆ โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Nutrient agar (NA) ที่เติม Nile red ได้แบคทีเรีย จำนวน 223 ไอโซเลท และมีแบคทีเรียที่มีผู้แยกไว้แล้วในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 118 ไอโซเลท รวมแบคทีเรียทั้งหมด 341 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดมาคัดเลือกรุ่นต้น โดยการเพาะเชื้อลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) ที่เติม Nile red โดยดูการเรืองแสงของโคโลนี ภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร พบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 33 ไอโซเลท ที่เรืองแสง ภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เมื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย 3 วิธี พบว่า วิธีที่ 2 (ดัดแปลงจากวิธีการของ Kaynar and Beyatli, 2009) เป็นวิธีที่เหมาะสมในการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย และพบว่า แบคทีเรีย *Micrococcus luteus* และแบคทีเรีย WT 24 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุด เท่ากับ 100.93 และ 99.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาการเจริญและการผลิต PHB ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรีย ทั้ง 2 สายพันธุ์ ในอาหาร Nutrient broth (NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ทั้ง *Micrococcus luteus* และ แบคทีเรีย WT24 ผลิต PHB ได้สูงสุด เท่ากับ 100.12 และ 101.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 48 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ และการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย WT24 โดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA พบว่า แบคทีเรีย WT24 มีความเหมือนกับ *Exiguobacterium* sp. เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรท การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต PHB การสกัด PHB

### Abstract

Total two hundred twenty three of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) producing bacteria were isolated from various sources on Nutrient agar (NA) with Nile red by spread plate technique. One hundred eighteen isolates were obtained from Microbiology laboratory of Maejo university. The primary screening of PHB production of 341 isolates were observed epifluorescence exciting Nile red wavelength of 366 nm upon binding to PHB granules in bacteria cells. It was found that 33 isolates showed fluorescence exciting Nile red at 366 nm. The optimization of PHB extraction method was investigated. It was found that the optimal extraction method was Method II (Kaynar and Beyatli, 2009). The screening of PHB production was studied under optimal extraction method. It was found that *Micrococcus luteus* and bacterial WT24 showed high PHB concentration at 100.93 and 99.86  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Time course of *Micrococcus luteus* and bacteria WT24 were examined in Nutrient broth at 37 °C. *Micrococcus luteus* and WT24 showed highest PHB concentration 100.12 and 101.50  $\mu\text{g/ml}$  for 48 and 36 h, respectively. Finally, the identification of bacteria by sequences of 16S rRNA was revealed. Bacteria WT24 had 100 % similarity with *Exiguobacterium* sp.

Key words: poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, screening PHB producing bacteria, PHB extraction

## คำนำ

ปัจจุบันทั่วโลก กำลังเผชิญกับปัญหาภาวะโลกร้อน (global warming) หรือ ภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง (climate change) ต้นเหตุสำคัญของภาวะโลกร้อน ร้อยละ 90 มาจากมนุษย์ สร้างกิจกรรมเผาผลาญเชื้อเพลิง ส่งผลให้มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ขึ้นสู่ชั้นบรรยากาศมากเกินไปจนความสามารถของโลกที่จะสะท้อนความร้อนจากพื้น โลกออกไปนอกโลกได้ทันปรากฏการณ์ “ภาวะโลกร้อน” ได้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาวะอากาศอย่างรุนแรงทั่วโลก ซึ่งล้วนแต่เป็นผลกระทบระดับมหันตภัยต่อสิ่งมีชีวิตบนโลกทั้งสิ้น เช่น พายุหมุนที่เกิดถี่ และรุนแรงมากขึ้น ระดับน้ำทะเลที่สูงขึ้นจากการละลายของน้ำแข็งขั้วโลก สภาพอากาศที่แปรปรวนจนยากจะคาดเดาฤดูกาล และวงจรการเกษตรเปลี่ยนแปลง เกิดโรคระบาดใหม่ ๆ เป็นต้น แถบภาคเหนือและภาคอีสานของประเทศไทยต้องเผชิญกับอากาศหนาวจัด ขณะที่ภาคกลางประสบกับปัญหาน้ำท่วมหนักอย่างไม่เคยเป็นมาก่อน ส่วนภาคใต้ก็มีพายุที่รุนแรงขึ้น ปัญหาทะเลกัดเซาะชายฝั่งเข้ามาลึกมากขึ้น หรือแม้กระทั่งภัยจากแผ่นดินไหวที่ ซึ่งผู้คนกำลังเผชิญหน้ากับสภาวะเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากภาวะ โลกร้อนต่าง ๆ มากมาย

ความเกี่ยวข้องระหว่างการใช้พลาสติกกับภาวะ โลกร้อน ก็ยังมีการใช้พลาสติกมากเท่าไรปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกปล่อยสู่ชั้นบรรยากาศโลก จากการเผาไหม้ในกิจกรรมการผลิต และเผาทำลายพลาสติกก็จะยิ่งสูงมากขึ้น ทำให้เกิดปัญหามลพิษตามมามากมาย เนื่องจากการเผาทำลายพลาสติกทำให้เกิดการสะสมสารพิษในชั้นบรรยากาศ ฝุ่นพลาสติกที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทำให้เกิดปัญหาที่สำคัญ คือการเสื่อมโทรมของดินและน้ำเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตทั้งในน้ำและบนบก เป็นต้นเหตุสำคัญของเกิดก๊าซเรือนกระจกที่สำคัญให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เป็นสารก่อมะเร็งเมื่อถูกเผา ทำให้เกิดการอุดตันในทางระบายน้ำ และทำให้เกิดน้ำท่วม เป็นอันตรายต่อระบบนิเวศ เป็นต้นเหตุของการเพาะพันธุ์และแพร่กระจายของพาหะนำโรคและการแพร่ระบาดของโรคร้ายหลายชนิด เป็นต้นเหตุของการเกิดอุบัติเหตุของการเดินทางทั้งทางบก และทางน้ำและทางอากาศ

ถุงพลาสติกที่เราใช้ ส่วนใหญ่ผลิตได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ที่ใช้เพลิงฟอสซิลคือพวกน้ำมัน ถ่านหิน หรือ ก๊าซธรรมชาติ เป็นวัตถุดิบ ซึ่งสามารถผลิตได้อย่างรวดเร็ว ปริมาณมาก และใช้ต้นทุนต่ำ แต่ประเทศไทยยังต้องสั่งเม็ดพลาสติกนำเข้าเพื่อนำมาผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกต่าง ๆ เพื่อใช้ในการบรรจุและผลิตเป็นวัสดุต่าง ๆ มากมาย ปัจจุบันประชากรทั่วโลกใช้พลาสติกเป็นจำนวนมาก เนื่องจากพลาสติกมีราคาถูกและสามารถผลิตเป็นอุปกรณ์เครื่องใช้

ต่าง ๆ ตามความต้องการได้ง่าย ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์จากพลาสติกเป็นจำนวนมาก ซึ่งบางชนิดใช้ครั้งเดียวทิ้ง จึงทำให้เกิดขยะพลาสติกเป็นจำนวนมากเป็นต้น ถึงแม้ว่าจะสามารถนำขยะพลาสติกบางส่วนไปแปรรูปกลับมาใช้ใหม่ก็ตาม แต่ขยะในส่วนที่เหลือก็ยากที่จะกำจัด เพราะใช้เวลาในการจัดการนานในการย่อยสลายถุงพลาสติก 1 ใบ ต้องใช้เวลาย่อยสลายถึง 450 ปี หากนำไปเผาก็จะทำให้เกิดสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งทำให้เกิดมลภาวะทำให้โลกร้อน จึงส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทั้งที่เป็นอยู่ ประกอบกับขณะนี้ราคาน้ำมันในตลาดโลกมีความผันผวนและมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้กระทบถึงราคาต้นทุนในการผลิตพลาสติกด้วย ในหลายประเทศจึงได้จำกัดการใช้พลาสติกและเร่งส่งเสริมการผลิตพลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้ และจำกัดการใช้พลาสติกลง พร้อมทั้งสนับสนุนให้มีการวิจัยเพื่อใช้พืชหรือชีววัตถุที่เหมาะสมที่จะนำมาผลิตพลาสติกชีวภาพเพื่อทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ งานวิจัยพลาสติกชีวภาพจึงเป็นการวิจัยแห่งอนาคต

ทั่วโลกพยายามคิดหาวิธีผลิตพลาสติกที่มีวัตถุดิบมาจากธรรมชาติ รวมทั้งประเทศไทยที่จัดให้มีโครงการ นวัตกรรมวัสดุชีวภาพ (Bio-based materials) เพื่อนำมาทำเป็นพลาสติกชีวภาพ (bioplastic) พลาสติกชีวภาพจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการบรรเทาปัญหาภาวะโลกร้อน ด้วยคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายได้ กลายเป็นธาตุในดินที่ไม่เป็นพิษกับดินและสิ่งแวดล้อม ในขณะที่ด้วยกันพยายามผลักดันให้เกิดผลิตภัณฑ์ปลายน้ำ เช่น ถุงพลาสติก หลอด ช้อน ส้อม ถาดใส่อาหาร อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ ชิ้นส่วนในรถยนต์ แผ่นดิสก์ ซีดี หรือการนำมาทำเป็นเสื้อผ้า กาว สำหรับหมอเพื่อใช้ในการผ่าตัดที่เมื่อใช้เสร็จก็สามารถทิ้งได้เลยอีกด้วย นอกจากนี้พลาสติกชีวภาพ ยังมีตลาดรองรับทั้งในอุตสาหกรรมเส้นใยสิ่งทอ อุตสาหกรรมพลาสติก อุตสาหกรรมยานยนต์ อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ ชิ้นส่วนอุปกรณ์ไฟฟ้า และบรรจุภัณฑ์ อีกทั้งยังเป็นการเตรียมความพร้อมให้กับอุตสาหกรรมส่งออกต่างประเทศ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบทางการเกษตรของไทย ข้อจำกัดในการผลิตพลาสติกชีวภาพหากเปรียบเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์แล้วถือว่ายังมีต้นทุนที่สูงอยู่ เพราะต้นทุนในการผลิตกิโลกรัมละ 1.5 - 2 ดอลลาร์สหรัฐ ในขณะที่พลาสติกสังเคราะห์กิโลกรัมละ 1 ดอลลาร์สหรัฐ

พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรท (poly-β-hydroxybutyrate, PHB) ซึ่งเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพประเภทอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ในสายโซ่ของโมเลกุลที่สามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายในธรรมชาติภายในระยะเวลาอันสั้น จึงเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ควรเร่งสนับสนุนให้มีการวิจัยเกี่ยวกับพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพให้มากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ ต้นทุนในการผลิตพลาสติกชีวภาพยังสูงกว่า

พลาสติกสังเคราะห์อยู่มาก ดังนั้น ก็คาดหวังในอนาคตว่า ถ้าหากมีผลงานวิจัยที่สามารถทำให้สามารถเพิ่มอัตราการผลิตของ PHB ได้สูง ๆ และสามารถลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในขั้นตอนต่าง ๆ ของกระบวนการผลิตลงได้ ก็จะทำให้พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพนี้เป็นที่นิยมแพร่หลายมากยิ่งขึ้น เป็นการส่งเสริมให้มีการลดปัญหาสิ่งแวดล้อม และยังเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถช่วยบรรเทาภาวะโลกร้อนที่แสดงให้เห็นถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตบนโลกได้อีกด้วย

ในงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิเรท และศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทที่ระยะเวลาต่าง ๆ จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้เพื่อผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้เองในธรรมชาติต่อไป

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้
2. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตได้สูง
3. เพื่อศึกษาการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้



### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้แบบที่เรียบที่สามารผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรท เพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตพลาสติกชีวภาพ
2. ทราบระยะเวลาในการผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทจากแบบที่เรียบเพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้ไปพัฒนาต่อขอดงานวิจัยทางด้านพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ
3. เป็นแนวทางในการผลิตเม็ดพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้เองภายในประเทศ และได้วัสดุที่ใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
4. เป็นแนวทางในการปรับปรุงกระบวนการผลิตที่ช่วยลดต้นทุนการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เพื่อแข่งขันกับการผลิตพลาสติกสังเคราะห์ได้
5. เป็นแนวทางช่วยลดปัญหามลพิษที่เกิดจากขยะพลาสติกที่ย่อยสลายยากในสิ่งแวดล้อมและบรรเทาปัญหาภาวะโลกร้อน ซึ่งนับวันจะทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น และยังช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมให้กับสิ่งมีชีวิตบนโลกปัจจุบันและอนาคต
6. เป็นแนวทางช่วยลดการสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศ เพราะปัจจุบันประเทศไทยต้องสั่งซื้อเม็ดพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากต่างประเทศเพื่อนำมาผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกต่าง ๆ มากมาย
7. การตีพิมพ์บทความในวารสารในประเทศ และวารสารนานาชาติ

## การตรวจเอกสาร

### พลาสติกชีวภาพ

พลาสติกชีวภาพเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ชนิดหนึ่งที่มีกลไกการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และแบคทีเรียในธรรมชาติ เมื่อย่อยสลายแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น น้ำ มวลชีวภาพ ก๊าซมีเทน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นสิ่งจำเป็นในการเจริญเติบโต และดำรงชีวิตของพืช จนไม่ก่อผลเสียตามมาหลังการใช้งาน เหมือนพลาสติกทั่วไป และพลาสติกชีวภาพสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ *Bacillus* sp., *Actinomycetes* sp., *Beijerinckia* sp., *Azospirillum* sp., *Chromatium* sp., *Chromobacterium* sp., *Chlorogloea* sp., *Hyphomicrobium* sp. เป็นต้น เนื่องจากพลาสติกชีวภาพมีราคาต้นทุนสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกสังเคราะห์จึงทำให้ไม่เป็นที่นิยม อย่างไรก็ตาม จากปัญหาขยะพลาสติกสังเคราะห์โดยเฉพาะพลาสติกที่มีอายุการใช้งานสั้นและปริมาณการใช้จำนวนมาก เช่น ถุงพลาสติก ฟิล์มห่ออาหาร และกล่องโฟมที่เพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ และยากต่อการกำจัดเพราะจุลินทรีย์ในธรรมชาติย่อยสลายได้ยาก และก่อให้เกิดปัญหามลพิษตามมา เช่น ปัญหาขยะมูลฝอย ปัญหาโลกร้อน เป็นต้น จึงทำให้พลาสติกชีวภาพ หรือพลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์เข้ามามีบทบาทมากขึ้นเพื่อที่จะทดแทนการใช้พลาสติกสังเคราะห์ (ภาณุวัฒน์, 2548)

ชนิดของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ได้แก่

#### พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid, PLA)

Polylactic acid หรือ Polylactide เป็นพลาสติกที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักให้ได้กรดแลคติกซึ่งกรดแลคติกนี้เป็น โมโนเมอร์ที่จะนำไปใช้ป็นสารตั้งต้นในการผลิตเป็นพลาสติก โดยนำไปผ่านกระบวนการโพลิเมอไรซ์ (Polymerization) ได้เป็นโพลิเมอร์ที่ เรียกว่า polylactide (พูนศักดิ์, 2551)

#### พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรท (Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, PHB)

