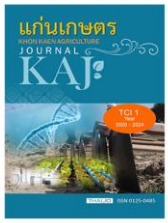
วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



การผลิตพลาสติกชีวภาพจากกล้วยโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน

Bioplastic production from bananas by soil isolating bacteria

ภัคจิรัตน์ สิงหะบุตร[1]*, พรรณี อภิวันท์[1], ผกากรอง ปั้นทอง[1] และภัทรพงษ์ เกริกสกุล[2]

Pakjirat Singhaboot[1]*, Pannee Apiwun[1], Phakakrong Panthong[1], Patarapong Kroeksakul[2]

[1] *คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*
[1] *Faculty of Agricultural Product Innovation and Technology, Srinakharinwirot University*
[2] *คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ*
[2] *Faculty of Environmental Culture and Ecotourism, Srinakharinwirot University*

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates; PHAs) ด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินจังหวัดนครนายกและจังหวัดฉะเชิงเทรา โดยใช้กล้วยสุกงอม 3 ชนิด ได้แก่ กล้วยไข่ กล้วยหอม และกล้วยน้ำว้า เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ จากตัวอย่างดินสามารถคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียที่ผลิต PHAs ได้ทั้งหมด 16 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส N22-3 มีปริมาณร้อยละของการสะสม PHAs สูงที่สุดคือ 30.10±0.25% ในอาหารที่มีการเติมน้ำกล้วยไข่ จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าแบคทีเรียซึ่งคัดแยกได้รหัส N22-3 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และจำแนกสายพันธุ์โดยวิธี 16S rRNA พบว่ามีความเหมือน 99.85% กับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Klebsiella pneumoniae* เมื่อตรวจสอบโครงสร้างของแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้พบว่ามีโครงสร้างคล้ายกับสารพอลิเมอร์ชีวภาพมาตรฐานชนิดพอลิไฮดรอกซีบิวไทเรต (polyhydroxybutyrate; PHB)
คำสำคัญ: พลาสติกชีวภาพ; พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต; กล้วย; *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT: The research aims to study the bioplastic of polyhydroxyalkanoates (PHAs) production by bacteria isolated from soil samples of Chachoengsao and Nakhon Nayok provinces using 3 kind of ripe banana; Lady Finger, Cavendish and Pisang Awak as carbon sources. Among only 16 isolates can produced PHAs. However, the maximum PHAs content (30.10±0.25%) was obtained from the isolate strain N22-3. The cell morphology was investigated by the Gram staining method using the light microscope. It was found that the N22-3 isolate was a Gram-negative. Then it was identified by 16S rRNA analysis and showed that the PHAs-producing bacterium had maximum sequence 99.85% similarity with *Klebsiella pneumoniae*. The PHAs film was characterized in its structure. The result showed that it was similar to the standard biopolymer of polyhydroxybutyrate (PHB).
Keyword: bioplastic; polyhydroxyalkanotes; banana*; Klebsiella pneumoniae*

บทนำ

พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) คือพลาสติกที่ผลิตได้จากทรัพยากรหมุนเวียน (Renewable resource) ต่างๆ หลายชนิด เช่น อ้อย มันสำปะหลัง และสามารถย่อยสลายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการย่อยสลายด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ตัวอย่างพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ที่ได้รับความสนใจทั้งในการวิจัยและขยายการผลิตสู่อุตสาหกรรมในปัจจุบัน ได้แก่ พอลิแลคติกแอซิด (Polylactic

* Corresponding author, E-mail: pakjirat@g.swu.ac.th

Received: date; February 5, 2020 Accepted: date; October 21, 2020 Published: date; June 5, 2021

acid; PLA) และพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (Polyhydroxyalkanoates; PHAs) สำหรับการผลิต PLA ขั้นตอนแรกคือการใช้น้ำตาลในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้เกิดการผลิตกรด แต่ในขั้นตอนสุดท้ายยังต้องนำกรดแลคติกไปผ่านกระบวนการทางเคมีเพื่อผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพ ซึ่งแตกต่างจากกระบวนการสังเคราะห์ PHAs ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมดจึงทำให้ได้รับความสนใจจากนักวิจัยเป็นอย่างมาก

PHAs มีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับพลาสติกที่สังเคราะห์จากปิโตรเคมีในกลุ่มพอลิโพรไพลีน (Polypropylene; PP) (Chen, 2009) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ PHAs สามารถนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่สังเคราะห์จากปิโตรเคมีได้ และมีการนำมาประยุกต์ใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้เพื่อใช้ในงานด้านต่างๆ ประกอบด้วย อุตสาหกรรมอาหารและยา เช่น ผลิตเป็นฟิล์มเคลือบผลไม้และอาหาร หนังเทียมไส้กรอก ฯลฯ ในงานด้านการแพทย์ เช่น การนำไปสังเคราะห์วัสดุนำส่งยา และไหมเย็บแผลละลาย เป็นต้น (Abou-Zeid, 2001) PHAs จัดเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์ประเภทพอลิเอสเทอร์ที่จุลินทรีย์หลายชนิดผลิตขึ้น เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรีย แต่โดยส่วนมากจะพบการสังเคราะห์ในจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ (Bengtsson et al., 2008) โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะสังเคราะห์สาร PHAs ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เอง และเก็บไว้ในเซลล์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนหรือพลังงานสำรอง (Energy storage) ภายใต้สภาวะที่มีแหล่งพลังงานหรือแหล่งคาร์บอนที่มากเกินพอ (Excess carbon) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในธรรมชาติโดยเริ่มจากกลไกการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ (ธนาวดี, 2549) ในขณะที่มีปริมาณสารอาหารบางตัวถูกจำกัด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ออกซิเจน ซัลเฟอร์ หรือแมกนีเซียม (Bernard, 2014) โดยสามารถเก็บเกี่ยวและแยก PHAs ออกด้วยการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Bacterial disruption)

