
- โพลีเมอร์ชีวภาพชนิดโพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวไทเรต (Poly-β-hydroxybutyrate) เป็นโพลีเมอร์ที่เกิดจากการสะสมสารประกอบคาร์บอนสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งพลังงานสำรองภายในแกรนูลของเซลล์จุลินทรีย์หรือไซยาโนแบคทีเรีย อันเนื่องมาจากสภาวะที่ไม่สมดุลของสารอาหารหรือสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีพของเซลล์ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตโพลีเมอร์ชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อเป็นวัตถุดิบในการนำไปพัฒนาเป็นพลาสติกชีวภาพ โดยทำการเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียจากแหล่งน้ำธรรมชาติโดยใช้ตาข่ายแพลงก์ตอนที่ขนาดตา 20 ไมโครเมตร และการเก็บตัวอย่างจากรากคอรัลลอยด์ของปรัง แล้วนำมาคัดแยกโดยใช้ไมโครปิเปตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อให้ได้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ ไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกจนได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ เมื่อนำมาตรวจสอบปริมาณการสะสมของโพลีเมอร์ชีวภาพไว้ในเซลล์ด้วยการย้อมสีซูดานแบลคบี พบว่าไอโซเลท SM6-3 เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากรากคอรัลลอยด์ของปรังในสวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ฯ กรุงเทพมหานคร มีปริมาณโพลีเมอร์สะสมในเซลล์สูงที่สุดเนื่องจากย้อมติดสีน้ำเงินเข้มทั่วทั้งเซลล์ จากการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เป็นไซยาโนแบคทีเรียในกลุ่มของ *Nostoc* sp. เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 สูตรปกติและสูตรที่ไม่เติมไนโตรเจน (N_2 -free medium) ใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์และแสงแดดที่มีการเติมอากาศอย่างต่อเนื่อง ผลการทดลองพบว่าอาหารเหลวทั้งสองสูตรไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไอโซเลท SM6-3 แต่การเพาะเลี้ยงโดยใช้แสงแดดจะมีการเจริญเติบโตได้เร็วกว่าแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ โดยมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดเท่ากับ 9.96×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน ได้ผลผลิตชีวมวลเท่ากับ 1.69 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเก็บ

เกี่ยวเซลล์ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องแยกกากอัตโนมัติแล้วนำชีวมวลมาสกัดโพลีเมอร์ชีวภาพออกจากเซลล์และหาปริมาณโพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวไทเรต (Poly- β -hydroxybutyrate, PHB) โดยการใช้ปฏิกิริยา Acid hydrolysis และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร พบว่ามีปริมาณโพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวไทเรต (PHB) เท่ากับ 0.33 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณที่สูงกว่าเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร BG-11 สูตรปกติ

คำหลัก: ไฮยาโนแบคทีเรีย การคัดแยก การเพาะเลี้ยง โพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวไทเรต

Abstract

Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) is a type of the PHA family of polyesters. PHB has been detected in Cyanobacteria such as *Spirulina* sp., *Nostoc* sp., or *Oscillatoria* sp. This research work aims to collect Cyanobacteria from the samples of natural water basin and Corralloid roots of *Cycas* sp. investigates of biopolymer production of Cyanobacteria as raw material for biodegradable polymer production. Firstly, Cyanobacteria samples were collected from natural water basin using plankton net and Corralloid roots of *Cycad*. Then, they were isolated by observation of their cells under microscopes. The isolated of SM6-3 was collected from Corralloid roots of *Cycas* sp. of Queen Sirikit Park in Bangkok, Thailand. This isolate was identified as *Nostoc* sp. by Morphology. However, this strain showed a large of polyester's droplets stained with Sudan Black B. Thus, this strain was selected to cultivate in BG-11 culture medium under indoor and outdoor cultivation with continues aeration. The results revealed that BG-11 that lack of nitrogen (N_2 -free medium) under outdoor condition was suitable for biopolymer production. The cell of Cyanobacteria was reached a maximum growth of 9.96×10^6 cell ml^{-1} within 18 days cultivation and the maximum biomass was 1.69 gL^{-1} . After harvesting by centrifugal technique by using a high performance self-cleaning Separator, the biomass was extracted by Acid hydrolysis technique. Total PHB was presented at 0.33 gL^{-1} . It was higher than cultivated with the normal BG-11 medium.

Keywords: Cyanobacteria, Isolation, Cultivation, Poly- β -hydroxybutyrate

6. คำนำ

จากสถานการณ์ภาวะโลกร้อน (Global Warming) ที่ส่งผลกระทบในวงกว้างทั้งในระดับโลกและระดับภูมิภาค ไม่ว่าจะเป็นภัยธรรมชาติ และการเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศ รวมถึงปัญหาการแพร่ระบาดของโรคต่างๆ นั้นพบว่าปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดปัญหาโลกร้อน คือการปล่อยก๊าซเรือนกระจกจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงปิโตรเลียม การขนส่ง และกระบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เป็นต้น อนึ่ง ในปัจจุบันนี้โลกกำลังเผชิญกับภาวะขาดแคลนปิโตรเลียม ไม่เพียงพอกับความต้องการของตลาดและมีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ จึงส่งผลกระทบโดยตรงต่ออุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกจากปิโตรเคมี จึงทำให้นวนคิดในการผลิต

สารโพลีเมอร์ (Polymers) จากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นพืช หรือเชื้อจุลินทรีย์ ขึ้นมาทดแทนการใช้ปิโตรเคมี (petrochemicals) เพื่อนำมาผลิตเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ กำลังเป็นที่สนใจของอุตสาหกรรมพลาสติกเป็นอย่างมาก ผนวกกับปัจจุบันนี้ผู้บริโภคได้ตระหนักถึงปัญหาดังกล่าวและให้ความสำคัญกับการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมมากขึ้น จึงทำให้การคิดค้นกระบวนการใหม่และการสร้างนวัตกรรมอย่างครบวงจรภายในเวลาอันรวดเร็วเป็นสิ่งที่ทุกประเทศจำเป็นต้องเร่งดำเนินการ เพราะนอกจากจะหมายถึงการรักษาสิ่งแวดล้อมที่ดีของประเทศของตนแล้ว ยังหมายถึงโอกาสในการแข่งขันทางเทคโนโลยีที่จะเชื่อมไปสู่เศรษฐกิจการค้าระหว่างประเทศด้วย

ความตื่นตัวด้านพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพทั้งด้านนโยบายการวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมและการสร้างผลิตภัณฑ์เพื่อเร่งรัดให้เกิดการตลาดพลาสติกทั่วไบนั้น เป็นไปอย่างรวดเร็วและมีขั้นตอนที่มีทิศทางอย่างชัดเจนส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้วในยุโรป สหรัฐอเมริกา รวมทั้งญี่ปุ่น โดยสามารถผลิตเม็ดพลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพในระดับอุตสาหกรรมแล้ว เช่นบริษัท Natureworks (สหรัฐอเมริกา) ใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดแลคติกและ PLA บริษัท Metabolix, Inc. (สหรัฐอเมริกา) สามารถผลิต PHAs ในระดับนำร่องและอยู่ระหว่างการสร้างโรงงานผลิต PHAs แห่งแรกในระดับอุตสาหกรรม โดยร่วมกับบริษัท ADM (สหรัฐอเมริกา) ในระดับนโยบายนั้นสหรัฐอเมริกาได้ตั้งเป้าหมายที่จะให้มีการใช้ผลิตภัณฑ์มวลชีวภาพจากปริมาณร้อยละ 5 ในปี ค.ศ. 2002 เพิ่มขึ้นร้อยละ 12 ในปี ค.ศ. 2010 และร้อยละ 20 ในปี ค.ศ. 2030 พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพเป็นหัวข้อที่มีการพูดถึงกันอย่างกว้างขวางและเป็นประเด็นหลักในการพัฒนาวิสัยทัศน์สำหรับการใช้งานในอนาคตอันใกล้ซึ่งแบ่งตามแหล่งกำเนิดวัตถุดิบได้ 2 ประเภทคือพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี และพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุดิบมวลชีวภาพปัจจุบันพลาสติกประเภทหลังกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งโดยนักวิทยาศาสตร์ตลอดจนนักธุรกิจและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกำลังตื่นตัวในการคิดค้นหาวัตถุดิบมวลชีวภาพ (biomass) ในการผลิตพลาสติกชนิดใหม่เช่นกลุ่มโพลีแลคติก (PLA) หรือโพลีแลคไทด์กลุ่มโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (PHAs) และกลุ่มโพลีไฮดรอกซีบิวไทเรต (PHB) เป็นต้น เพื่อรองรับมาตรการหรือนโยบายในการจัดการด้านสิ่งแวดล้อม และแนวโน้มการค้าขายสินค้าอุปโภคบริโภคที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่สูงขึ้น

กลุ่มจุลินทรีย์เป็นอีกชีวมวลอีกแหล่งหนึ่งที่กำลังเป็นที่น่าสนใจของนักวิจัย และมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยกันอย่างกว้างขวางในปัจจุบันโดยพบว่าโพลีเมอร์กลุ่ม Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) เป็นส่วนประกอบที่พบในเซลล์ชั้นในของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มโปรคาริโอตเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของ PHB คือมีความสามารถทนความร้อนได้สูงไม่ละลายน้ำและสามารถย่อยสลายได้ส่วนใหญ่ผลิตได้จากกระบวนการหมักจากแบคทีเรียไซยาโนแบคทีเรีย หรือที่รู้จักกันในชื่อสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) เป็นอีกหนึ่งกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีการสะสมโพลีเมอร์ชีวภาพชนิดนี้ไว้อยู่ในเซลล์เช่นเดียวกัน

ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic) หมายถึง พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่มีส่วนประกอบสำคัญอย่างน้อยหนึ่งชนิดเป็นโพลิเมอร์ชีวภาพ และวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตทั้งหมดหรือบางส่วนเป็นวัตถุดิบที่สามารถผลิตหรือปลูกขึ้นใหม่ทดแทนได้ (Renewable raw materials) เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวโพด เป็นต้น พืชดังกล่าวมีส่วนประกอบของแป้ง น้ำตาล และเส้นใยซึ่งใช้เป็นองค์ประกอบหลักในการนำมาผลิตเป็นพลาสติกชีวภาพได้โดยใช้กระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) หรือ กระบวนการหมัก (fermentation) ผสมกับเทคโนโลยีด้านเคมีระดับสูง เช่น กระบวนการสังเคราะห์ และกระบวนการขึ้นรูป เป็นต้น นอกจากนี้พลาสติกชีวภาพยังมีคุณสมบัติที่สามารถแตกสลายทางชีวภาพ (biodegradable) ได้อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติ โดยจะถูกจุลินทรีย์ในธรรมชาติใช้เป็นอาหารและย่อยสลายได้ พลาสติกชีวภาพก่อให้เกิดการปลดปล่อยก๊าซเรือนกระจกในปริมาณที่น้อยกว่าพลาสติกทั่วไปไม่ต่ำกว่าร้อยละ 20 ทั้งนี้สมาคม European Bioplastics ได้ทำการศึกษากำลังการผลิตพลาสติกชีวภาพทั่วโลก ดังแสดงใน Figure 1 โดยในปี พ.ศ. 2552 มีกำลังการผลิตพลาสติกชีวภาพรวมประมาณ 440,000 ตัน และจะเติบโตขึ้นเป็นประมาณ 1.47 ล้านตัน ในปี พ.ศ. 2556 คิดเป็นการเติบโตร้อยละ 35 ต่อปี

นอกจากนี้ European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE) และ European Bioplastics ได้มีการประมาณการว่ากำลังการผลิตของพลาสติกชีวภาพในปี พ.ศ. 2550 ทั่วโลกมีกำลังการผลิตพลาสติกชีวภาพประมาณ 360,000 ตัน และจากการประกาศการเพิ่มกำลังการผลิตและโรงงานที่จะเกิดขึ้นใหม่ ทำให้คาดการณ์ว่ากำลังการผลิตพลาสติกชีวภาพจะเติบโตเป็น 2.32 ล้านตัน และ 3.45 ล้านตัน ในปี พ.ศ. 2556 และปี พ.ศ. 2563 ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 36 ต่อปี (พ.ศ. 2550-2556) และร้อยละ 6 ต่อปี (พ.ศ. 2556-2563) ตามลำดับ ซึ่งนับว่าค่อนข้างสูง โดยคิดเป็นอัตราส่วนของพลาสติกชีวภาพแต่ละชนิดดังแสดงใน Figure 2 จะเห็นว่าพลาสติกชีวภาพที่ผลิตกันมากที่สุดในปัจจุบัน คือ พลาสติกจากแป้ง โดยมีสัดส่วนร้อยละ 40 รองลงมา คือ PLA มีสัดส่วนใกล้เคียงกันคือ ร้อยละ 39 แต่คาดการณ์ว่าในอนาคตประเภทพลาสติกชีวภาพที่ผลิตจะมีความหลากหลายเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะ โพลีเอทิลีนที่ผลิตจากวัตถุดิบชีวมวล กำลังมีการก่อสร้างโรงงานที่ประเทศบราซิล และ PHA ที่จะมีการเพิ่มกำลังการผลิตทั้งจากโรงงานเดิมและมีโรงงานที่เกิดขึ้นใหม่

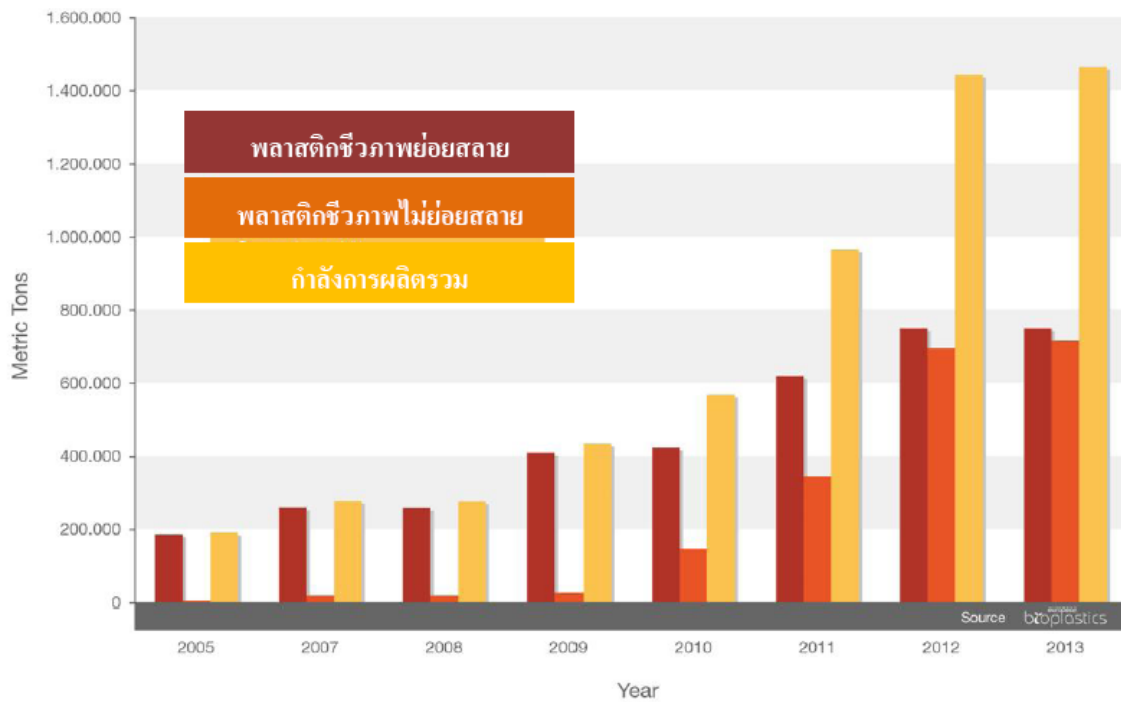


Figure 1 Capacity of Bio-plastic production from 2006 to 2013

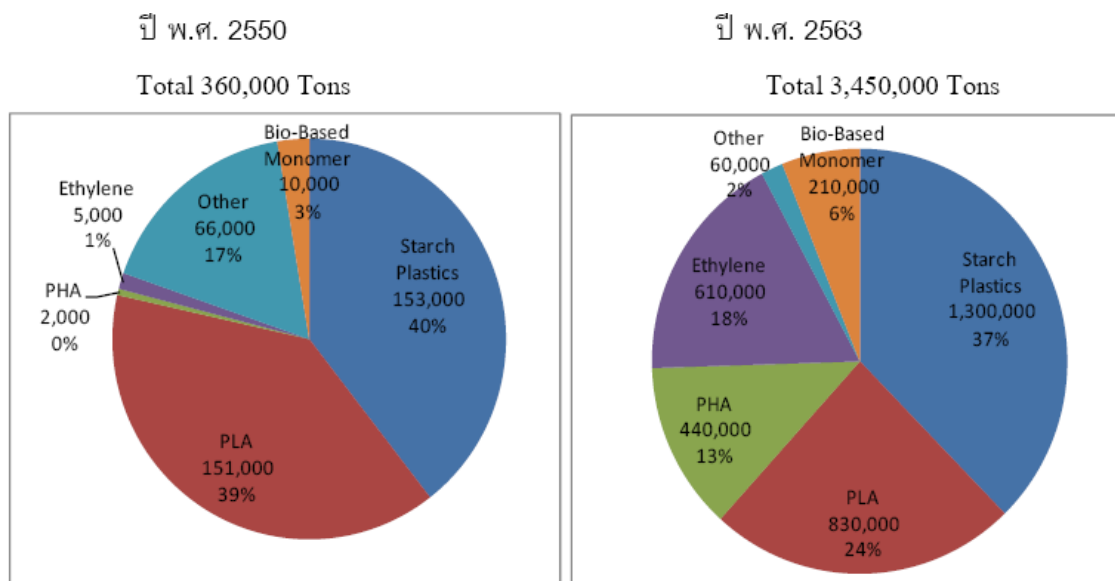


Figure 2 Capacity of emerging bio-base plastic by resin types, 2008 and 2021

Other = Cellulose Film, PTT, Nylon and Polyurethane

Source: Pro-Bip 2009, commissioned by EPNOE and European Bioplastics, Utrecht University

ปัจจุบันพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ แบ่งตามแหล่งกำเนิดวัตถุดิบได้ 2 ประเภท คือ

1. พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี (petroleum-based biodegradable plastics) ได้แก่ Polycaprolactone, Polyvinyl alcohol เป็นต้น

2. **พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากวัตถุดิบมวลชีวภาพ (bio-based biodegradable plastics)** ได้แก่ วัสดุที่มาจากแหล่งธรรมชาติ เช่น กลุ่มโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ผลิตและสะสมเอาไว้ในเซลล์ และ วัสดุที่ได้จากการสังเคราะห์ มักจะเกิดจากผลผลิตของกระบวนการหมัก (fermentation) เช่น สารประกอบโพรตีน หรือเพคติน ที่สามารถจะพัฒนาต่อไปเป็นสารโพลีเมอร์ รวมทั้งสาร polylactic acid (PLA) ซึ่งได้จากกระบวนการPolymerization) ของ กรดแลคติก