PHB เป็นโพลิเมอร์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่สะสมอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์ประกอบด้วยหมู่คาร์บอนิล ออกซิเจน และหมู่เมทิล โดยโครงสร้างดังกล่าวจะต่อกันเป็นสาย PHB ด้วยพันธะเอสเทอร์จำนวน โมโนเมอร์ที่ประกอบเป็นสาย PHB มีประมาณ 23,000-35,000 คุณสมบัติของ PHB จัดเป็นโพลิเมอร์ขนาดใหญ่ จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟอร์ม ไคคลอโรมีเทน ไคคลอโรเอซีเทต เป็นต้น แต่ PHB ไม่สามารถละลายได้ในสารละลายมีขี้ว เช่น น้ำ เมทานอล เอทานอล สำหรับความหนาแน่นของ PHB จะอยู่ระหว่าง 1.171-1.260 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร PHB ที่มีความหนาแน่นต่ำจะไม่มีรูปร่างที่แน่นอน แต่ถ้าหากมีความหนาแน่นสูงจะสามารถดกผลึกได้ ส่วนจุดหลอมเหลวจะแปรผันระหว่าง 157-188 องศาเซลเซียส

### ลักษณะของ PHB

PHB เป็นสารที่มีลักษณะคล้ายไขมัน ลอยตัวเป็นก้อนอยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์แบคทีเรีย ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานให้แก่เซลล์ การสังเคราะห์ PHB จะเกิดเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีอาหารไม่สมบูรณ์ และมีปริมาณคาร์บอนมากเกินไป (Sayyed and Gangurde, 2009) จุลินทรีย์จะเปลี่ยนสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งคาร์บอนให้เป็นอะซีติลโคเอ หากจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่มีสารอาหารต่าง ๆ สมบูรณ์เกินไป อะซีติลโคเอที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนให้เป็นแหล่งพลังงานและชีวมวล แต่ถ้าอยู่ในสภาวะที่อาหารไม่สมดุล และมีปริมาณคาร์บอนมากเกินไป อะซีติลโคเอจะถูกเปลี่ยนให้เป็น PHB (Byrom, 1987) โดยที่ปัจจัยการผลิต PHB ขึ้นอยู่กับ อัตราการเติบโต สารอาหารคาร์บอน และภาวะจำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส หรือ ออกซิเจน (Dawes and Senior, 1973)

คุณสมบัติทางกายภาพของ PHB จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ละลายได้ใน คลอโรฟอร์มและไดคลอโรมีเทน (Crottes *et al.*, 2008) ตกตะกอนด้วยอีเทอร์ จุดหลอมเหลว 160-180 องศาเซลเซียส ไม่ละลายในเอทานอลร่อน เป็นฟิล์มเมื่อระเหยคลอโรฟอร์มออก ไม่สามารถละลายในสารละลายมีขี้ เช่น น้ำ เมทานอล เอทานอล การละลายได้ของ PHB ในสารละลายต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 1 และเป็นโฮโมโพลิเมอร์ประกอบด้วยกรดไฮดรอกซีที่มีคาร์บอน 4 อะตอม เป็นโพลิเมอร์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ สะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ ประกอบด้วยหมู่คาร์บอนิล ออกซิเจน และหมู่เมทิล (Wallen and Rohwedder, 1974) สามารถย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อม มีคุณสมบัติเหมือนเทอร์โมพลาสติก (thermoplastics) (Holmes, 1985) และ PHB จัดเป็นพลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) ซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพใกล้เคียงกับโพรพิลีน (Polypropylene, PP) ที่เป็นพลาสติกสังเคราะห์แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม หรือนำมาหลอมเป็นภาชนะต่าง ๆ เช่น ทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้แก่ ฟิล์มห่อของ ถุง ขวด แผ่นกระดาษ เป็นต้น (Kaynar and Beyatli, 2009)

PHB (Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate) จัดเป็นโพลิเมอร์ที่อยู่กลุ่มเดียวกับ PHA (Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate) และ PHV (Poly- $\beta$ -hydroxyvalerate) PHB มักจะพบเป็นโคโพลิเมอร์กับ PHV ซึ่ง PHB มีคุณสมบัติทางกายภาพเช่นเดียวกับเทอร์โมพลาสติกจึงสามารถนำหลอมเป็นภาชนะผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ และ PHB เป็นโพลิเมอร์ที่มีลักษณะคล้ายผลึก และมีโมเลกุลขนาดใหญ่สะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ ประกอบด้วยหมู่คาร์บอนิล เมทิล และออกซิเจน โดยที่โมโนเมอร์จะต่อกันเป็นสาย PHB ด้วยพันธะเอสเทอร์ (ภาพที่ 1) จำนวนโมโนเมอร์ที่ประกอบ

ตารางที่ 1 คุณสมบัติการละลายของ PHB ในสารละลายต่าง ๆ

ละลายได้ดีมาก	ละลายได้ดี	ละลายไม่ได้
คลอโรฟอร์ม	ไดโอเซน	น้ำ
ไดคลอโรมีเทน	ออกทานอน	เมทานอล
ไดคลอโรอะซิเตด	โทลูอิน	เอทานอล
ทรีโอลิน	ฟิรดิน	1-โพรพานอล
เอทิลีนคาร์บอเนต		2-โพรพานอล
โพรพิลีนคาร์บอเนต		กรดเกลือเจือจาง
ทรีฟลูออโรเอทานอล		อัลคาไลไฮเปอร์คลอไรท์
แอสติกแอนไฮไดรด์		ไดเอทิลอีเทอร์
โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล		เอทิลีนแอสซิเตด
ไดเมทิลฟอร์มามิน		เอทิลเมทิลคีโตน
เอทิลอะซิโตะอะซิเตด		เททราไฮโดรฟูราน
ได-, ไตร-, เททรา- คลอโรอีเทน		เอทิลโพรมีเอต
กรดอะซิติก		บิวทิลแอสซิเตด
แอลกอฮอล์ (คาร์บอนมากกว่า 3 อะตอม)		เฮกเซน

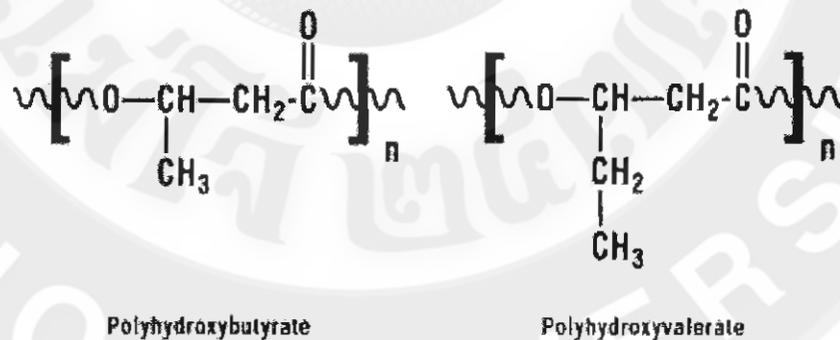
ที่มา Lafferty *et al.*, (1998) อ้างโดย สาโรจน์ และ หยาคฝน (2542)

กันเป็นสาย PHB มีประมาณ 23,000–35,000 ซึ่งความยาวของสาย PHB ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้คือ วิธีสกัด PHB ออกจากเซลล์ ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ผลิกระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเซลล์ ชนิดของสารอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ พบว่ามีจุลินทรีย์มากกว่า 20 ชนิด สามารถสังเคราะห์และสะสม PHB ไว้ภายในเซลล์ เช่น *Actinomycetes* sp., *Bacillus* sp., *Beijerinckia* sp., *Azospirillum* sp., *Chromobacterium* sp., *Chromatium* sp., *Chlorogloea* sp., *Hyphomicrobium* sp., *Ferrobacillus* sp., *Dexia* sp., *Rhodospirillum* sp., *Micrococcus* sp., *Lumpeopaedia* sp., *Streptomyces* sp., *Rhizobium* sp., *Nocardia* sp., *Spirillum* sp. และ *Sphaerotilus* sp. แต่สำหรับจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อผลิต PHB ได้แก่ *Alcaligenes* sp., *Azobacter* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Methylobacterium* sp. (Byrom., 1987)

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของ PHB เทียบกับพอลิโพรพิลีน

สมบัติ	PHB	โพรพิลีน (PP)
จุดหลอมเหลวผลึก (องศาเซลเซียส)	175	176
การเกิดผลึก (องศาเซลเซียส)	80	70
น้ำหนักโมเลกุล (คาลตัน)	$5 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (องศาเซลเซียส)	15	-10
ความหนาแน่น (กรัม/ลบ.ซม.)	1.25	0.905
โมดูลัส (Gpa)	4.0	1.7
ความทนแรงดึง (Mpa)	40	38
ความสามารถในการยืด (%)	6	400
ความต้านทานอัลตราไวโอเล็ต	สูง	ต่ำ
ความต้านทานตัวทำละลาย	ต่ำ	สูง

ที่มา Evan and Sikdar (1990) อ้างโดย หยาตผนและสาโรจน์ (2542)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ PHB และ PHV (กานูวัฒน์, 2548)

โดยทั่วไป พบว่า การสังเคราะห์และการสะสม PHB ของจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นสูงหลังจากการเติบโตของจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงตัว และจุลินทรีย์จะต้องอยู่ภายใต้ภาวะการเจริญเติบโตที่มีสารอาหารไม่สมดุล กล่าวคือ ในภาวะปกติที่มีสารอาหารต่าง ๆ เพียงพอต่อการเจริญ

เติบโตจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารเหล่านั้นเพื่อการสังเคราะห์โปรตีน ไขมันและสารชีวภัณฑ์อื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ แต่เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในภาวะจำกัดของสารอาหารบางชนิด ได้แก่ ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ออกซิเจน หรือฟอสฟอรัส ก็จะเป็นสาเหตุทำให้จุลินทรีย์สังเคราะห์และสะสม PHB จากแหล่งอาหารคาร์บอนที่มากเกินไป เช่น การเพาะเลี้ยง *Alcaligenes eutrophus* H16 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแอมโมเนียมอย่างเพียงพอ แบคทีเรียจะอยู่ในระยะของการเจริญและมีการสังเคราะห์โปรตีนตามปกติ แต่หลังจากที่แอมโมเนียมถูกใช้หมดไป จึงทำให้การสังเคราะห์โปรตีนสิ้นสุดลง ดังนั้น แบคทีเรียจะสังเคราะห์ PHB ขึ้นอย่างรวดเร็วจากการใช้สารอาหารคาร์บอนที่มีอยู่ ดังตัวอย่างการเพาะเลี้ยง *Azotobacter vinelandii* ภายใต้ภาวะของการเพาะเลี้ยงที่จำกัดออกซิเจนละลายและมีปริมาณไนโตรเจนมากอย่างเพียงพอ พบว่า แบคทีเรีย *Azotobacter vinelandii* สามารถผลิต PHB ได้สูงถึง 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่ถ้าหากมีการเพิ่มปริมาณออกซิเจนละลายให้แก่ระบบของการเพาะเลี้ยงดังกล่าว ก็จะทำให้การผลิต PHB ลดลงอย่างชัดเจน และจากการศึกษายังพบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสารอาหารไนโตรเจน จะทำให้การสะสม PHB ภายในเซลล์สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์

ขณะนี้ PHB สามารถผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรมและได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตสินค้าหรือบรรจุภัณฑ์หลายชนิดได้แล้ว แต่พบว่า การใช้ประโยชน์จากพลาสติกชีวภาพยังไม่เป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางนัก เนื่องจากต้นทุนของการผลิต PHB ยังสูงมาก จึงทำให้พลาสติกชีวภาพที่ผลิตได้ยังคงมีราคาแพง และถือว่าเป็นเหตุผลหลักที่ทำให้พลาสติกชีวภาพไม่อาจจะแข่งขันได้กับพลาสติกสังเคราะห์ที่มีราคาถูกกว่าเป็นอย่างมาก

มีรายงานเกี่ยวข้องกับ การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตผลิตพอลิไฮดรอกซีชีวทิเรทจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ แยกจากดินโดย Gloria *et al.* (1997) แยกแบคทีเรียที่ผลิตไฮดรอกซีชีวทิเรทจากดินได้ 78 ไอโซเลต พบว่า มีจำนวน 29 ไอโซเลต ที่มีปริมาณ PHB 40 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์ และทดสอบลักษณะทางชีวเคมี พบว่า เป็นแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* ซึ่งสายพันธุ์นี้สามารถใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตได้หลายชนิด และสามารถเจริญที่อุณหภูมิได้กว้าง และมีการแยกแบคทีเรียที่ผลิตเบต้าไฮดรอกซีชีวทิเรท จากดินเหนียวได้ 73 ไอโซเลต ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน และมีแหล่งคาร์บอน พบว่า มี 23 ไอโซเลต ที่สามารถผลิต PHB ได้ (Wang and Bakken, 1998) และ Arshad *et al.* (2007) ทำการแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนและบริเวณที่ไม่มีมีการปนเปื้อน ได้เชื้อทั้งหมด 18 ไอโซเลต และทำการย้อมสี Sudan black พบว่า แบคทีเรียที่ผลิตเบต้าไฮดรอกซีชีวทิเรทเป็น *Pseudomonas, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Escherichia* และ *Bacillus* พบว่า สายพันธุ์ MS2D ผลิตเบต้าไฮดรอกซีชีวทิเรทได้สูงสุด 65 เปอร์เซ็นต์ และมี 4 สายพันธุ์

ที่สามารถผลิตแซคคาไรด์ได้ด้วย นอกจากนี้ ยังมีรายงานการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทจากกากตะกอนและแยกได้จากน้ำทิ้งโดย Redzwan (1997) รายงานการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากบ่อน้ำบาดและน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม โดยย้อมสี Sudan Black และเลี้ยงเชื้อที่ผลิตเม็ดไขมันในอาหารที่จำกัดปริมาณไนโตรเจน และมีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้สะสม PHB และย้อมสี Nile Blue PHA ที่สกัดได้ยืนยันด้วยวิธี Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy และ Cortes *et al.* 2008 แยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทจากของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลบรรจุกระป๋อง โดยคัดเลือกจากการย้อมด้วยสี Sudan Black และ Nile red เช่นกัน และสกัดเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทโดยวิธีการทางเคมี นอกจากนี้ ยังจำแนกชนิดของเชื้อโดยใช้ 16S rRNA พบว่า เป็นแบคทีเรีย *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Paracoccus*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Methylobacterium* ในปีเดียวกัน Ree *et al.* (2004) ได้รายงานการแยกแบคทีเรีย *Acinetobacter sp.* ที่สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทได้จากกากตะกอนน้ำทิ้ง โดยทำการย้อมด้วยสี Sudan black พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ RTA 3117 สามารถเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรท 0.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง และสายพันธุ์ 3757 ที่ถูกจำกัดด้วยฟอสเฟต แอมโมเนีย หรือซัลเฟต สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรท ได้ 2, 7.8 และ 11.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ต่อมา Yan *et al.* (2008) แยกแบคทีเรียที่ผลิตเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทได้จากกากตะกอนน้ำทิ้งเช่นกัน พบว่า ได้แบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลท เมื่อนำมาคัดเลือกในอาหารที่มีอะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนโดยการย้อมสี Nile blue และดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์และยืนยันผลโดยวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาณอาหาร 150 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรีย SB3 สามารถผลิตเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทได้สูงสุดเท่ากับ 27.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Porwal *et al.* (2008) แยกแบคทีเรียจำนวน 35 ไอโซเลท จากแหล่งต่าง ๆ เช่น อาหารที่ปนเปื้อน ดินที่มีไนโตรเจนปริมาณมาก กากตะกอน กากตะกอนที่ปนเปื้อนน้ำมัน เมื่อจำแนกเชื้อโดยใช้ 16S rRNA พบว่าเป็น *Bacillus*, *Bordetella*, *Enterobacter*, *Proteus* และ *Pseudomonas* ซึ่ง Alias and Tan (2005) คัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทจากน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว โดยการย้อมสี Sudan Black พบว่า มี 10 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตได้ในอาหารที่จำกัดแหล่งไนโตรเจนและเติม น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน และมี 1 ไอโซเลทที่สามารถผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรท เมื่อย้อมด้วย Nile Blue A มี 2 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญและผลิตเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรท โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นวัตถุดิบ ซึ่ง Kung *et al.* (2007) ได้แยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถ

ผลิต PHB โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม Nile red ร่วมกับวิธีการทางพันธุศาสตร์เพื่อขึ้นชั้นผล โดยตรวจหาจุลินทรีย์ที่สะสมเม็ดไขมันไว้ในเซลล์ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ โดยการย้อมสี โคโลนีด้วย Nile red และตรวจสอบการสะสมเม็ดไขมันภายในเซลล์โดยการย้อมสี sudan black พบว่า จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ได้ประมาณ 100 สายพันธุ์ ซึ่งการใช้วิธีการดังกล่าวข้างต้นในการตรวจหาแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB เป็นวิธีการที่ได้ผลเร็ว และ Arun *et al.* (2009) รายงานการแยกแบคทีเรียที่ผลิต PHB ได้จากแหล่งต่าง ๆ บริเวณทะเล พบว่า ได้เชื้อจำนวน 42 ไอโซเลท แต่มีเพียง 4 ไอโซเลทที่สะสม PHB ภายในเซลล์ และยังพบว่า *Vibrio sp.* (MK4) สามารถผลิต PHB ได้สูงที่สุด เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ของ *Vibrio sp.* (MK4) ได้แก่ ผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบกะ พบว่า ได้เซลล์ 9.1 กรัมต่อ ลิตรและผลิต PHB ได้ 4.22 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

มีรายงานการผลิต PHB จากแบคทีเรีย *Bacillus sp.* ได้แก่ Yilmaz *et al.* (2005) รายงานว่า *Bacillus pasteurii* P2 และ *Bacillus lentus* P18 สามารถผลิต PHB ในอาหาร Nutrient broth medium ที่เติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้สูงกว่าในอาหารที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน นอกจากนี้ ยังพบว่า *Bacillus pasteurii* P2 ผลิต PHB สูง ในอาหารที่มีแลคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน และ L-glycine เป็นแหล่งไนโตรเจน และ *Bacillus lentus* P18 สามารถผลิต PHB สูงได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน คือ กลูโคส และ DL-tryptophan ตามลำดับ นอกจากนี้ Kaynar and Beyatli (2009) แยกแบคทีเรีย *Bacillus spp.* ที่สามารถผลิต PHB ได้จากกล้าไส้ปลาชนิดต่าง ๆ พบว่า เป็น *Bacillus pasteurii*, *Bacillus badius*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lentus* และ *Bacillus pumilus*

#### การย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพ

PHB ซึ่งเป็นพลาสติกชีวภาพประเภทแอลิฟาติกโพลีเอสเตอร์ (Aliphatic polyester) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเตอร์ในสายของโมเลกุล จึงทำให้สามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ ในธรรมชาติการย่อยสลายทางชีวภาพของ PHB เกิดได้ทั้งในดินและทะเล และในการย่อยสลายโพลิเมอร์จะเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดีพอลิเมอร์ไรเซชัน (Depolymerization) ซึ่งอาศัยการทำงานของ

เอนไซม์หลายชนิดของจุลินทรีย์ เช่น ไฮโดรจิเนส(Hydrogenase) ดีเมอเรส (Depolymerase) และ เอสเทอเรส (Esterase) เป็นต้น โดยโมโนเมอร์และไดเมอร์ที่ได้จากการย่อยสลาย PHB จะกลายเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ อัตราการย่อยสลายโพลิเมอร์จะเร็ว หรือช้าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น พื้นที่ผิวหน้าของ PHB ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาณสารอาหาร และปริมาณออกซิเจน อัตราการย่อยสลายพลาสติกชีวภาพหนา 1 มิลลิเมตร ในแต่ละสภาวะแวดล้อมจะแตกต่างกันออกไป เช่น การย่อยสลายในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะใช้ระยะเวลา 6 สัปดาห์ แต่นานถึง 60 สัปดาห์ในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนในดินที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะใช้เวลา 75 สัปดาห์ และนานถึง 350 สัปดาห์ ในน้ำทะเลที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นต้น (ภาณุวัฒน์, 2548)

#### ประเภทของพลาสติกย่อยสลายได้ (พูนศักดิ์, 2551)

แบ่งประเภทของการย่อยสลายออกเป็น 5 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. การย่อยสลายได้โดยแสง (Photodegradation) การย่อยสลายโดยแสงมักเกิดจากการเติมสารเติมแต่งที่มีความว่องไวต่อแสงลงในพลาสติก หรือสังเคราะห์โคโพลิเมอร์ให้มีหมู่ฟังก์ชันหรือพันธะเคมีที่ไม่แข็งแรง แดกหักง่ายภายใต้รังสียูวี เช่น หมู่คีโตน (Ketone group) อยู่ในโครงสร้าง เมื่อสารหรือหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวสัมผัสกับรังสียูวีจะเกิดการแตกของพันธะกลายเป็นอนุมูลอิสระ (Free radical) ซึ่งไม่เสถียร จึงเข้าทำปฏิกิริยาต่ออย่างรวดเร็วที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่โพลิเมอร์ ทำให้เกิดการขาดของสายโซ่ แต่การย่อยสลายนี้จะไม่เกิดขึ้นภายในบ่อฝังกลบขยะ กองปุ๋ยหมัก หรือสภาวะแวดล้อมอื่นที่มืด หรือแม้กระทั่งชั้นพลาสติกที่มีการเคลือบด้วยหมึกที่หนามากบนพื้นผิว เนื่องจากพลาสติกจะไม่ได้สัมผัสกับรังสีอัลตราไวโอเลตโดยตรง

2. การย่อยสลายทางกล (Mechanical degradation) โดยการให้แรงกระทำแก่ชิ้นพลาสติกทำให้ชิ้นส่วนพลาสติกแตกออกเป็นชิ้น ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้โดยทั่วไปในการทำให้พลาสติกแตกเป็นชิ้นเล็ก ๆ

3. การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative degradation) การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพลาสติก เป็นปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนลงในโมเลกุลของโพลิเมอร์ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เองในธรรมชาติอย่างช้า ๆ โดยมีออกซิเจน และความร้อน แสงยูวี หรือแรงทางกลเป็นปัจจัยสำคัญ เกิดเป็นสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydroperoxide, ROOH) ในพลาสติกที่ไม่มีการเติม สารเติมแต่งที่ทำหน้าที่เพิ่มความเสถียร (stabilizing additive) แสงและ

ความร้อนจะทำให้ ROOH แตกตัวกลายเป็นอนุมูลอิสระ RO และ OH ที่ไม่เสถียร และเข้าทำปฏิกิริยาต่อที่พันธะเคมีบนตำแหน่งคาร์บอนในสายโซ่โพลิเมอร์ ทำให้เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลอย่างรวดเร็ว แต่ด้วยเทคโนโลยีการผลิตที่ได้รับการวิจัยและพัฒนาขึ้นในปัจจุบัน ทำให้โอเลฟินเกิดการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนได้เร็วขึ้นภายในช่วงเวลาที่กำหนด โดยการเติมสารเติมแต่งที่เป็นเกลือของโลหะทรานสิชัน ซึ่งช่วยทำหน้าที่คะตะลิสต์ เร่งการแตกตัวของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระ ทำให้สายโซ่โพลิเมอร์เกิดการแตกหักและสูญเสียสมบัติเชิงกลรวดเร็วยิ่งขึ้น

4. การย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis degradation) เป็นการย่อยสลายของโพลิเมอร์ที่มีหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์ เช่น แป้ง โพลีเอสเทอร์ โพลียูรีเทน โพลิคาร์บอเนต และโพลิแอมไฮดรอกไซด์ ผ่านปฏิกิริยาที่ก่อให้เกิดการแตกหักของสายโซ่โพลิเมอร์ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดขึ้น โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทที่ใช้คะตะลิสต์ (Catalytic hydrolysis) และไม่ใช้คะตะลิสต์ (Non-catalytic hydrolysis) ซึ่งประเภทแรกยังแบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือ แบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายนอกโมเลกุลของโพลิเมอร์เร่งให้เกิดการย่อยสลาย (External-catalytic degradation) และแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของโพลิเมอร์เองในการเร่งให้เกิดการย่อยสลาย (Internal catalytic degradation) โดยคะตะลิสต์จากภายนอกมี 2 ชนิด คือ คะตะลิสต์ที่เป็นเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น Depolymerase, Lipase, Esterase และ Glycohydrolase ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางชีวภาพ และคะตะลิสต์ที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Non-enzyme) เช่น โลหะแอลคาไลด์ (Alkaline metal) เบส (Base) และกรด (Acid) ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมในธรรมชาติ ในกรณีนี้จัดเป็นการย่อยสลายทางเคมี สำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแบบที่ใช้คะตะลิสต์จากภายในโมเลกุลของโพลิเมอร์นั้นใช้หมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group) ของหมู่เอสเทอร์ หรือเอไมด์บริเวณปลายของสายโซ่โพลิเมอร์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

5. การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation) การย่อยสลายของโพลิเมอร์จากการทำงานของจุลินทรีย์โดยทั่วไปมีกระบวนการ 2 ขั้นตอน เนื่องจากขนาดของสายโพลิเมอร์ยังมีขนาดใหญ่และไม่ละลายน้ำ ในขั้นตอนแรกของการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นภายนอกเซลล์โดยการปลดปล่อยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ซึ่งเกิดได้ทั้งแบบใช้ endo-enzyme หรือ เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะภายในสายโซ่โพลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบ และแบบ exo-enzyme หรือ เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะที่ละหน่วยจากหน่วยซ้ำที่เล็กที่สุดที่อยู่ด้านปลายของสายโซ่โพลิเมอร์ เมื่อโพลิเมอร์แตกตัวจนมีขนาดเล็กพอจะแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์และเกิดการย่อยสลายต่อในขั้นตอนที่ 2 ได้ผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย (Ultimate

biodegradation) คือ พลังงาน และสารประกอบขนาดเล็กที่เสถียรในธรรมชาติ (Mineralization) เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซมีเทน น้ำเกลือ แร่ธาตุต่าง ๆ และมวลชีวภาพ (Biomass)

### การผลิต PHB โดยจุลินทรีย์

กลไกการสังเคราะห์ PHB ในแบคทีเรีย *Alcaligenes eutrophus* มีขั้นตอนการสังเคราะห์ดังภาพที่ 2 โดยมีเอนไซม์เกี่ยวข้อง 3 ชนิดคือเอนไซม์ 3-ketothiolase จะเร่งให้เกิดการรวมตัวกันของ Acetyl CoA ได้เป็น Acetoacetyl-CoA, เอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase จะเป็นตัวรีดิวซ์ acetoacetyl-CoA ไปเป็น R(-)-3-hydroxybutyryl-CoA และ เอนไซม์ PHA synthase จะเร่งปฏิกิริยา polymerizes สาร R(-)-3-hydroxybutyryl-CoA ได้เป็นโพลิเมอร์ PHB (พุนส์กดี, 2551) โดยทั่วไป พบว่า การสังเคราะห์และการสะสม PHB ของจุลินทรีย์จะเกิดขึ้นเมื่อการเจริญของจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) หรือมีการผลิต PHB ไปพร้อม ๆ กับการเจริญ (Growth-associated) (Babel, 1990) และจุลินทรีย์อยู่ภายใต้ภาวะจำกัดของสารอาหาร เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ออกซิเจน หรือฟอสฟอรัส เพราะในสภาวะแวดล้อมที่มีสารอาหารเพียงพอจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารเหล่านี้เพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในภาวะของสารอาหารจำกัดจะทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์สังเคราะห์และสะสม PHB แทนการเจริญเติบโต ดังภาพที่ 3

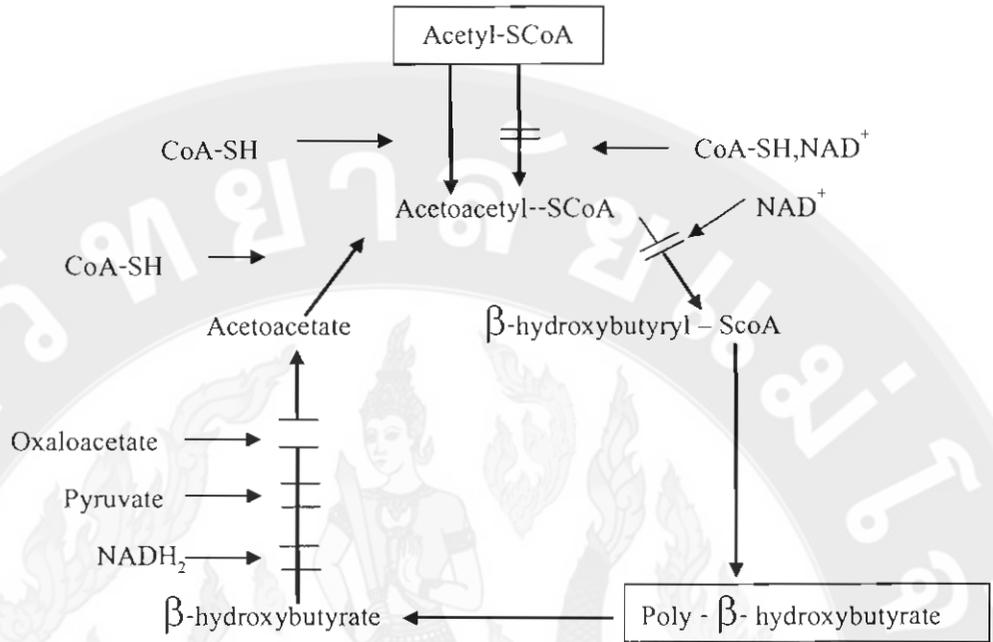
### การประยุกต์ใช้ประโยชน์จาก PHB

เบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรท จัดเป็นพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ ซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพเช่นเดียวกับเทอร์โมพลาสติก สามารถนำมาทำเป็นฟิล์ม ซีด เส้นใย และบรรจุภัณฑ์ต่าง ๆ (Byrom, 1987)

Braunegg *et al.* (1998) รายงานการนำ PHB ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้แก่ 1. นำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น ทำแคปซูลยา ทำด้ายเย็บแผลหรือไหมเย็บแผล ที่สามารถสลายตัว