ปัจจุบันการผลิต PHAs ยังต้องใช้ต้นทุนสูงและมีอัตราการผลิตต่ำ อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น กระบวนการผลิต ต้นทุนของแหล่งคาร์บอนและสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ รวมทั้งต้นทุนการสกัด เป็นต้น ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ใช้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิต PHAs เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อต้นทุนการผลิต โดยทั่วไปแหล่งคาร์บอนมักจะใช้น้ำตาลบริสุทธิ์ซึ่งพบว่ามีราคาค่อนข้างสูง หรือใช้ผลิตผลทางการเกษตรที่มีน้ำตาลหรือแป้งเป็นองค์ประกอบในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เช่น ข้าวโพด และมันสำปะหลัง แต่อย่างไรก็ตามการนำผลิตผลทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบมาใช้ในกระบวนการผลิต PHAs ต้องนำวัตถุดิบเหล่านั้นไปย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อนนำมาใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้เกิดความยุ่งยากในการนำมาใช้และเสียเวลาในการ ปรับสภาพ นอกจากนั้นยังอาจเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตอีกด้วย ดังนั้นการหาแหล่งคาร์บอนทดแทนที่มีมูลค่าต่ำจึงเป็นอีกทางเลือกที่สามารถช่วยลดต้นทุนการผลิต

แหล่งคาร์บอนที่มีการนำมาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิต PHAs ตัวอย่างเช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยGetachew และ Woldesenbet (2016) ได้ศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย ซังข้าวโพด และเปลือกกล้วย มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิต PHAs พบว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรสามารถใช้สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียได้ ซึ่งชานอ้อยสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHAs ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่น โดยแบคทีเรียมีการผลิต PHAs ได้สูงถึง 52% ของน้ำหนักเซลล์ แต่ต้องนำชานอ้อยไปผ่านขั้นตอนการปรับสภาพก่อนนำมาใช้ ตัวอย่างผลพลอยได้ (By-product) จากกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิต PHAs เช่น หางนม (Janes et al., 1990) กากน้ำตาล (Gouda et al., 2001) และกลีเซอรอล (Cavalheiro et al., 2009) เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีการน้ำผลไม้ที่ได้จากผลไม้หรือพืชที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบมาเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการลดต้นทุนการผลิต เนื่องจากไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพที่ซับซ้อน ตัวอย่างน้ำผลไม้หรือพืชที่ได้มีการนำมาใช้ในกระบวนการผลิต PHAs เช่น น้ำมะพร้าว (Phathipchotikun et al., 2014) น้ำสับปะรด น้ำส้ม (Suwannasing et al., 2015) น้ำข้าวฟ่างหวาน (Tanamool et al., 2013) และน้ำอ้อย (Suwannasing et al., 2011, Singhaboot and Kaewkannetra, 2015) เป็นต้น

Mezzolla และคณะ (2017) ได้ศึกษาการนำน้ำกล้วยที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการแปรรูปมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* ที่ผ่านการดัดแปลงทางพันธุกรรมเพื่อผลิต PHAs พบว่า *E. coli* สามารถเจริญได้ดีและมีการผลิต PHAs 3.9 กรัม/ลิตร ซึ่งสูงกว่าไฮโดรไลเสตจากเปลือกมันฝรั่ง และไฮโดรไลเสตจากข้าวโพด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำกล้วยที่เป็นผลพลอยได้สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยทั่วไปกล้วยสุกงอมจนลักษณะของผลกล้วยโดยเฉพาะส่วนที่เป็นเปลือกมีสีดำ

คล้ำ จะส่งผลให้ไม่น่ารับประทานสำหรับผู้บริโภค รวมทั้งยังเป็นปัญหาสำคัญทำให้เกษตรกรหรือผู้จำหน่ายกล้วยไม่สามารถจำหน่ายได้ และไม่เหมาะที่จะนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นในลักษณะที่เห็นสีและชิ้นส่วนของกล้วยชัดเจน แต่หากพิจารณาถึงองค์ประกอบของกล้วยจะพบว่าประกอบด้วยสารอาหารหลายชนิดประกอบอยู่ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม เป็นต้น (Mezzolla et al., 2017) โดยเฉพาะน้ำตาลที่มีอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง

งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะนำกล้วยสุกงอมมาใช้ประโยชน์ในการเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพชนิด PHAs ซึ่งสายพันธุ์กล้วยที่นำมาศึกษาเป็นสายพันธุ์กล้วยที่นิยมปลูกและรับประทานมากในประเทศไทย ประกอบด้วย กล้วยหอม (Cavendish banana) กล้วยไข่ (Lady Finger banana) และกล้วยน้ำว้า (Pisang Awak banana) และใช้แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินในพื้นที่จังหวัดนครนายก และจังหวัดฉะเชิงเทรา รวมทั้งศึกษาคุณลักษณะของพลาสติกชีวภาพที่ผลิตได้จากกล้วยเพื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ชีวภาพทางพานิชย์ชนิดอื่น สำหรับเป็นข้อมูลในการปรับปรุงคุณสมบัติให้ดียิ่งขึ้นเหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมวัตถุดิบ

นำกล้วยสุกสายพันธุ์ต่างๆ ประกอบด้วย กล้วยไข่ กล้วยหอม และกล้วยน้ำว้า โดยเปลือกของกล้วยมีสีดำคล้ำประมาณร้อยละ 70 ของพื้นที่ผิวทั้งหมดขึ้นไป นำมาปอกเปลือกและปั่นในเครื่องปั่นให้ละเอียด แยกน้ำและส่วนที่เป็นกากออกจากกันด้วยผ้าขาวบาง โดยส่วนที่เป็นกากนำมาบีบคั้นซ้ำอีกครั้งเพื่อให้ได้น้ำกล้วยออกมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ เป็นเวลา 10 นาที ที่ความเร็วรอบ 10000 รอบ/นาที ส่วนที่เป็นน้ำนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีเบื้องต้นก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบ โดยจะวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณสารต่างๆ ในกล้วย ซึ่งประกอบไปด้วย ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟิวริก (Dobois et al., 1956) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และค่า pH

การคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิต PHAs จากดิน

สายพันธุ์แบคทีเรียที่จะนำมาศึกษาการผลิต PHAs ในงานวิจัยนี้จะคัดแยกจากดินบริเวณพื้นที่เพาะปลูกในจังหวัดนครนายกและจังหวัดและฉะเชิงเทรา ขั้นตอนแรกนำตัวอย่างดินซึ่งเก็บที่ความลึกประมาณ 15 เซนติเมตร ปริมาณ 10 กรัม เติมลงในอาหาร Nutrient broth (NB) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รอบการเขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการปรับสภาพและเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร Minimal medium; MM (Grothe et al., 1999) ซึ่งเติมน้ำกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้ได้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และบ่มเชื้อด้วยสภาวะเช่นเดียวกัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง MM ที่เติมน้ำกล้วย แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้นมาทดสอบการสะสม PHAs โดยการย้อมสี Sudan Black B (Burdon, 1946; Grothe et al., 1999) ตรวจสอบลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็ง และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) โดยย้อมสีแกรม (Gram staining method)

การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน

การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทำโดยวิธี 16S rRNA ซึ่งเป็นวิธีทางอณูชีววิทยาสามารถระบุสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ระดับสปีชีส์และระดับสายพันธุ์ภายในสปีชีส์ โดยอาศัยการเปรียบเทียบฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ที่มีผู้ศึกษาและรวบรวมไว้แล้ว หรือเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์มาตรฐานที่รู้สปีชีส์ หลักการระบุชนิดจุลินทรีย์ทำโดยหาลำดับเบส (Sequence) ในชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์เทียบกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อระบุชนิดของจุลินทรีย์

การผลิต PHAs ด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินโดยใช้กล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน

เจือจางน้ำกล้วยด้วยอาหาร MM ให้ได้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร ปรับ pH เป็น 7 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียคัดแยกได้จากดินลงไป 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ควบคุมรอบการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและความเข้มข้นของ PHAs ที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ซึ่งจะใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง ได้แก่ *Alcaligenes latus*

การสกัด PHAs

นำตัวอย่างเซลล์แห้งของแบคทีเรียมาเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 6% (ปริมาตร/ปริมาตร) ในอัตราส่วน 1:1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์เป็นเวลา 10 นาที ที่ความเร็วรอบ 10000 รอบ/นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มร้อนอัตราส่วน 1:1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองเพื่อกำจัดสารชนิดอื่นซึ่งจะไม่สามารถละลายในคลอโรฟอร์มได้ออก และนำสารละลายที่ได้ไประเหยคลอโรฟอร์มออกจนแห้งจะได้แผ่นฟิล์ม PHAs ที่มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น และวิเคราะห์โครงสร้างตัวอย่างแผ่นฟิล์ม PHAs ที่สกัดได้โดยใช้เทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) เปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ในเชิงพาณิชย์

ผลการศึกษาและการอภิปรายผล

คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีเบื้องต้นของกล้วย

กล้วยหอม กล้วยไข่ และกล้วยน้ำว้า เป็นสายพันธุ์กล้วยที่นิยมปลูกและรับประทานในประเทศไทย แต่พบว่าเมื่อกล้วยสุกจะเริ่มมีผิวเป็นสีดำคล้ำอย่างรวดเร็ว (**Figure 1**) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำกล้วยสุกงอมมาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อให้ผลิต PHAs ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากปิโตรเคมี

Figure 1 Ripe banana was used as carbon sources for PHAs production (Cavendish banana (a), Pisang Awak banana (b) and Lady Finger banana (c))

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีเบื้องต้นของกล้วยสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อประเมินความเป็นได้ในการนำไปใช้ โดยเมื่อนำน้ำกล้วยมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ผลแสดงดัง **Table 1**

Table 1 Some physicochemical properties of banana juice

Banana speccies	Total sugar (g/L)	Total soluble solids (°brix)	pH
Cavendish	552.0±0.6	23.0	4.88
Lady Finger	625.0±1.0	26.5	4.46
Pisang Awak	683.0±0.1	28.0	5.54

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีเบื้องต้นของกล้วยสายพันธุ์ต่างๆ พบว่ากล้วยน้ำว้ามีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงที่สุดคือ 683.0±0.13 กรัม/ลิตร รองลงมาคือ กล้วยไข่ 625.0±1.02 กรัม/ลิตร และกล้วยหอม 552.0±0.6 กรัม/ลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้อยู่ประมาณ 23-28 องศาบริกซ์ และค่า pH อยู่ระหว่าง 4.46-5.54 น้ำตาลในกล้วยถือเป็นตัวแปรสำคัญในการนำมาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณมากพอที่จะสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ แต่ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิต PHAs จะต้องเจือจางน้ำกล้วยให้ความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำลง เนื่องจากความเข้มข้นน้ำตาลในกล้วยมีปริมาณสูงมากอาจเกิดการยับยั้งการเจริญจากวัตถุดิบ (Substrate inhibition) ส่งผลให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้

การผลิต PHAs ด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินโดยใช้กล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน

งานวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณพื้นที่ซึ่งมีการเพาะปลูกกล้วยในจังหวัดนครนายก และจังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งคาดว่าจะมีโอกาสพบเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้กล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและการผลิต PHAs ได้ โดยตัวอย่างดินจากจังหวัดนครนายกจะใช้รหัสตัวอย่างเป็น N ขณะที่ตัวอย่างดินจากจังหวัดฉะเชิงเทรา จะใช้รหัส C ตัวอย่างรหัส เช่น N12-1 แสดงว่าเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในจังหวัดนครนายกตัวอย่างที่ 12 และเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ลำดับที่ 1

การตรวจสอบการสะสม PHAs เชิงคุณภาพ สามารถทำได้โดยการนำโคโลนีของเชื้อที่คัดแยกได้ย้อมด้วยสี Sudan Black B แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากมีการสะสม PHAs จะติดสีน้ำเงินของ Sudan Black B ส่วนหากไม่มีการสะสม PHAs จะเห็นเซลล์เป็นสีแดงซึ่งเป็นสีของซาฟรานินที่ใช้ย้อมในขั้นตอนสุดท้าย จากการคัดแยกพบจุลินทรีย์ทั้งหมด 18 สายพันธุ์ที่มีการผลิตและสะสม PHAs ภายในเซลล์ (**Figure 2**)

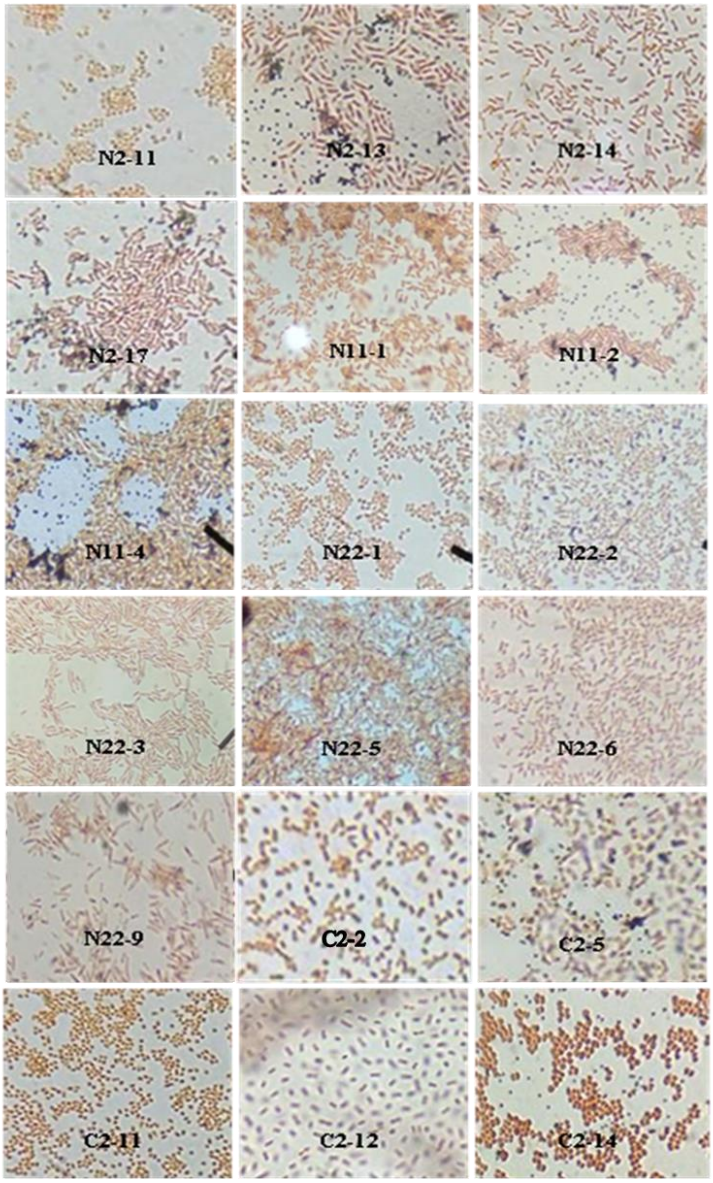


Figure 2 Photomicrograph (×100) of isolates showing the PHAs granules produced in bacterial cells by Sudan black B staining method

กรณีที่บางสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ย้อมติดสี Sudan Black B เพียงเล็กน้อยอาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น จุลินทรีย์ใช้ PHAs ที่สะสมไว้ภายในเซลล์เป็นแหล่งคาร์บอนสำรองสำหรับการเจริญจากการที่สารอาหารหมด ทำให้มีแค่บางเซลล์ที่ยังมีการสะสม PHAs จึงติดสี Sudan Black B อยู่บ้าง หรืออาจเนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีการสะสม PHAs ในปริมาณต่ำจึงส่งผลให้เซลล์จุลินทรีย์ติดสีไม่เต็มเซลล์ ดังนั้นการย้อมสี Sudan Black B จึงเป็นเพียงการตรวจสอบการสะสม PHAs เบื้องต้นเท่านั้น จึงต้องนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MM ที่มีกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนอีกในขั้นตอนต่อไปเพื่อยืนยันการผลิต PHAs โดยหลังจากการเพาะเลี้ยงและนำเซลล์มาสกัดจะได้ PHAs ออกมาเป็นลักษณะแผ่นฟิล์ม ผลการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในน้ำกล้วยและการผลิต PHAs เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง *A. latus* แสดงดังรูปหมายเลข 3 (**Figure 3**)