ซึ่งในปัจจุบันพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ได้จากวัตถุดิบมวลชีวภาพ กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากโดยนักวิทยาศาสตร์ตลอดจนนักธุรกิจและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง กำลังตื่นตัวในการคิดค้นหาวัตถุดิบมวลชีวภาพ (Biomass) ในการผลิตพลาสติกชนิดใหม่ เช่น โพลีแลคติก แอซิด (Polylactic Acid, PLA) หรือโพลีแลคไทด์ (Polylactide) และ กลุ่มโพลีไฮดรอกซีอัลคาโนเอท (Polyhydroxyalkanoates, PHAs) ฯลฯ เพื่อรองรับมาตรการและนโยบายในการจัดการ ด้านการรักษาสิ่งแวดล้อม พร้อมทั้งแนวโน้มการขยายสินค้าอุปโภคบริโภคที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

กระบวนการผลิตพลาสติกชีวภาพ สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มเทคโนโลยีได้ 3 กลุ่มเทคโนโลยี คือ

1. เทคโนโลยีต้นน้ำ ได้แก่ การเตรียมวัตถุดิบ กระบวนการหมัก (Fermentation) ด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ
2. เทคโนโลยีกลางน้ำ ได้แก่ กระบวนการโพลีเมอไรเซชัน (Polymerization)
3. เทคโนโลยีปลายน้ำ ได้แก่ กระบวนการคอมพาวด์ดิ้ง (Compounding) หรือกระบวนการขึ้นรูป

กระบวนการหมัก (Fermentation) โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

1. การเตรียมน้ำตาล โดยเริ่มต้นจากการบดหรือโม่ผลผลิตทางการเกษตรโดยให้ละเอียดเป็นผง จากนั้นทำการย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาลโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสที่มีเอนไซม์ หรือกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
2. การเตรียมโมโนเมอร์ โดยการนำน้ำตาลไปหมักด้วยจุลินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อผลิตโมโนเมอร์
3. การเตรียมโพลีเมอร์ เช่น ในกรณีของ PHAs เป็นกระบวนการหมักโดยตรงจากน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลไปเป็นโพลีเมอร์โดยจะผลิตเก็บไว้ในเซลล์

กระบวนการโพลีเมอไรเซชัน (Polymerization)

เป็นกระบวนการสังเคราะห์โพลีเมอร์จากโมโนเมอร์ซึ่งเกิดปฏิกิริยาเคมีแล้วเชื่อมต่อกันเป็นสายยาว ภายใตสภาวะต่างๆ เช่น ตัวเร่งปฏิกิริยา อุณหภูมิ ความดัน ซึ่งปฏิกิริยาเคมีในกระบวนการโพลีเมอไรเซชัน ได้แก่

1. ปฏิกิริยาการควบแน่น (condensation) : โมโนเมอร์มีส่วนที่ไวต่อปฏิกิริยาที่ปลายทั้งสองเมื่อทำปฏิกิริยากันแล้วจะเกิดการเชื่อมต่อกันเป็นสายยาว
2. ปฏิกิริยาการเติม (addition) : โมโนเมอร์มีพันธะคูอยู่ในโครงสร้าง เมื่อเกิดปฏิกิริยาพันธะคูจะเปิดออก แล้วจึงเชื่อมต่อเป็นสายยาว
3. ปฏิกิริยาการเปิดวง (ring-opening): มอนอเมอร์มีโครงสร้างเป็นวงแหวน เมื่อเกิดปฏิกิริยาจะเกิดการเปิด วงแล้วจึงเชื่อมต่อเป็นสายยาว

กระบวนการคอมพาวด์ดิ้ง (Compounding)

เป็นเทคโนโลยีที่สำคัญและจำเป็นในการปรับสมบัติทางกายภาพและทางกลให้พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพแสดงปรากฏการณ์การไหลและการก่อตัวได้ดี รวมทั้งมีความยืดหยุ่น แก้ปัญหาเรื่องความเปราะบางเพื่อให้เขาใกล้เคียงกับสมบัติเดนของพลาสติกที่มาจากปิโตรเคมีที่เราคุ้นเคยกันดี โดยเฉพาะให้ใกล้เคียงกับโพลีเอทธิลีนหรือโพลีโพรพิลีนในมากที่สุด โดยการผสมกับโพลีเมอร์ชนิดอื่นหรือการเติมสารเติมแต่ง เช่น พลาสติกไซเซอร์ สารช่วยผสม (compatibilizer) ฟลเลอร์ (filler) สารเสริมแรง (reinforcing agent) สารก่อผลึก (nucleating agent) เปนตน Khanna และ Srivastava (2005) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลกลูโคส กรดแลกติก กรากน้ำตาล กลีเซอรอล กรดอะซิติก โซโลส กรดโปรไพโอนิก แป้ง และน้ำตาลแลคโตสพบว่าน้ำตาลฟรุคโตส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ *Ralstonia eutropha* สามารถผลิต PHAs ได้สูงสุด Stein buchyl (1991) ได้ศึกษาการผลิต PHAs จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ สายพันธุ์ที่ต่างกันจะมีศักยภาพในการผลิต PHAs ได้ต่างกัน ซึ่งมีองค์ประกอบของ PHAs ที่แตกต่างกันด้วย และผลการทดลองของ Timm และคณะในปี ค.ศ. 1990 ก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน การผลิต PHAs มักจะผลิตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่าง 7.0 สภาวะดังกล่าวอาจเหมาะสมกับการผลิต PHAs ของจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามงานวิจัยส่วนใหญ่ยังพัฒนาอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการ ดังนั้นหากได้รับการสนับสนุนจากทุกองค์กรทั้งในภาครัฐและภาคเอกชนในการผลักดันให้เกิดการพัฒนาองค์ความรู้และพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อนำไปสู่การสนับสนุนให้เกิดธุรกิจการค้าและสอดคล้องกับนโยบายการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม งานวิจัยในครั้งนี้น่าจะศึกษา คัดแยก และคัดเลือกจุลินทรีย์ หรือ ไซยาโนแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสะสมโพลีเมอร์ไว้ในเซลล์ ตลอดจนศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ชีวมวลสูง เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการสกัดใช้เป็นโพลีเมอร์ชีวภาพต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

เครื่องมือ วัสดุ และ อุปกรณ์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้ออัตโนมัติ
- ตาข่ายแพลงก์ตอน ขนาด 45 ไมโครเมตร
- เครื่องวัดอุณหภูมิ
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่างของน้ำ
- กล้องจุลทรรศน์
- เครื่องดูดจ่ายสารเคมีอัตโนมัติ (Auto-pipette)
- หลอดฟลูออเรสเซนส์
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง

- เครื่องวัดความเข้มของแสง
- ปืนอากาศ
- เครื่องวัดจำนวนเซลล์ (Haemocytometer)
- เครื่องเขย่า
- เครื่องปั่นผสม
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้อบ
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
- เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน
- หลอดทดลองและเครื่องแก้วขนาดต่างๆ
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- ชุดกรองอากาศ PTFE ขนาด 0.45 μm
- อุปกรณ์เย็บเชื้อ (loop)
- สายยางซิลิโคน
- ข้อต่อ สามทาง และตัวปรับความเร็วลม
- เครื่องตั้งเวลาอัตโนมัติ
- ขวดน้ำกลั่น
- แผ่นสไลด์เรียบและแผ่นสไลด์หลุม
- เข็มเย็บเชื้อ
- ไมโครปิเปต
- จานเพาะเลี้ยงเชื้อ

สารเคมี

- สารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ KNO_3 , MnCl_2 , Citric acid, K_2HPO_4 , ZnSO_4 , H_3BO_3 , MgSO_4 , CuSO_4 , KOH , CaCl_2 , CoCl_2 , HCl , Na_2MoO_4 , Fe citrate เป็นต้น
- สารเคมีสำหรับการเก็บรักษาเซลล์ ได้แก่ Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- สารเคมีสำหรับสกัดโพลีเมอร์ ได้แก่ เมทานอล, กรดซัลฟูริก, เฮกเซน เอทานอล อะซิโตน ไตรเตตระฟูแรน คลอโรฟอร์ม, Nigrosin, Sudan Black B, Xylene เป็นต้น

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและคัดแยกเชื้อไฮยาโนแบคทีเรีย

1.1 การเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

การทดลองในครั้งนี้ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่เจริญและลอยอยู่ในผิวน้ำโดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่าตาข่ายแพลงก์ตอนขนาด 20 ไมโครเมตร ที่ปลายตาข่ายจะมีกระบอกสำหรับเก็บตัวอย่างเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย วิธีการใช้งานตาข่ายแพลงก์ตอน ให้ใช้มือที่ไม่ถนัดจับที่ปลายเชือก ส่วนมือที่ถนัดให้จับตาข่ายแพลงก์ตอนโยนไปในบริเวณตัวแทนของแหล่งน้ำที่ต้องการเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างน้ำลงในภาชนะเก็บตัวอย่างขนาด 250 มิลลิเมตร แช่เย็นไว้ในภาชนะบรรจุน้ำแข็งที่เตรียมไว้เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ในห้องปฏิบัติการต่อไป