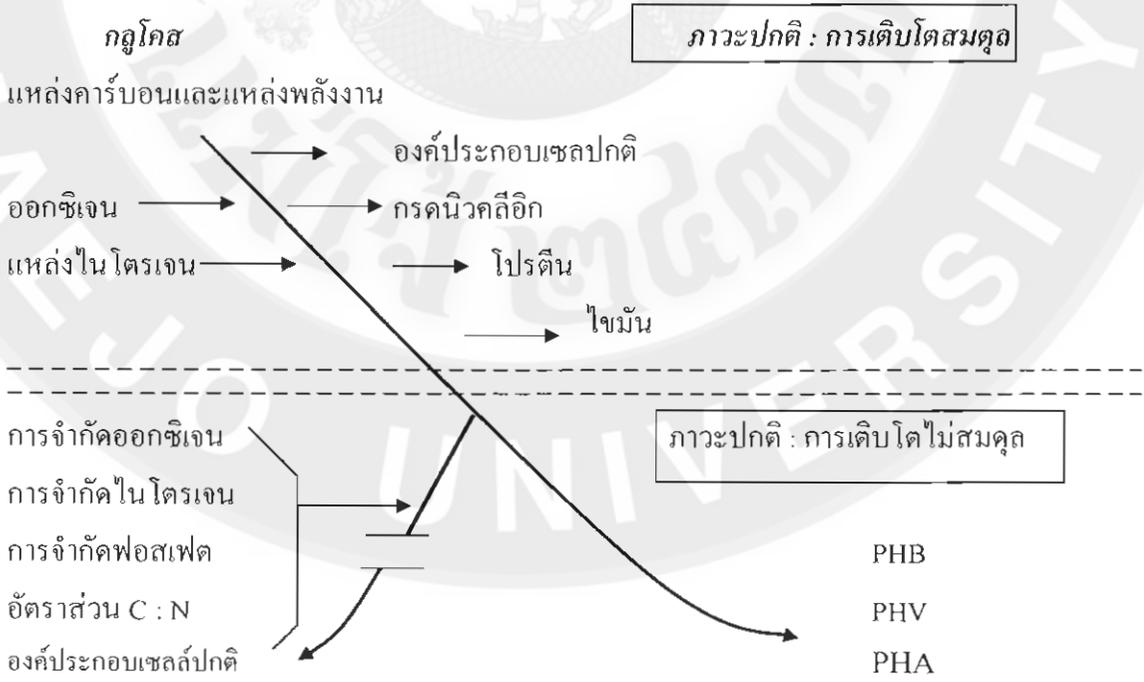
2. นำมาประยุกต์ใช้ในทางการเกษตร เช่น ทำวัสดุคลุมหน้าดิน และเมื่อเกิดการย่อยสลายจะไม่ส่งผลเสียต่อต้นพืช แต่สิ่งที่ได้จากการย่อยสลายเป็นสิ่งจำเป็นในการเจริญเติบโตและดำรงชีวิตของพืช ได้แก่ น้ำ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

3. นำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น วัสดุห่อของ ถุง ขวด ถ้วย แก้ว เป็นต้น



ภาพที่ 2 วิธีการสังเคราะห์ PHB

ที่มา Lafferty *et al.* (1988) อ้างโดย สาโรจน์ และ หยาตผ่น (2542)



ภาพที่ 3 ผลของสภาพแวดล้อมต่อการสังเคราะห์ PHB

ที่มา Lafferty *et al.* (1988) อ้างโดย สาโรจน์ และ หยาตผ่น (2542)

### การศึกษาวิธีการสกัด PHB ออกจากเซลล์แบคทีเรีย

PHB เป็นพลาสติกชีวภาพที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งมีประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์จุลินทรีย์ (Schlegel *et al.*, 1961) ดังนั้น จึงมีการศึกษาหาวิธีการที่จะสกัด PHB ออกจากเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่

#### สารเคมีที่ใช้ในการสกัด PHB (Zhaolin and Xuean., 2000)

1. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) โดยใส่คลอโรฟอร์มในเซลล์แบคทีเรีย แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3-4 ชั่วโมง และนำไปเขย่า ระยะเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายทั้งหมด และทำให้ตกตะกอนด้วยเมทานอล และอบให้แห้ง
2. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, SDS) โดยใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ SDS และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น ปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยน้ำกลั่น และอบให้แห้ง
3. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ร่วมกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (NaClO-SDS) ซึ่งมีคุณสมบัติในการกำจัดสารอื่นที่ไม่ใช่ PHB และช่วยละลายไขมันได้ดี

Hahn *et al.* (1994) รายงานว่า PHB ที่สะสมอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์สามารถสกัดออกมาได้โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite, NaOCl) ที่มีค่าผสมอยู่ ซึ่งจะช่วยกำจัดสารเปปติโดไกลแคนและสารอื่นที่ไม่ใช่ PHB ได้ (ตารางที่ 3)

Fiorese *et al.* (2009) สกัด PHB จาก *Cupriavidus necator* โดยสกัดด้วยสารละลาย 1,2-propylene carbonate พบว่า อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดคือที่อุณหภูมิ 130 °C ระยะเวลา 30 นาที และระยะเวลาในการตกตะกอนที่เวลา 48 ชั่วโมง และพบว่าประสิทธิภาพการสกัด PHB ได้ดี ได้ผลผลิตของการสกัดเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ และได้ PHB ที่มีความบริสุทธิ์ถึง 84 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสภาวะดังกล่าวได้ PHB ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ  $7.4 \times 10^5$  และได้ PHB ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เท่ากับ  $2.2 \times 10^5$  ถ้าใช้อุณหภูมิในการสกัดที่ 145 องศาเซลเซียส และได้ผลผลิตของการสกัดเพียง 45-54 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง 1,2-Propylene carbonate มีประสิทธิภาพช่วยในการสกัด PHB ได้ดี นอกจากนี้ การปรับพีเอชร่วมกับการให้ความร้อนในการสกัด PHB มีผลช่วยปรับปรุงการสกัด PHB ให้ดียิ่งขึ้นด้วย

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลและความบริสุทธิ์ของ PHB เมื่อพรีทรีทด้วยไฮโปคลอไรท์

พรีทรีทเมนต์	น้ำหนักโมเลกุล (MW)	ความบริสุทธิ์ (% Purity)
ไม่ได้พรีทรีทด้วยไฮโปคลอไรท์	1,200,000	50
พรีทรีทเฉพาะสารลดแรงตึงผิวอย่างเดียว		
- SDS (1%)	810,000	87
- Triton X-100 (1%)	800,000	87
พรีทรีทสารลดแรงตึงผิวแล้วตามด้วยไฮโปคลอไรท์		
- SDS (1%)	730,000	97
- Triton X-100 (1%)	790,000	98
พรีทรีทเฉพาะไฮโปคลอไรท์อย่างเดียว (ระยะเวลา 1 นาที)	680,000	87

ที่มา : Ramsay *et al.* (1990) อ้างโดย Kanokphorn (2007)

## อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

### อุปกรณ์

- เครื่องแก้ว เช่น จานเลี้ยงเชื้อ หลอดแก้ว ขวดบรรจุอาหาร แท่งแก้ว บีกเกอร์ สไลด์
- ไวแอลเก็บเชื้อแบบแช่แข็ง (Cryo vial)
- กล่องใส่ไวแอลเก็บเชื้อแบบแช่แข็ง (Cryo box)
- เครื่องเขย่า (Shaker)
- เครื่องปั่นผสม (Vortex)
- เครื่องเขย่าแบบหมุนวนที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Orbitor incubator shaker)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- เครื่องชั่งหยาบ (Laboratory balance) 2 ตำแหน่ง
- เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-WINLAB spectrophotometer)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet class II)
- ไมโครเวฟ (Microwave)
- ตู้อบแห้ง (Hot air oven)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- เครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูง (High intensity ultrasonic processor vibra cell, Ultrasonic sonicate)
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
- โถดูดความชื้น (Desicator)
- ตู้ดูดควัน (Fume hood)
- เครื่องกวนสารละลายและให้ความร้อน (Hot plate stirrer)
- กล่องยูวี (UVGV-58 MINERALIGHT<sup>®</sup> LAMP MULTIBAND UV-254/366 NM)
- ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
- ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

### สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- เอทานอล (ethanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)
- เมทานอล (Methanol, CH<sub>3</sub>OH)
- โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite, NaOCl)
- โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>SO<sub>4</sub>Na)
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl)
- พอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรต (Poly-β-hydroxybutyrate, PHB)
- ไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl)
- กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform, CHCl<sub>3</sub>)
- อะซิโตน (Acetone, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)
- สีไนล์เรด (Nile red dye)
- ไซลีน (Xylene)
- บีฟเอ็กแทรกซ์ (Beef extract)
- เปปโตน (Peptone)
- วัุ้น (Agar)
- คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet)
- ไอโอดีน (Iodine)
- ซาฟรานิน (safranin)

### สารเคมีที่ใช้จำแนกแบคทีเรีย โดยวิธีการหาลำดับเบสของ DNA ในช่วงของยีน 16S rRNA

- ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Genomic DNA Mini Kit
- ชุดทำ PCR product ให้บริษัท MONTAGE<sup>®</sup> life science kits
- Gotaq<sup>®</sup>Green Master mix
- Primer 27F (Forward primer) 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
- Primer 1522R (Reverse primer) 5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3'
- Loading dye
- O' GeneRuler<sup>™</sup> 100 bp DNA Ladder Plus
- เอนไซม์ RNase

## วิธีการวิจัย

### 1. การแยก (Isolation) และคัดเลือกรวม (Screening) แบคทีเรียที่ผลิต PHB ขั้นต้น

(ดัดแปลงจาก Spiekermann *et al.*, 1999)

1.1 เก็บตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ ดิน (ดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน ดินบริเวณท่อน้ำทิ้ง โรงอาหารกลาง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ดินตะกอนทะเล) น้ำทิ้ง อาหารหมักคอง และแหล่งอื่น ๆ (เช่น ผึ้ง น้ำผึ้ง ดอกกล้วย)

1.2 นำตัวอย่างมาทำการเจือจางตามลำดับในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร Nutrient agar (NA) ที่เติม Nile red (ความเข้มข้นสุดท้ายของ Nile red ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (NA+Nile red) แล้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.3 นำจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อไปส่องดูภายใต้หลอดแสงที่มีความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เพื่อดูการเรืองแสงของโคโลนี โดยคว่ำถ้าโคโลนีใดเรืองแสงภายใต้แสงที่มีความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร คาดว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียที่สะสม PHB ภายในเซลล์ เนื่องจาก Nile red จะข้อมติไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์แล้วทำให้เห็นโคโลนีเรืองแสงได้ จากนั้นนำโคโลนีแบคทีเรียที่เรืองแสงมาทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยการขีดเชื้อ (streak) ลงบนอาหารแข็ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว แล้วเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ในกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

### 2. การคัดเลือกรวมแบคทีเรียที่ผลิต PHB ขั้นต้นของแบคทีเรียที่มีผู้แยกไว้แล้วในห้องปฏิบัติการ

จุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้

นำแบคทีเรียที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่มีผู้แยกไว้แล้ว ของห้องปฏิบัติการ จุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 118 ไอโซเลท มาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA+Nile red แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนำไปส่องภายใต้แสงที่มีความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีเรืองแสงภายใต้แสงที่มีความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ไว้ศึกษาต่อไป

### 3. การหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย 1 ไอโซเลท ที่มีโคลนนิ่งเรื่องแสงภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร มาศึกษาวิธีการที่เหมาะสมที่จะใช้ในการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย

#### 3.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

นำแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง (NA slant) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร Nutrient broth (NB) ที่บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

#### 3.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.1 เดิมลงในอาหาร NB ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนวนที่ควบคุมอุณหภูมิได้ เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลวมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง (supernatant) และเก็บส่วนตะกอนเซลล์ (pellet) ไว้ จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร 2 ครั้ง แล้วเก็บเซลล์แบคทีเรียไว้ศึกษาต่อไป

#### 3.3 การสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย

นำหลอดแก้วฝาเกลียวที่สะอาดไปอบแห้งให้มีน้ำหนักคงที่ จากนั้นชั่งเซลล์แบคทีเรีย น้ำหนัก 0.1 กรัม ใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียว แล้วนำเซลล์แบคทีเรียไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง

#### วิธีการสกัด PHB

นำเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการแช่แข็ง มาทำการสกัด PHB ด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี คือ

**วิธีที่ 1** เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhaolin and Xuecan (2000) มีวิธีการสกัด ดังนี้

1. นำเซลล์แบคทีเรียน้ำหนัก 0.1 กรัม ที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว จำนวน 3 หลอด มาเติมสารละลาย Sodium dodecyl sulfate (SDS) 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร (pH 10.0) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ระยะเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งและเก็บเฉพาะส่วนของตะกอนเซลล์

2. เติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10.0 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร โดยปริมาตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีตะกอนเซลล์ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 3 นาที

3. เติมกลอโรฟอร์ม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปต้มในอ่างน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชั่วโมง (ขั้นตอนนี้ให้ทำในตู้ดูดควัน) เพื่อระเหยกลอโรฟอร์มออกไป หลังจากระเหยกลอโรฟอร์มออก จะเห็นเป็นลักษณะคราบสีขาวติดอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง

4. นำหลอดที่มีสารที่ได้จากการสกัดไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที แล้วนำหลอดทดลองไปชั่งน้ำหนักของสารที่สกัดได้และบันทึกน้ำหนัก

5. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดด้วยลูกแก้วแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที จะได้ crotonic acid

6. รอให้เย็นประมาณ 5-10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร (nm)

**วิธีที่ 2** เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Kaynar and Beyatli (2009) มีวิธีการสกัดดังนี้

1. นำเซลล์แบคทีเรียน้ำหนัก 0.1 กรัม ที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว มาเติม 2M HCl ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปใส่ไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 ชั่วโมง

2. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเก็บเฉพาะส่วนของตะกอนเซลล์

3. เติมกลอโรฟอร์มปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในส่วนตะกอนเซลล์ ปิดฝาหลอดแล้วนำไปแช่ ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง

4. นำหลอดทดลองไประเหยกลอโรฟอร์มออก โดยการต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชั่วโมง (ขั้นตอนนี้ให้ทำการทดลองในตู้ดูดควัน)

5. นำหลอดทดลองที่มีสารที่สกัดได้ ไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที แล้วนำหลอดทดลองไปชั่งน้ำหนักของสารที่สกัดได้และบันทึกน้ำหนัก

6. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดด้วยลูกแก้วและนำไปต้มในน้ำเดือด ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที จะได้ crotonic acid
7. รอให้เย็นประมาณ 5-10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร

### วิธีที่ 3 การทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยเครื่อง Ultrasonic sonicate

1. นำเซลล์แบคทีเรียที่แช่แข็งแล้วใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 7.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง Ultrasonic sonicate โดยปล่อยกระแสไฟฟ้าจากเครื่อง 70 เปอร์เซ็นต์ โดยตั้งเวลาให้เครื่องทำงาน 50 วินาที หยุด 10 วินาที จนครบ 20 รอบ
  2. เทซัสเพนชันของเซลล์จากข้อ 1 ใส่ลงในหลอดทดลองแก้วฝาเกลียวแล้วเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปต้มในอ่างน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อระเหยคลอโรฟอร์มออกไป (ขั้นตอนนี้ให้ทำการทดลองในตู้ดูดควัน)
  3. นำหลอดทดลองที่มีสารที่สกัดได้ ไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที แล้วนำหลอดทดลองไปชั่งน้ำหนักที่ได้และบันทึกน้ำหนักของสารที่สกัดได้
  4. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดด้วยลูกแก้วและนำไปต้มในน้ำเดือด ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที จะได้ crotonic acid
  5. รอให้เย็นและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร
- ขั้นตอนนี้เลือกวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย ที่ได้รับความเข้มข้นของ PHB มากที่สุด ไว้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