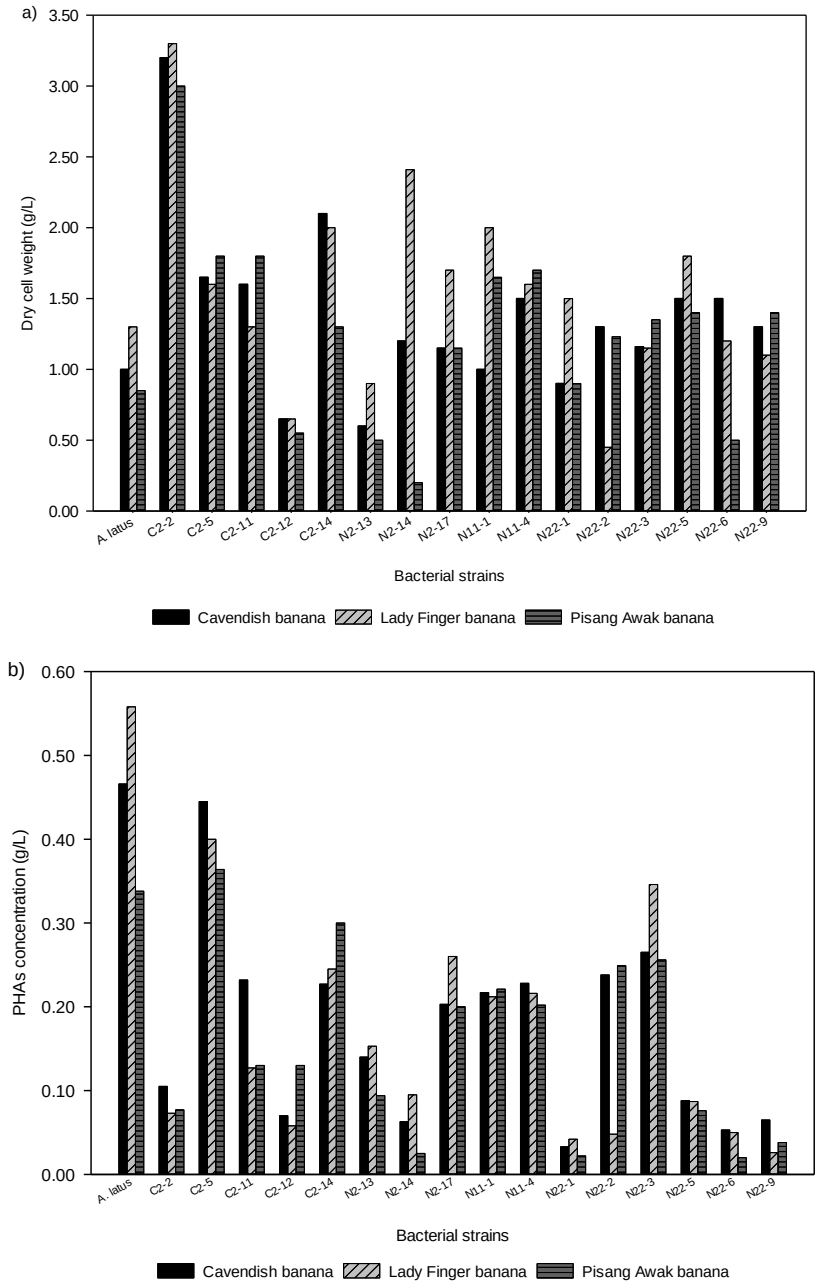


Figure 3 Dry cells weight (a) and PHAs production (b) of bacterial strains isolated from soil under fermentation in medium containing banana juice at 37 °C and 48 h incubation times

จากผลการทดลองในขั้นตอนตรวจสอบการผลิต PHAs ด้วยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำกล้วย พบว่ามีเพียง 16 สายพันธุ์เท่านั้นที่ผลิต PHAs ได้ โดยพบว่าแบคทีเรียรหัส C2-2 สามารถเจริญได้ดีในอาหาร MM ที่มีการเติมน้ำกล้วยทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งถึง 3.30±0.10 กรัม/ลิตร เมื่อเติมน้ำกล้วยไข่ลงในอาหาร ในทางตรงข้ามกลับพบว่าผลิต PHAs ได้ความเข้มข้นต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียรหัสอื่น โดยแบคทีเรียรหัส C2-5 มีการผลิต PHAs ได้สูงที่สุดคือ 0.45±0.05 กรัม/ลิตร ในอาหารที่มีการเติมน้ำกล้วยหอม แต่ทั้งนี้เมื่อพิจารณาปริมาณร้อยละของการสะสม PHAs ซึ่งคำนวณจากปริมาณของ PHAs ต่อปริมาณเซลล์ พบว่าอาหารที่มีการเติมน้ำกล้วยหอม แบคทีเรียรหัส C2-5 มีปริมาณร้อยละของการสะสม PHAs สูงที่สุดเท่ากับ 26.97±0.48% อาหารที่มีการเติมน้ำกล้วยไข่พบการสะสม PHAs ในแบคทีเรียรหัส N22-3 สูงถึง 30.10±0.25% และอาหารที่มีการเติมน้ำกล้วยน้ำว้าพบว่าแบคทีเรียรหัส C2-12 มีปริมาณร้อยละของการสะสม PHAs สูงที่สุดเท่ากับ 23.67±0.50% สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ *A. latus* สามารถเจริญและผลิต PHAs ได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน ทั้งนี้อาจเกิดจากสภาวะยังไม่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียที่คัดแยกได้จึงมีการผลิต PHAs ต่ำซึ่งควรมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป โดย *A. latus* พบว่ามีปริมาณร้อยละของการสะสม PHAs เท่ากับ 46.60±0.29% 42.92±0.53% และ 39.99±0.71% ในอาหารที่มีการเติมน้ำกล้วยหอม น้ำกล้วยไข่ และน้ำกล้วยน้ำว้า ตามลำดับ ผลการทดลองดังรูปภาพหมายเลข 4 (**Figure 4**) และจากการทดลองพบว่าน้ำกล้วยสามารถใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญได้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vega et al. (1988) ที่ได้ศึกษาการใช้น้ำกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ *Apiotrichum curvatum* ในการผลิตน้ำมัน พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและผลิตน้ำมันได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยน้ำกล้วยและมีการเติมสารสกัดยีสต์ในปริมาณต่ำ (0.05%) ร่วมด้วย เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Mezzolla และคณะ (2017) ที่พบว่าผลพลอยได้น้ำกล้วยจากอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารสามารถใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และผลิต PHAs ได้ดี