1.2 การเก็บตัวอย่างจากรากปรง

การทดลองในครั้งนี้ได้ดำเนินการเก็บรวบรวมรากคอร์ลลอยด์ซึ่งเป็นรากของต้นปรงที่เจริญขึ้นมาเหนือผิวดิน นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ แล้วนำส่วนปลายราก (Root tip) ของรากคอร์ลลอยด์มาผ่าออกตามแนวขวาง ใช้เข็มเย็บเย็บเย็บเอาส่วนที่เป็นสีเขียวบริเวณ Cyanobacterial zone ด้วยเทคนิคที่ปลอดภัย แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 เพื่อขยายจำนวนเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

1.3 การเพิ่มจำนวนตัวอย่างเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

การทดลองนี้ใช้อาหารเหลวสูตร BG-11 ซึ่งเป็นอาหารสูตรมาตรฐานสำหรับเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย โดยนำชุดตัวอย่างจากข้อ 1.1 และ 1.2 มาเพาะเลี้ยงในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร BG-11 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 250 มิลลิลิตร ให้อากาศที่ผ่านการกรองจากปั๊มให้อากาศเป็นเวลา 30-60 วัน หรือจนกว่าตัวอย่างนั้นๆจะมีสีเขียวหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน

2. การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย

เมื่อเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งต่างๆแล้ว ตามขั้นตอนที่ 1.3 นำตัวอย่างที่ได้มาทำการคัดแยกเซลล์เพื่อให้ได้ตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นเซลล์เดี่ยวสายพันธุ์ที่มีความบริสุทธิ์โดยใช้วิธีดูลูกออกโดยใช้ไมโครปิเปตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ยูวดี พีรพรพิศาล, 2546) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 2.1 เจือจางปริมาณเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่หยดบนแผ่นกระจกสไลด์ 3-5 ครั้ง
- 2.2 นำแผ่นสไลด์หลุมที่มีไซยาโนแบคทีเรียมาหาตัวเซลล์ที่เป็นสายพันธุ์ที่พบเป็นหลักๆในแต่ละแหล่ง (Dominant species) ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
- 2.3 จุ่มปลายไมโครปิเปตที่ดึงเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียจากข้อ 2 ลงในอาหารเหลวที่หยดไว้บนแผ่นสไลด์แผ่นใหม่โดยใช้ จุกยางสวมที่ปลายไมโครปิเปต ป้อนอาหารเหลวที่มีเซลล์ออก จากนั้นตรวจดูเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีการเดียวกับที่กล่าวมาตามข้อ 2 จนได้เพียง 1 เซลล์ แล้วจึงย้ายไปลงในอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงต่อไป

3. การเก็บรักษาสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้

นำหัวเชื้อไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากข้อ 2 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร มาเก็บรักษาไว้ใน

หลอดแช่แข็ง (Cryotube) ซึ่งภายในหลอดมีสารละลาย 20% ไดเมทิลซัลโฟไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

4. การคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตโพลีเมอร์ชีวภาพได้

นำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้มาคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการสะสมโพลีเมอร์ไว้ในเซลล์สูง โดยใช้เทคนิคการย้อมด้วยสีซูดาน แบลค บี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ซึ่งวิธีการย้อมด้วยสี Sudan Black B (ดัดแปลงจาก Burdon, 1946)

- 1) เตรียมแผ่นฟิล์มของเซลล์จุลินทรีย์หรือไซยาโนแบคทีเรียบนแผ่นสไลด์ โดยนำเซลล์มาหยดลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วตรึงรอยแผ่นฟิล์มหรือรอยเสมียร์ด้วยเปลวไฟ
- 2) จุ่มแผ่นสไลด์ในสารละลาย 0.3% ซูดาน แบลค บี ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที
- 3) ล้างสีในส่วนที่เกินออกด้วยน้ำสะอาดหรือจุ่มใน Xylene หลายๆ ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง
- 4) ย้อมทับด้วยสารละลาย 0.5% safranin ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 วินาที
- 5) ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำสะอาดแล้วซับให้แห้ง แล้วหาปริมาณโพลีเมอร์ที่สะสมในเซลล์สำหรับวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 100 เท่า (จะสังเกตเห็นเป็นเม็ดสีน้ำเงินเข้มหรือจุดดำภายในเซลล์)

5. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

5.1 การเตรียมกล้าเชื้อตั้งต้น (Starter culture)

นำไซยาโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 มาเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรมาตรฐาน BG-11 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด cool white ในอัตรา 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยมีระดับความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ และอุณหภูมิห้องเฉลี่ย 27 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ log phase หรือวัดค่าความขุ่นได้ประมาณ 0.3 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

5.2 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย

นำหัวเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ 5.1 มาศึกษาอัตราการเจริญเติบโตด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบกะในระดับฟลากส์ (Flask scale) ขนาด 5 ลิตร ด้วยอาหารเหลวสูตรมาตรฐาน BG-11 โดยมีการศึกษากรรมวิธีการให้แสง 2 กรรมวิธี ได้แก่

- 1) การเพาะเลี้ยงแบบให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์

เพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรียภายในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิเฉลี่ย 27 องศาเซลเซียส โดยให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด Cool white ที่มีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ในอัตรา 12 ชั่วโมงต่อวัน

2) การเพาะเลี้ยงแบบให้แสงจากแสงแดด

เพาะเลี้ยงไฮยาโนแบคทีเรียนอกห้องปฏิบัติการ ในบริเวณที่มีแสงแดดส่องได้ทั่วถึงตลอดวัน บันทึกอุณหภูมิและความเข้มของแสงทุกวัน วันละ 3 ครั้ง คือเวลา 9.00 น. 12.00 น. และ 15.00 น.

5.3 การติดตามการเจริญเติบโต

ตลอดกระบวนการเพาะเลี้ยงทั้ง 2 กรรมวิธีนี้จะเก็บตัวอย่างเพื่อติดตามการเจริญเติบโตของไฮยาโนแบคทีเรียต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน โดยมีวิธีการติดตามการเจริญเติบโตดังนี้

- 1) วัดความหนาแน่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร
- 2) นับจำนวนเซลล์ โดยใช้แผ่นสไลด์นับจำนวนเซลล์ (Heamacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่มีกำลังขยาย 40 เท่า
- 3) วัดน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเก็บตัวอย่างเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ให้สะอาดแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในตู้ดูดความชื้นและชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณน้ำหนักแห้ง

6. การสกัดโพลีเมอร์ชีวภาพจากเซลล์ไฮยาโนแบคทีเรีย (John et al., 1960)

นำชีวมวลของไฮยาโนแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากข้อ 5 มาสกัดโพลีเมอร์ชีวภาพออกจากเซลล์และหาปริมาณโพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวไทเรต (Poly-β-hydroxybutyrate, PHB) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 6.1 นำชีวมวลของไฮยาโนแบคทีเรีย 1 กรัม เติมนคลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 6.2 นำไปบ่มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 6.3 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร
- 6.4 นำไปบ่มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 6.5 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- 6.6 ขยี้ให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร

7. การเตรียมแผ่นฟิล์มเบื้องต้นโดยใช้เซลล์ไฮยาโนแบคทีเรีย

ศึกษาอัตราส่วนระหว่างเซลล์ชีวมวลของไฮยาโนแบคทีเรียกับสารพลาสติไซเซอร์ ดังต่อไปนี้

- 7.1 นำเซลล์ของไฮยาโนแบคทีเรีย 50 กรัม มาเติมกลีเซอรอลให้มีอัตราส่วนร้อยละ 5, 10, 15, 20, 30
- 7.2 ต้มกับน้ำสะอาดปริมาตร 140 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที
- 7.3 เทส่วนผสมลงในแผ่นเพลทแก้วแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.4 ดึงแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้ออกจากแผ่นเพลทแล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆของแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้ คือ ความหนา ปริมาณน้ำอิสระ ปริมาณความชื้น ค่าสี และค่าการละลายน้ำ

- 1) ความหนา (thickness) วัดด้วยเครื่องวัดความหนา
- 2) การวัดค่าสี (Color Measuring) ด้วยเครื่องวัดสี Konica Minolta Chroma meter, CR-400
- 3) ปริมาณความชื้น (moisture content) วัดด้วยเครื่องวัดความชื้น
- 4) ปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w) วัดด้วยเครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ Novasina รุ่น TH 200
- 5) การละลายน้ำ (water solubility) ตามวิธีของ Su, J., *et al.* (2010) และ Tongdeesoontorn, W., *et al.* (2011) โดยตัดแผ่นฟิล์มให้มีน้ำหนักประมาณ 0.3 กรัม แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนักก่อนการละลาย (W_0) แล้วไปแช่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิดปากบีกเกอร์ด้วยพาราฟิล์ม วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (กระดาษกรองที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว) นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนักหลังการละลาย (W_1) นำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การละลายน้ำ

8 ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 การเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย งานวิจัยนี้ได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรีย 2 รูปแบบ คือ

- 8.1.1 การเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญอยู่ตามแหล่งน้ำตามธรรมชาติโดยใช้ตาข่ายแพลงก์ตอน (Plankton net) ขนาด 20 ไมโครเมตร ที่ระดับความลึกประมาณ 50 เซนติเมตร หรือไม่ต่ำกว่าที่ระดับแสงสามารถส่องผ่านได้ ซึ่งจะมีลักษณะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง ดังแสดงใน Figure 3



Figure 3 Sample collections from the part of natural water basins area of Thailand

1. Rajamangala University of Technology Lanna (Doi Saket) Reservoir, Chiang Mai
2. Huai Yang, Sa Kaeo 3. Pak Mun Dam, Ubon Ratchathani
4. Khong Tha Dan Dam, Nakhon Nayok 5. The King's Royally Initiated Laem Phak Bia, Petchaburi
6. Bo Phan Khan, Roi-et

8.1.2 การเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในบริเวณรากของปรง โดยเก็บรวบรวมรากคอร์รัลลอยด์ซึ่งเป็นรากของต้นปรงที่เจริญขึ้นมาเหนือผิวดิน ไม่มีการตอบสนองต่อแรงโน้มถ่วงของโลก จากสวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ฯ กรุงเทพมหานคร รากคอร์รัลลอยด์มีลักษณะปลายรากแตกเป็นสองแฉก คล้ายปะการัง ไม่มีหมวกราก ที่บริเวณ Cyanobacterial zone ของรากคอร์รัลลอยด์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ มีสีเขียวของไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ภายในรากตรงกลางชั้นคอร์เทกซ์และเซลล์ชั้นนี้จะถูกล้อมรอบด้วยเซลล์เยื่อหุ้มทั้งด้านนอกและด้านใน ดังแสดงใน Figure 4



Figure 4 Coralloid roots of *Cycas* sp.