### 4. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB โดยใช้วิธีการสกัดที่เหมาะสม และการวิเคราะห์ปริมาณ PHB

การเตรียมเชื้อเริ่มต้นเหมือนวิธีการในข้อ 3.1 และวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเหมือนวิธีการในข้อ 3.2 จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียมาสกัด ตามวิธีที่ 2 ซึ่งเป็นวิธีการที่ดัดแปลงจาก Kaynar and Beyatli (2009) ขั้นตอนนี้ผู้ทดลองเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ได้มากที่สุดไว้ศึกษาต่อไป

## 5. ศึกษาการเจริญและการผลิต PHB ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

วิธีการเตรียมเชื้อเริ่มต้นเหมือนวิธีการในข้อ 3.1 เดิมเชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร Nutrient broth ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ข้าง หลังจากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนวนที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ระยะเวลา 108 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และวัดการเจริญของเซลล์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำเซลล์ของแบคทีเรียมาสกัด ตามวิธีการที่ 2 ( คัดแปลงจาก Kaynar and Beyatli, 2009) และวิเคราะห์ความเข้มข้นของ PHB

## 6. การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรีย

### 6.1 ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultural characteristic)

นำแบคทีเรีย WT24 มาฉีดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาลักษณะการเจริญของ แบคทีเรีย WT24 โดยบันทึกลักษณะโคโลนี เช่น สี รูปร่าง ผิวหน้า และขอบของโคโลนี

### 6.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

นำแบคทีเรีย WT24 ที่เจริญบน NA slant อายุ 24 ชั่วโมง ไปย้อมสีแบบแกรม (Gram 's staining) แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1000 เท่า เพื่อดูรูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ การติดสีแกรม และบันทึกผลการทดลอง

### 6.3 การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนที่ยีน

#### 16S rRNA

#### การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย WT24 ในอาหารเหลว Nutrient broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำซัสเพนชันเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNA extraction kit (Geneaid, Taiwan) ตามขั้นตอนคือ เดิม lysozyme ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ละลาย lysozyme 10 มิลลิกรัม ใน TEN buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติม RNase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 10 นาที (กลับหลอดทุก 3 นาที)

จากนั้นเติม GB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (จนกว่าตะกอนจะละลายจนใส กลับหลอดไปมาทุก 3 นาที) เติม Absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำทั้งหมดในหลอดไปใส่ลง GD column ที่อยู่ในหลอด microcentrifuge 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 นาที เทของเหลวในหลอดทิ้ง จากนั้นเติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 นาที เทของเหลวในหลอดทิ้ง เติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นย้าย GD column ลงหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม elution buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 5 นาที ทิ้ง GD column แล้วเก็บ DNA (ส่วนใส) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ต่อไป

#### การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีนในส่วนของ 16S rRNA โดยในขั้นตอนนี้จะใช้ universal primer คือ 27F (Forward primer) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 1522R (Reverse primer) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3' (Operon) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ซึ่งมีลำดับเบสประมาณ 1,500 คู่เบส ทำการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับการ PCR โดยให้มีปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย

Gotaq ®Green Master mix	25	ไมโครลิตร
Primer 27F	4	ไมโครลิตร
Primer 1522R	4	ไมโครลิตร
Genomic DNA	4	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	13	ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง PCR Thermal Cycler โดยกำหนดโปรแกรมการทำงานดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	เวลา 5 นาที
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	เวลา 1 นาที
Annealing	55 องศาเซลเซียส	เวลา 1 นาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	เวลา 1 นาที
Terminating	72 องศาเซลเซียส	เวลา 5 นาที
Hold	4 องศาเซลเซียส	จนกว่าจะใช้งาน

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของ DNA ภายใต้สนามไฟฟ้าผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (Agarose gel electrophoresis) ตามขั้นตอนดังนี้ คือ เตรียม Agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร (% w/v) นำไปหลอมให้ละลายปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมด้วย gel star ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำเจลที่ได้มาเทใน apparatus รอให้เจลแข็งตัว และนำเจลไปวางในเครื่อง run gel เท 1X TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจล จากนั้นเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอดังนี้

#### DNA marker ประกอบด้วย

- O' GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	1	ไมโครลิตร
- 1 X TAE buffer	4	ไมโครลิตร
- loading dye	2	ไมโครลิตร

#### DNA ตัวอย่าง ประกอบด้วย

- DNA ตัวอย่าง	5	ไมโครลิตร
- loading dye	2	ไมโครลิตร

ปิดฝาเครื่องและตั้งกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ ระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยเครื่อง Transiluminator

#### การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

โดยใช้ชุด Montage® PCR โดยเปิด PCR product มาปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ TE buffer (pH 7.5) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงใน reservoir (Filter tube) นำ reservoir ใส่งในหลอด microcentrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 15 นาที นำของเหลวที่อยู่ในหลอด microcentrifuge tube ทิ้ง แล้วเติม TE buffer (pH 7.5) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน reservoir คูัดขึ้นลงแล้วคว่ำ reservoir ลงในหลอด microcentrifuge อันใหม่ จากนั้นนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 2 นาที ซึ่งจะได้ PCR product ที่บริสุทธิ์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อที่จะนำไปหาลำดับเบสของยีนในส่วนของ 16S rRNA โดยบริษัท First Base Laboratories Company ประเทศมาเลเซีย จากนั้นนำลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information; NCBI ซึ่งทำให้ทราบ Genus และ Species ของแบคทีเรียได้

## ผลการวิจัย

### 1. การแยก (Isolation) และคัดเลือกรหัส (Screening) แบคทีเรียที่ผลิต PHB ขั้นต้น

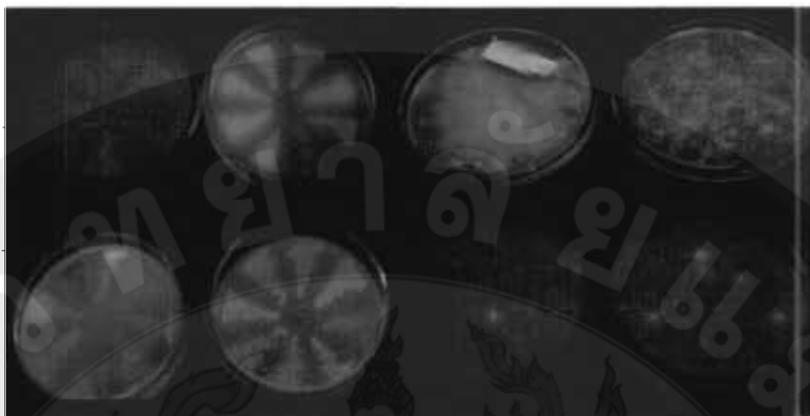
จากการแยกแบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ เช่น ดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน ดินบริเวณท่อน้ำทิ้ง โรงอาหารกลาง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ดินตะกอนทะเล อาหารหมักดอง น้ำทิ้ง และแหล่งอื่น ๆ (ผึ่งน้ำผึ่ง ดอกกล้วย) โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) ที่เติม Nile red (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากผลการทดลองในตารางที่ 4 มีแบคทีเรียที่แยกได้ในการทดลองนี้ จำนวน 223 ไอโซเลท โดยเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดิน น้ำทะเล น้ำเสีย อาหารหมัก และแหล่งอื่น ๆ มีจำนวน 110, 3, 56, 47 และ 7 ไอโซเลท ตามลำดับ ในการทดลองนี้ มีแบคทีเรียที่มีผู้แยกไว้แล้วในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ม.แม่โจ้ จำนวน 118 ไอโซเลท รวมแบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาใช้ในการทดลองนี้มีจำนวน 341 ไอโซเลท

จากการคัดเลือกรหัสแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ขั้นต้น โดยนำงานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียเจริญไปส่องภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ซึ่งหากมีโคโลนีของแบคทีเรียเรืองแสงภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร คาดว่าจะเป็นแบคทีเรียที่สะสม PHB ภายในเซลล์ (ภาพที่ 4) ในการทดลองนี้ พบว่า มีแบคทีเรียที่มีโคโลนีเรืองแสงซึ่งแยกได้จาก ดิน น้ำเสีย อาหารหมัก และแบคทีเรียที่มีผู้แยกไว้แล้วในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 5, 17 และ 3 และ 8 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมแบคทีเรียที่คาดว่าจะสะสม PHB ภายในเซลล์ที่ คัดเลือกได้ในขั้นต้นทั้งหมดจำนวน 33 ไอโซเลท

ตารางที่ 4 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

แหล่งตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย (ไอโซเลท)	จำนวนแบคทีเรียที่เรืองแสงภายใต้แสงความยาวคลื่น 366 nm (ไอโซเลท)
ดิน	SO	110	5
น้ำทะเล	SWT	3	-
น้ำเสีย	WT	56	17
อาหารหมัก	FM	47	3
อื่น ๆ (ผึ่ง น้ำผึ่ง ดอกกล้วย)	OT	7	-
แบคทีเรียที่มีผู้แยกไว้แล้วในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ม.แม่โจ้	ST	118	8
รวม		341	33

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบแบคทีเรียที่เรืองแสงภายใต้แสง ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร



**ภาพที่ 4** ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เรืองแสงภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร บนอาหาร NA+Nile red ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

## 2. ผลการหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย

เลือกโคโลนีแบคทีเรียที่เรืองแสงภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร มาจำนวน 1 ไอโซเลท มาทดลองหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด PHB ซึ่งในการทดลองนี้ทดลองใช้วิธีการสกัด PHB จากเซลล์ของแบคทีเรีย 3 วิธี คือ **วิธีที่ 1** คัดแปลงจากวิธีการของ Zhaolin and Xuenan (2000) **วิธีที่ 2** คัดแปลงจากวิธีการของ Kaynar and Beyatli (2009) และ **วิธีที่ 3** การทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูงโดยใช้เครื่อง Ultrasonic sonicate ก่อนการสกัด จากผลการทดลองในตารางที่ 5 พบว่า ได้ความเข้มข้นของ PHB ที่สกัดได้จากวิธีที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 4.89, 5.43 และ 0.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

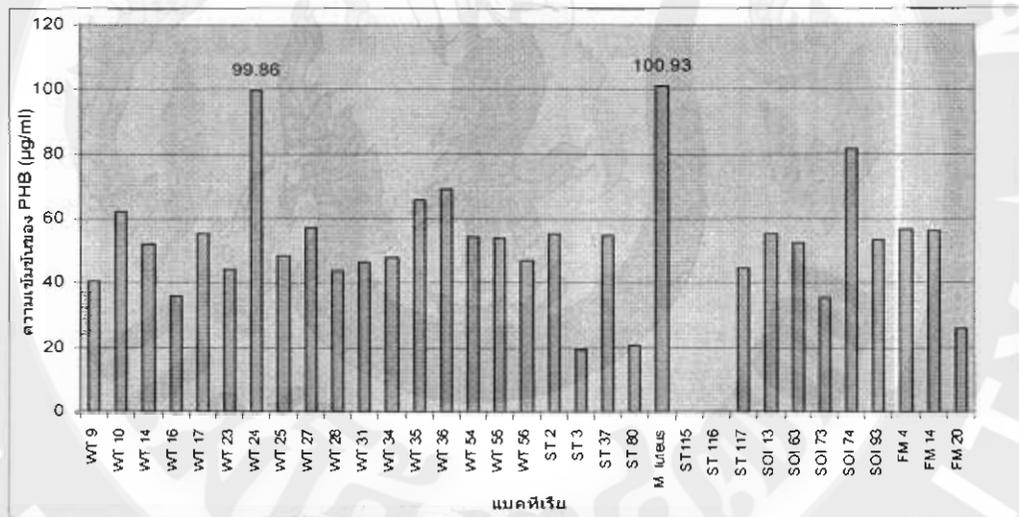
**ตารางที่ 5** ความเข้มข้นของ PHB ที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีการต่าง ๆ

วิธีการที่ใช้สกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย	ความเข้มข้นของ PHB (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
<b>วิธีที่ 1</b> คัดแปลงจากวิธีการของ Zhaolin and Xuenan (2000)	4.89
<b>วิธีที่ 2</b> คัดแปลงจากวิธีการของ Kaynar and Beyatli (2009)	5.43
<b>วิธีที่ 3</b> การทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic sonicate ก่อนการสกัด	0.96

### 3. ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB โดยใช้วิธีการสกัดที่เหมาะสม

จากการนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในขั้นต้น ทั้งแบคทีเรียที่ผู้ทดลองแยกได้เองในการทดลองนี้ และแบคทีเรียที่มีผู้แยกไว้แล้วในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของ ม.แม่โจ้ จำนวน 25 และ 8 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมแบคทีเรียที่นำมาสกัดเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ PHB จำนวน 33 ไอโซเลท โดยทำการสกัดตามวิธีที่ 2 ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Kaynar and Beyatli (2009) จากผลการทดลองในภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่า แบคทีเรีย *Micrococcus luteus* ผลิต PHB ได้มากที่สุดเท่ากับ 100.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรีย WT24 ที่แยกได้จากบ่อน้ำทิ้งของโรงงานผลิตปลาหมัก ผลิต PHB ได้เท่ากับ 99.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในขั้นตอนนี้ ผู้ทดลองเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ได้มากที่สุด จำนวน 2 เชื้อ คือ *M. luteus* และ แบคทีเรีย WT24 ไว้ศึกษาต่อไป

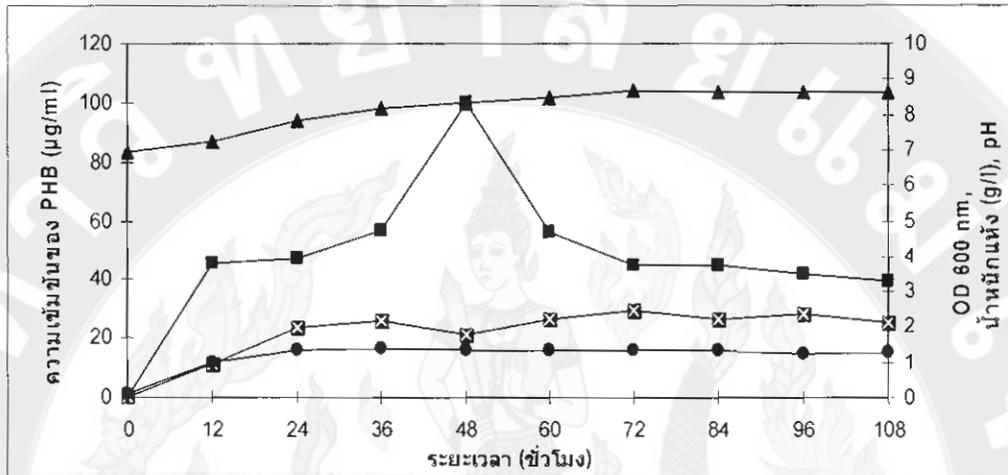


ภาพที่ 5 ความเข้มข้นของ PHB ที่สกัดด้วยวิธีการที่ 2 (ดัดแปลงจากวิธีการของ Kaynar and Beyatli, 2009) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient broth บ่มบนเครื่องเขย่า 150 รอบ ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