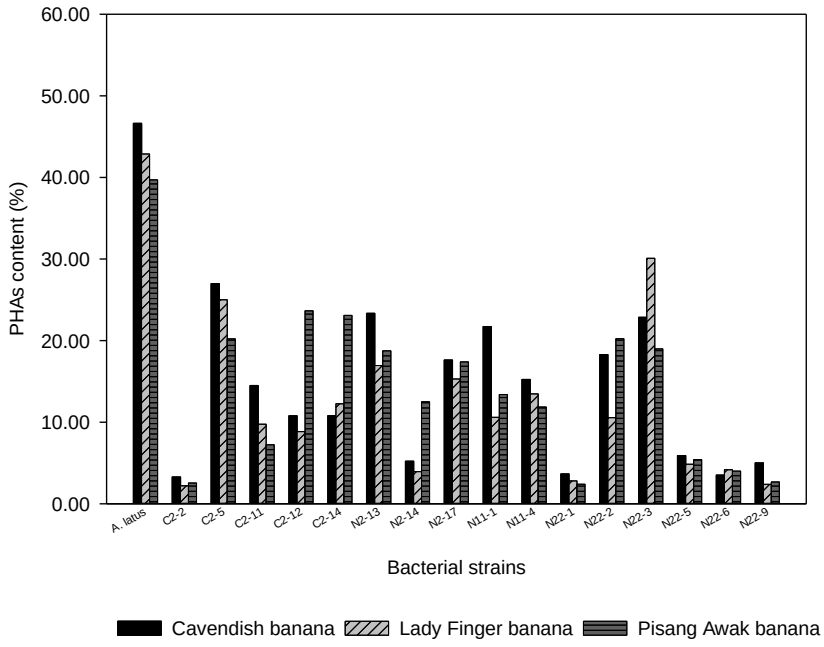


Figure 4 PHAs content of isolated PHAs producer under fermentation in medium containing banana juice at 37 °C and 48 h incubation times

แบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส C2-5 C2-12 และ N22-3 สามารถผลิต PHAs ได้สูงในอาหารที่มีการเติมกล้วยหอม กล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ตามลำดับเมื่อเทียบกับรหัสอื่น จึงนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา แสดงดังตารางที่ 2 พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งสามรหัสมีลักษณะโคโลนีคล้ายกันคือมีสีขาวขุ่น ผิวเรียบ รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีลักษณะเป็นแท่งสั้น แต่พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส C2-5 และ C2-12 ย้อมติดสีน้ำเงินของคริสตัลไวโอเลตซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก แต่แบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส

N22-3 ย้อมติดสีแดงซึ่งเป็นสีของซาฟรานินซึ่งแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ กรณีของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีการผลิตสปอร์จึงสูญเสียพื้นที่ภายในเซลล์เพื่อใช้สร้างสปอร์ ทำให้สามารถสะสม PHAs ภายในเซลล์จะได้ต่ำเมื่อเทียบกับแกรมลบ นอกจากนั้นยังมีการเจริญเติบโตช้า ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส N22-3 ไปทำการจำแนกสายพันธุ์โดยวิธีทางอณูชีววิทยาด้วยการหาลำดับเบส (sequence) ผลการจำแนกสายพันธุ์พบว่ามีความเหมือนถึง 99.85% กับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Klebsiella pneumoniae* จากการทดลองที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถใช้น้ำตาลที่มีในกล้วยในการเจริญและยังสามารถผลิต PHAs ได้ดี สอดคล้องกับรายงานวิจัย Tufail et al. (2017) ได้ทำการทดลองคัดแยกเชื้อจากดิน และพบว่าเป็นแบคทีเรีย *K. pneumoniae* เช่นเดียวกัน ซึ่งเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถเจริญและผลิต PHAs ในแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น น้ำมันจากการทอดอาหารหรือน้ำมันจากการประกอบอาหาร และน้ำตาลกลูโคส เป็นต้น

Table 2 Morphological characteristics of isolate strains

Morphology	N22-3	C2-5	C2-12
Whole colony appearance	Circular	Irregular	Irregular
Color	White	Cream	Cream
Surface	Smooth	Smooth	Smooth
Elevation	Convex	Raised	Raised
Shape	Rod shape	Rod shape	Rod shape
Gram's test	Negative	Positive	Positive

คุณลักษณะของ PHAs ที่ผลิตได้

ขั้นตอนการตรวจสอบยืนยันสามารถทำได้โดยนำสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ที่ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MM ที่มีกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอน และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากการเพาะเลี้ยงนำเซลล์มาสกัด PHAs ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์และคลอโรฟอร์ม หากมีการสะสมก็จะได้แผ่นฟิล์ม PHAs ออกมา ซึ่งลักษณะแผ่นฟิล์ม PHAs ของแบคทีเรีย *A. latus* มีลักษณะที่แตกต่างกันไปเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารอาหารเหลวสูตร MM ที่มีกล้วยชนิดต่างๆ โดยเมื่อเติมน้ำกล้วยไข่และกล้วยหอมลงในอาหารแผ่นฟิล์มที่ได้มีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น เช่นเดียวกับเมื่อเติมน้ำกล้วยหอมลงในอาหารแต่พบว่าแผ่นฟิล์มเมื่อเติมน้ำกล้วยหอมมีความเปราะมากกว่าซึ่งดูได้จากการที่สกัดออกมาแล้วไม่สามารถคงตัวเป็นแผ่นได้