A. The locating of coralloid roots (arrow) B. dichotomous branching C. Cyanobacterial zone (arrow)

8.2 การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรีย

เมื่อนำตัวอย่างน้ำมาเพิ่มปริมาณเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียโดยเฉพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 แล้วนำมาคัดแยกให้ได้เซลล์บริสุทธิ์โดยใช้วิธีคัดแยกด้วยไมโครปิเปตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Manipulative methods) เป็นวิธีการแยกไซยาโนแบคทีเรียที่ต้องการโดยวิธีกล ซึ่งของเหลวและเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย จะไหลเข้าสู่ไมโครปิเปตเองโดยอาศัยแรงตึงแคปิลลารี จากนั้นนำไซยาโนแบคทีเรียที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ ในขั้นตอนนี้ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงประมาณ 60–120 วัน ในสภาวะแบบออโตโทรฟิก โดยให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด Cool white ที่มีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ในอัตรา 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิห้องเฉลี่ยประมาณ 28-29 องศาเซลเซียส การตรวจสอบว่าไซยาโนแบคทีเรียเจริญขึ้นหรือไม่โดยสังเกตจากสีของอาหารเหลวซึ่งจะมีสีเขียวหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน ตรวจสอบว่าได้สายพันธุ์บริสุทธิ์หรือไม่ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ดังแสดงใน Figure 5

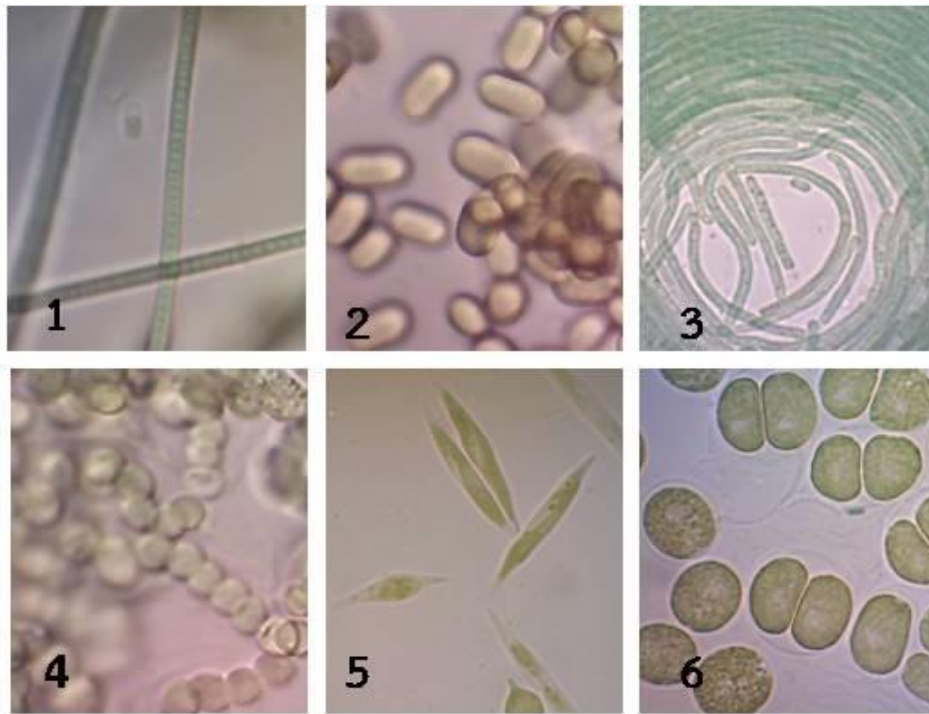


Figure 5 Microphotographs of some Cyanobacteria isolated from different water basins and coralloid roots of *Cycas* sp. 1. NT01-1; 2. SM5-1; 3. NT05-5; 4. SM6-3; 5. LH01-3; 6. NT05-3

เมื่อนำตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้มาคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการสะสมโพลีเมอร์ไว้ในเซลล์ โดยใช้เทคนิคการย้อมด้วยสีชูตาน แบลค บี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่าไอโซเลท SM6-3 เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากรากคอร์ลลอยด์ของปรงมีเมล็ดสีน้ำเงินเข้ม หรือจุดดำภายในเซลล์มากที่สุด ดังแสดงใน Figure 6 จึงเลือกสายพันธุ์นี้มาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ ไอโซเลท SM6-3 มีรูปร่างเป็นกลุ่มเซลล์มาเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย trichome ประกอบด้วย vegetative cell และ heterocyst cell เรียงสลับหรืออยู่ปลายสุดของเส้นสาย trichome

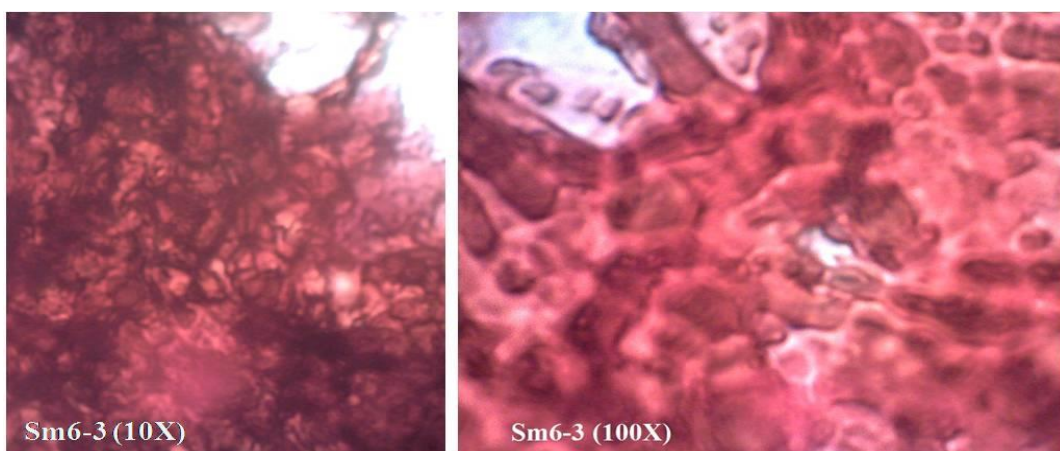


Figure 6 Microscopic visualization of Cyanobacteria isolate SM6-3 for PHB by using Sudan Black B staining and illuminated very dark granules inside pink cells. (left) with 10X (right) with 100X

8.3 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย

ในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท SM6-3 โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร BG-11 ที่มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ หรือมีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ให้อากาศบริสุทธิ์แบบต่อเนื่องจากปั๊มอากาศที่มีการกรองอากาศด้วย Filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน เพาะเลี้ยงด้วยแสง 2 แบบ คือ การให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด Cool white ที่มีความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ในอัตรา 12 ชั่วโมง/วัน ในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 27 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการ ในบริเวณที่มีแสงแดดส่องได้ทั่วถึงตลอดวัน

ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแบบใช้แสงแดดมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและให้ผลผลิตสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ กล่าวคือเซลล์มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง Stationary phase ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง มีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด 1.035×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลิตชีวมวลได้สูงสุด 1.75 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เพาะเลี้ยงโดยใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง Stationary phase ในวันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด 6.74×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลิตชีวมวลได้สูงสุด 0.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับดังแสดงใน Figure 7

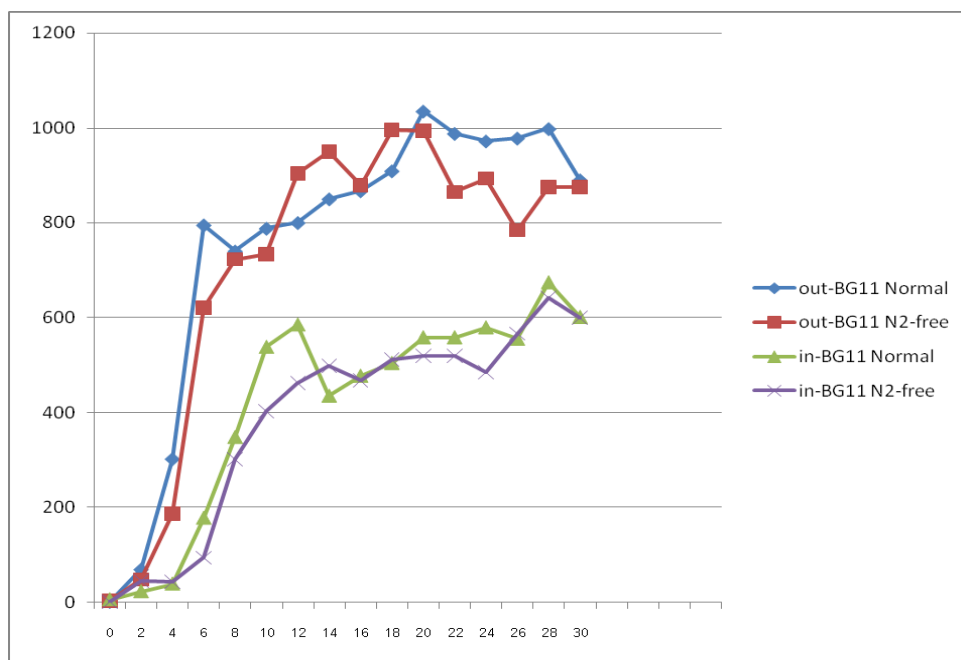


Figure 7 Growth profile of SM6-3 under autotrophic condition and outdoor cultivation