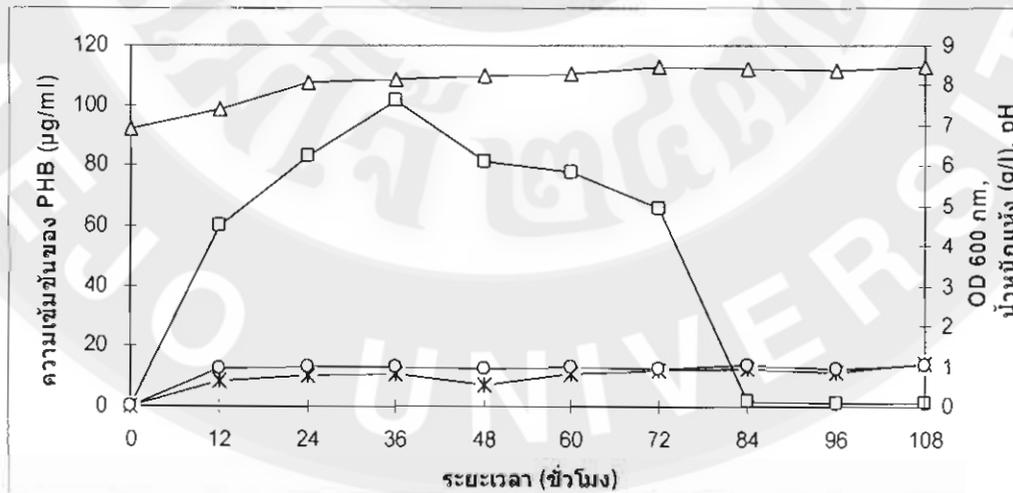
### 4. ผลการศึกษาการเจริญและการผลิต PHB ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

จากการนำ *M. luteus* และแบคทีเรีย WT24 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ระยะเวลา 108 ชั่วโมง วัดการเจริญของเซลล์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และวิเคราะห์ความเข้มข้นของ PHB และวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า *M. luteus* สามารถผลิต PHB สูงสุดในระยะเวลาที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 100.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพ

ที่ 6) ส่วนแบคทีเรีย WT24 มีการเจริญสูงที่สุดในระยะเวลา 36 ชั่วโมง และผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 101.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง (ภาพที่ 7) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ในการทดลองนี้ มีการสะสม PHB สัมพันธ์กับการเจริญ



ภาพที่ 6 การเจริญและการผลิต PHB ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของ *Micrococcus luteus* ในอาหาร Nutrient broth บ่มบนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (—■—) ความเข้มข้นของ PHB (—▲—) น้ำหนักเซลล์แห้ง (—●—) ค่าการดูดกลืนแสง (OD 600 nm)



ภาพที่ 7 การเจริญและการผลิต PHB ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรีย WT 24 ในอาหาร Nutrient broth บ่มบนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (—□—) ความเข้มข้นของ PHB (—▲—) น้ำหนักเซลล์แห้ง (—△—) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (—○—) ค่าการดูดกลืนแสง (OD 600 nm)

## 5. ผลการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรีย

### ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultural characteristic)

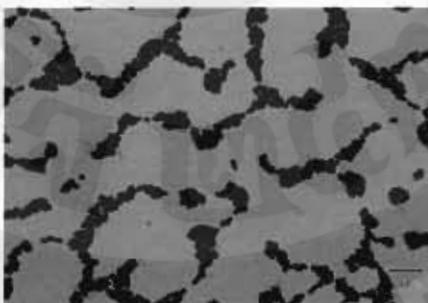
จากการนำแบคทีเรีย WT24 มาจัดลงบนอาหาร NA ผลการทดลองในภาพที่ 8 จะเห็นได้ว่า แบคทีเรีย WT24 มีโคโลนีสีเหลืองส้ม โคโลนีกลม ขอบโคโลนีเรียบ ผิวหน้าโคโลนีเรียบ และโคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร



ภาพที่ 8 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย WT24 บนอาหาร Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

### ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

จากการนำแบคทีเรีย WT24 มาย้อมสีแบบแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1000 เท่า ผลการทดลองในภาพที่ 9 จะเห็นได้ว่า แบคทีเรีย WT24 เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน การจัดเรียงตัวของเซลล์อยู่เดี่ยว ๆ และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก



ภาพที่ 9 ลักษณะของเซลล์แบคทีเรีย WT24 เมื่อย้อมสีแบบแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1000 เท่า

### การจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย WT24 โดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA (ภาพที่ 10) แล้วนำลำดับเบสไปเปรียบเทียบความคล้ายกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information;

NCBI จากผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรีย WT24 มีความคล้ายกับฐานข้อมูล Gen Bank จะ ได้ Accession number ของเชื้อ (ภาพที่ 11) ที่ระบุว่าเป็นเชื้อ *Exiguobacterium* sp. ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย WT24

ไอโซเลท	แบคทีเรีย	Accession number	Identities	% Homology
WT24	<i>Exiguobacterium</i> sp.	GQ503330.1	1000/1000	100

```

CGAGCGCAGGAAGCCGTCTGAACCCTTCGGGGGACGACGGTGGGAATGAGCGGC
GGACGGGTGAGTAACACGTAAAGAACCTGCCCATAGGTCTGGGATAACCACGAG
AAATCGGGGCTAATACCGGATGTGTCATCGGACCGCATGGTCCGCTGATGAAAGG
CGCTCCGGCGTCGCCCATGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA
CGGCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA
ATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGCTTTCGGGTGCG
TAAAGTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTGCCGCAGGCAATGGCGGCACCTTGAC
GGTACCTTGCGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCTCT
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGCCATTGGAAACTGGGA
GGCTTGAGTATAGGAGAGAAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGCCTATAACTGACGCTG
AGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGAAGCTAACG
CATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAG
AACCTTACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCCTTC
GGGGGCAGGGG

```

ภาพที่ 10 ลำดับเบสของเชื้อ *Exiguobacterium* sp. WT24 GQ503330.1



## วิจารณ์ผลการวิจัย

### 1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต PHB ขั้นต้น

จากผลการแยกแบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ บนอาหาร Nutrient agar ที่เติม Nile red พบว่า ได้แบคทีเรียที่แยกมาจากดินจำนวนมากว่าแหล่งอื่น ๆ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากตัวอย่างดินที่นำมาใช้แยกเชื้อในการทดลองนี้ มีจำนวนตัวอย่างมากกว่าตัวอย่างจากแหล่งอื่น ๆ ซึ่ง นงลักษณ์และปรีชา(2539) รายงานว่า ในดินมักพบจำนวนแบคทีเรียมากทั้งชนิดและปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

จากผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ขั้นต้น บนอาหาร NA+Nile red โดยนำงานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียเจริญไปส่องภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ซึ่งหากมีโคโลนีของเชื้อเรืองแสงภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร คาดว่าจะเป็นแบคทีเรียที่สะสม PHB ภายในเซลล์ เนื่องจาก Nile red ที่ผสมลงไปในการเลี้ยงเชื้อเป็นสีที่มีคุณสมบัติในการเชื่อมติดกับส่วนไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (Greenspan *et al.*, 1985) ซึ่ง Neissa *et al.* (2011) และ Aarthi *et al.* (2011) รายงานว่า การใช้สี Nile red เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหาแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ Spickermann *et al.* (1999) เสนอแนะว่า สี Nile red ไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย และสามารถแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ออกจากแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิต PHB ได้ แต่ไม่สามารถใช้แยกเชื้อที่ผลิต wax และ triacylglycerol นอกจากนี้ ยังมีรายงานการใช้สี Nile red ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีชีวทีเรทจากน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว (Alias and Tan, 2005) ในการทดลองนี้ พบว่า มีแบคทีเรียที่มีโคโลนีเรืองแสงภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ที่แยกได้จากน้ำเสียจากบริเวณบ่อน้ำทิ้งของโรงงานผลิตปลาหมัก มีจำนวนมากกว่าที่แยกได้จากแหล่งอื่นๆ ซึ่ง Cortes *et al.* (2008) รายงานว่า เชื้อที่สามารถผลิต PHB ส่วนใหญ่ เป็นเชื้อที่แยกได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของของเสียที่ถูกปล่อยออกจากโรงงานอุตสาหกรรมเพราะบริเวณดังกล่าวมีสารอินทรีย์ปนเปื้อนปริมาณมาก และมีไซยาโนแบคทีเรียจำนวนมากซึ่งไซยาโนแบคทีเรียจะใช้สารอาหาร แล้วส่งผลทำให้เกิดความไม่สมดุลของสารอาหารจึงทำให้พบแบคทีเรียที่สะสม PHB เจริญบริเวณดังกล่าวจำนวนมากกว่าบริเวณอื่น ๆ พบแบคทีเรียต่าง ๆ เช่น *Bacillus* E13, *Staphylococcus* E4, *Paracoccus* E33, *Micrococcus* E36, *Bacillus* C18, *Methylobacterium* C54 และ *Rhodococcus* C20L ซึ่ง Dawes and Senior (1973) พบว่า ปังจัยที่มีผลต่อการผลิต PHB ขึ้นอยู่กับ อัตราการเติบโต สารอาหารคาร์บอน และภาวะ

จำกัดสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส หรือ ออกซิเจน นอกจากนี้ Thirumala *et al.* (2010) แยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ผลิต PHB จากดินและจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอกทีเวตเต็ดสลัดจ์ (Activated sludge) ส่วน Reddy *et al.* (2009) รายงานว่า *Bacillus megaterium* strain OU303A ซึ่งแยกได้จากตะกอนของเสียในชุมชน ผลิต PHB ได้ถึง 62.43 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Manna *et al.* (2000) พบว่า แบคทีเรียที่ผลิต PHB ปริมาณที่สูงได้จาก *Azotobacter chroococcum* ซึ่งแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ เช่น ดิน น้ำ ปุ๋ยหมัก และตะกอนของเสีย และ Ceyhan and Ozdemir (2011) แยกแบคทีเรียที่ผลิต PHB จากน้ำทิ้งจากบ้านเรือน พบว่า *Enterobacter aerogenes* สายพันธุ์ 12Bi ผลิต PHB ได้ 16.66 ถึง 96.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และได้ผลผลิต PHB สูงสุดเท่ากับ 96.25 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 18 ชั่วโมง

## 2. การหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย

การหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย ในการทดลองนี้ ใช้วิธีการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย 3 วิธี คือ วิธีที่ 1 ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhaolin and Xuenan (2000) วิธีที่ 2 ดัดแปลงจากวิธีการของ Kaynar and Beyatli (2009) และ วิธีที่ 3 การทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูงโดยใช้เครื่อง Ultrasonic sonicate พบว่า การสกัด PHB ตามวิธีที่ 2 ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Kaynar and Beyatli (2009) ให้ความเข้มข้นของ PHB มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยวิธีอื่น ๆ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสารเคมี อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้สกัดแตกต่างกัน ซึ่งการสกัดในวิธีที่ 2 มีการพรีทรีทด้วย 2M HCl ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ก่อนทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ซึ่งอาจมีผลทำให้สกัด PHB ออกจากเซลล์แบคทีเรียได้ง่ายขึ้น และ Fiorese *et al.* (2009) รายงานว่า การพรีทรีทเซลล์แบคทีเรียโดยการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างร่วมกับการใช้ความร้อนก่อนการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรียมีผลทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้ยิ่งขึ้นด้วย นอกจากนี้ ขั้นตอนการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรียในคลอโรฟอร์มยังมีผลทำให้ PHB ตกตะกอนดีขึ้นจึงทำให้สกัด PHB ออกจากเซลล์ได้มากยิ่งขึ้นด้วย (Kaynar and Beyatli, 2009) ส่วนการสกัดตามวิธีที่ 1 ในขั้นตอนแรกของการสกัดใช้ sodium dodecyl sulfate (SDS) 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร ซึ่ง SDS มีคุณสมบัติในการละลายไขมันหรือโปรตีนให้หลุดออกจากเซลล์แบคทีเรีย (Zhaolin and Xuenan, 2000) หลังจากนั้นใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร เพื่อช่วยแยกส่วนเปปติโดไกลแคนและสารที่ไม่ใช่ PHB ออกไป ในการทดลองนี้ อาจใช้ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรต์น้อยเกินไปจึงมีผลทำให้ PHB ถูกขับออกจากเซลล์ได้ปริมาณน้อยกว่าวิธีการที่ 2 และในการทดลองนี้ไม่ได้ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไฮโปคลอไรต์ ซึ่ง

Hahn *et al.* (1994) กล่าวว่าไว้ว่า ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เหมาะสมในการสกัด PHB คือ 30 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร และสามารถสกัด PHB ได้ปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้น 35, 25, 20, และ 15 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ตามลำดับ นอกจากนี้ Ailing *et al.* (2010) รายงานวิธีการสกัด PHB จาก *Acidiphilium cryptum* DX1-1 โดยใช้วิธีการสกัด 4 วิธี พบว่า วิธีการสกัดด้วย Chloroform-sodium hypochlorite เป็นวิธีที่ดีที่สุด โดยสกัด PHB ได้สูง 73 เปอร์เซ็นต์ และได้ PHB ที่มีความบริสุทธิ์ถึง 92 เปอร์เซ็นต์ และได้ PHB ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 326 kg/mol ซึ่ง Ramsay *et al.* (1990) พบว่า การฟริทท์ด้วยสารลดแรงตึงผิวคือ Triton X-100 และ SDS ก่อนทำการย่อยด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์เพื่อแยกสกัด PHA จาก *R. eutropha* โดยสารลดแรงตึงผิวจะช่วยแยกส่วนอื่นของเซลล์ เช่น โปรตีนออกไปได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้ได้ PHB ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น นอกจากนี้ Hahn *et al.* (1994) เสนอแนะว่า การสกัด PHB โดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์กับคลอโรฟอร์มจะช่วยทำให้ช่วยแยกส่วนของเซลล์ที่ไม่ใช่ PHA ออกไปได้ด้วยเช่นกัน และส่งผลทำให้ PHA ออกจากเซลล์ได้ดีขึ้น และยังช่วยลดความหนืดในชั้นของคลอโรฟอร์มด้วย ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด PHB คือใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 30 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร ระยะเวลา 90 นาที จะทำให้เก็บเกี่ยว PHB ได้ 91 เปอร์เซ็นต์ และมีความบริสุทธิ์ถึง 97 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์สูงขึ้นจะมีผลทำให้อัตราการย่อยสลายและสกัด PHB ได้สูงขึ้นด้วย สำหรับการสกัดในวิธีที่ 3 ในการทดลองนี้ เมื่อนำเซลล์แบคทีเรียไปผ่านขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นความถี่สูง และละลาย PHB ด้วยคลอโรฟอร์ม แต่ได้ความเข้มข้นของ PHB น้อยกว่าวิธีที่ 1 และ วิธีที่ 2 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการสกัดในวิธีที่ 3 ไม่ได้ทำการฟริทท์ด้วยกรด (2M HCl) ซึ่งงานวิจัยของ Kaynar and Beyatli (2009) รายงานว่า หลังจากที่ผ่านมาขั้นตอนการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยคลื่นความถี่สูงแล้ว ควรนำไปฟริทท์ด้วย 2M HCl อีกครั้ง เพื่อให้ง่ายต่อการสกัด PHB ออกจากเซลล์แบคทีเรีย

ในการทดลองนี้ ผู้ทดลองเลือกใช้วิธีที่ 2 ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Kaynar and Beyatli (2009) เป็นวิธีที่ใช้ในการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรียในการทดลองต่อไป

### 3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB โดยใช้วิธีการสกัดที่เหมาะสม

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB โดยใช้วิธีการสกัดที่เหมาะสมคือวิธีการที่ 2 (ดัดแปลงจาก Kaynar and Beyatli, 2009) พบว่า แบคทีเรีย *Micrococcus luteus* ผลิต PHB ได้มากที่สุด เท่ากับ 100.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรีย WT24 ที่แยกได้จากบ่อน้ำทิ้งของโรงงานผลิตปลาหมึกสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 99.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่ง