ลักษณะแผ่นฟิล์ม PHAs ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส C2-5 C2-12 และ N22-3 มีลักษณะที่แตกต่างกันโดยแผ่นฟิล์มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส N22-3 มีลักษณะเป็นแผ่นใส มีความคงตัวเป็นแผ่นดีกว่าแผ่นฟิล์มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส C2-5 และ C2-12 ในขณะที่แผ่นฟิล์มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส C2-5 และ C2-12 มีลักษณะเป็นแผ่นสีขาวขุ่นค่อนไปทางเหลือง (**Figure 5**)

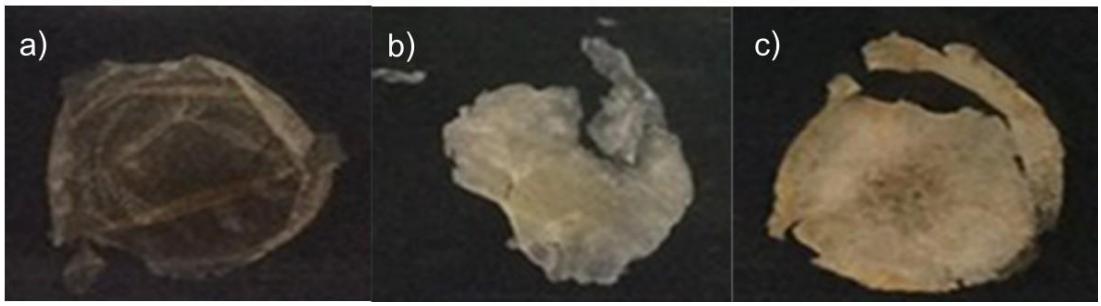


Figure 5 The PHAs film produced by isolate strain code N22-3 (a), C2-5 (b) and C2-12 (C) using banana juice as a carbon source

เมื่อนำแผ่นฟิล์มที่สกัดได้มาตรวจสอบโครงสร้างโดยวิเคราะห์หมู่ฟังชั่นด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ซึ่งทดสอบแผ่นฟิล์ม PHAs จากแบคทีเรียเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์เกณฑ์วิเคราะห์ ได้แก่ PHB ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ย่อยในกลุ่มของ PHAs และเป็นพอลิเมอร์ที่พบว่ามีการผลิตมากที่สุดเมื่อใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นพบว่าการใช้กล้วยซึ่งมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักในการหมักโดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ จึงมีโอกาสสูงที่จะพบการผลิต PHAs ชนิดของ PHB เป็นหลัก ผู้วิจัยจึงเลือกเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์มาตรฐานชนิดนี้

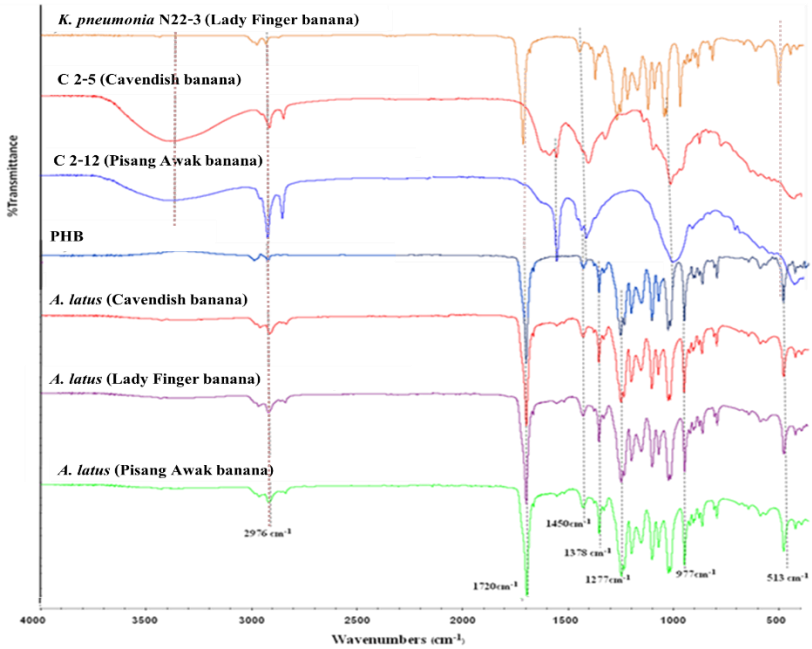


Figure 6 FTIR spectrum of standard PHB and synthesized PHAs from *A. latus* and isolate strains using banana as carbon sources

ผลการวิเคราะห์หมูฟังชั่นของแผ่นฟิล์ม PHAs ด้วยเทคนิค FTIR เปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ชนิด PHB (**Figure 6**)จะเห็นได้ว่าหมู่ฟังชั่นที่พบในช่วงความถี่ต่างๆ โดยเฉพาะในช่วงความถี่ 1720 (cm^{-1}) เป็นตำแหน่งของหมู่ C=O (ester) (Kunasundari et al., 2011) ซึ่งยืนยันได้ว่าฟิล์มที่ได้เป็น PHAs เนื่องจากมีหมู่เอสเทอร์ในสายพอลิเมอร์ ตำแหน่งในช่วงความถี่อื่นๆ พบว่ามีสัญญานของพีคที่วัดได้อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับพอลิเมอร์มาตรฐานชนิด PHB ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้แผ่นฟิล์ม PHAs ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมน้ำกล้วยเป็นแหล่งคาร์บอนมีโครงสร้างเป็น PHB โดยข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการปรับปรุงคุณสมบัติให้ดียิ่งขึ้นเหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ต่อไป