ในขณะเดียวกันเมื่อปรับสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโดยไม่มีการเติมธาตุไนโตรเจนลงไป ในอาหาร (N-free medium) พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรียไอโซเลท SM6-3 แต่

อย่างไรก็ดี เซลล์มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง Stationary phase ในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง มีความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุด 9.96×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลิตชีวมวลได้สูงสุด 1.69 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาจจะสืบเนื่องจาก ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เป็นชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกันในรากปรองแบบเอนโดไฟต์ (endophyte) ทำให้สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (N_2 -fixation) ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกสถานะในการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยไม่มีการเติมไนโตรเจนลงในสูตรอาหาร BG-11

8.4 การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในระดับขยายขนาด

การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดในครั้งนี้ได้ออกแบบบ่อเพาะเลี้ยงเป็นแบบเปิดนอกห้องปฏิบัติการ (Raceway pond) โดยติดตั้งใบพัดมอเตอร์เพื่อให้เกิดการไหลเวียนน้ำเพาะเลี้ยงในบ่อเพื่อให้เซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียได้รับแสงอย่างสม่ำเสมอ ลดปริมาณออกซิเจนในบ่อที่อาจจะเป็นอันตรายต่อเซลล์จากปฏิกิริยา Photo oxidation ได้ รวมทั้งป้องกันการตกตะกอนของเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยบ่อเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นชุดของบ่อที่มีขนาดความจุ 1,000 ลิตร จำนวน 6 บ่อ ดังแสดงใน Figure 8 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียในระดับขยายขนาดใช้อาหารสูตร BG-11 ที่ไม่เติมธาตุไนโตรเจน (N-free medium) ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิก ได้รับแสงจากธรรมชาติ (แสงแดด) มีความหนาแน่นของเซลล์ 1.035×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลิตชีวมวลสูงสุด 1.88 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน โดยตลอดระยะเวลาในการศึกษาในครั้งนี้มีระดับความเข้มของแสงอยู่ในช่วง 11-17 kLux และอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ในช่วง 35-41 องศาเซลเซียส ดังแสดงใน Figure 9

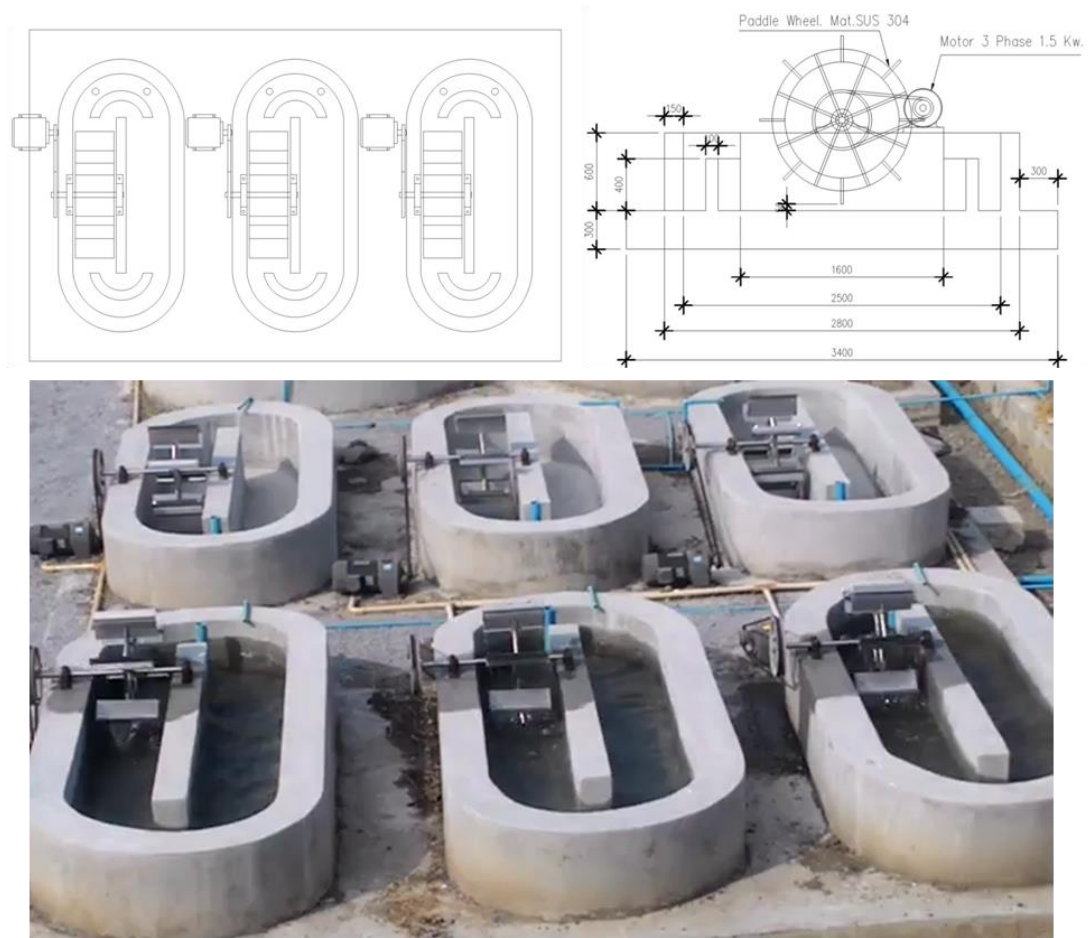


Figure 8 Six Raceway ponds with 1,000 liter, including paddle wheel three phase motors, 1.5 kw.

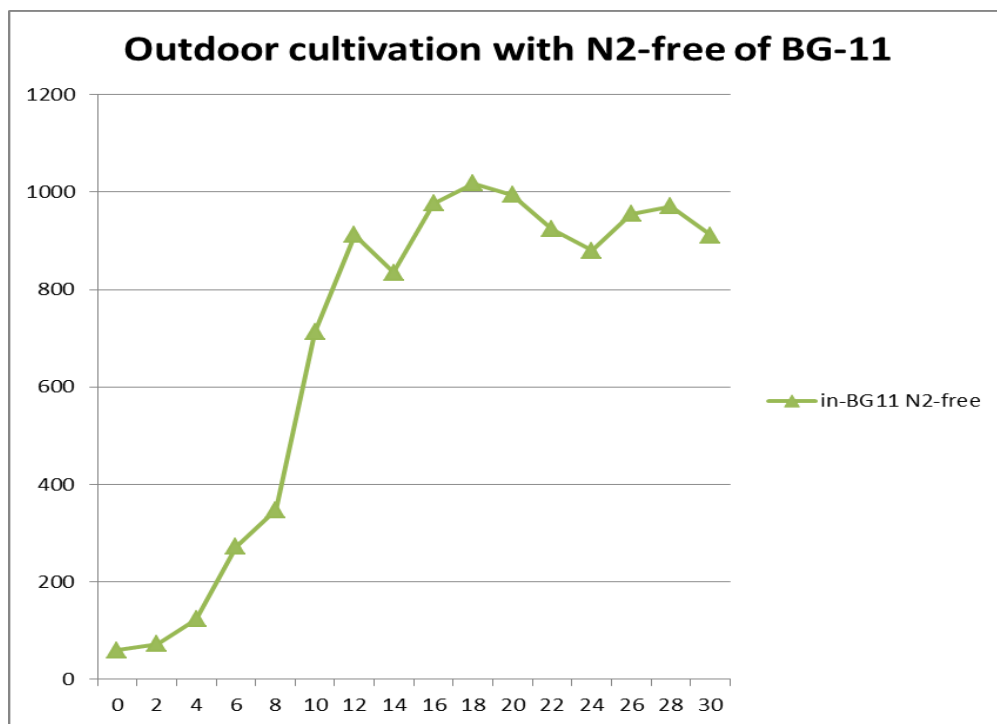


Figure 9 Growth profile of SM6-3 under autotrophic condition and outdoor cultivation

อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดข้างต้นเป็นการเพาะเลี้ยงโดยอ้างอิงจากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งแผนการศึกษากระบวนการเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดในขั้นต่อไปคือจะต้องทำการศึกษาและพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียให้มีความเหมาะสมและประหยัดต้นทุนในการผลิต รวมทั้งปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการกระตุ้นการสะสมโพลีเมอร์ไว้ในเซลล์ที่สูง เพื่อให้สามารถผลิตชีวมวลได้ในปริมาณเพียงพอต่อการนำไปเป็นวัตถุดิบสำหรับการใช้ในการศึกษาการสกัดโพลีเมอร์และการขึ้นรูปในขั้นตอนต่อไปได้