Ramsay *et al.* (1990) รายงานว่า *Micrococcus halodenitrificans* สามารถผลิต PHB ได้ ในสถานะที่มีการจำกัดของแหล่งไนโตรเจน และ Crotes *et al.* (2009) พบว่า *M. luteus* ที่แยกได้จากตะกอนทะเลที่มีการปนเปื้อนของน้ำเสียจากโรงงานผลิตปลากระป๋องสามารถผลิต PHB ได้เช่นกัน นอกจากนี้ ในการทดลองนี้ ยังพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อน้ำทิ้งของโรงงานผลิตปลาหมักสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณสูงด้วยเช่นกัน ซึ่ง Kaynar and Beyatli (2009) รายงานว่าเชื้อที่สามารถผลิต PHB แยกได้จากไส้ปลา เช่น *Bacillus* sp. เพราะในไส้ปลามีแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการสะสม PHB นอกจากนี้ Arun *et al.* (2009) พบว่า เชื้อที่แยกได้จากตะกอนทะเลเป็นเชื้อที่สามารถผลิต PHB ได้ เนื่องจากบริเวณทะเลเป็นแหล่งที่มีสารอาหารที่เหมาะสม เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรดด่าง และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB เชื้อที่แยกได้ ได้แก่ *Wausteria eutropha* และ *Vibrio* sp. และรายงานของ Yezza *et al.* (2007) พบว่า แบคทีเรีย *Alcaligenes latus* ที่แยกได้จากลูกแมปเปิ้ลที่สูงงอมเป็นเชื้อที่สามารถผลิต PHB ได้ เนื่องจากมีน้ำตาลซูโครสซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณมากจึงเป็นแหล่งที่มีสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB

ในขั้นตอนนี้ ผู้ทดลองเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ได้มากที่สุด จำนวน 2 เชื้อ คือ *Micrococcus luteus* และ แบคทีเรีย WT24 ไว้ศึกษาต่อไป

#### 4. การศึกษาการเจริญและการผลิต PHB ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

จากการนำ *M. luteus* และแบคทีเรีย WT24 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth พบว่า ในการทดลองนี้ *M. luteus* สามารถผลิต PHB สูงสุดในระยะเวลาที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 100.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ผลน้ำหนักรวมเซลล์แห้งที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่าลดลงเล็กน้อย อาจเป็นผลมาจากความคลาดเคลื่อนจากผู้ทดลอง ในการทดลองนี้ พบว่า แบคทีเรีย *M. luteus* มีการผลิต หรือสะสม PHB สัมพันธ์กับการเจริญ ซึ่ง Sierra *et al.* (1962) พบว่า *Micrococcus halodenitrificans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบเกลือ มีการผลิต PHB ในช่วงการเจริญ exponential phase ด้วยเช่นกัน โดยผลิตได้ 1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่มีการให้อากาศน้อยกว่า 28 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้ามีการเติมกลีเซอรอล ไพรูเวท หรือ อะซิเตท ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลทำให้เชื้อสามารถผลิต PHB ได้สูงขึ้นถึง 46-60 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Braunegg และ Bogensbergen (1984) รายงานว่า การสะสม PHB จะเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญ (Growth-associated) นอกจากนี้ Lee *et al.* (1996) รายงานว่า จุลินทรีย์สามารถสะสม PHB ได้ในระหว่างการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นการผลิต PHB โดยไม่ขึ้นกับปริมาณธาตุอาหารที่มีจำกัด

ในการทดลองนี้ แบคทีเรีย WT24 มีการเจริญสูงที่สุดในระยะเวลา 36 ชั่วโมง และผลิต PHB สูงสุดที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้น PHB เท่ากับ 101.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแบคทีเรียนี้มีการสะสม PHB สัมพันธ์กับการเจริญเช่นเดียวกับแบคทีเรีย *M. luteus* ซึ่ง ชนัญ (2537) รายงานว่า แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตคงที่ ที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง และมีปริมาณ PHB สูงสุดที่ 36 ชั่วโมง โดยผลิต PHB ได้เท่ากับ 0.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน Thirumala *et al.* (2010) พบว่า ระยะเวลาในการสะสม PHB ของ *Bacillus spp.* อยู่ในช่วง 32-36 ชั่วโมง หรืออยู่ในช่วงเริ่มต้นของการเจริญจนถึงการเจริญในระยะคงที่ ในการทดลองนี้ ได้วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และแบคทีเรีย *M. luteus* และ WT24 ผลิต PHB ได้ความเข้มข้น 100.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 101.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลิตได้ปริมาณไม่สูงมากนัก จากงานวิจัยของ Kaynar and Beyatli (2009) พบว่า *Bacillus spp.* ผลิต PHB ได้ความเข้มข้น 3,000-15,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่ง Kanokphon (2007) พบว่า สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิต PHB ของ *R. sphaeroides* คืออาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย อะซิเตท (acetate) 4 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.02 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C : N) เท่ากับ 6 : 1 ไคโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลิต PHB ได้สูงสุดเท่ากับ 8.20 กรัมต่อลิตร

ซึ่งในการทดลองนี้ แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ผลิต PHB ได้ปริมาณไม่สูงมากนัก ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากสภาพในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียยังไม่ใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHB ของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนรวมทั้งสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต PHB ซึ่งจะต้องทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิต PHB ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ต่อไป นอกจากนี้ ควรศึกษาเกี่ยวกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย โดยใช้สับเซสตรที่มีราคาถูกเพื่อช่วยลดต้นทุนในการผลิต PHB จากแบคทีเรียเพื่อให้การผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำลง และสามารถแข่งขันกับต้นทุนในการผลิตพลาสติกสังเคราะห์ได้อีกแนวทางหนึ่งด้วย

##### 5. การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรีย

ในการทดลองนี้ จำแนกชนิดของแบคทีเรีย WT24 โดยศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีโคโลนีสีเหลืองส้ม และลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า เป็นแบคทีเรีย

รูปร่างท่อน คีดสีแกรมบวก และการจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอใน ส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย WT24 แล้วนำลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับความคล้ายกับ ฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information; NCBI พบว่า แบคทีเรีย WT24 มีความคล้ายกับฐานข้อมูล Gen Bank จะได้ Accession number ของเชื้อที่ระบุว่าเป็นเชื้อ *Exiguobacterium* sp. ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ Nishimura *et al.* (2002) กล่าวว่า การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียยังไม่ เพียงพอต่อการจำแนกชนิดของเชื้อ จึงควรมีการศึกษาด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล เช่น การ วิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rDNA ซึ่งการจำแนกแบคทีเรียโดยการหา ลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA เป็นเทคนิคการจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยม และให้ความแม่นยำสูง ซึ่งน่าจะได้ผลที่เชื่อถือได้ มีรายงานของ Chaturvedi *et al.* (2008) แยกแบคทีเรียจากบริเวณอาร์กติก และจำแนกชนิดโดยใช้ 16S rRNA พบว่า มีความ คล้ายคลึงกับ *Exiguobacterium acetylicum* DSM 20416(T) (97.4 %), *Exiguobacterium oxidotolerans* DSM 17272(T) (97.4 %), *Exiguobacterium indicum* IAM 15368(T) (97.6 %), *Exiguobacterium undae* DSM 14481(T) (98.2 %), *Exiguobacterium sibiricum* DSM 17290(T) (98.6 %) and *Exiguobacterium antarcticum* DSM 14480(T) (99.6 %). นอกจากนี้ Kim *et al.* (2005) จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลเหลืองในประเทศเกาหลี โดยวิธี 16srRNA พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ *Exiguobacterium aestuarii* และ *Exiguobacterium marinum* ถึง 98.1-98.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน แกรมบวก และเจริญได้ในที่มีเกลือความ เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่ง Du *et al.* (2006) รายงานการแยกแบคทีเรีย ที่ผลิต PHB ในสภาพแวดล้อมทางทะเล พบว่า มีแบคทีเรียที่ผลิต PHB ได้ 76 ไอโซเลท จำแนก ชนิดแบคทีเรียเป็น *Exiguobacterium*, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Flavobacteria*, *Sphingobacteria* และ *Erythrobacter* ส่วน Singh and Parmar (2011) จำแนกชนิดแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB โดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอใน ส่วนของยีน 16S rRNA ที่แยกได้จากสภาพแวดล้อมต่างกัน พบว่า เป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ 2 สาย พันธุ์ที่สามารถผลิต PHB ได้คือ *Rahnella aquatilis* and *Stenotrophomonas maltophilia* ซึ่งแยก ได้จากทราย และได้นำ *R. aquatilis* ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ ได้แก่ ชนิดของ แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส และค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลต่อการเจริญ และผลิต PHB ด้วย นอกจากนี้ Aarthi and Ramana (2011) จำแนกและศึกษาลักษณะของ แบคทีเรียที่ผลิต PHB ได้ ซึ่งแยกได้จากดินในสวน บนอาหาร Nutrient agar โดยใช้คุณลักษณะ ทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี รวมทั้งศึกษาลำดับเบสใน 16S rRNA พบว่า

เป็น *Bacillus mycoides* DFC1, *Bacillus cereus* DC1, *Bacillus cereus* DC2, *Bacillus cereus* DC3 และ *Bacillus cereus* DC4 ซึ่งคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต PHB ได้โดยดูจากการเรืองแสงของโคโลนีเมื่อย้อมโคโลนีด้วยสี Nile red รวมทั้งศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) และยังพบว่า แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สามารถผลิต PHB ได้อยู่ในช่วง 12.18- 57.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำหนักเซลล์แห้ง และ *Bacillus mycoides* DFC1 สามารถผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 1.83 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลิตได้ 57.20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อศึกษาการเจริญและการผลิต PHB โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแป้งสาลี แป้งข้าวโพด แป้งจากมันฝรั่ง พบว่า *Bacillus mycoides* ให้ผลผลิตของ PHB เท่ากับ 1.28 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

## สรุปผลการทดลอง

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต PHB ในการทดลองนี้ ได้แยกแบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ เช่น ดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน ดิน น้ำทิ้ง อาหารหมักดอง โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Nutrient agar + Nile red ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง ได้แบคทีเรียที่แยกได้เองจำนวน 223 ไอโซเลท และมีแบคทีเรียที่มีผู้แยกไว้แล้วจำนวน 118 ไอโซเลท รวมแบคทีเรียที่ใช้ในการคัดเลือกทั้งหมดจำนวน 341 ไอโซเลท เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB ขึ้นต้น โดยคุณลักษณะโคโลนีแบคทีเรียที่เรืองแสงได้ภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร พบว่า มีแบคทีเรียจำนวนที่คาดว่าจะผลิต PHB จำนวน 33 ไอโซเลท

การหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย โดยใช้วิธีการสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย 3 วิธีคือ **วิธีที่ 1** ดัดแปลงจากวิธีการของ Dong and Sun (2000) **วิธีที่ 2** ดัดแปลงจากวิธีการของ Kaynar and Beyatli (2009) และ **วิธีที่ 3** การทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูงโดยใช้เครื่อง Ultrasonic sonicate พบว่า **วิธีที่ 2** ได้ความเข้มข้นของ PHB มากที่สุดเท่ากับ 5.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHB โดยใช้วิธีการสกัดที่เหมาะสม และการวิเคราะห์ปริมาณ PHB โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ขึ้นต้นจำนวน 33 ไอโซเลท มาสกัด PHB จากเซลล์แบคทีเรีย ตามวิธีที่ 2 พบว่า แบคทีเรีย *Micrococcus luteus* และ แบคทีเรีย WT24 ผลิต PHB ได้เท่ากับ 100.93 และ 99.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การเจริญและการผลิต PHB ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรีย *M. luteus* และแบคทีเรีย WT24 ในอาหาร Nutrient broth พบว่า *M. luteus* และแบคทีเรีย WT24 สามารถผลิต PHB ได้สูงสุด เท่ากับ 100.12 และ 101.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาที่ 48 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ

การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรีย โดยศึกษาคุณลักษณะทางการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า แบคทีเรีย WT24 มีโคโลนีสีเหลืองส้ม รูปร่างท่อน เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA พบว่า แบคทีเรีย WT 24 มีความเหมือนกับ *Exiguobacterium* sp. เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

## เอกสารอ้างอิง

- ชนัญญ์ ผลประไพ. 2537. **สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทจาก *Alcaligenes* sp. สายพันธุ์ A-04 ในระดับถังหมัก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพฯ.
- นงลักษณ์ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2539. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพฯ. 576 น.
- พูนศักดิ์ สักกทัตติยกุล. 2551. พลาสติกชีวภาพ(Bioplastic). จาก <http://server.thaigoodview.com> [วันที่ 26 กันยายน 2552].
- ภาณุวัฒน์ บุญธรรม. 2548. พลาสติกชีวภาพจากจุลินทรีย์. จาก <http://www.technoinhome.com>. [วันที่ 15 กันยายน 2552].
- หยาดฝน มหาทรัพย์ไพบุสย์และสาโรจน์ ศิริสันสนียกุล. 2542. **จลนพลศาสตร์การผลิตพอลิเบต้าไฮดรอกซีบิวทิเรทของ *Alcaligenes eutrophus* DSM 545.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- Aarhi, N. and K.V. Ramana. 2011. Identification and characterization of polyhydroxybutyrate producing *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. **Inter. J. Environ. Sci.** 1(5): 744-756.
- Ailing, X., L. Yanyan, Z. Qing, L.I. Jialuo and X. Jinlan. 2010. Extraction and characterization of PHB from *Acidiphilium cryptum* DX1-1. **J. Wuhan University Technol. Mater. Sci.** 25(6): 938-943.
- Alias, Z. and I.K.P., Tan. 2005. Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. **Biores. Technol.** 96(11): 1229-1234.
- Arshad, M.U., N. Jamil, N. Naheed and T. Hasnain. 2007. Analysis of bacterial strains from contaminated and non-contaminated sites for the production of biopolymers. **Afric. J. Biotechnol.** 6(9): 1115-1121.
- Arun, A., R. Arthi, V. Shanmugabalaji and M. Eyini. 2009. Microbial production of poly-beta-hydroxybutyrate by marine microbes isolated from various marine environments. **Biores. Technol.** 100: 2320-2323.

- Babel, W. 1990. The mixed substrate concept, applied for microbial syntheses of metabolites. **Biotechnol. Advance**, 8: 261-275.
- Braunegg, G. and B. Bogensbergen. 1984. Zur Kinetik des Wachstums und der Speicherung von Poly- $\beta$ (-)-3-hydroxybuttersäure bei *Alcaligenes latus*. **Acta Biotechnologica**, 5: 339-345.
- Braunegg, G., G. Lefebvre and K.F. Genser. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspect. **J. Biotechnol.** 65: 127-161.
- Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganism : Technology and economic. **Trends Biotechnol.** 5: 246-250.
- Ceyhan1, N. and G. Ozdemir. 2011. Poly-hydroxybutyrate (PHB) production from domestic wastewater using *Enterobacter aerogenes* 12Bi strain. **Afric. J. Microbiol. Res.** 5(6): 690-702.
- Chaturvedi, P., V. Prabakar, R. Manorama, P.K. Pindi, B. Bhadra, Z. Begum and S. Shivaji. 2008. *Exiguobacterium soli* sp. nov., a psychrophilic bacterium from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58(10): 2447-53.
- Cortes, A.L., A.L. Landazuri, J.Q. Garcia and J.Q. Maldonado. 2008. Screening and Isolation of PHB-producing bacteria in a polluted marine microbial mat. **Microbial Ecology**, 56: 112-120.
- Dawes, E.A. and P.J. Senior. 1973. The role and regulation of energy reserve polymer in microorganisms. **Adv. Microbiol. Physiol.** 10: 135-266.
- Du, H., N. Jiao, Y. Hu and Y. Zeng. 2006. Diversity and distribution of pigmented heterotrophic bacteria in marine environments. **Federation European Microbiol. Societies Microbiol. Lett.** 57: 92–105.
- Evan. J.D. and S.K. 1990. Biodegradable plastics: An idea whose time has come. **Chemtech.** 29: 38-42.
- Fiorese, M.L., F. Freitas, J. Pais, A. Maria. 2009. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylenecarbonate. **Engineer. Life Sci.** 9(6): 454–461.