สรุป

กล้วยสุกงอมทั้ง 3 สายพันธุ์ซึ่งประกอบด้วย กล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า และกล้วยหอม สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการผลิต PHAs โดยแบคทีเรียได้ ซึ่งทำให้ช่วยลดต้นทุนด้านแหล่งคาร์บอนในการผลิต PHAs รวมทั้งเป็นการนำกล้วยสุกงอมมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ซึ่งเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการเพิ่มมูลค่าให้กับกล้วย และจากการคัดแยกแบคทีเรียจากดินในจังหวัดนครนายกและจังหวัดฉะเชิงเทรา พบแบคทีเรียสายพันธุ์ *K. pneumonia* N22-3 สามารถผลิต PHAs โดยใช้กล้วยในการเจริญได้ การตรวจพบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการ PHAs ในพื้นที่จังหวัดนครนายกและจังหวัดฉะเชิงเทราชี้ให้เห็นถึงความอุดมสมบูรณ์ของดินและความหลากหลายทางชีวภาพ

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณงบประมาณในการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่สัญญา 490/2559 และคณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้โอกาสและสนับสนุนการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ธนาวดี ลี้จากภัย. 2549. พลาสติกย่อยสลายได้เพื่อสิ่งแวดล้อม. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ: บริษัท ไทยเอฟเฟคท์สตูดิโอ จำกัด.

Abou-Zeid, D. M. 2001. Anaerobic biodegradation of natural and synthetic polyesters. Ph.D. Dissertations in Science, Technical University Carolo-Wilhelmina at Brunswick, Germany.

Bengtsson, S., A. Werker, M. Christensson, and T. Welander. 2008. Production of polyhydroxy lalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. Bioresource Technology. 99: 509-511.

Bernard, M. 2014. Industrial potential of polyhydroxyalkanoate bioplastic: a brief review. University of Saskatchewan Undergraduate Research Journal. 1: 1-14.

Burdon, K. L. 1946. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. Journal of Bacteriology. 52: 665-678.

Cavalheiro, J. M. B. T., M. C. M. D. Almeida, C. Grandfils, and M. M. R. Fonseca. 2009. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. Process Biochemistry. 44: 509-515.

Chen, G. Q. 2009. A microbial polyhydroxyl alkanoates (PHA) based bio-and materials industry. Chemical Society Reviews. 38: 2434-2466.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28: 350-356.

El-Sayed, A. A., H. M. Abdelhady, A. M. Hafez, and T. A. Khodair. 2009. Batch production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Ralstonia eutropha* and *Alcaligenes latus* using bioreactor different culture strategies. Journal of Applied Sciences Research. 5: 556-564.

Getachew, A., and F. Woldesenbet. 2016. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. BMC Research Notes. 9: 509

Grothe, E., M. Moo-Young, and Y. Chisti. 1999. Fermentation optimization for the production of poly (ß-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. Enzyme and Microbial Technology. 25:132-141.

Gouda, M. K., A. E. Swellam, and S. H. Omar. 2001. Production of PHB by *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. Microbiological Research. 156: 201-207.

Mezzolla, V., O. F. D'Urso, and P. Poltronieri. 2017. Optimization of polyhydroxyalkanoate production by recombinant *E. coli* supplemented with different plant by-products. BioTechnology: An Indian Journal. 13: 138-155.

Janes B., J. Hollar, and D. Dennis. 1990. Molacular characterization of the poly-β-hydoxybutyrate biosynthetic pathway of *Alcaligenes eutrophus* H16. In: Novel biodegradable microbial polymer. (Eds: Dawes, E.A.). The Netherlands. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht.

Kunasundari, B., and K. Sudesh. 2011. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. eXPRESS Polymer Letters. 5: 620-634.

Nandini, P., C. Amruta, P. Bhavesh, R. Pragya, V. Priti, and P. Mital. 2011. Screening of PHB (polyhydroxyalkanoates) producing bacteria from diverse sources. Microbial Biotechnology. 36: 216-274.

Phathipchotikun, R., P. Piwpan, A. Jaturapiree, and P. Jaturapiree. 2014. Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 from low-cost substrate as carbon source. KKU Research Journal. 19(Supplement Issue): 53-59.

Santhanam, A., and S. Sasidharan. 2010. Microbial production of polyhydroxyalkanotes (PHA) from *Alcaligenes* spp. and *Pseudomonas oleovorans* using different carbon sources. African Journal of Biotechnology. 9: 3144-3150.

Singhaboot, P., and P. Kaewkannetra. 2015. A higher in value biopolymer product of polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesized by *Alcaligenes latus* in batch/repeated batch fermentation processes of sugar cane juice. Annals of Microbiology. 65: 2081-2089.

Suwannasing, W., S. Moonamart, and P. Kaewkannetra. 2011. Yields of polyhydroxyalkanoates (PHAs) during batch fermentation of sugar cane juice by *Alcaligenes latus* and *Alcaligenes eutrophus.* Life Science Journal. 5: 960-966

Suwannasing, W., T. Imai, and P. Kaewkannetra. 2015. Cost-effective defined medium for the production of polyhydroxyalkanoates using agricultural raw materials. Bioresource Technology. 194: 67-74.

Tanamool, V., T. Imai, P. Danvirutai, and P. Kaewkannetra. 2013. Biopolymer generation from sweet sorghum juice: screening, isolation, identification, and fermentative polyhydroxyalkanoate production by *Bacillus aryabhattai.* Turkish Journal of Biology. 37: 259-264.

Tufail, S., S. Munir, and N. Jamil. 2017. Variation analysis of bacterial polyhydroxyalkanoates production using saturated and unsaturated hydrocarbons. Brazilian Journal of Microbiology. 48: 629-636.

Vega, E. Z., B. A. Glatz, and E. G. Hammond. 1988. Optimization of banana juice fermentation for the production of microbial oil. Applied and Environmental Microbiology. 54: 748-752.