8.5 วิธีการเก็บเกี่ยวชีวมวลของไซยาโนแบคทีเรีย

การทดลองนี้ได้ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้หลักการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชีวมวลและอาหารเพาะเลี้ยงออกจากกันด้วยเครื่องแยกกากเซลล์แบบอัตโนมัติ (High performance self-cleaning Separator) ซึ่งสามารถนำอาหารเพาะเลี้ยงหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ได้ ดังแสดงใน Figure 10 โดยพบว่าสภาวะการทำงานของเครื่องแยกกากที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียโอโซเลท SM6-3 คือ ใช้อัตราในการป้อนน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ 400 ลิตรต่อชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที และเก็บกากชีวมวลอัตโนมัติที่เวลา 50 นาทีต่อครั้ง ทั้งนี้สภาวะการทำงานของเครื่องสามารถปรับสภาวะได้ตามความต้องการขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการนำชีวมวลไปใช้ในลำดับต่อไป รวมทั้งสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ชีวมวลของไซยาโนแบคทีเรียที่ได้จากการเก็บเกี่ยวเมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ ได้แก่ ความชื้น เถ้า ไขมัน โปรตีน และปริมาณเส้นใย พบว่าไซยาโนแบคทีเรียโอโซเลท SM6-3 มีความชื้น (Moisture) 5.79 % เถ้า (Ash) 6.58 % ไขมัน (Lipid) 10.11 % โปรตีน (Protein) 29.97 % ปริมาณเส้นใย (Fiber) 6.55 % และคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) 41.0 % โดยน้ำหนัก ดังแสดงใน Table 1



Figure 10 (left) High performance self-cleaning Separator (right) Biomass of Cyanobacteria isolate SM6-3

นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะของชีวมวลที่ปั่นแยกกากได้จะคล้ายเยลลี่หรือเมือกวันและเมื่อพิจารณาองค์ประกอบจาก Table 1 ที่พบว่าภายในเซลล์มีค่าคาร์โบไฮเดรตสูง ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเพราะภายในเซลล์มีโพลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบหลัก จึงได้ทดสอบลักษณะของเซลล์ด้วยวิธีการย้อมแบบ Negative stain ด้วยสีย้อม Nigrosin โดยนำเซลล์จำนวน 1 loop มาเสมีร์ลงบนหยดสีย้อม Nigrosin บนแผ่นสไลด์และตรวจสอบปริมาณโพลีแซคคาไรด์ที่สะสมในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 100X โดยใช้น้ำมัน (Oil immersion) ทาที่เลนส์วัตถุเพื่อป้องกันเลนส์ชำรุดเสียหาย พบว่าเซลล์มีลักษณะเป็นแคปซูลที่มีวงใสอยู่ล้อมรอบเซลล์เป็นจำนวนมาก ดังแสดงใน Figure 11 ซึ่งลักษณะของโพลีแซคคาไรด์ที่สะสมอยู่รอบนอกของเซลล์ (exopolysaccharides) ดังกล่าวนี มีโครงสร้างคล้ายไกลแคนหรือแซนแทน (G. Morris and S. Harding, 2009) จัดเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีความสำคัญ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางการเกษตร เนื่องจากมีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำได้ดี สามารถเพิ่มความชุ่มชื้นในดินได้ ซึ่งคณะผู้วิจัยจะได้วางแผนการศึกษา ชนิดและคุณสมบัติของโพลีแซคคาไรด์ ความเป็นไปได้ในการนำไปเพาะเลี้ยงขยายขนาด และศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์ในลำดับต่อไป

Table 1 Chemical Characteristics in Cyanobacteria SM6-3 within 18 days of cultivation in BG-11 (N-free medium) under autotrophic condition

Chemical Characteristics	(% gDW)
Moisture	5.79
Ash	6.58
Lipids	10.11
Proteins	29.97
Fibers	6.55
Sugars/Carbohydrates	41.00

gDW: gram Dry Weight

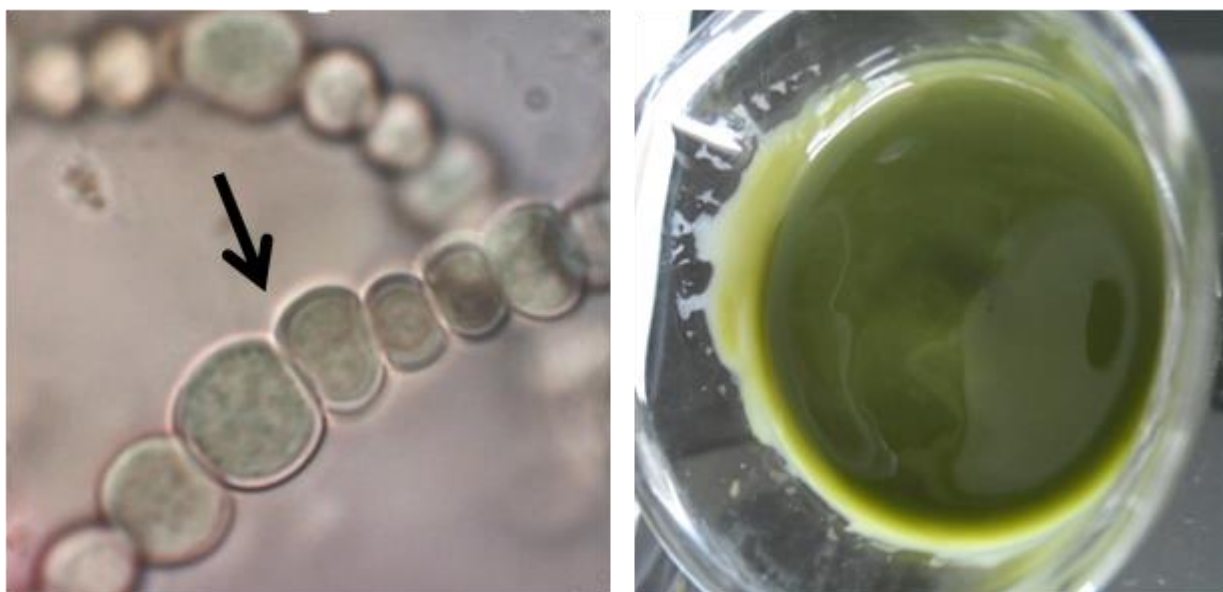


Figure 11 (left) the exocellular or capsular polysaccharide layer of Cyanobacteria isolate SM6-3 (arrow) by negative staining with nigrosin dye (right) the jelly presented in biomass of SM6-3

8.6 การศึกษาปริมาณโพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวไทเรต (PHB) จากเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

เมื่อนำชีวมวลของไซยาโนแบคทีเรียที่ปั่นแยกกากได้มาสกัดโพลีเมอร์ชีวภาพออกจากเซลล์และหาปริมาณโพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวไทเรต (Poly- β -hydroxybutyrate, PHB) โดยการใช้ปฏิกิริยา Acid hydrolysis และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 235 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหาร BG-11 สูตรปกติ มีปริมาณโพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวไทเรต (PHB) เท่ากับ 0.21 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ไม่เติมธาตุไนโตรเจน (N-free medium) มีปริมาณเท่ากับ 0.33 กรัมต่อลิตร นั่นคือเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย ไอโซเลท SM6-3 มีการสะสมปริมาณของโพลีเมอร์ชีวภาพสูงกว่าอาหารสูตรปกติ โดยที่มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันในอาหารทั้งสองสูตร ดังแสดงใน Table 2

Table 2 PHB accumulation in Cyanobacteria SM6-3 within 18 days of cultivation in BG-11 mediums

Medium	Maximum Biomass (g L^{-1}) 1)	PHB content (g L^{-1})	PHB content (% cdw)
BG-11 (Normal)	1.75	0.21	14.00
BG-11 (N $_2$ -free)	1.69	0.33	19.53

8.7 การเตรียมแผ่นฟิล์มเบื้องต้นโดยใช้เซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

ฟิล์มจากชีวมวลของไซยาโนแบคทีเรีย SM6-3 มีลักษณะแข็งเปราะและฉีกขาดง่าย ไม่สามารถแกะออกจากแผ่นเพลทที่ใช้ในการขึ้นรูปได้ ทำให้ไม่สามารถนำไปผลิตเป็นแผ่นฟิล์มโดยตรงได้ โดยจะต้องเติมสารเติมแต่งที่เหมาะสมอื่นๆเข้าไปเพื่อเพิ่มคุณสมบัติของฟิล์มให้มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นมากขึ้น การทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาอัตราส่วนระหว่างเซลล์ชีวมวลของไซยาโนแบคทีเรียกับสารพลาสติกไซเซอร์ ในการทดลองนี้ใช้กลีเซอรอลในอัตราส่วน ร้อยละเท่ากับ 5, 10, 15, 20, 25, 30 เพื่อทดสอบการขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มเบื้องต้น พบว่าเมื่อเติมกลีเซอรอลร้อยละ 20-30 แผ่นฟิล์มจะมีลักษณะเปื่อยยุ่ยและเยิ้มที่ผิว ไม่สามารถดึงออกมาเป็นแผ่นฟิล์มได้ ในขณะที่ร้อยละ 5 และชุดควบคุม ฟิล์มจะแห้งเปราะ ขาดง่ายไม่สามารถดึงเป็นแผ่นฟิล์มได้เช่นกัน มีเพียงกลีเซอรอลที่ร้อยละ 10-15 เท่านั้นที่สามารถดึงแผ่นฟิล์มออกจากเพลทได้ ดังแสดงใน Figure 12 และเมื่อนำแผ่นฟิล์มไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆ เช่น ความหนา ปริมาณน้ำอิสระ ความชื้น และการละลายน้ำ พบว่าชุดทดสอบที่เป็นส่วนผสมกลีเซอรอล 10% มีความหนาของฟิล์ม (thickness) เท่ากับ 0.09 มิลลิเมตร ปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w) 3.39 % ความชื้น (Moisture Content) 20.40% ค่าการละลายน้ำ (Water Solubility) 67.81% ส่วนชุดทดสอบที่มีกลีเซอรอล 15% มีความหนาของฟิล์ม (thickness) เท่ากับ 0.11 มิลลิเมตร ปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w) 2.57 % ความชื้น (Moisture Content) 13.79% ค่าการละลายน้ำ (Water Solubility) 76.83% โดยทั้งสองชุดการทดลองมีค่าความสว่าง (L) เท่ากับ 32.66 และ 30.17 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 3