- Gloria, D., R.S. Reyes and M.M. Ulep. 1997. Isolation, screening and identification of bacteria for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) production. **Environ. Sci.** 66: 737-748.
- Greenspan, P., E.P. Mayer and S.D. Fowler. 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **J. Cell Biology** 100: 965-973.
- Hahn, S. K., Y.K. Chang and S.Y. Lee. 1994. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 34-39.
- Hahn, S.K., Y. K. Chang, B.S. Kim and H.N. Chang. 1994. Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. **Biotechnol. Bioengineer.** 44: 256-261.
- Holmes, P.A. 1985. Applications of PHBs: a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physics Technol.** 16: 32-6.
- Kanokphorn, S. 2007. **Production and characterization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) from *Rhodobacter sphaeroides*.** Thesis for degree of doctor. Songklanakarin University: Songkla.
- Kaynar, P. and Y. Beyatli. 2009. Determination of poly-*b*-hydroxybutyrate production by *Bacillus* spp. isolated from the intestines of various. **Fish Sci.** 75:439-443.
- Kim I.G., M.H. Lee, S.Y. Jung, J.J. Song, T.K. Oh and J.H. Yoon. 2005. *Exiguobacterium aestuarii* sp. nov. and *Exiguobacterium marinum* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55(2): 885-890.
- Kung, S.S., Y.C. Ahuang, C.H. Chen and C.C. Chein. 2007. Isolation of polyhydroxy alkanooates-producing bacteria using a combination of phenotypic and genotypic approach. **Lett. Appl. Microbiol.** 44(4): 364-371.
- Lafferty, R.M., B. Korsatko and W. Korsatko. 1998. Microbial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. **Biotechnol.** 6: 135-176.
- Lee, Y.H., T.W. Kim, J.S. Park and T.L. Huh. 1996. Effect of the supplement of metabolites on cell growth and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis of *Alcaligenes latus*. **J. Micribiol. Biotechnol.** 6: 120-127.

- Manna, A. and A.K. Paul. 2000. Degradation of microbial polyester (3-hydroxybutyrate) in environmental samples and in culture. **Biodegrad.** 11: 323-329.
- Nishimura, T., A. Meguro, S. Hasegawa, Y. Nakagawa, M. Shimisu and H. Kunoh. 2002. An endophytic Actinomycetes, *Streptomyces* sp. AOK-30, isolated from mountain laurel and its antifungal activity. **J. Plant Pathol.** 68: 390-397.
- Pinzon, N.M., K.G. Aukema, J.A. Gralnick and L.P. Wackett. 2011. Nile red detection of bacterial hydrocarbons and ketones in a high-throughput format. **American Microbiol.** 2(4): 109-111.
- Porwal, S. T. Kumar, S. Lal, A. Rani, S. Kumar, S. Cheema, H.J. Purohit, R. Sharma, S. Kumar, S. Patel and V.C. Kalia. 2008. Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. **Biotechnol. Res.** 99. 5444-5451.
- Ramsay, B.A., K. Lomaliza, C. Chavarie, B. Dube, P. Bataille and J.A. Ramsay. 1990. Production of poly-(P-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acids. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 2093-2098.
- Reddy, S.V., M. Thirumala and S.K. Mahmood. 2009. Production of PHB and poly (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. **Microbiol. Biotechnol.** 25: 391-397.
- Redzwan, G., S.N. Gan and I.K.P. Tan. 1997. Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from an integrated-farming pond and palm-oil mill effluent ponds. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13: 707-709.
- Ree, G.N., G.Vasiliadis, J.W. May and R.C. Bayly. 2004. Production of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Acinetobacter* spp. isolated from activated sludge. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 38(6): 734-737.
- Sayed, R.Z., N.S. Gangurde and S.B. Chincholkar. 2009. Hypochlorite digestion method for efficient recovery of PHB from *Alcaligenes faecalis*. **Indian J. Microbiol.** 49: 230-232.
- Schlegel, H.G., G. Gottschalk and R.V. Barta. 1961. Formation and utilization of poly-  $\beta$ -hydroxybutyric acid by knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). **Nature (London)**. 191: 463-465.

- Sierra, G. and N. E. Gibbons . 1962. Production of Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid granules in *Micrococcus halodenitrificans*. **Canadian J. Microbiol.** 8(2): 249-253.
- Singh, P. and N. Parmar. 2011. Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate(PHB)-producing bacteria. **Afric. J. Biotechnol.** 10(24): 4907-4919.
- Spiekermann, P., B.H.A. Rehm, R. Kalsheuer, D. Baumeister and A. Steinbuchel. 1999. A sensitive, viable-colony staining method using Nile Red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acid and other lipid storage compounds. **Arch. Microbiol.** 171: 73-80.
- Thirumala, M., S.V. Reddy and S.K. Mahmood. 2010. Production and characterization of PHB two novel strains of *Bacillus* spp. Isolated from soil and activated sludge. **Indus. Microbiol. Biotechnol.** 37: 271-278.
- Wallen, L.L. and W.K. Rohwedder. 1974. Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates from Activated Sludge. **Environ. Sci. Technol.** 8: 576-579.
- Wang, J.G. and L.R. Bakken. 1998. Screening of soil bacteria for poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. **Microb. Ecol.** 35: 94-101.
- Yan, S., S.B. Subramanian, R.D. Tyagi and R.Y. Surampalii. 2008. Polymer production by bacterial strains isolated from activated sludge treating municipal wastewater. **Water Sci. Technol.** 57(4): 533-539.
- Yilmaz, M., H. Soran and Y. Beyatli. 2005. Determination of poly-b-hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 21: 565-566.
- Zhaolin and Xuenan. 2000. A new method of recoving polyhydroxyalkanoate from *Azotobacter chroococcum*. **Chinese Sci. Bulletin.** 45(3): 252-256.



ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

Nutrient agar (NA) ประกอบด้วย

- Beef Extract	3	กรัมต่อลิตร
- Peptone	5	กรัมต่อลิตร
- Agar	15	กรัมต่อลิตร
- น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
เติม Nile red	0.5	ไมโครกรัมต่อลิตร

ละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่น แล้วบรรจุภาชนะ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ส่วนอาหาร Nutrient broth (NB) มีส่วนประกอบเหมือน Nutrient agar แต่ไม่ต้องเติมวัน

## 2. การเตรียมสารละลาย

2.1 การเตรียม Nile red ชั่ง Nile Red น้ำหนัก 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ละลายใน DMSO 1 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในอาหาร NA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 µg/ml การเตรียม Nile red ให้มีความเข้มข้น 0.5 µg ในอาหาร 500 ml

C1 แทน ความเข้มข้นเริ่มต้นของ nile red คือ 0.25 mg/ml หรือ  $0.25 \times 10^3$  µg/ml

C2 แทน ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการเตรียม คือ 0.5 µg

V2 แทน ปริมาตรอาหาร NA ที่ต้องการเตรียม

V1 คือ ปริมาตรที่ต้องการหา

$$\begin{aligned} \text{สูตร} \quad C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ \text{แทนค่า} \quad 0.25 \times 10^3 \times V_1 &= 0.5 \times 500 \\ V_1 &= \frac{0.5 \times 500}{0.25 \times 10^3} = 1 \text{ ml} \end{aligned}$$

ดังนั้น ใส่ Nile red 1 ml ในอาหารปริมาตร 500 ml จะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 µg/ml

## 2.2 การเตรียม 2M HCl

C1 คือความเข้มข้นเริ่มต้นของ HCl คือ 12.1 M

C2 คือความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการเตรียม คือ 2 M

V2 คือปริมาตรอาหาร HCl ที่ต้องการเตรียม

V1 คือปริมาตรที่ต้องการหา

$$C1V1 = C2V2$$

แทนค่า  $12.1 \times V1 = 2 \times 60$

$V1 = 9.92 \text{ ml}$  แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 60 มล.

## 2.3 การเตรียม 1% SDS

ชั่ง SDS 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล.

## 2.4 การเตรียม 0.85 % NaCl

ชั่ง NaCl 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล.

## 2.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน PHB ( $\mu\text{g/ml}$ )

เตรียม stock solution 100  $\mu\text{g/ml}$  (โดย ชั่ง PHB 0.001 กรัม ละลายในคลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตร)

เตรียม working volume 3  $\mu\text{g/ml}$

$$\text{จาก } C1V1 = C2V2$$

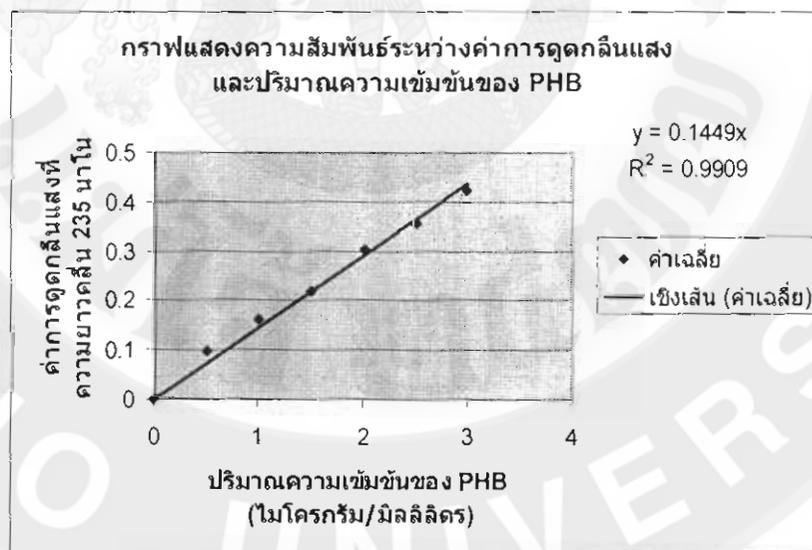
แทนค่า  $100 \times V1 = 3 \times 1$

จะได้  $V1$  เท่ากับ 0.03 ml หรือ 30  $\mu\text{l}$

ดังนั้น เตรียม ความเข้มข้น PHB 3  $\mu\text{g/ml}$  โดยปิเปต PHB จาก stock solution ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  มา 30  $\mu\text{l}$  ผสมในคลอโรฟอร์ม 970  $\mu\text{l}$  แสดงดังตาราง

ตารางที่ 7 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน PHB

ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	working volumn 3 ( $\mu\text{g/ml}$ )	คลอโรฟอร์ม ( $\mu\text{l}$ )
0	0	1000
0.5	166.67	833.33
1.0	333.33	666.67
1.5	500	500
2.0	666.67	333.33
2.5	833.33	166.67
3.0	1000	0



ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ PHB

การคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของ PHB

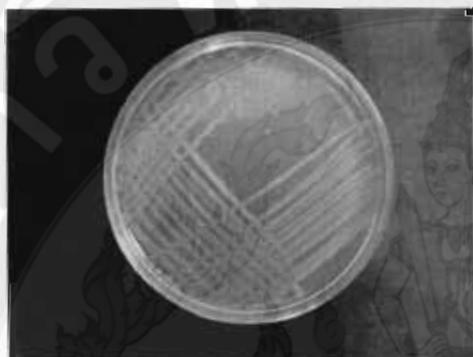
$$\text{ปริมาณความเข้มข้นของ PHB } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{OD}_{235 \text{ nm}} \text{ ที่เจือจาง 50 เท่า} \times \text{ค่าเจือจาง 50 เท่า}}{\text{ค่าความชัน คือ 0.1449}}$$

### วิธีการย้อมสีแกรม

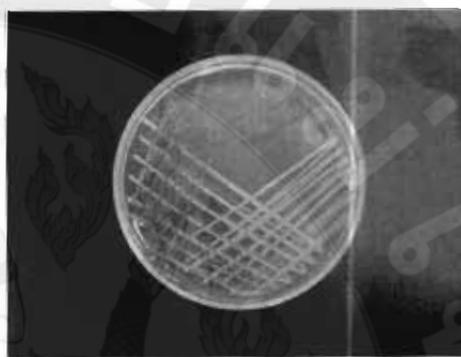
1. ล้างแผ่นสไลด์ให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง
2. smear เชื้อบนแผ่นสไลด์และทำให้แห้งในอากาศ แล้วนำไปผ่านไฟเพื่อให้เซลล์ติดสไลด์
3. ย้อมด้วยสี crystal violet ให้ท่วมรอยเชือนาน 1-2 นาที
4. เทสีทิ้งไป และล้างด้วยน้ำประปาเบา ๆ
5. หยด iodine ให้ท่วมสไลด์ ทิ้งไว้เวลานาน 1 นาที
6. เท iodine ทิ้งไป แล้วล้างด้วยน้ำประปาเบา ๆ
7. ล้างสีม่วงของ crystal violet ออกด้วย acetone alcohol (ethylalcohol+acetone) ล้างสีออก 5-10 วินาที แล้วล้างเบา ๆ ด้วยน้ำทันที
8. ย้อมทับหรือย้อมซ้ำ (counter stain) ด้วย safranin เป็นเวลา 1 นาที
9. เทสีทิ้งไป แล้วล้างด้วยน้ำเบา ๆ ผึ่งสไลด์ให้แห้ง แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

## ภาคผนวก ข

## ลักษณะโคโลนีและลักษณะเซลล์ของแบคทีเรีย

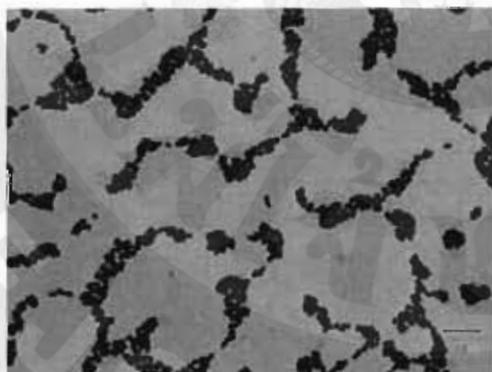


ก)

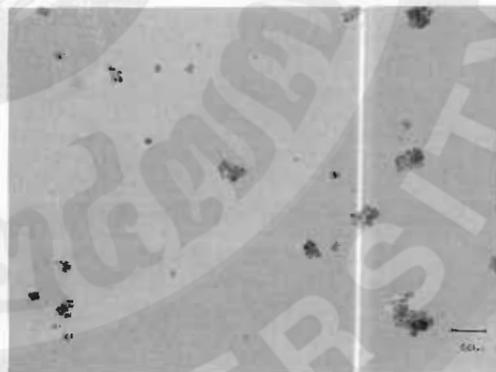


ข)

ภาพที่ 13 ลักษณะโคโลนีของ ก) *Exiguobacterium* sp. ข) *Micrococcus luteus* บนอาหาร Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง



ก)



ข)

ภาพที่ 14 ลักษณะเซลล์แบคทีเรีย ก) *Exiguobacterium* sp. ข) *Micrococcus luteus* เมื่อย้อมสีแบบแกรมส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1,000 เท่า