Table 3 Effect of plasticizer: glycerol concentration for Cyanobacteria SM6-3 films properties

Concentration	Moisture	Thickness	Water activity	Water	Color appearance		
	Content (%)	(mm.)	(a_w , %)	Solubility (%)	L	a*	b*
control	16.50	-	-	-	-	-	-
Glycerol 10%	20.40	0.09	3.39	67.81	31.66	2.73	-0.30
Glycerol 15%	13.79	0.11	2.57	76.83	30.17	1.76	-2.34

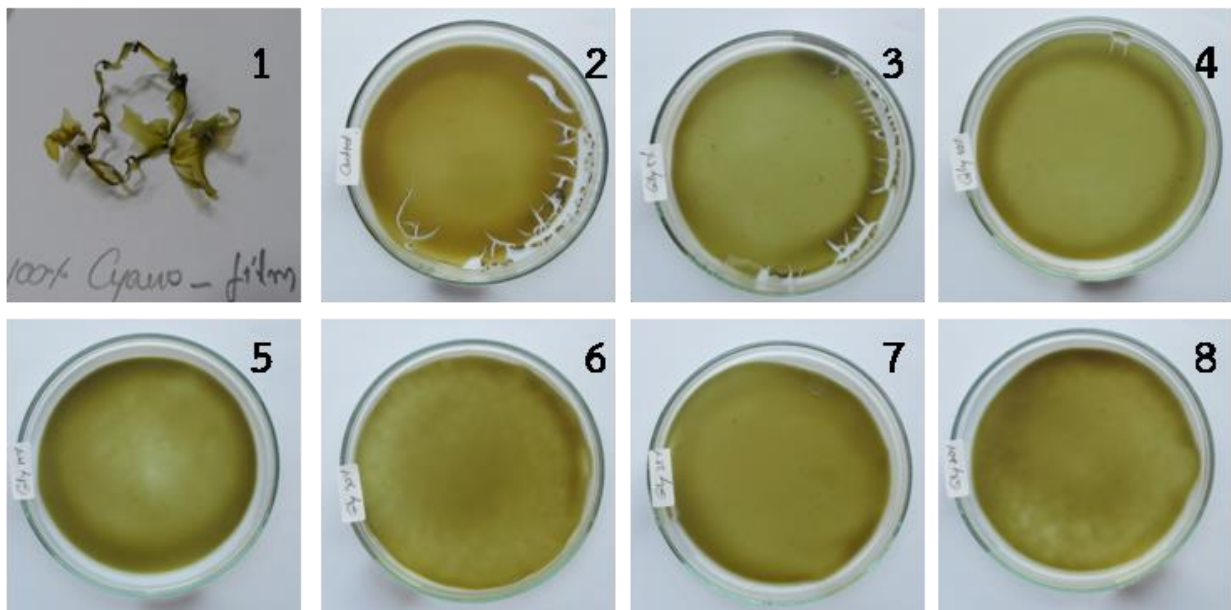


Figure 12 Cyanobacterial film with difference concentrated of glycerol. 2: control, 3: Glycerol 5%, 4: Glycerol 10%, 5: Glycerol 15%, 6: Glycerol 20%, 7: Glycerol 25% and 8: Glycerol 30%

อย่างไรก็ตามลักษณะของแผ่นฟิล์มทุกกรรมวิธีที่ได้ยังไม่มีคุณสมบัติในการยืดหยุ่นมากเท่าที่ควร ทำให้ไม่มีแรงต้านในการดึง ฉีกขาดได้ง่าย จะต้องศึกษาและพัฒนาวิธีการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนผสมของ Plasticizer และ Lubricant ชนิดต่างๆ เพิ่มเติมในลำดับต่อไป ตลอดจนศึกษากระบวนการสกัดและทำบริสุทธิ์ PHB จากชีวมวลของไซยาโนแบคทีเรียไฮโซเลท SM6-3 การขึ้นรูปและการศึกษากระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพต่อไป

9 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

- 9.1 ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นไฮโซเลท SM6-3 ซึ่งคัดแยกได้จากรากคอรัลลอยด์ของปรังมีรูปร่างเป็นกลุ่มเซลล์มาเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย trichome ประกอบด้วย vegetative cell และ heterocyst cell เรียงสลับหรืออยู่ปลายสุดของเส้นสาย trichome จากการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นไซยาโนแบคทีเรียสกุล *Nostoc* sp.
- 9.2 สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือการเพาะเลี้ยงแบบใช้แสงแดด ด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่ไม่เติมธาตุไนโตรเจน (N-free medium) โดยพบว่าอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับ BG-11 สูตรปกติ ซึ่งมีอัตราการเจริญ 9.96×10^6 cells ml⁻¹ เมื่อเพาะเลี้ยง 18 วัน ได้ชีวมวล 1.69 กรัมต่อลิตร
- 9.3 การเพาะเลี้ยงในระบบเปิดในระดับขยายขนาดโดยใช้อาหารสูตร BG-11 ที่ไม่เติมธาตุไนโตรเจน (N-free medium) ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบออโตโทรฟิกในระบบเปิดนอกห้องปฏิบัติการ พบว่า

- มีจำนวนเซลล์สูงที่สุด 1.02×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง 18 วัน ได้ชีวมวล 1.88 กรัมต่อลิตร
- 9.4 การสกัดโพลีเมอร์ชีวภาพออกจากเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียโดยใช้ปฏิกิริยา Acid hydrolysis พบว่า ปริมาณโพลีเบต้าไฮดรอกซีบิวไทเรต (Poly- β -hydroxybutyrate, PHB) เท่ากับ 0.33 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหาร BG-11 สูตรที่ไม่เติมธาตุไนโตรเจน (N-free medium)
- 9.5 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มเบื้องต้นโดยใช้เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียผสมกับกลีเซอรอล 10-15% สามารถผลิตแผ่นฟิล์มที่มีความหนาขนาด 0.11 มิลลิเมตร แต่ยังคงมีความยืดหยุ่นน้อย จะต้องหาสารช่วยสร้างความยืดหยุ่นและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

ข้อเสนอแนะและการนำไปใช้ประโยชน์

โครงการวิจัยนี้สามารถคัดแยกเชื้อไซยาโนแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตโพลีเมอร์ชีวภาพ รวมทั้งได้สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตโพลีเมอร์ชีวภาพที่สามารถนำไปต่อยอดในระดับขยายขนาดต่อไปโดยจะต้องพิจารณาสูตรอาหารที่ประหยัดและเร่งการเจริญเติบโตให้ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงต่อรอบให้ลดลง ตลอดจนต้องศึกษาแนวทางการป้องกันและจัดการการปนเปื้อนของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและเศษไม้ในบ่อเพาะเลี้ยงให้มีประสิทธิภาพ รวมทั้งทดสอบวิธีการขึ้นรูปจากสารสกัดโพลีเมอร์จากเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียแทนการขึ้นรูปทั้งเซลล์ชีวมวล

10 เอกสารอ้างอิง

- ยุวดี พิรพรพิศาล และฉมาภรณ์ นิวาสะบุตร. 2546. คู่มือปฏิบัติการสาหร่ายวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 5. เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ธนาวดี ลีจากภัย (2547) พลาสติกย่อยสลายได้เพื่อสิ่งแวดล้อม ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
- Biodegradable Materials and Natural Fiber Composites in Agriculture and Horticulture, Biodegradable plastics: Market Development in Europe, page7-16, www.ktbl.de
- Burdon, K.L. (1946). Fatty Material in Bacteria and Fungi Revealed by Staining Dried, Fixed Slide Preparations. Journal of Bacteriology, 52(6), 665-678
- Khanna, S. and Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoate. Process Biochemistry 40: 607-619.

- Phylipsen, D.; Kerssemeeckers, M.; Blok, K.; Patel, M.; de Beer, J., Eder, P. (Ed.), Wolf, O. (Ed.) (2002): Clean technologies in the materials sector – Current and future environmental performance of material technologies. European Commission - Institute for Prospective Technological Studies (IPTS), Seville, 2002, EUR 20515EN
- SPMP-CIPAD-IISI-PECHINEY-PARDOS MARKETING ၁၇၇ An analysis of plastics consumption and recovery in Europe 2002&2003, <http://www.plasticseurope.org>
- Steinbüchel A (1991). Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom D (ed) Biomaterials: novel materials from biological sources. Stockton, NewYork, pp. 124-213.
- Su, J.F., Huang, Z., Yuan, X.Y., Wang, X.Y. and Li, M. 2010. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. Carbohydrate Polymers. 79:145-153.
- Techno-economic Feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe EUR22103EN Review of Bioplastics 2005 Meeting, Frankfurt, Germany
- Timm A, Steinbüchel A (1990). Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acid from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3360-3367
- Tongdeesoontorn, W., Mauer, L.J., Wongruong, S., Sriburi, P. and Rachtanapun, P. 2011. Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. Chemistry Central Journal. 5:6. Available: <http://journal.chemistrycentral.com/content/pdf/1752-153X-5-6.pdf>. [1 September 2013]